

ผลของการบริโภคข้าวต่อระดับไตรเมทิลามีนเอ็นออกไซด์ในเลือดและการเกิดโรคหัวใจในหนูโต
วายเรือริง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Effects of Gac fruit supplementation on serum trimethylamine N- oxide and
cardiovascular complications in rats with chronic kidney disease



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

Department of Biochemistry

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการบริโภคผักขาวต่อระดับไตรเมทิลามีนเอ็น ออกไซด์ในเลือดและการเกิดโรคหัวใจในหนูไตวายเรื้อรัง
โดย	น.ส.กานุมาศ เข้มแข็ง
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฐิติณัฐ ดิษยบุตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล ทรัพย์วโรบล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฐิติณัฐ ดิษยบุตร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล ทรัพย์วโรบล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เอกสิทธิ์ โกวิทย์ดำรงค์)

..... กรรมการ
(ดร.ศวรรณี สุธีร์วรพงศ์)

ภาณุมาศ เข้มแข็ง : ผลของการบริโภคผักข้าวต่อระดับไตรเมทิลามีนเอ็นออกไซด์ในเลือดและการเกิดโรคหัวใจในหนูไตวายเรื้อรัง. (Effects of Gac fruit supplementation on serum trimethylamine N-oxide and cardiovascular complications in rats with chronic kidney disease) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.ฐลีนัส ดิษยบุตร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ,รศ. ดร.สุวิมล ทรัพย์วิโรบล

บทนำ: ไตรเมทิลามีน (Trimethylamine) เป็นสารที่สร้างจากแบคทีเรียในลำไส้และเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง Trimethylamine N-oxide (TMAO) ซึ่งทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดโดยเฉพาะในวิธีการทดลอง: หนูแรทเพศผู้สายพันธุ์วิสตาจำนวนกลุ่มละ 9 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มไตเรื้อรัง (chronic kidney disease) กลุ่มสารทดสอบผักข้าว (Gac) กลุ่มสารทดสอบไลโคปินและเบต้าแคโรทีน (STD) กลุ่มสารทดสอบผักข้าวร่วมกับแบคทีเรีย *B. longum* และ *L. salivarius* (Synbiotic) และกลุ่มสารโปรไบโอติกควบคุม *L. Casei* (*Lactobacillus Casei*) โดยหนูกลุ่มทดสอบจะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นไตวายเรื้อรังโดย Cisplatinและทุกกลุ่มได้รับอาหารเสริม choline เป็นระยะเวลา 15 สัปดาห์

ผลการทดลอง: พบว่าหนูกลุ่ม Synbiotic มีระดับ serum TMAO ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CKD รวมถึงยังพบการลดลงของเชื้อในกลุ่ม Proteobacteria ในลำไส้และลดการแสดงออกของเอนไซม์ Trimethylamine-(TMA) lyase ซึ่งจำเป็นต่อการสร้าง TMA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริม Synbiotics ยังกระตุ้นการแสดงออกของ Zonula occludens type 1 (ZO-1) ซึ่งเป็น tight junction gene ที่บริเวณลำไส้ใหญ่ (Colon) อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การให้สารสกัดผักข้าวเพียงอย่างเดียว หรือการให้โปรไบโอติกควบคุมไม่พบความเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CKD

สรุปผล: การเสริม Synbiotic ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดผักข้าว และโปรไบโอติกชนิด *B. longum* และ *L.salivarius* ที่มีประสิทธิภาพในการลดการรั่วที่ผนังลำไส้ ช่วยลดเชื้อ Proteobacteria ในลำไส้หนู CKD ลดการแสดงออกของ TMA lyase enzyme เพิ่มการแสดงออกของ tight junction gene ZO-1 และสามารถลดระดับ serum TMAO ได้อย่างมีนัยสำคัญ หรือ การเสริม Synbiotic ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดผักข้าว และโปรไบโอติกชนิด *B. longum* และ *L. salivarius* สารลดระดับ serum TMAO ในหนูโรคไตเรื้อรังได้อย่างมีนัยสำคัญมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนทางหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังต่อไป

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6370041030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORD:

Panumas Kamkang : Effects of Gac fruit supplementation on serum trimethylamine N-oxide and cardiovascular complications in rats with chronic kidney disease. Advisor: Assoc. Prof. THASINAS DISSAYABUTRA, M.D.,PhD. Co-advisor: NATTHAYA CHUAYPEN, Ph.D.,Assoc. Prof. SUWIMOL SAPWAROBOL, Ph.D.

Background: Trimethylamine (TMA) is a substrate produced by bacteria in the gut and a precursor for trimethylamine N-oxide (TMAO), accounted for a uremic toxin which contributes to cardiovascular disease pathogenesis, especially in patients with chronic kidney disease (CKD). We believed that supplementing with gac fruit extract and/ or probiotics aiming to lessen gut permeability may help reduce circulating level of TMAO in the blood. We conducted an animal study with the supplementation of gac fruit extract, and probiotics such as *B. longum* and *L. salivarius* on CKD rats to evaluate the anti-TMAO effect. Methods: Male Wistar rats (n=9 in each group), divided into 6 groups, including a Control, Chronic Kidney Disease (CKD), Gac fruit extract group (Gac), Standard lycopene and beta carotene group (STD), Gac fruit combine with *B. longum* and *L. salivarius* and *L. Casei* groups. All groups will be induced with chronic kidney disease using cisplatin. All groups had received choline supplementation for a period of 15 weeks. Results: It was found that the rats in Synbiotic group had a significantly decreased serum level of TMAO ($P<0.05$) compared to the CKD group. Additionally, a reduction in the abundance of Proteobacteria in the gut microbiome and a decrease in the expression of the enzyme TMA lyase, which is an essential enzyme for TMA production, were statistically significant ($P<0.05$). Furthermore, it was observed that the supplementation of Synbiotics also stimulated the expression of Zonula occludens type 1 (ZO-1), a tight junction gene in the colon, which was statistically significant. Besides, when comparing the effects of gac fruit extract alone or the administration of the control probiotic, no significant changes were observed compared to the CKD group. Conclusions: Supplementing with Synbiotic, which consists of gac fruit extract combine with probiotics *B. longum* and *L. salivarius* has been found to effectively reduce gut permeability, reduce the expression of TMA lyase enzyme, increase the expression of the tight junction gene ZO-1, and significantly lower serum TMAO level in rats with CKD.

Field of Study: Medical Biochemistry

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ดร.นายแพทย์ฐิติณัฐ ดิษยบุตร อาจารย์ที่ปรึกษา
ภาควิชาชีวเคมีคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะ
ตลอดการทำวิจัย และตลอดการทำเล่มวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ดร.ณัฐชยาน์ ช่วยเพ็ญ
ภาควิชาชีวเคมีคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษา
ตลอดการทำวิจัย พร้อมทั้งกรุณาให้ข้อมูลอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์
ดร. สุวิมล ทรัพย์วโรบล คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้คำปรึกษา และแก้ไข
ข้อบกพร่องเล่มวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์นายแพทย์มานะ ทวีวิศิษฐ์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้กรุณาช่วยเหลือทางด้านการอ่านไสลดทางพยาธิวิทยา
และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และ บุคลากรหน่วยวิจัย Metabolic disease in gastrointestinal and
urinary system research unit และ Center of excellence in hepatitis and liver cancer ที่ให้
ความช่วยเหลือแก่ผู้ทำวิจัยตลอดมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ภานุมาศ เข้มแข็ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)	2
วัตถุประสงค์หลัก.....	2
วัตถุประสงค์รอง.....	2
สมมติฐาน (Hypothesis)	2
คำสำคัญ (Key words)	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits and applications).....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
ฟักข้าว	5
ไตรเมทิลามีน ไตรเมทิลามีนเอ็น-ออกไซด์และแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง	6
คุณสมบัติทางเคมีของ TMAO	6
ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียในลำไส้และผลิตไตรเมทิลามีน	7

การกำจัด TMAO.....	9
TMAO กับโรคหลอดเลือดหัวใจและกล้ามเนื้อหัวใจโต.....	10
ไลโคปีนและสุขภาพหัวใจและหลอดเลือด.....	12
เบต้าแคโรทีน (beta-carotene).....	13
ความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Gut dysbiosis).....	14
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology).....	15
รูปแบบการวิจัย	15
สัตว์ทดลอง.....	15
การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size calculation).....	15
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	17
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	17
สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการ	17
สารเคมีที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นโรคหัวใจ	17
สารสกัดที่ใช้ในการป้อนสัตว์ทดลอง	17
สารเคมีที่ใช้ในการอวัยวะเก็บสัตว์ทดลองเพื่อในการศึกษาระดับโมเลกุล	17
สารเคมีที่ใช้ในการเก็บเลือดในสัตว์ทดลอง	18
สารเคมีที่ใช้ในการการุณยฆาตสัตว์ทดลอง	18
สารเคมีที่ใช้ในการเก็บอวัยวะของสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาลักษณะเซลล์.....	18
สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA จากอุจจาระ	18
สารเคมีที่ใช้วัดระดับค่า Trimethylamine-N-oxide (TMAO)	18
สารเคมีที่ใช้ในการวัดระดับค่า Brain Natriuretic Peptide (BNP).....	18
สารเคมีที่ใช้วัดระดับไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในเลือด	18
สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA จากเลือด	19
สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA	19

สารเคมีที่ใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน (Gene expression).....	19
สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR	19
วิธีดำเนินการวิจัย	19
วิธีการทดลอง.....	19
การเก็บตัวอย่างเลือด อวัยวะ และอุจจาระ จากหนูทดลอง	20
การเก็บเลือด	20
การเก็บเลือดจากหัวใจ	20
การเก็บอวัยวะ	20
การเก็บอุจจาระ	20
เตรียมสาร PAH@MnO ₂ NPs.....	21
การตรวจวัดระดับ TMAO เทคนิค Colorimetric เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน.....	21
การตรวจวัดระดับ TMAO ในพลาสมา	21
การตรวจวัดระดับสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในเลือดด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer	22
การตรวจวัดระดับ BNP ด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	22
การเตรียมสารทำกราฟมาตรฐาน.....	22
การวัดระดับ Brain Natriuretic Peptide (BNP) ในพลาสมา.....	22
การตรวจหาจุลินทรีย์จากตัวอย่างอุจจาระ.....	23
การวัดคุณภาพ DNA	24
การวัดการแสดงออกของยีน	24
การคำนวณการแสดงออกของยีน	25
การสกัด RNA จากเลือด จากชิ้นเนื้อ	26
ขั้นตอนการทำ Lyse samples และ separate phases	26
9) ขั้นตอนการทำ Isolate RNA.....	26

การสังเคราะห์ cDNA	27
การวัดการแสดงออกของยีน	28
กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ	30
การรวบรวมข้อมูล	35
การวิเคราะห์ข้อมูล	35
บทที่ 4 ผลการทดลอง	36
1. สารสกัดผักขาว (Gac fruit extract).....	36
2. ผลน้ำหนักรัตว์ทดลอง.....	37
3. ผลการศึกษาระดับค่าครีอะตินิน (Cr).....	38
4. ผลการศึกษาระดับค่าไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในเลือดตรวจวัดด้วยเทคนิค UV-visible ...	39
5. ผลการศึกษาระดับค่าไตรเมทิลามีน เอ็น-ออกไซด์ (Trimethylamine N-oxide TMAO) ...	40
6. ผลการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ TMA Lyase	42
7. ผลการศึกษาสัดส่วนของน้ำหนักรัตว์ต่อน้ำหนักรัตว์	42
8. ผลขนาดเซลล์ cardiac myocyte ด้วยการย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin.....	43
9. ผล TMAO ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด vascular calcification.....	44
10. ผลพยาธิสภาพลำไส้ของสัตว์ทดลอง	47
11. ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (reads) ของยีน 16S rRNA.....	48
12. ผลความหลากหลายของแบคทีเรีย Shannon-Wiener (alpha-diversity).....	49
13. จำนวนชนิดของแบคทีเรียแต่ละชนิด (observed OUT; richness)	50
14. ผลความสม่ำเสมอของชนิดแบคทีเรียแต่ละชนิด (Pielou's evenness; evenness)	52
15. ผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลอง (β -diversity).....	54
16. ผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลอง (β -diversity) ระหว่างก่อนการ ได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15	55
17. ผลเปรียบเทียบร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัม	62

18. การเปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียระหว่างกลุ่มในระดับโพลัม	62
19. ผลเปรียบเทียบร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุล	63
20. ผลความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีเอตินินและปริมาณร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุล (relative abundance)	65
21. ผลความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และค่าร้อยละในระดับสกุลของหนูกุ่ม Symbiotic (relative abundance)	65
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล	67
บรรณานุกรม	96
ประวัติผู้เขียน	103



สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1 แสดงแบคทีเรียที่ผลิต TMA จากสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน.....	8
Table 2 แสดงไพรเมอร์ของ TMA lyase และ 16S.....	24
Table 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา qPCR.....	25
Table 4 แสดงไพรเมอร์ของ NF-kB และ GAPDH.....	28
Table 5 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา qPCR.....	29
Table 6 แสดงขั้นตอนของการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Hematoxylin & Eosin.....	31
Table 7 แสดงขั้นตอนของการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Von Kossa.....	32
Table 8 แสดงขั้นตอนของการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Masson Trichrome.....	33
Table 9 แสดงคะแนนการย้อมติดสีของ ZO-1.....	35
Table 10 แสดงผลการประเมินการย้อมติด ZO-1 content ที่ลำไส้ส่วน colon ของสัตว์ทดลอง	47
Table 11 แสดงผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลอง (Bray-Curtis).....	56
Table 12 แสดงผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลองระหว่างก่อนการได้รับ สารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 (Bray-Curtis).....	57
Table 13 แสดงผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลอง (Jaccard).....	59
Table 14 แสดงผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลองระหว่างก่อนการได้รับ สารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 (Jaccard).....	60
Table 15 แสดงผลร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียที่ลดลงระดับไฟลัมในแต่ละกลุ่ม ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15.....	62
Table 16 แสดงผลร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นระดับไฟลัมในแต่ละกลุ่ม ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15.....	62
Table 17 แสดงผลเปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียในไฟลัมที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ กลุ่มสารทดสอบ.....	63

Table 18 แสดงผลร้อยละของแบคทีเรียในไฟลัมที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CKD ระหว่างกลุ่ม CKD และกลุ่มสารทดสอบ 63

Table 19 แสดงผลร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียที่ลดลงระดับสกุลในแต่ละกลุ่มในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15..... 64

Table 20 แสดงผลร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นระดับสกุลในแต่ละกลุ่มในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15..... 64

Table 21 แสดงผลร้อยละ ของแบคทีเรียในสกุลที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และกลุ่มสารทดสอบ 65

Table 22 แสดงผลร้อยละของแบคทีเรียในสกุลที่เพิ่มเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และกลุ่มสารทดสอบ 65

Table 23แสดงสัดส่วนร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัม 75

Table 24 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกันกลุ่ม CKD เปรียบเทียบกับ Control..... 77

Table 25 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกัน CKD เปรียบเทียบกับ Gac..... 77

Table 26 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกัน CKD เปรียบเทียบกับ STD 78

Table 27 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกัน CKD เปรียบเทียบกับ Synbiotic..... 78

Table 28 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกัน CKD เปรียบเทียบกับ L.Casei..... 79

Table 29 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและค่าร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัม (relative abundance)..... 79

Table 30 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม Control (relative abundance)..... 80

Table 31 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม Gac (relative abundance)..... 80

Table 32 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม STD (relative abundance)	80
Table 33 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละ ของแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม Synbiotic (relative abundance).....	80
Table 34 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม L.Casei (relative abundance).....	80
Table 35 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับไฟลัม (relative abundance).....	81
Table 36 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม Control ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15.....	81
Table 37 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม CKD ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15.....	82
Table 38 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม Gac ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15	83
Table 39 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม STD ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15	84
Table 40 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม Synbiotic ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15.....	85
Table 41 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม L.Casei ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15.....	86
Table 42 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ Control ในระดับสกุล.....	87
Table 43 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ Gac ในระดับสกุล.....	88
Table 44 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ STD ในระดับสกุล.....	89

Table 45 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ Synbiotic ในระดับสกุล	90
Table 46 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ L.Casei ในระดับสกุล	91
Table 47 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและส่วนร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุล (relative abundance).....	92
Table 48 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม Control (relative abundance).....	92
Table 49 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม Gac (relative abundance).....	92
Table 50 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม STD (relative abundance).....	93
Table 51 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม Synbiotic (relative abundance).....	93
Table 52 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม L.Casei (relative abundance).....	93
Table 53 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับสกุล (relative abundance).....	93
Table 54 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละ ในระดับสกุลของหนูกลุ่ม Synbiotic ในสัปดาห์ที่ 0 (relative abundance).....	94
Table 55 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละ ในระดับสกุลของหนูกลุ่ม Synbiotic ในสัปดาห์ที่ 15 (relative abundance).....	94
Table 56 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละ ในระดับสกุลของหนูกลุ่ม Control (relative abundance).....	94
Table 57 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละ ในระดับสกุลของหนูกลุ่ม Gac (relative abundance).....	94

Table 58 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับสกุลของหนูกลุ่ม STD (relative abundance)..... 95

Table 59 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับสกุลของหนูกลุ่ม Synbiotic (relative abundance)..... 95

Table 60 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับสกุลของหนูกลุ่ม L.Casei (relative abundance)..... 95



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
Figure 1 แสดงกรอบแนวความคิดงานวิจัย.....	3
Figure 2 แสดงลักษณะกายวิภาคของผลพริกขี้หนู (a) ผลอ่อน และ (b) ผลสุกปานกลาง.....	5
Figure 3 แสดงตัวอย่างอาหารที่ใช้นิยมใช้พริกขี้หนูมาเป็นส่วนประกอบ	6
Figure 4 แสดงสูตรโครงสร้างของ TMA TMAO และกระบวนการสร้าง TMAO (14).....	7
Figure 5 แสดงกระบวนการสร้างของไตรเมทิลามีน (TMA) จากสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน (18).....	8
Figure 6 แสดงกลไกของ TMAO ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบของเยื่อผนังหลอดเลือด (19).....	11
Figure 7 แสดงกลไกหลักของการปกป้องผนังหลอดเลือดด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตามธรรมชาติ (34).....	13
Figure 8 แสดงการคำนวณขนาดตัวอย่างด้วยโปรแกรม n4Studies.....	16
Figure 9 น้ำหนักตัวของหนูทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง.....	38
Figure 10 ระดับค่าครีอะตินิน ของหนูทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง	39
Figure 11 แสดงระดับค่าไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในเลือด	40
Figure 12 A-F แสดงระดับค่า TMAO (Trimethylamine N-oxide -TMAO).....	41
Figure 13 แสดงผลการแสดงออกของเอนไซม์ TMA Lyase	42
Figure 14 (A -B) แสดงน้ำหนักและสัดส่วนของน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัว.....	43
Figure 15 (A-F) แสดงขนาดเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin.....	44
Figure 16 (A-F) แสดงผลหลอดเลือดบริเวณส่วนโค้งเอออร์ติก (Aortic arch).....	45
Figure 17 (A-F) แสดงผลหลอดเลือดบริเวณเอออร์ตาส่วนท้อง (Abdominal aorta)	46
Figure 18 แสดงผลพยาธิสภาพลำไส้ส่วน colon ที่ย้อม ZO-1 ของสัตว์ทดลอง.....	48
Figure 19 แสดงความลึกของนิวคลีโอไทด์สายสั้น (sequencing depth).....	48
Figure 20 (A-G) แสดง Shannon – Wiener index.....	50
Figure 21(A-G) แสดงชนิดของแบคทีเรียแต่ละชนิด (observed OUT; richness).....	51

Figure 22 (A-G) แสดงความสม่ำเสมอของแบคทีเรียแต่ละชนิด (evenness)	53
Figure 23 แสดงผล Bray-Curtis.....	54
Figure 24 แสดงผล Jaccard	55
Figure 25 แสดงผล Bray-Curtis ของชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15	56
Figure 26 แสดงผล Jaccard ของชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15	59
Figure 27 สรุปผลการวิจัย	72



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันอุบัติการณ์ของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก รวมทั้งยังเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตทั่วโลก ตัวอย่างของโรคหัวใจและหลอดเลือด ประกอบด้วย ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Myocardial infarction) หลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) หัวใจโต (cardiac hypertrophy) และภาวะหัวใจวาย (Heart failure) เป็นต้น (1) ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาและทำความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิสรีรวิทยาที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจมากขึ้น และผลงานวิจัยพบความเชื่อมโยงระหว่างจุลินทรีย์ในลำไส้และระดับค่าไตรเมทิลามีนเอ็นออกไซด์ (Trimethylamine N-oxide, TMAO) ในพลาสมาต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและโรคไตเรื้อรัง (2, 3)

TMAO เป็นสารในกลุ่มเอมีนออกไซด์ ซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยอาศัยจุลินทรีย์ในลำไส้ระหว่างการเผาผลาญสารอาหารที่มีส่วนประกอบของคาร์นิทีน (carnitine) โคลีน (choline) และบีเทน (betaine) เป็นต้น ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไตรเมทิลามีน (TMA) ที่ลำไส้ ต่อมาถูกออกซิไดซ์ที่ตับโดยเอนไซม์ Flavin-containing monooxygenase 3 ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น TMAO (4) ซึ่งส่งผลต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคหัวใจและหลอดเลือด ปัจจุบันมีการพัฒนายาเพื่อยับยั้งการสร้าง TMAO ซึ่งเป็นกลุ่มโคลีนอนาล็อก ได้แก่ iodomethylcholine (IMC) 3,3-dimethyl-1-butanol (DMB) fluoromethylcholine (FMC) และ betaine aldehyde เนื่องจากยาในกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการทำงานของ choline-TMA lyase: (CutC) ทำให้จุลินทรีย์ในลำไส้ไม่สามารถผลิตสาร TMA ได้ (5) ยิ่งไปกว่านั้นปัจจุบันเริ่มมีการใช้สารสกัดที่ได้จากผักและผลไม้ในการช่วยลด TMAO และลดภาวะแทรกซ้อนของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาสารสกัดเรสเวอราทรอลที่สามารถเพิ่มจำนวนแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) และเพิ่มจำนวนไบฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacterium*) (6) ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่ดีต่อโฮสต์เซลล์ เนื่องจากสามารถช่วยผลิตสารยับยั้ง ป้องกันการยึดเกาะของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ช่วยทำลายสารพิษและการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (7) เป็นต้น และยังสามารถเพิ่มการผลิตไฮโดรเลสย่อยเกลือน้ำดีไปทำปฏิกิริยาการแตกตัว (deconjugation) ระหว่างคอเลสเตอรอลและเกลือน้ำดี ส่งผลให้คอเลสเตอรอลถูกขับออกทางอุจจาระมากขึ้น(6) หรือการศึกษาสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ไตรโกเนลไลน์ (trigonelline) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นต้น

แคโรทีนอยด์เป็นสารที่พบได้มากในผักและผลไม้ที่มีสีแดง ส้ม และสีเหลือง เช่น พริกขี้หนู มะเขือเทศ แครอท และฟักทอง โดยแคโรทีนอยด์ที่มักตรวจพบได้ทั้งในเลือดและเนื้อเยื่อ ได้แก่ ไล

โคป็น เบต้าแคโรทีน ลูทีน เบต้า-คริปโตแซนทิน และ ซีแซนทิน เป็นต้น (8) แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงสารไลโคปีน และเบต้าแคโรทีนที่พบความสัมพันธ์ต่อการช่วยลดเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (9) จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าระดับไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในซีรัมอาจสามารถนำมาใช้บ่งชี้ความเสี่ยงของเกิดภาวะหลอดเลือดหัวใจ (10, 11)

ไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนเป็นสารที่นิยมพบได้มากในผลของฟักข้าว (Gac fruit) เนื่องจากมีปริมาณไลโคปีนมากถึง 38,000 ไมโครกรัม/100 กรัม และมีเบต้าแคโรทีนมากถึง 10,100 ไมโครกรัม/100 กรัม เมื่อเทียบกับมะเขือเทศซึ่งพบไลโคปีนเพียง 700 ไมโครกรัม/100 กรัม (12) แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนต่อระดับ TMAO ที่ส่งผลต่อการลดภาวะแทรกซ้อนของโรคหัวใจและหลอดเลือด ดังนั้นงานวิจัยนี้สนใจศึกษาผลของการเสริมฟักข้าวและการบริโภคแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* และแบคทีเรีย *Bifidobacterium longum* ในหนูไตวายเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงระดับไตรเมทิลามีนเอ็นออกไซด์ในเลือดและตัวชี้วัดโรคหัวใจและหลอดเลือด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

วัตถุประสงค์หลัก

1. เพื่อศึกษาผลของการบริโภคฟักข้าวและโพรไบโอติกต่อระดับไตรเมทิลามีนเอ็นออกไซด์ในเลือดในหนูไตวายเรื้อรัง
2. เพื่อศึกษาผลของการบริโภคฟักข้าวและโพรไบโอติกต่อการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในหนูไตวายระยะสุดท้าย

วัตถุประสงค์รอง

3. เพื่อศึกษาผลของการบริโภคฟักข้าวและโพรไบโอติกต่อการดำเนินโรคไตในหนูไตวายระยะสุดท้าย
4. เพื่อศึกษาผลของการบริโภคฟักข้าวและโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ในหนูไตวายระยะสุดท้าย

สมมติฐาน (Hypothesis)

1. การบริโภคฟักข้าวและโพรไบโอติกช่วยลดระดับไตรเมทิลามีนเอ็นออกไซด์ในเลือดหนูไตวายระยะสุดท้าย
2. การบริโภคฟักข้าวและโพรไบโอติกสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงเปลี่ยนแปลงการดำเนินโรคไตในหนูไตวายระยะสุดท้าย
3. การบริโภคฟักข้าวและโพรไบโอติกส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ในหนูไตวายระยะสุดท้าย

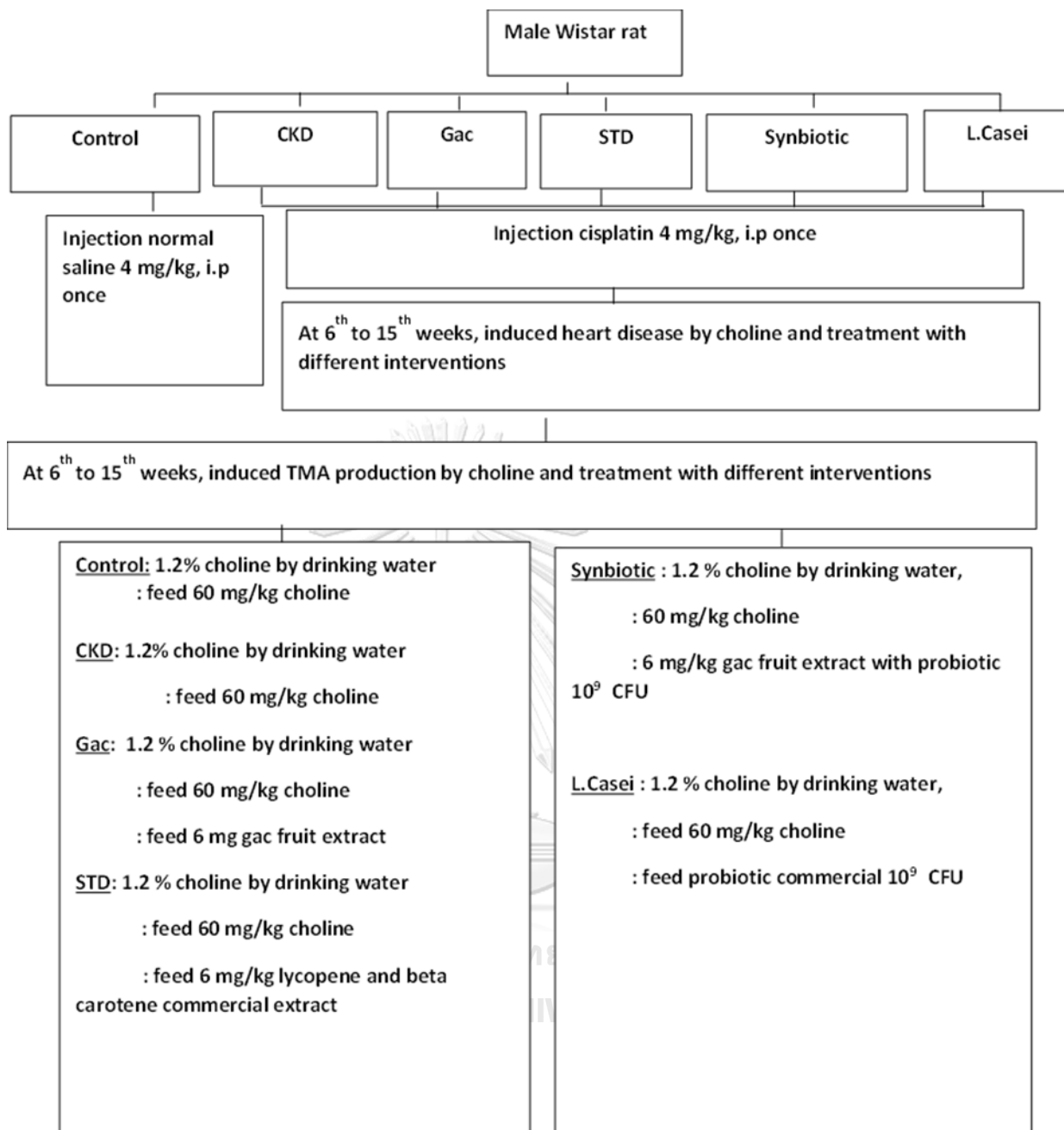


Figure 1 แสดงกรอบแนวความคิดงานวิจัย

คำสำคัญ (Key words)

ไตรเมทิลามีนเอ็นออกไซด์, โรคหัวใจและหลอดเลือด, ฟักข้าว, โพรไบโอติก, โรคไตวายเรื้อรัง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits and applications)

ทราบถึงประโยชน์ของการบริโภคฟักข้าวและโพรไบโอติกในการช่วยชะลอหรือบรรเทาการดำเนินโรคไต โรคหัวใจ และลดความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษากลไกในการป้องกันโรคและเป็นแนวทางในการแนะนำเกี่ยวกับพฤติกรรมกรรมการบริโภคอาหารของผู้ป่วยโรคไตและโรคหัวใจ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฟักข้าว

ฟักข้าว (*Momordica Cochinchinensis* Sprung) เป็นพืชในวงศ์ Cucurbitaceae เดิมทีได้ตีในที่มีภูมิอากาศร้อน เช่น ประเทศไทย เวียดนาม และอินเดีย เป็นต้น (11) ปัจจุบันฟักข้าวจัดเป็นพืชทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เนื่องจากสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้มากมายเพื่อออกจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ ยกตัวอย่างเช่น สบู่ แชมพู แยม น้ำดื่มสมุนไพร และแคปซูลฟักข้าว เป็นต้น ลักษณะกายวิภาคของฟักข้าว ประกอบไปด้วย เมล็ด (seed) เนื้อ (pulp) เยื่อหุ้มเมล็ด (aril) และเปลือก (peel) โดยส่วนเนื้อคิดเป็น 49-75 % ของน้ำหนักทั้งหมด เยื่อหุ้มเมล็ดคิดเป็น 6-31 % และเปลือกคิดเป็น 17% ของน้ำหนักทั้งหมด (12) นอกจากนี้ลักษณะทางกายภาพอื่น ๆ ของฟักข้าว ได้แก่ ลักษณะดอกมีสีขาว ความยาวประมาณ 5-10 ซม ลำต้นมีลักษณะเป็นเถาวัลย์ และผลจะมีลักษณะเป็นรูปรีหรือรูปไข่ และมีหนามสั้นปกคลุมบริเวณผล เนื้อด้านในและเยื่อหุ้มเมล็ดเมื่อผลสุกเต็มที่จะเป็น สีส้มจนถึงแดง (13) ในประเทศไทยนิยมนำฟักข้าวมาประกอบอาหารต่างๆ มากมาย เช่น ผัดยอดอ่อนฟักข้าว ต้มจืดฟักข้าว แกงส้มฟักข้าว เป็นต้น

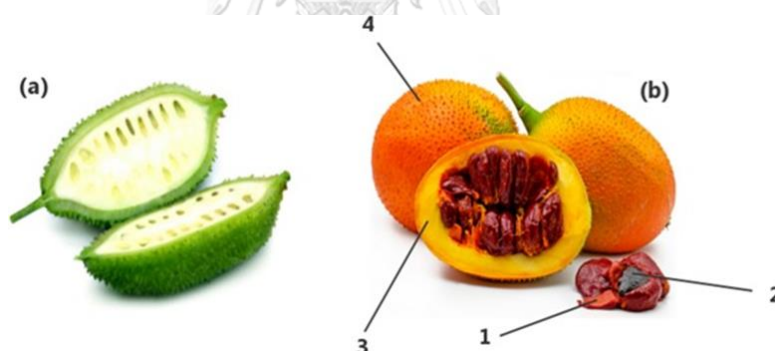


Figure 2 แสดงลักษณะกายวิภาคของผลฟักข้าว (a) ผลอ่อน และ (b) ผลสุกปานกลาง

สารสำคัญในฟักข้าว ประกอบด้วย แคโรทีนอยด์ (carotenoids) วิตามินอี (alpha-tocopherol) โอเมก้า 3 (omega-3) กรดไขมัน (fatty acids) สารประกอบพอลิฟีนอล (polyphenol compounds) และสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid compounds) ซึ่งสารเหล่านี้มีประโยชน์ต่อสุขภาพอย่างมากสำหรับร่างกายมนุษย์ ยกตัวอย่างเช่น ต่อต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ การป้องกันมะเร็ง การบำรุงสายตา การพัฒนาและการสืบพันธุ์ของตัวอ่อน ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน และบำรุงระบบประสาท (14-16) แต่อย่างไรก็ตามสารไลโคปีน และเบต้าแคโรทีน เป็นสารที่พบได้มากที่สุดในการฟักข้าว (17) โดยบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดจะพบสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนมากกว่าผักผลไม้ชนิดอื่น ๆ เช่น แครอท หรือ มะเขือเทศ (11, 18) ฟักข้าวยังอุดมไปด้วย

คุณค่าทางโภชนาการ ประกอบด้วย โยอาหาร (3.54 กรัม/100 กรัมผลสด) โปรตีน (0.62 กรัม/100 กรัมผลสด) ไขมัน (0.37 กรัม/100 กรัม) คาร์โบไฮเดรต (7.85 กรัม/100 กรัมผลสด) พลังงาน (37 กิโลแคลอรี/100 กรัมผลสด) โพแทสเซียม (487.40 มิลลิกรัม/100 กรัมผลสด) ฟอสฟอรัส (100.78 มิลลิกรัม/100 กรัมผลสด) วิตามินซี (3.79 มิลลิกรัม/100 กรัมผลสด) และ วิตามินอี (3.15 มิลลิกรัม/100 กรัมผลสด) (10)



Figure 3 แสดงตัวอย่างอาหารที่ใช้นิยมใช้ผักเข้ามาเป็นส่วนประกอบ

ไตรเมทิลามีน ไตรเมทิลามีนเอ็น-ออกไซด์และแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง

คุณสมบัติทางเคมีของ TMAO

ไตรเมทิลามีน เอ็น-ออกไซด์ (Trimethylamine N-Oxide, TMAO) เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของเอมีนออกไซด์มีสูตรโมเลกุลเป็น $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ และน้ำหนักมวลโมเลกุลอยู่ที่ 75.1 ดาลตัน เป็นของแข็งไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ละลายได้ในน้ำและมักจะอยู่ในรูปของไดไฮเดรต (dihydrate) (13) ในทางเคมี TMAO ถูกสร้างขึ้นจากการเกิดออกซิเดชันของไตรเมทิลามีนในลำไส้ (Trimethylamine, TMA) โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ ภายหลังจากถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ flavin-containing monooxygenases 3 (FMO3) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ TMAO (4) ดังแสดงในภาพที่ 3

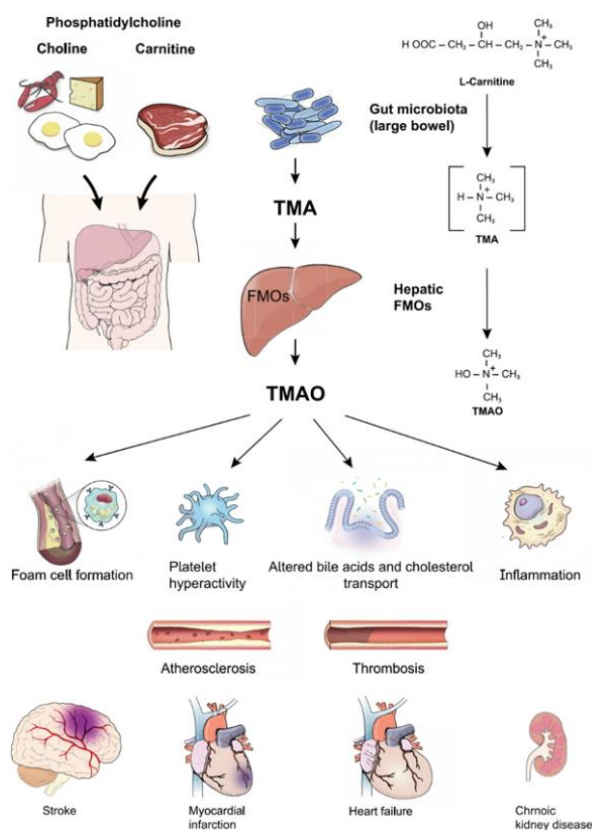


Figure 4 แสดงสูตรโครงสร้างของ TMA TMAO และกระบวนการสร้าง TMAO (14)

ความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียในลำไส้และผลิตภัณฑ์เมทิลามีน

TMA สร้างจากองค์ประกอบของอาหารจำพวกไข่แดง ตับ นม เนื้อสัตว์ (เนื้อแดง สัตว์ปีก) และปลาซึ่งมีส่วนประกอบของสารฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidylcholine) โคลีน (choline) คาร์นิทีน (carnitine) เบทาอีน (betaine) และเออโกไธโอนีน (ergothioneine) สารเหล่านี้จะถูกแปลงเป็น TMA โดยอาศัยจุลินทรีย์ในลำไส้ผ่านวิถีเมแทบอลิซึม (21) โคลีนจะถูกจุลินทรีย์เปลี่ยนให้เป็น TMA ผ่านทางกลไก choline-TMA lyase (CutC) โดย CutC จะทำการตัดแยกพันธะคาร์บอนและไนโตรเจนให้ สร้างรูปใหม่เป็น TMA และ acetaldehyde (15, 16) ซึ่งแบคทีเรียที่พบว่ามีบทบาทในการช่วยเปลี่ยนโคลีนเป็น TMA ได้แก่ไฟลัม *Actinobacteria*, *Bacteroidota*, *Firmicutes* และ *Proteobacteria* (17) ในขณะที่สารแอล-คาร์นิทีนในอาหารจำพวกพวกเนื้อแดงจะถูกจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงเป็น TMA ผ่านทางกลไก carnitine reductase/oxidase (cntAB) ซึ่ง cntAB จะกระตุ้นการแตกตัวของออกซิเจนและได้เป็น TMA และ malic semialdehyde (18, 19) โดยแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการช่วยเปลี่ยนเป็น TMA คือ ไฟลัม *Proteobacteria* (17) ดังแสดงในภาพที่ 5

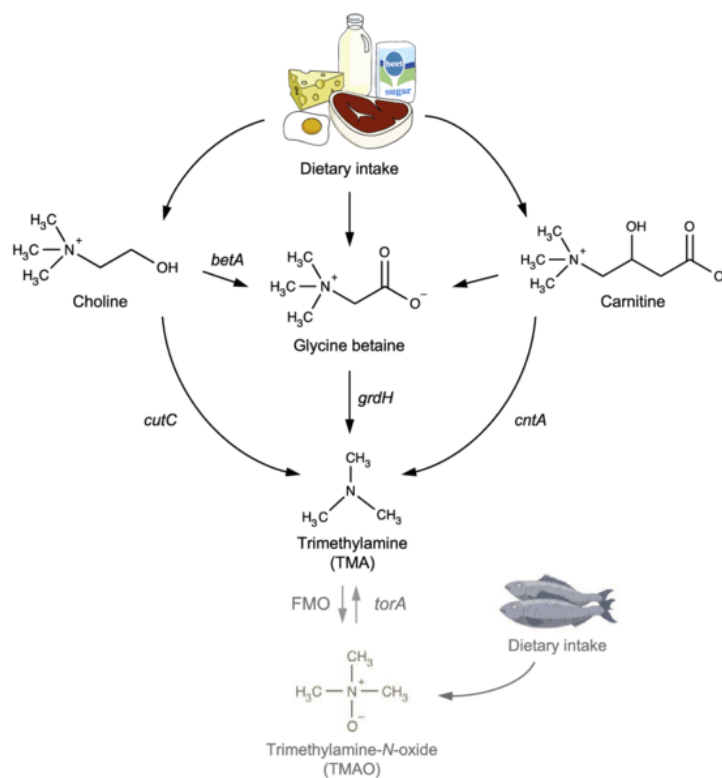


Figure 5 แสดงกระบวนการสร้างของไตรเมทิลามีน (TMA) จากสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน (18)

Table 1 แสดงแบคทีเรียที่ผลิต TMA จากสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน

Phylum	Genus or Species	References
TMA N-oxide		
Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	Robinson et al., 1952, Cruden and Galask, 1988
	<i>Mobiluncus</i>	
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	
	<i>Clostridium</i>	
	<i>Staphylococcus</i>	
	<i>Sarcina</i>	
	<i>Streptococcus</i>	
	<i>Alcaligenes</i>	

Proteobacteria	<i>Campylobacter</i>	Sellars et al., 2002
	<i>Citrobacter</i>	Lin and Hurng, 1989
	<i>Escherichia</i>	Robinson et al., 1952; Ishimoto and Shimokawa, 1978; Cox and Knight, 1981; Takagi et al., 1981; Easter et al., 1982; Lin and Hurng, 1989; Denby et al., 2015
	<i>Proteus</i>	Robinson et al., 1952; Strøm et al., 1979; Stenberg et al., 1982
	<i>Pseudomonas</i>	Robinson et al., 1952; Lee et al., 1977; Easter et al., 1982; Chen et al., 2011
Choline		
Actinobacteria	<i>Mobiluncus</i>	Cruden and Galask, 1988
	<i>Olsenella</i>	Craciun and Balskus, 2012; Martinez-del Campo et al., 2015
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	Cruden and Galask, 1988
Firmicutes	<i>Anaerococcus</i>	Craciun and Balskus, 2012; Romano et al., 2015
	<i>Clostridium</i>	Robinson et al., 1952; Bradbeer, 1965; Fiebig and Gottschalk, 1983; Möller et al., 1986; Craciun and Balskus, 2012; Martinez-del Campo et al., 2015; Romano et al., 2015
	<i>Desulfitobacterium</i>	Craciun and Balskus, 2012

การกำจัด TMAO

TMAO จัดเป็นโมเลกุลขนาดเล็กทำให้ไตสามารถกรองออกทางปัสสาวะได้ง่าย ประมาณ 94.5 % ถูกขับออกทางปัสสาวะ ภายใน 24 ชั่วโมง ทางเหงื่อและอุจจาระ ประมาณ 4% ทางการหายใจ และสารคัดหลั่งอื่น ๆ คิดเป็นเพียงแค่ 1% หรือ น้อยกว่า 1% (4, 20) ระดับค่าเลือดปกติของ TMAO ที่พบในคนสุขภาพดีจะน้อยกว่า 10 ไมโครโมล/ลิตร ($\mu\text{mol/L}$) ในขณะที่ผู้ป่วยที่เป็นโรค

ไตสามารถพบระดับค่า TMAO ในเลือดมากถึง 40 ไมโครโมล/ลิตร ($\mu\text{mol/L}$) เนื่องจากคนไข้โรคไตวายเรื้อรังประสิทธิภาพการกรองของเสียจำพวก uremic toxin จะลดลงส่งผลให้พบระดับ TMAO ในเลือดสูง (21) นอกจากนี้ยังมีรายงานความเข้มข้นของ TMAO ในพลาสมาที่ประมาณ 0.6 ไมโครโมล/ลิตร ($\mu\text{mol/L}$) ในหนูแรท (22, 23) และน้อยกว่า 5 ไมโครโมล/ลิตร ($\mu\text{mol/L}$) หนูไมซ์ (24)

TMAO กับโรคหลอดเลือดหัวใจและกล้ามเนื้อหัวใจโต

ภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (Atherosclerosis, AS) จัดเป็นโรคอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากการอักเสบของเยื่อผนังหลอดเลือด ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา TMAO ถูกระบุว่าเป็นตัวบ่งชี้สำคัญของการเกิดโรค AS โดยใช้แนวทางเมแทโบลิมิกส์ในการศึกษาทางคลินิก เนื่องจาก TMAO เป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการปลดปล่อยสารก่อการอักเสบ (inflammatory cytokine) และเหนี่ยวนำให้พัฒนาไปเป็นภาวะหลอดเลือดแข็งตัวในที่สุด (13)

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่า TMAO เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหลั่งสารการอักเสบมากขึ้น เช่น เพิ่มการหลั่ง tumor necrosis factor-(TNF- α), Interleukin 1 beta (IL-1 β) และ Interleukin 10 (IL-10) (25, 26) ในขณะเดียวกันเมื่อศึกษาในเซลล์บุผนังหลอดเลือดสายสะดือของมนุษย์ (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) พบว่า TMAO สามารถเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ IL-1 β และ IL-18 ได้เช่นกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาและปริมาณของ TMAO และเมื่อศึกษาในเซลล์บุผนังของหลอดเลือดแดง carotid (CAECs) พบว่า TMAO จะไปกระตุ้นบริเวณ nod-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasomes ทำให้เกิดการซึมผ่านของเยื่อผนังหลอดเลือดและกระตุ้นการหลั่งสารการอักเสบ (13, 27)

กลไกการทำงานของ TMAO ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบของเยื่อผนังหลอดเลือดประกอบด้วยสามกระบวนการหลักๆ กระบวนการแรกเริ่มจาก TMAO จะเข้าสู่หลอดเลือดและไปยับยั้งบริเวณ Sirtuin 3 (SIRT3) ในไมโทคอนเดรีย ซึ่งโดยปกติ Sirtuins จัดเป็น NAD⁺ dependent enzyme ทำให้ SIRT3 สามารถจับและสลาย superoxide dismutase 2 (SOD2) ดังนั้นถ้า SIRT3 ถูกยับยั้ง ทำให้การทำงานของ SOD2 ลดลง ส่งผลเสียต่อสถานะสมดุลของ mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) ต่อมาทำให้เกิดเพิ่มขึ้นของ reactive oxygen species (ROS) (13, 28, 29) และเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกตัวของโปรตีน thioredoxin-interactive (TXNIP) จาก thioredoxin (TRX) ส่งผลให้ TXNIP ไปกระตุ้นการแสดงออกของ NLRP3 ASC และ caspase-1 ทำให้เกิดการหลั่งสารอักเสบพวก IL-18 และ IL-1 β (30, 31) กระบวนการที่สองเริ่มจาก TMAO ไปกระตุ้นกลไกการส่งสัญญาณของ NF- κ B ผ่านทาง protein kinase C (PKC) ทำให้ I κ B kinase (I κ B) ถูกย่อยสลายโดย phosphorylation และถูก

trimer ส่งผลให้ไปกระตุ้นการปลดปล่อยสารอักเสบต่างๆ รวมถึงเพิ่มการยึดเกาะของเซลล์โมโนไซต์ที่บริเวณหลอดเลือด (32) และกระบวนการสุดท้าย TMAO ไปยับยั้งกลไกการทำงานของ MAPK/ERK ส่งผลให้ไปลดการแสดงออกของ NF- κ B และลดการตอบสนองต่อการอักเสบ (33) ดังแสดงในภาพที่ 6

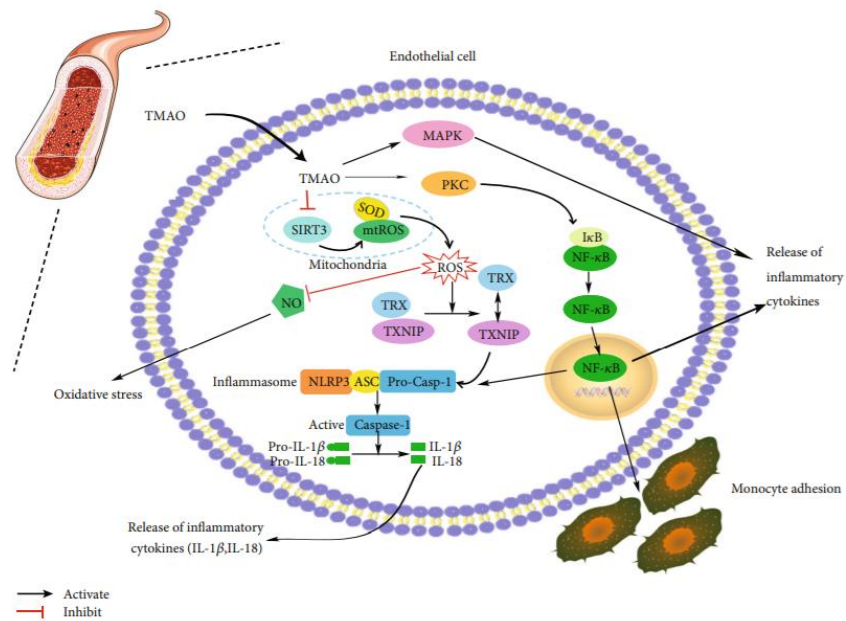


Figure 6 แสดงกลไกของ TMAO ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบของเยื่อผนังหลอดเลือด (19)

ยิ่งไปกว่านั้นปัจจุบันมีหลักฐานงานวิจัยที่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับค่า TMAO ต่อการกระตุ้นให้กล้ามเนื้อหัวใจโตร่วมกับการเกิดพังผืด จากการศึกษาของคุณ Zehua Li และคณะ ในปี 2017 รายงานว่ามีระดับ TMAO ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในพลาสมาในแบบจำลองหนูที่มีภาวะหัวใจโตมากเกินไปจนเกิด transverse aortic constriction (TAC) และยังการเพิ่มขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ การเพิ่มขึ้นของระดับค่า atrial natriuretic peptide (ANP) และ β -myosin heavy chain (β -MHC) ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการบ่งชี้โรคหัวใจ อีกทั้งการศึกษานี้ยังมีการสันนิษฐานว่า TMAO ที่กระตุ้นภาวะหัวใจโตอาจเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ TGF- β 1 / Smad3 เนื่องจากพบการแสดงออกของ Smad3 ด้วยการทำให้ Western blot ในหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหัวใจโต (39) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานกลไกที่แน่ชัดระหว่าง TMAO และ ส่งสัญญาณ TGF- β 1 / Smad3

ไลโคปีนและสุขภาพหัวใจและหลอดเลือด

ไลโคปีนจัดเป็นสารไลโปฟิลิก ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นอะไซคลิกแคโรทีนอยด์ ที่มีสูตรเคมีเป็น $C_{40}H_{56}$ ประกอบด้วยพันธะคู่ที่เรียงตัวเป็นเส้นตรง 13 พันธะ และมี 11 พันธะถูกเชื่อมเข้าด้วยกัน นอกจากนี้โครงสร้างจะมีลักษณะเป็นวง ทำให้สามารถละลายได้ดีในสารกลุ่มอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เฮกเซน เบนซีน เมทิลีน คลอไรด์ และอะซิโตน แต่ทั้งนี้ยังสามารถละลายได้เล็กน้อยในตัวทำละลายเมธานอลหรือเอทานอล (40)

สารไลโคปีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่มีสีแดงในพืช นิยมพบในผักและผลไม้ที่มีสีแดงและส้ม เช่น แดงโม ส้มโอสีชมพู แอปริคอต มะละกอ แครอท ฟักทอง มันเทศ และมะเขือเทศ ทั้งนี้บทบาทที่สำคัญของไลโคปีนมีหลายประการ ได้แก่ ด้านการอักเสบ และควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ รวมไปถึงการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น

ปัจจุบันมีหลักฐานงานวิจัยมากมายสนับสนุนบทบาทของไลโคปีนต่อการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจเช่น พบว่าการลดลงของระดับไลโคปีนในพลาสมาที่สัมพันธ์กับความเครียดที่เพิ่มขึ้นของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ ซึ่งแสดงออกโดยความหนาขึ้นของผนังหลอดเลือดแดง (8) หรือ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าหนูในกลุ่ม high fat diet เมื่อได้รับไลโคปีน ผักโขม และข้าวฟ่างแดง ส่งผลให้ระดับค่า TMAO ลดลง 31.0%, 31.5% และ 19.3% ตามลำดับ (41)

ในปี 2004 งานวิจัยของคุณ Howard D Sesso และคณะพบว่าความเข้มข้นของไลโคปีนในพลาสมาที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับความเครียดที่ลดลงของโรคหลอดเลือดหัวใจในผู้หญิง (42) หรือยังมีการศึกษาที่พบว่าระดับแคโรทีนอยด์ในซีรัมที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับความเครียดที่ลดลงของระดับ NT-pro BNP ในซีรัม สามารถบ่งชี้ถึงบทบาทในการป้องกันภาวะหัวใจทำงานหนัก (43) แต่อย่างไรก็ดีกลไกที่แน่ชัดระหว่าง TMAO และไลโคปีนปัจจุบันยังทราบไม่ชัดเจน

ปัจจุบันจึงมีการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตามธรรมชาติ (natural bioactive compounds) มาใช้ในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ โดยบทบาทที่สำคัญของไลโคปีนสามารถยับยั้งการแสดงออกของ lipopolysaccharide (LPS) - monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6) และ vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ในเซลล์บุผนังหลอดเลือดของมนุษย์ อีกทั้ง ไลโคปีนยังสามารถลดการแสดงออกของโมเลกุลการยึดเกาะระหว่างเซลล์-1 (ICAM-1) ที่เกิดจาก TNF- α และการยึดเกาะของเซลล์บุผนังหลอดเลือดโมโนไซต์ หรือสามารถไปยับยั้งเส้นทางการส่งสัญญาณ NF kB ซึ่งสามารถป้องกันการอักเสบ การสร้างเส้นเลือดใหม่ การแพร่กระจาย เป็นต้น (44) ดังแสดงในภาพที่ 7

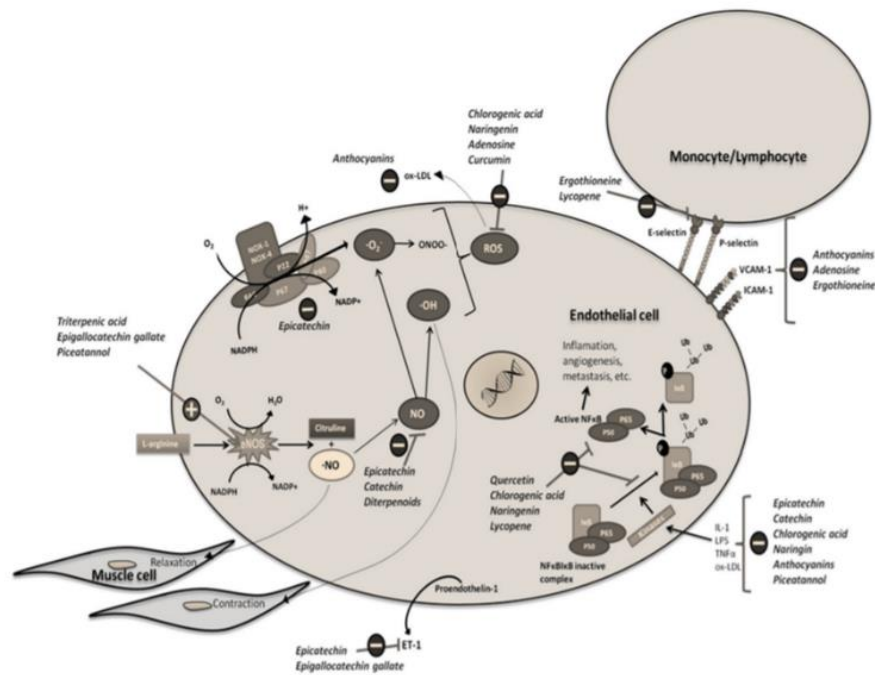


Figure 7 แสดงกลไกหลักของการปกป้องบุผนังหลอดเลือดด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตามธรรมชาติ (34)

เบต้าแคโรทีน (beta-carotene)

เบต้าแคโรทีน จัดเป็นเตตระเทอร์พีนอยด์ (tetra-terpenoid) ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอม ขนาด 536 ดาลตัน สามารถละลายได้ดีในไขมัน นอกจากนี้เบต้าแคโรทีนเป็นแหล่งที่สำคัญที่สุดของวิตามินเอที่ไม่ก่อให้เกิดการแปรรูป เนื่องจากโมเลกุลนี้สามารถแยกออกได้ภายหลังการดูดซึมเพื่อสร้างวิตามินเอ (เรตินอล) (35, 36) นอกจากนี้เบต้าแคโรทีนส่วนใหญ่มักพบอยู่ในรูปแบบทรานส์ แต่หลังจากการแปรรูปอาหารด้วยความร้อนจะกลายเป็นเบต้าแคโรทีนในรูปซิส ซึ่งประกอบไปด้วยหลายไอโซเมอร์ เช่น ไอโซเมอร์ 9-cis, 13-cis และ 15-cis (37) นอกจากนี้กระบวนการย่อยเบต้าแคโรทีนจะเริ่มจากการรับประทานและการบดเคี้ยวอาหารที่มีสารเบต้าแคโรทีน จากนั้นอาหารจะถูกส่งต่อไปยังกระเพาะอาหาร ซึ่งขั้นตอนนี้ผนังเซลล์พีซจะเริ่มถูกทำลาย ทำให้สารเบต้าแคโรทีนถูกปล่อยออกมาเพิ่มขึ้นประมาณ 35% ระหว่างกระบวนการย่อยอาหารที่บริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้ (36)

สารเบต้าแคโรทีน พบในผักและผลไม้ที่มีสีส้ม สีแดง เช่น ฟักทอง แครอท มะเขือเทศ เป็นต้น โดยเบต้าแคโรทีนมีบทบาทที่สำคัญต่อร่างกายมนุษย์ เช่น เบต้าแคโรทีน มีความเกี่ยวข้องกับเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และเนื้อเยื่อ ดังนั้นเบต้าแคโรทีนอาจช่วยให้เกิดการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ ๆ สำหรับใช้ในการป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ เนื่องจากเบต้าแคโรทีนสามารถไปยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α ซึ่งสัมพันธ์กับความเครียดจากไนโตรออกซิเดชันที่ลดลงและการตอบสนองต่อ

การอักเสบในเซลล์บุผนังหลอดเลือด (38) ในปี 2015 งานวิจัยของคุณ Csepanyi และคณะพบว่าหนูที่ได้รับเบต้าแคโรทีนในปริมาณ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมก่อนการทดสอบ ISAVREP (ischemia and reperfusion) สามารถส่งเสริมการทำงานของหัวใจ โดยเพิ่ม cardiac output (CO) และ aortic flow (AF) (35)

ความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Gut dysbiosis)

จุลินทรีย์ในลำไส้จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความซับซ้อนและมีจำนวนประชากรขนาดใหญ่ซึ่งอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร โดยมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของโฮสต์ (host metabolism) เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (immunity) และช่วยการดูดซึมสารอาหาร (nutritional absorption) (39,40) ปัจจุบันมีการศึกษารายงานว่าความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้อาจส่งผลให้เกิดความบกพร่องของผนังลำไส้ และทำให้เกิดรูรั่วและเกิดภาวะ bacterial translocation ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบและเหนี่ยวนำให้เกิดโรคต่างๆตามมาในที่สุด เช่น เบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes) ภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ไตวายเรื้อรัง (chronic kidney diseases) และความดันโลหิตสูง (hypertension) (39-41) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆที่สนับสนุนว่าจุลินทรีย์ในลำไส้มีความเชื่อมโยงกับโรคหลอดเลือดหัวใจ โดยพบการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในสกุล *Escherichia*, *Shigella*, *Desulfovibrio* และ *Streptococcus* และพบการลดลงของแบคทีเรียในสกุล *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Pyramidobacter*, *Prevotellaceae*, *UCG-0 0 1* และ *Prevotella* (49) ในขณะที่การศึกษาความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ต่อการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง พบว่าความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้เกิดการการเพิ่มจำนวนและการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติของเซลล์ลิมโฟไซต์ ส่งผลให้เกิด autoantibodies และสัมพันธ์กับการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง (50) นอกจากนี้จุลินทรีย์ก่อโรคมียังไปกระตุ้น T helper cell และเพิ่ม lipopolysaccharides ทำให้มีกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (42) นอกจากนี้ไฟลัมแบคทีเรียที่โดดเด่นในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteria* และ *Proteobacteria* ซึ่งแบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* จัดเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ตัวอย่างเช่น ช่วยสร้างความสมดุลของผนังลำไส้ไม่ให้เกิดการรั่ว และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพภูมิคุ้มกัน (43) รวมถึงมีการศึกษาที่พบว่า *Lactobacilli* เกี่ยวข้องกับการควบคุมเมแทบอลิซึมของโคเลสเตอรอล การผลิตสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากลำไส้ เช่น ไตรเมทิลลามีน-เอ็น-ออกไซด์ (TMAO) กรดไขมันสายสั้น (SCFAs) ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) และกรดน้ำดี (BA) (44) (45) รวมถึงยังมีงานวิจัยของคุณ Qianqian Wang และคณะในปี 2022 ที่ศึกษาในโมเดลสัตว์ทดลองพบว่าหนูที่ได้รับโคลีนร่วมกับการได้รับ *Bifidobacterium longum* และ *Bifidobacterium breve* พบว่าสามารถลดระดับ TMAO ในเลือด ร่วมกับลดความเข้มข้นของ TMA ในอุจจาระ (46)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology)

รูปแบบการวิจัย

รูปแบบการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (experimental study) ซึ่งผ่านการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ COA No. 005/2565 และ Institutional Biosafety Committee คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ใบอนุญาต MDCU-IBC 006/2022

สัตว์ทดลอง

หนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ (male rat) Wistar จากบริษัทสยามโนมูระ จำกัด น้ำหนัก 280-350 กรัม อายุ 6 สัปดาห์ เลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส และได้รับแสง/ความมืด 12 ชม./12 ชม. เข้าถึงน้ำและอาหารโดยอิสระ เลี้ยงในกรง ๆ ละ 4 ตัว เพ่า ๆ กัน หนูถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 9 ตัว รวม 54 ตัว

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size calculation)

ผู้วิจัยได้คำนวณขนาดตัวอย่างอ้างอิงจากข้อมูลการศึกษาของ JunyiZeng และคณะ (Zeng et al., 2019) ซึ่งศึกษาการเสริมไลโคปีนต่อการช่วยลดภาวะหัวใจโตในหนูทดลอง โดยใช้สูตร Two Independent Means คำนวณด้วยโปรแกรม n4Studies ดังนี้

Testing two independent means

Formula[ref]: (i)

$$n_1 = \frac{(z_{1-\frac{\alpha}{2}} + z_{1-\beta})^2 \left[\sigma_1^2 + \frac{\sigma_2^2}{r} \right]}{\Delta^2}$$

$$r = \frac{n_2}{n_1}, \Delta = \mu_1 - \mu_2$$

Mean in group 1 (μ_1) = 10.27

Mean in group 2 (μ_2) = 6.57





SD. in group 1 (σ_1) = 3.02

SD. in group 2 (σ_2) = 1.30

Ratio (r) = 1

Alpha (α) = 0.01 **0.05**

Beta (β) = 0.1 **0.2**

Sample size
Power of study
2X2 Table
About us

Figure 8 แสดงการคำนวณขนาดตัวอย่างด้วยโปรแกรม n4Studies

เมื่อ n = จำนวนตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

μ = ค่าเฉลี่ยภายในกลุ่ม $\mu_1=10.27$, $\mu_2=6.57$

σ = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานภายในกลุ่ม $\sigma_1=3.02$, $\sigma_2=1.30$

r = สัดส่วนของตัวอย่างระหว่างกลุ่ม $r=1$

α = ค่าความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $\alpha = 0.05$, $Z(0.975) = 1.959964$

β = ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย $\beta = 0.2$, $Z(0.800) = 0.841621$

Sample size: Group1 (n_1) = 7, Group2 (n_2) = 7

ซึ่งจากการคำนวณพบว่าได้ต้องมีตัวอย่างหนุอย่างน้อยกลุ่มละ 7 ตัว แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยประสงค์จะใช้ตัวอย่างหนุอย่างน้อยกลุ่มละ 9 ตัว เนื่องจากหนุมีอัตราการเสียชีวิตจากการได้รับ cisplatin ประมาณ 25% ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่ต้องใช้ทั้งหมดเป็น 54 ตัว

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- 1) Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
- 2) Microcentrifuge tube 0.5, 1.5, 2 uL (Axygen, USA)
- 3) Centrifuge tube 50 mL (NEST, China)
- 4) Vortex (Scientific Industries, USA)
- 5) Feeding tube No. 18 # 1.5” (NLAC, Thailand)
- 6) Centrifuge (Eppendorf, Germany)
- 7) Syringe 1, 5, 20 mL (NIPRO, Japan)
- 8) Hypodermic needle 18, 26 G (NIPRO, Japan)
- 9) Syringe filter 0.2 μm (Whatman, UK)
- 10) Incubator (Mettler, Germany)
- 11) Thermo shaker incubator (MIULAB, China)
- 12) pH meter (MT, USA)
- 13) Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- 14) Microplate reader (BioTek @Instruments, Inc.)

สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการ

1. สารเคมีที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นโรคไตวายเรื้อรัง

- 1) Cisplatin 50 mg/50 ml (UNISTIN, Korea)
- 2) Ortho – Phosphoric acid 85% (Merk, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นโรคหัวใจ

- 1) 90% Choline chloride - $(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{Cl}) \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (Healthy (HangZhou) Husbandry Sci-tech Co., Ltd., China)

สารสกัดที่ใช้ในการป้อนสัตว์ทดลอง

- 1) Lycopene Powder 96% (Xi'an Lanshan Biotechnology Co., Ltd., China)
- 2) Beta Carotene 99% (Shaanxi Undersun Biomedtech Co., Ltd., China)
- 3) Gac Extract Powder (Specialty Natural Products Co., Ltd., Thailand)

สารเคมีที่ใช้ในการอวัยวะเก็บสัตว์ทดลองเพื่อในการศึกษาระดับโมเลกุล

- 1) DNA/RNA shield™ Fecal collection tube (PANGEA, USA)

- 2) DNA/RNA shield™ (Zymo research, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการเก็บเลือดในสัตว์ทดลอง

- 1) 25,000 unit/5 mL Heparin LEO® (LEO Pharma A/S, Denmark)
- 2) Ethanol absolute (Merck, Germany)
- 3) Oxygen gas (Yuwell, Thailand)

สารเคมีที่ใช้ในการการุณยฆาตสัตว์ทดลอง

- 1) 99.9% Isoflurane (Attane™, USA)
- 2) Ethanol absolute (Merck, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการเก็บอวัยวะของสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาลักษณะเซลล์

- 1) 10% Neutral buffered formalin (Bio-Optica, Italy)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA จากอุจจาระ

- 1) Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe Microprep kit (Zymo research, USA)

สารเคมีที่ใช้วัดระดับค่า Trimethylamine-N-oxide (TMAO)

- 1) Trimethylamine-N-oxide (TMAO), (SIGMA-ALDRICH, USA)
- 2) Polyallylamine hydrochloride (PAH, Mw 17,500 Da) (SIGMA-ALDRICH, USA)
- 3) Polysodium 4-styrenesulfonate (PSS, Mw 70,000 Da) (SIGMA-ALDRICH, USA)
- 4) Potassium permanganate (KEMAUS, Australia)
- 5) Hydrogen chloride (HCl) (Merk, Germany)
- 6) Sodium chloride (NaCl) (Sofclens, Thailand)
- 7) 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), (SIGMA-ALDRICH, USA)
- 8) Hydrogen peroxide (H₂O₂), (QRëC™ - Qchemical, New Zealand)

สารเคมีที่ใช้ในการวัดระดับค่า Brain Natriuretic Peptide (BNP)

- 1) BNP ELISA Kit, Brain Natriuretic Peptide ELISA Kit, (FineTest, China)

สารเคมีที่ใช้วัดระดับไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในเลือด

- 1) Ethanol absolute (Merck, Germany)

- 2) Heptane (QRèC™ - Qchemical, New Zealand)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA จากเลือด

- 1) TRIzol™ LS reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- 2) Chloroform (Merck, Germany)
- 3) 2-Propanaol (Merck, Germany)
- 4) Ethanol absolute (Merck, Germany)
- 5) Water-DEPC Treated Water (Cellconic, Korea)

สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

- 1) RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน (Gene expression)

- 1) 4X CAPITAL™ qPCR Green Master Mix (BiotechRabbit, Germany)

สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR

- 1) 10X PCR buffer (KOD-Plus-Neo, Japan)
- 2) 25mM Magnesium chloride (KOD-Plus-Neo, Japan)
- 3) 0.2 Deoxynucleotide triphosphate หรือ dNTP (KOD-Plus-Neo, Japan)
- 4) Taq DNA polymerase (KOD-Plus-Neo, Japan)

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการทดลอง

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม โดยหนูกลุ่ม Control เป็นหนูกลุ่มที่ไม่เป็นโรคไตเรื้อรัง ในขณะที่หนูกลุ่ม CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei เป็นหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นไตวายเรื้อรังด้วยการฉีดเข้าทางช่องท้อง cisplatin 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (47) จำนวน 1 ครั้ง ร่วมกับการได้รับ 0.5% phosphate ทางน้ำดื่มเพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นไตวายเรื้อรังเพิ่มมากขึ้น และเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และในสัปดาห์ที่ 5 จะเก็บเลือดเพื่อตรวจวัดระดับค่า Creatinine (Cr) ระดับค่า TMAO และเก็บอุจจาระ ในสัปดาห์ที่ 6 จนถึงสัปดาห์ที่ 15 หนูทุกกลุ่ม ยกเว้นหนูกลุ่มสุขภาพดี จะได้รับ 1.2 % Choline chloride ทางน้ำดื่ม ร่วมกับการป้อน Choline chloride 60 mg/kg และได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่ม ประกอบด้วย

กลุ่ม Control เป็นหนูกุ่มที่ไม่เป็นโรคไตเรื้อรัง
 กลุ่ม CKD เป็นหนูกุ่มโรคไตวายเรื้อรัง
 กลุ่ม Gac เป็นหนูกุ่มโรคไตวายเรื้อรัง ที่ได้รับสารสกัดฟักข้าว 6 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมผลสด
 กลุ่ม STD เป็นหนูกุ่มโรคไตวายเรื้อรัง ที่ได้รับสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนมาตรฐานอย่างละ 6 มิลลิกรัม

กลุ่ม Synbiotic เป็นหนูกุ่มโรคไตเรื้อรัง ที่ได้รับสารสกัดฟักข้าว 6 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมผลสด ร่วมกับได้รับ *Bifidobacterium longum* และ *Lactobacillus salivarius* จำนวน 10^9 Colony forming unit (CFU)

กลุ่ม L.Casei เป็นหนูกุ่มโรคไตวายเรื้อรังที่ได้รับ *Lactobacillus casei* (commercial probiotic) จำนวน 10^9 CFU

การเก็บตัวอย่างเลือด อวัยวะ และอุจจาระ จากหนูทดลอง

การเก็บเลือด

เจาะบริเวณปลายหางหนูบริเวณ Proximal ventral tail artery และเก็บในหลอดสารกันเลือดแข็งชนิด heparin ปริมาตรอย่างน้อย 1.5 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 g นาน 15 นาที เพื่อเก็บส่วนพลาสมาไปวิเคราะห์ ระดับค่า Cr และ TMAO ต่อไป

การเก็บเลือดจากหัวใจ

ภายหลังจากสัปดาห์ที่ 10 จะทำการการุณยฆาตสัตว์ทดลอง ด้วยการวางยาสลบด้วย Isoflurane จากนั้นจะเก็บเลือดจากบริเวณหัวใจ และเก็บในหลอดสารกันเลือดแข็งชนิด heparin ปริมาตรอย่างน้อย 6 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 g นาน 15 นาทีเพื่อเก็บส่วนพลาสมาไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้ ระดับค่า Cr ระดับค่า TMAO ระดับค่าไลโคปีน เบต้าแคโรทีน ในเลือดและระดับค่า BNP

การเก็บอวัยวะ

เก็บอวัยวะต่างๆ ประกอบด้วย ไตข้างขวา หัวใจ ตับ ลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน หลอดเลือดเออตาตาร์ และเอออร์ตาส่วนท้อง มาแช่ไว้ใน 10 % พาราฟอร์มัลดีไฮด์ เพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และแบ่งอวัยวะส่วนหนึ่งมาแช่ใน RNA later™ Solution เพื่อศึกษาระดับโมเลกุล

การเก็บอุจจาระ

เก็บอุจจาระจากบริเวณ Anus และเก็บใส่ในหลอด DNA/RNA shield™ ในหลอดขนาด 1.5 mL จากนั้นนำมาแช่ - 20°C ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ (DNA) เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

3.5.3 การตรวจวัดระดับ Trimethylamine-N-oxide (TMAO) (Chang et al., 2021)

เตรียมสาร PAH@MnO₂ NPs

- 1) เตรียมสารละลาย PAH 1 mL (1mg/mL) ผสมกับ NaCl 0.1 (mol/L) และ KMnO₄ 15 μ L (27.6 mg/mL)
- 2) จากนั้นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งแมงกานีสถูกเปลี่ยนเป็น MnO₂ ซึ่งสามารถจากการเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำตาลเป็นสีม่วง
- 3) เติม MnO₂ NPs ลงไปในสารละลาย PSS (1 mg/mL, 0.1 M NaCl) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
- 4) จากนั้นนำตะกอนบริเวณด้านล่าง ไปละลายใน PAH (1 mg/mL, 0.1 mol/L NaCl) และเขย่าเป็นเวลา 30 นาที
- 5) นำมาล้างสามครั้งด้วยน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้ PAH@MnO₂ NPs

การตรวจวัดระดับ TMAO เทคนิค Colorimetric เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน

- 1) สำหรับกระบวนการตรวจวัดความเข้มข้นต่างๆ ของ TMAO (100 μ L) ซึ่งอยู่ในช่วง 15.6 ถึง 1,000 μ M ถูกผสมกับ 20 μ L HCl และ 20 μ L PAH@MnO₂ NPs เขย่าเป็นเวลา 3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- 2) จากนั้นใช้ 20 μ L ของสารผสมระหว่าง HCl และ 20 μ L PAH@MnO₂ NPs ผสมกับสารละลาย TMB/H₂O₂ 100 μ L
- 3) เมื่อสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อนจากสีเหลือง เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของ TMAO และจากนั้นวัดความยาวคลื่นที่ A₆₅₀
- 4) จากนั้นนำค่าที่วัดได้มา plot ทำกราฟเชิงเส้นเป็นสัดส่วนความเข้มข้นของ TMAO ในช่วงที่วัดได้ เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน

การตรวจวัดระดับ TMAO ในพลาสมา

- 1) ชั้นแรกหยอดพลาสมา 100 μ L ลงในหลุม 96 well plate
- 2) จากนั้นเติม HCl 20 μ L และเติม PAH@MnO₂ NPs 20 μ L
- 3) ต่อมา 20 μ L ของของผสมข้างต้นถูกดึงออกมาและผสมกับสารละลาย TMB/H₂O₂ 100 μ L
- 4) ค่าที่ได้รับของ A₆₅₀ ถูกบันทึกเพื่อกำหนดความเข้มข้นของ TMAO ในเลือดครบของหนูแรทปกติ/หรือ CKD โดยใช้กราฟการเปรียบเทียบตามลำดับสำหรับการทดสอบสีด้วยสเปกโตรมิเตอร์

การตรวจวัดระดับสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในเลือดด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

- 1) ใช้ตัวอย่างเลือดประมาณ 1 – 1.5 mL จากนั้นเติมสารกันเลือดแข็ง heparin 30 IU
- 2) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- 3) จากนั้นเก็บส่วนพลาสมาลงในหลอดทดลอง หลอดละ 50 μ L
- 4) จากนั้นเติมแอลกอฮอล์ 50 μ L และเติมเฮปเทน (heptane) 150 μ L ลงในหลอดทดลอง จากนั้น vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เป็นเวลา 1 นาที
- 5) จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 2000 rpm เป็นเวลา 1 นาที และดูดชั้นของสารเฮปเทนออกไป
- 6) นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ในคิวเวทแบบแก้ว ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

การตรวจวัดระดับ BNP ด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การเตรียมสารทำกราฟมาตรฐาน

- 1) เติม 1 mL sample dilution buffer ลงในหลอดที่ระบุว่าเป็น zero tube จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้เข้ากัน
- 2) จากนั้นเจือจางสารมาตรฐานทั้งหมด 7 หลอด ดังนี้

การวัดระดับ Brain Natriuretic Peptide (BNP) ในพลาสมา

- 1) เติมตัวอย่างพลาสมาหรือเติมสารมาตรฐาน 100 μ L ลงในหลุม 96 well plate และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที
- 2) จากนั้นดูดสารออกจาก plate และล้างเป็นจำนวนสองครั้งด้วย wash buffer
- 3) เติม Biotin – labeled Antibody Working Solution 100 μ L ลงไปในแต่ละหลุม จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
- 4) จากนั้นดูดสารออกจากหลุม และล้างเป็นจำนวนสามครั้งด้วย wash buffer
- 5) เติม HRP-Streptavidin Conjugated (SABC) Working Solution 100 μ L ลงไปในแต่ละหลุม จากนั้น บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
- 6) จากนั้นดูดสารออกจากหลุม และล้างเป็นจำนวน 5 ครั้งด้วย wash buffer
- 7) เติม TMB substrate solution 90 μ L จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-20 นาที
- 8) เติม Stop solution 50 μ L และนำไปวัดที่ 450 นาโนเมตร

- 9) หมายเหตุ: Biotin – labeled Antibody Working Solution (ควรเตรียมก่อนใช้ภายใน 1 ชั่วโมง) และ HRP-Streptavidin Conjugated (SABC) Working Solution (ควรเตรียมก่อนใช้ภายใน 30 นาที)

การตรวจหาจุลินทรีย์จากตัวอย่างอุจจาระ

- 1) การสกัด DNA จากตัวอย่างอุจจาระของหนูทดลองด้วย ZymoBIOMICS™ DNA Microprep Kit ใส่อุจจาระลงใน ZR BashingBead™ Lysis tube จากนั้นเติม ZymoBIOMICS™ Lysis Solution 750 µL
- 2) จากนั้น vortex อุจจาระให้เป็นเนื้อเดียวกันกับเม็ด bead เป็นเวลา 40 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- 3) เก็บบริเวณส่วนใสด้านบน ปริมาตร 400 µL ลงในหลอด 1.5 ml ที่มี filter Zymo-Spin™ III-F Filter จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้ง filter Zymo-Spin™ III-F Filter และเติม ZymoBIOMICS™ DNA Binding Buffer 1,200 µL
- 4) จากนั้นดูดสารในชั้นที่ 4 มา 800 µL ลงในหลอด 1.5 ml ที่มี filter Zymo-Spin™ III-CR column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- 5) เทสารละลายภายในหลอดทิ้ง และเติมสารในข้อ 6 อีกหนึ่งรอบ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- 6) เติม 400 uL ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 1 ลงในหลอดใหม่ Zymo-Spin™ III-CR column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- 7) เติม 700 uL ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2 ลงในหลอดใหม่ Zymo-Spin™ III-CR column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- 8) 8) เติม 200 uL ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2 ลงในหลอดใหม่ Zymo-Spin™ III-CR column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที
- 9) ย้าย Zymo-Spin™ III-CR column ไปยังหลอดใหม่ และเติม 50 µL DNase Free water แลวบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที
- 10) เตรียม Zymo-Spin™ III- HRC column filter ในหลอดใหม่ และเติม 600 µL ZymoBIOMICS™ HRC Prep Solution และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 g เป็นเวลา 3 นาที
- 11) ย้าย elute DNA ไปใส่ Zymo-Spin™ III- HRC column filter และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 16000 g เป็นเวลา 3 นาที

การวัดคุณภาพ DNA

ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ก่อนส่ง sequencing โดยตัวอย่างที่เหมาะสมต้องมีความเข้มข้น DNA ตั้งแต่ 0.05 ng/ μ L ขึ้นไปและมีความบริสุทธิ์ ($OD_{260/280}$) = 1.8-2.0 โดยวิธี nanophotometry

1) Nanophotometry

1.1 ทำการล้างกระจกและตั้งค่า blank โดยใช้สารละลาย DNase free water 1 μ L

2) หยด DNA ปริมาตร 1 μ L ลงบนกระจกของเครื่อง และกดให้เครื่องวัดปริมาณและคุณภาพของ DNA โดยใช้การดูดกลืนแสงของ DNA ตามสูตรดังต่อไปนี้

- ความเข้มข้น DNA (μ g/ml) = $OD_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$

- คุณภาพ DNA = $(OD_{260}) / (OD_{280})$

การวัดการแสดงออกของยีน

วัดการแสดงออกของยีน ด้วยเครื่อง QuantStudio™ 5 Real – Time PCR System โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Table 2 แสดงไพรเมอร์ของ TMA lyase และ 16S

Target	Primer name	Sequence (5' → 3')	PCR product (bp)
CutC	Forward	TTYGCIGGITAYCARCCNTT	275
	Reverse	TGNGGYTCIACRCAICCCAT	
16S rRNA	Forward	AGRGTTHGATYMTGGCTCAG	177
	Reverse	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT	

การเตรียมสารละลายสำหรับ 1 ปฏิกริยา ปริมาตร 15 μ L ประกอบด้วย

- SYBR Green 3.75 μ L

- Forward primer 0.6 μ L

- Reverse primer 0.6 μ L
- Water For PCR 9.95 μ L
- cDNA 1 μ L

Table 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา qPCR

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา			
Step 1	Hold stage	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที
Step 1	PCR stage	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
Step 2		อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
Step 3		อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 20 วินาที
Step 1	Melt Curve stage	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 วินาที
Step 2		อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 20 วินาที
Step 3		อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 วินาที

หมายเหตุ: TMA lyase ใช้ 45 cycles ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส

การคำนวณการแสดงออกของยีน

คำนวณการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$1) \Delta Cq(\text{treatment}) = Cq(\text{target}) - Cq(\text{reference})$$

$$\Delta Cq(\text{control}) = Cq(\text{target}) - Cq(\text{reference})$$

$$2) \Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{treatment}) - \Delta Cq(\text{control})$$

$$3) 2^{-\Delta\Delta Cq} = \text{Normalized expression ratio}$$

โดยกำหนดให้

Treatment ได้แก่ กลุ่ม CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei

กลุ่ม Control หนูกลุ่มที่ไม่เป็นโรคไตเรื้อรัง

กลุ่ม CKD หนูกลุ่มโรคไตวายเรื้อรัง ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

กลุ่ม Gac หนูกลุ่มโรคไตวายเรื้อรัง ที่ได้รับสารสกัดพืชข้าว

กลุ่ม STD หนูกลุ่มโรคไตวายเรื้อรัง ที่ได้รับสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนมาตรฐาน

กลุ่ม Synbiotic หนูกุ่มโรคไตเรื้อรัง ที่ได้รับสารสกัดฟักข้าว ร่วมกับได้รับ *Bifidobacterium longum* และ *Lactobacillus salivarius*

กำหนดให้

กลุ่ม Casei หนูกุ่มโรคไตเรื้อรังที่ได้รับ *Lactobacillus casei*

Control ได้แก่ หนูกุ่มที่ไม่เป็นโรคไตเรื้อรัง

Target แสดงค่า CT ของ TMA lyase

Reference: แสดงค่า CT ของ 16S rRNA

เมื่อคำนวณตามขั้นตอนจะได้ค่า $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ซึ่งเป็นอัตราส่วนการแสดงออกของยีนที่เทียบกับ

House-keeping gene หากค่า $2^{-\Delta\Delta Cq}$ มีค่ามาก แสดงว่ายีนนั้น ๆ มีการแสดงของมาก (10)

การสกัด RNA จากเลือด จากชิ้นเนื้อ

ขั้นตอนการทำ Lyse samples และ separate phases

- 1) ชั่งตัวอย่างอวัยวะไต 100 mg แลวนำไปใส่โกร่งเพื่อบดชิ้นเนื้อให้ละเอียด
- 2) จากนั้นเติม 0.5 ml TRIzol™ LS จากนั้นบดให้ละเอียด
- 3) ดูดสารละลาย 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง
- 4) จากนั้นเติมสารละลาย TRIzol™ LS ลงไปอีก 0.5 mL เพื่อล้างโกร่ง และดูดสารละลาย 1.5 mL ลงในหลอดทดลองอีกครั้ง
- 5) เติม Chloroform 0.2 mL และเขย่าให้เข้ากัน
- 6) นำตัวอย่างตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที
- 7) นำตัวอย่างไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 8) จากนั้นดูดส่วนใสด้านบน ลงในหลอดทดลอง 1.5 mL
- 9) ขั้นตอนการทำ Isolate RNA
 - 1) เติม isopropanol 0.5 mL และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
 - 2) นำตัวอย่างไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
 - 3) จากนั้นทิ้งส่วนใสด้านบน และเก็บ RNA ที่ตกตะกอนบริเวณก้นหลอด
 - 4) Resuspend ตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol ปริมาตร 1 mL และนำไป vortex
 - 5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
 - 6) ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง และเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ 10-20 นาที รอจนกระทั่ง ethanol ระเหย

- 7) Resuspend ตะกอน RNA ด้วย Water-DEPC Treated Water ปริมาตร 50 μ L จากนั้นผสมให้เข้ากัน
- 8) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วย Heat block เป็นเวลา 10 นาที
- 9) นำ RNA ไปวัดคุณภาพด้วยเครื่อง Nano spectrophotometer แล้วเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์ cDNA

ใช้ RNA ที่มีความเข้มข้น 2,000 ng จากนั้นทำ RevertAid

First Strand cDNA Synthesis Kit ดังนี้

- 1) เตรียมความเข้มข้นตัวอย่าง RNA ที่ 2,000 ng จากนั้นทำ First Strand cDNA Synthesis Kit โดยมีขั้นตอนดังนี้

เตรียมปฏิกิริยาปริมาตร 12 μ L ประกอบด้วย

- RNA จำนวน X μ L
- Random hexamer 1 μ L
- Water-DEPC Treatment Water 12-X μ L

หมายเหตุ: X แสดงปริมาณ RNA ที่ 2,000 ng

- 1) ปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 2) เตรียมสาร Master mix สำหรับการสังเคราะห์ cDNA
- 3) 5X Reaction 4 μ L
- 4) Ribolock RNase inhibitor 1 μ L
- 5) 10M dNTP Mix 2 μ L
- 6) RevertAid reverse transcriptase 1 μ L
- 4) จากนั้นเติม Master mix ปริมาตร 8 μ L
- 5) ปั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 6) นำมาปั่นต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
- 7) หยุดปฏิกิริยา ด้วยการปั่นที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 8) เก็บรักษา cDNA ที่ -80 องศาเซลเซียส

การวัดการแสดงออกของยีน

วัดการแสดงออกของยีน ด้วยเครื่อง QuantStudio™ 5 Real – Time PCR System โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Table 4 แสดงไพรเมอร์ของ NF-κB และ GAPDH

Target	Primer name	Sequence (5'→3')	PCR product (bp)
NF-κB	Forward	CGCAAAGGACCTACGAGAC	193
	Reverse	TGGGGGAAAACATCAAAG	
GAPDH	Forward	TGGAGTCTACTGGCGTCTTC	121
	Reverse	TTCACACCCATCACAAACATG	

การเตรียมสารละลายสำหรับ 1 ปฏิกริยา ปริมาตร 20 μL ประกอบด้วย

- SYBR Green 3.75 μL
- Forward primer 0.15 μL
- Reverse primer 0.15 μL
- Water For PCR 9.95 μL
- cDNA 1 μL

- 1) Aliquot ลงในหลอด PCR ปริมาตร 14 μL
- 2) เติม 1 μL cDNA และผสมให้เข้ากัน
- 3) นำไป spin down
- 4) จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม QuantStudio™ Design & Analysis Software version 1.4.3
- 5) จากนั้นนำมาคำนวณการแสดงออกของยีนด้วยสูตร $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method

Table 5 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา qPCR

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา			
Step 1	Hold stage	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที
Step 1	PCR stage	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 วินาที
Step 2		อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 15 วินาที
Step 3		อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 20 วินาที
Step 1	Melt Curve stage	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 วินาที
Step 2		อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 20 วินาที
Step 3		อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 วินาที

หมายเหตุ: NF-kB primer ใช้ 45 cycles ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส

การคำนวณการแสดงออกของยีน

คำนวณการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$1) \Delta Cq(\text{treatment}) = Cq(\text{target}) - Cq(\text{reference})$$

$$\Delta Cq(\text{control}) = Cq(\text{target}) - Cq(\text{reference})$$

$$2) \Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{treatment}) - \Delta Cq(\text{control})$$

$$3) 2^{-\Delta\Delta Cq} = \text{Normalized expression ratio}$$

โดยกำหนดให้

Treatment ได้แก่ กลุ่ม CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei

กลุ่ม Control หนูกลุ่มที่ไม่เป็นโรคไตเรื้อรัง

กลุ่ม CKD หนูกลุ่มโรคไตวายเรื้อรัง ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

กลุ่ม Gac หนูกลุ่มโรคไตวายเรื้อรัง ที่ได้รับสารสกัดฟักข้าว

กลุ่ม STD หนูกลุ่มโรคไตวายเรื้อรัง ที่ได้รับสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนมาตรฐาน

กลุ่ม Synbiotic หนูกลุ่มโรคไตเรื้อรัง ที่ได้รับสารสกัดฟักข้าว ร่วมกับได้รับ *Bifidobacterium longum* และ *Lactobacillus salivarius*

กลุ่ม L.Casei หนูกลุ่มโรคไตวายเรื้อรังที่ได้รับ *Lactobacillus casei*

Control ได้แก่ หนูกลุ่มที่ไม่เป็นโรคไตเรื้อรัง

Target แสดงค่า CT ของ NF-kB

Reference: แสดงค่า CT ของ GAPDH

เมื่อคำนวณตามขั้นตอนจะได้ค่า $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ซึ่งเป็นอัตราส่วนการแสดงออกของยีนที่เทียบกับ House-keeping gene หากค่า $2^{-\Delta\Delta Cq}$ มีค่ามาก แสดงว่ายีนนั้น ๆ มีการแสดงของมาก (10)

กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ

- 1) คงสภาพ (fixation) โดยการแช่น้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ ด้วย 10% neutral buffer formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยการตัดแบบ coronal section
- 2) เตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (tissue processing) เตรียมชิ้นเนื้อด้วยเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (automatic tissue processing) โดยมีหลักการ คือ การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ แล้วแทรกด้วย พาราฟิน (paraffin) หรือ พาราพลาสติก (paraplast) เข้าสู่ชิ้นเนื้อ โดยเติมสารเคมีลง ตามโถและตั้งค่าเวลาดังต่อไปนี้

Table 6 แสดงขั้นตอนของการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Hematoxylin & Eosin

ลำดับ	สารเคมี	เวลา (นาที)
การดึงพาราฟินออก (Deparaffinized)		
1	Xylene	3
2	Xylene	3
3	Xylene	3
การดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (Rehydration)		
4	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
5	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
6	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
7	Tap water	1
การย้อมสี (Staining)		
8	Hematoxylin	5
9	Tap water	5
10	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
11	Eosin	5
12	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
13	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydration)		
14	Absolute alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
15	Absolute alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
การนำแอลกอฮอล์ออกจากเนื้อเยื่อ (Clearing)		
16	Xylene	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
17	Xylene	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง

Table 7 แสดงขั้นตอนของการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Von Kossa

ลำดับ	สารเคมี	เวลา (นาที)
การดึงพาราฟินออก (Deparaffinized)		
1	Xylene	3
2	Xylene	3
3	Xylene	3
การดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (Rehydration)		
4	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
5	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
6	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
7	Tap water	1
8	Drop % 5 silver nitrate solution and keep under lamp	1 hour
9	Distilled water	3
การย้อมสี (Staining)		
10	หยด % 5 silver nitrate solution and Expose section to bright sunlight, or UV lamp sunlight, or UV lamp	1 hour
11	Distilled water	3
12	5 % sodium thiosulfate	1
13	Distilled water	3
14	Counterstain with nuclear fast red	10
15	Distilled water	3
16	Incubate 60 °C	5

Table 8 แสดงขั้นตอนของการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสี Masson Trichrome

ลำดับ	สารเคมี	เวลา (นาที)
การดึงพาราฟินออก (Deparaffinized)		
1	Xylene	3
2	Xylene	3
3	Xylene	3
การดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (Rehydration)		
4	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
5	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
6	95% alcohol	จุ่ม (dip) 10 ครั้ง
7	Tap water	1
8	Distilled water	3
9	Dip Bouin's fixative and incubate 56 °C	1
10	Tap water	5
การย้อมสี (Staining)		
11	Dip Bouin's fixative and incubate 56 °C	1
12	Tap water	5
13	Distilled water	3
14	drop weigert's iron hematoxylin	5
15	Distilled water	3
16	drop phosphotungstic- Phosphomolybdic acid	10
17	Distilled water	3
18	หยด Aniline blue	8
19	Distilled water	3
20	Dip 1 % acetic water	จุ่ม (dip) 1 ครั้ง
21	Distilled water	3
22	Dehydration incubates 60 °C	5

กระบวนการย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ด้วยแอนติบอดี ZO - 1

1) ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อในพาราฟินบล็อกที่ต้องการศึกษา ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อไมโครทอมที่ความหนา 2 ไมโครเมตร วางลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยประจุบวก ปริ้นท์คิวอาร์โค้ดสำหรับเครื่องย้อมอัตโนมัติและแปะที่หัวสไลด์ จากนั้นนำสไลด์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน แล้วนำไปย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดี ZO-1 โดยเครื่องย้อมพิเศษอิมมูโนฮิสโตเคมีแบบอัตโนมัติ รุ่น BenchMark Ultra ด้วย UltraView Universal DAB Detection kit

2) เตรียมสไลด์ โดยการบ่มสไลด์ด้วยน้ำยา EZ prep ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เพื่อล้างพาราฟินออกจากสไลด์ รวมถึงเติมน้ำเข้าเซลล์ และล้างด้วย Reaction buffer

3) การคืนสภาพอีพิโทป บ่มสไลด์ด้วยเอนไซม์ Protease2 เป็นเวลา 8 นาที และล้างด้วย Reaction buffer

4) การยับยั้งเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และยับยั้งการจับกันอย่างไม่จำเพาะของแอนติเจน ด้วย inhibitor ลดอุณหภูมิเป็น 37 องศาเซลเซียส แล้วบ่มอีก 4 นาที และล้างด้วย Reaction buffer

5) การหยดแอนติบอดี โดยจะหยดแอนติบอดีปฐมภูมิ ZO-1 (Dilution 1:50) ที่เตรียมไว้ลงบนสไลด์ 100 ไมโครลิตร บ่มสไลด์ 60 นาที ล้างด้วย Reaction buffer จากนั้นหยดแอนติบอดีทุติยภูมิ HRP multimer บ่มสไลด์ 8 นาที แล้วล้างด้วย Reaction buffer

6) การขยายสัญญาณสี โดยหยด diaminobenzidine (DAB) และ peroxides (H_2O_2) แล้วบ่มสไลด์ 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้เป็นผลิตภัณฑ์สีน้ำตาล และหยด copper เพื่อเพิ่มความเข้มของสี จากนั้นล้างด้วย Reaction buffer

7) ย้อมส่วนที่ไม่ติดสีด้วย Hematoxylin 8 นาที และ bluing reagent 4 นาที เพื่อให้พื้นหลังเป็นสีน้ำเงิน สุดท้ายจึงล้างออกด้วย Reaction buffer หลังจากนั้นนำสไลด์ออกจากเครื่องย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีแบบอัตโนมัติแล้วจะนำน้ำออกจากสไลด์ โดยนำไปจุ่ม ethanol ความเข้มข้น 95% 20 ครั้ง และ 100% 40 ครั้ง แล้วจุ่มสไลด์ใน xylene อีก 20 ครั้ง หลังจากนั้นหยด permount แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

การวิเคราะห์และแปลผลการย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

- 1) นำสไลด์มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่ขนาดหัว 40X
- 2) จากนั้นดูการแสดงออกของ ZO-1 ด้วยการย้อมติดสีน้ำตาลบริเวณลำไส้ใหญ่ส่วนโคลอน โดยแบ่งระดับการแสดงออกเป็นดังนี้

Table 9 แสดงคะแนนการย้อมติดสีของ ZO-1

ZO-1 expression score	Grade
Less than 10%	0
Less than 25%	1
25-50%	2
50-75%	3
75-100%	4

การรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดของการทำวิจัยในครั้งนี้จะเก็บรวบรวมวิธีการทดลองทั้งหมดไว้ในสมุดจดบันทึก และรวบรวมผลการทดลองทั้งหมดไว้ในคอมพิวเตอร์

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์ข้อมูลสัตว์ทดลองด้วยโปรแกรม GraphPad Prism Version 9.4.1 และ SPSS version 23 (IMB statistic, USA) ในการวิเคราะห์ผล น้ำหนัก ระดับค่าครีเอตินิน ผลสัสดส่วนของน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัวของหนู ระดับค่าไตรเมทิลามีนเอ็น-ออกไซด์ ระดับค่าไลโคปีนและระดับค่าเบต้าแคโรทีน ระดับการแสดงออกของยีน NF- κ B และการแสดงออกของเอนไซม์ TMA lyase โดยใช้สถิติประเภท student t- test ในการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่ม และใช้สถิติประเภท multiple repeated measures ANOVA ในการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ มากกว่าสองกลุ่มการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P value < 0.05)
2. การวิเคราะห์ข้อมูลของความหลากหลายจุลินทรีย์ในลำไส้ จะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป QIIME2 โดยจะวิเคราะห์ alpha-diversity, Beta-diversity และ Relative abundance โดยใช้สถิติแบบ non-parametric statistics และวิเคราะห์ความแตกต่างของจุลินทรีย์ ด้วยการดูการกระจายตัวของตัวอย่างด้วยหลักการ (Principal Coordinate Analysis; PCoA) และใช้สถิติ Permutational multivariate analyses of variance (PERMANOVA) และใช้โปรแกรม SPSS version 23 (IBM statistic, USA)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. สารสกัดฟักข้าว (Gac fruit extract)

1.1) การคำนวณหาไลโคปีนจากเชื้อหุ้มเมล็ดฟักข้าว

จากการสกัดด้วยวิธี liquid - liquid extraction อัตราส่วน hexane: acetone: ethanol (50: 25: 25 v/v/v) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ที่ความยาวคลื่น (nm) ดังนี้ A₆₆₃, A₆₄₅, A₅₀₅, A₄₅₃ จากนั้นนำผลค่าความยาวคลื่นที่วัดได้มาแทนลงในสมการเพื่อหาความเข้มข้นของไลโคปีน ดังสมการ (61)

$$\text{Lycopene (mg/100 ml)} = -0.0458A_{663} + 0.2044A_{645} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453} \quad (1)$$

สารสกัดที่ 4 ยาวคลื่น A₆₆₃ วัดได้ 0.017

A₆₄₅ วัดได้ 0.021

A₅₀₅ วัดได้ 4.078

A₄₅₃ วัดได้ 4.083

ขั้นที่ 1 แทนค่าลงในสูตร

$$\text{ดังนี้} = -0.0458 (0.017) + 0.204 (0.021) + 0.372(4.078) - 0.0806(4.083)$$

เท่ากับ 1.1914316 mg/100 mL solvent

ขั้นที่ 2 แปลงเป็น mg/ 100 g sample

ซึ่งสาร 103.9569 กรัม ละลายใน solvent 250 mL

จาก 250 mL solvent แสดงว่ามี sample 103.9569 g

ถ้าใช้ 100 mL solvent แสดงว่ามี sample 41.58276 g/100 g sample

แสดงว่า มี lycopene 1.1914316 mg/ 41.58276 g sample

ดังนั้น ถ้า 100 g sample มี lycopene = $1.1914316/41.58276 * 100 = 2.8652$ mg

สรุป ตัวอย่างมี lycopene = 2.87 mg/100 g sample

1.2) การคำนวณหาเบต้าแคโรทีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าว

จากการสกัดด้วยวิธี liquid - liquid extraction อัตราส่วน hexane: acetone: ethanol (50: 25: 25 v/v/v) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ที่ความยาวคลื่น (nm) ดังนี้ A 663, A 645, A 505, A 453 จากนั้นนำผลค่าความยาวคลื่นที่วัดได้มาแทนลงในสมการเพื่อหาความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีน ดังสมการ (61)

$$\text{Beta - carotene (mg/100 ml)} = 0.216A_{663} - 1.22A_{645} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453} \quad (2)$$

สารสกัดที่ 4 ยาวคลื่น A₆₆₃ วัดได้ 0.017

A₆₄₅ วัดได้ 0.021

A₅₀₅ วัดได้ 4.078

A₄₅₃ วัดได้ 4.083

ขั้นที่ 1 แทนค่าลงในสูตร

$$\text{ดังนี้} = 0.216 (0.017) - 1.22 (0.021) - 0.304(4.078) + 0.452(4.083)$$

เท่ากับ 0.583856 mg/100 ml solvent

ขั้นที่ 2 แปลงเป็น mg/ 100 g sample

ซึ่งสาร 103.9569 กรัม ละลายใน solvent 250 ml

จาก 250 mL solvent มี sample 103.9569 g

ถ้า 100 mL solvent มี sample 41.58276 mg/100 g sample

แสดงว่ามี เบต้าแคโรทีน 0.583856 mg / 41.58276 g sample

ดังนั้น ถ้า 100 g sample มีเบต้าแคโรทีน = $0.583856 / 41.58276 * 100 = 1.4040$ mg

สรุปมีตัวอย่างเบต้าแคโรทีน 1.40 mg/100 g sample

2. ผลน้ำหนักรักตัวสัตว์ทดลอง

สุขภาพโดยทั่วไปของสัตว์ทดลองระหว่างการวิจัย จากการศึกษาผลของการบริโภคสารสกัดฟักข้าว และการบริโภคแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* และ *Bifidobacterium longum* พบว่าในสัปดาห์ที่ 15 หนูในกลุ่ม CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei มีน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม control และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักอยู่ที่ (Control: 689.1 ± 75.5), (CKD: 491.8 ± 98.66), (Gac: 443.8 ± 60.88), (STD: 463.7 ± 78.3), (Synbiotic: 502.0 ± 75.6) และ (L.Casei: 462.0 ± 110.7) ดังแสดงในภาพที่ 9

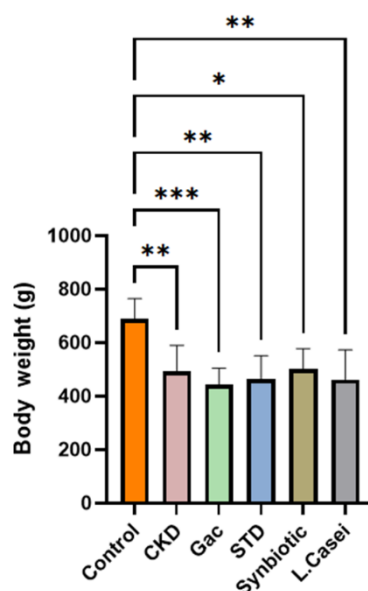


Figure 9 น้ำหนักตัวของหนูทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง

หนูกลุ่ม control ที่ไม่เป็นไตวายเรื้อรัง หนูกลุ่มไตวายเรื้อรัง (CKD), หนูกลุ่มไตวายเรื้อรังที่ได้รับสารสกัดฟักข้าว (Gac), หนูกลุ่มไตวายเรื้อรัง ที่ได้รับสารมาตรฐานเบต้าแคโรทีนร่วมกับไลโคปีน (L.Casei), หนูกลุ่มไตวายเรื้อรัง ได้รับสารสกัดฟักข้าวร่วมกับโพรไบโอติก (Synbiotic) และหนูกลุ่มไตวายเรื้อรังที่ได้รับแลคโตบาซิลัสสายพันธุ์คาเซอี (L.Casei) จากตารางแสดงค่า mean±SD และเครื่องหมาย * แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ และ ** แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

3. ผลการศึกษาระดับค่าครีอะตินิน (Cr)

ภายหลังการถูกเหนี่ยวนำให้เป็นไตวายเรื้อรังด้วยยา cisplatin พบว่าหนูในกลุ่ม CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei จะมีระดับค่า Cr ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม control ($p < 0.05$) และมีค่าเฉลี่ยระดับค่า Cr อยู่ที่ (Control 0.21 ± 0.05), (CKD: 1.26 ± 0.35), (Gac: 1.29 ± 0.69), (STD: 1.15 ± 0.36), (Synbiotic 1.20 ± 0.51) และ (L.Casei: 1.42 ± 0.85) ในขณะที่เมื่อวัดระดับค่า Brain (B-type) natriuretic peptide (BNP) ด้วยเทคนิค ELISA พบว่าระดับค่า BNP ทั้งใน 6 กลุ่มการทดลองมีระดับค่า BNP ที่ต่ำกว่า limit of quantitation, LOQ ที่ 18.25 pg/mL

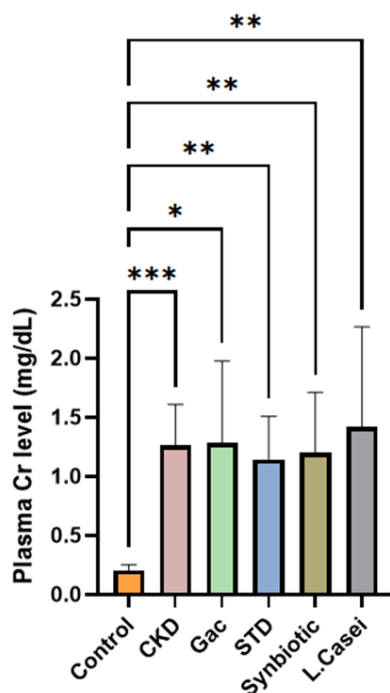


Figure 10 ระดับค่าครีอะตินิน ของหนูทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง
 เครื่องหมาย * แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ และ ** แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ ***
 $P < 0.001$

4. ผลการศึกษาระดับค่าไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในเลือดตรวจวัดด้วยเทคนิค UV-visible

จากการศึกษาพบว่าระดับค่าไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม STD และ Gac ($p=1.000$) อีกทั้งยังพบว่าระหว่างกลุ่ม L.Casei และ STD มีระดับค่าไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนที่ใกล้เคียงกัน ที่ ($p=1.000$) ในขณะที่หนูกลุ่ม Control, CKD และ L.Casei พบว่ามีระดับไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม STD ที่ p value 0.975, 0.355 และ 0.255 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 11 A-B

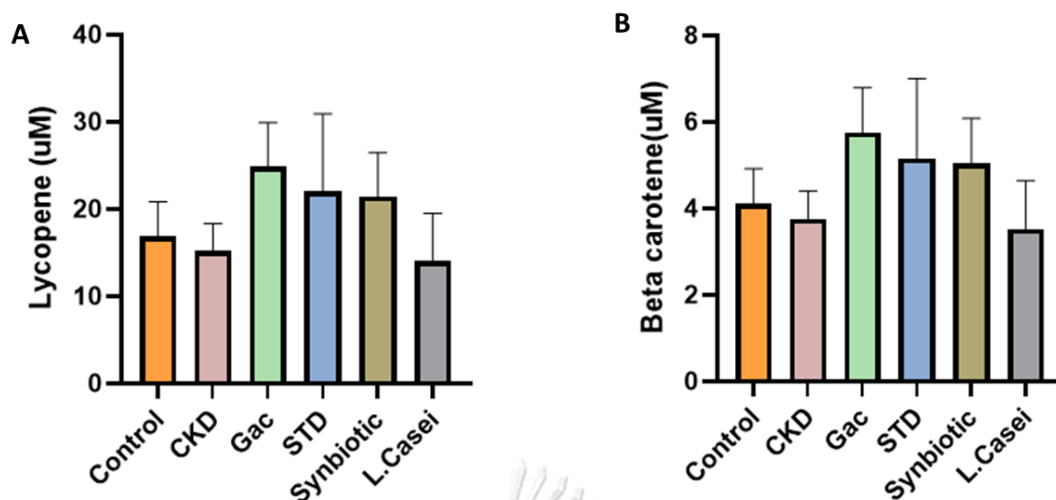


Figure 11 แสดงระดับค่าไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในเลือด

5. ผลการศึกษาในระดับค่าไตรเมทิลามีน เอ็น-ออกไซด์ (Trimethylamine N-oxide TMAO)

จากผลการทดลองพบว่ากลุ่ม Control มีระดับค่า TMAO ภายหลังการได้รับโคลีนในสัปดาห์ที่ 15 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และพบว่าระดับค่า TMAO กลุ่ม Synbiotic ภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 มีระดับค่า TMAO ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 12E อีกทั้งเมื่อติดตามระดับค่า TMAO ในกลุ่มการทดลองอื่นๆ ได้แก่ Gac, STD, L.Casei พบว่าระดับ TMAO มีแนวโน้มลดลงเช่นกันภายหลังการได้รับสารทดสอบ ที่ p value 0.188, 0.406, 0.219 ดังแสดงในภาพที่ 12 A-F

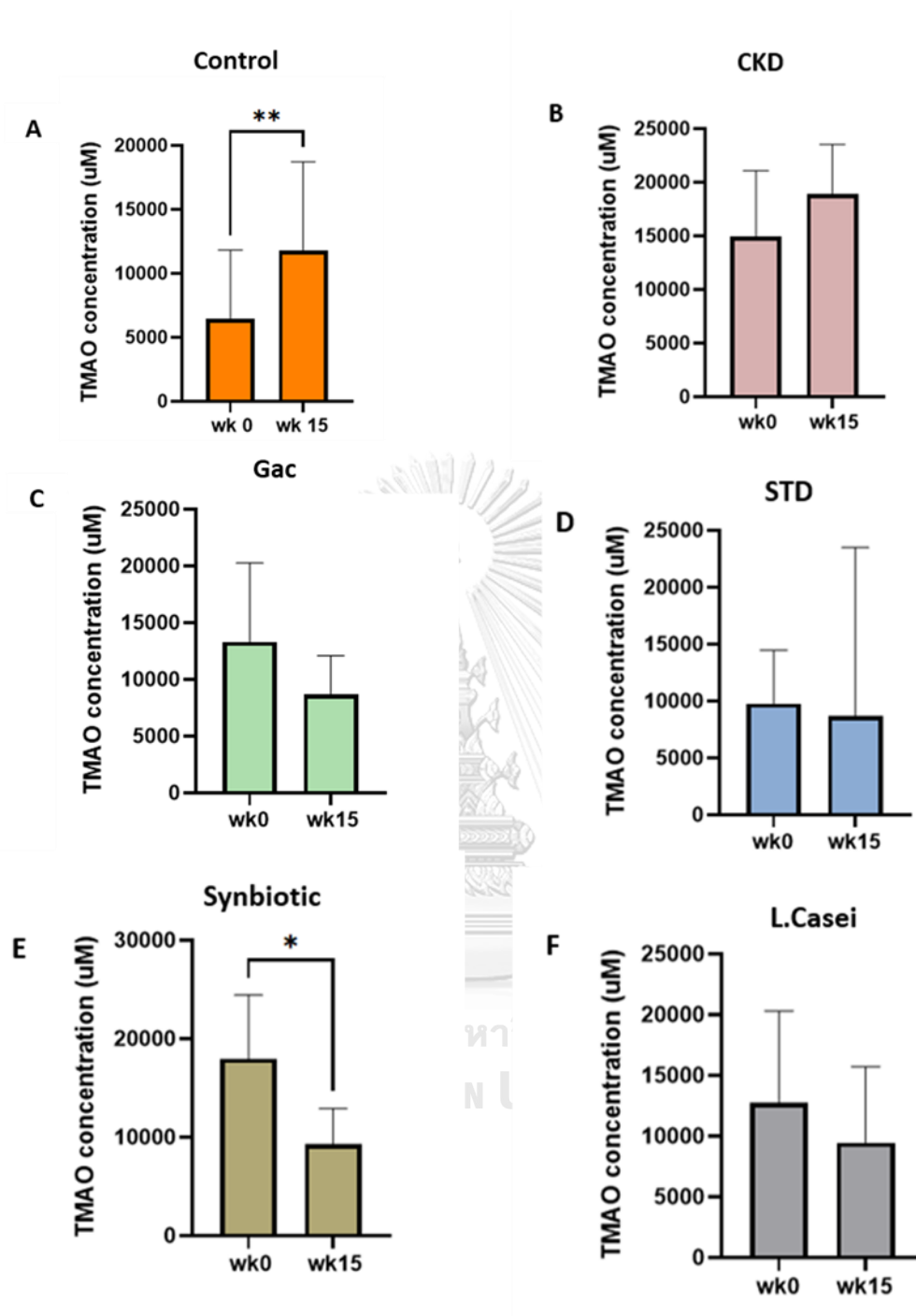


Figure 12 A-F แสดงระดับค่า TMAO (Trimethylamine N-oxide -TMAO) เครื่องหมาย * แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ และ ** แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$

6. ผลการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ TMA Lyase

การศึกษานี้พบว่าหนูในกลุ่ม CKD มีการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ TMA lyase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มปกติ ($p < 0.05$) อีกทั้งยังพบว่าเฉพาะหนูโรคไตเรื้อรังในกลุ่มที่ได้รับ synbiotics มีการแสดงออกของยีนการสร้างเอนไซม์ TMA lyase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูโรคไตเรื้อรังที่ไม่ได้รับการรักษา (Synbiotic vs CKD, $p < 0.01$) อีกทั้งยังพบว่าหนูกลุ่ม Gac, STD และ L.Casei มีการแนวโน้มการแสดงออกของ TMA lyase ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CKD ที่ $p=1.000$, 0.351 และ $p=1.000$ ตามลำดับ

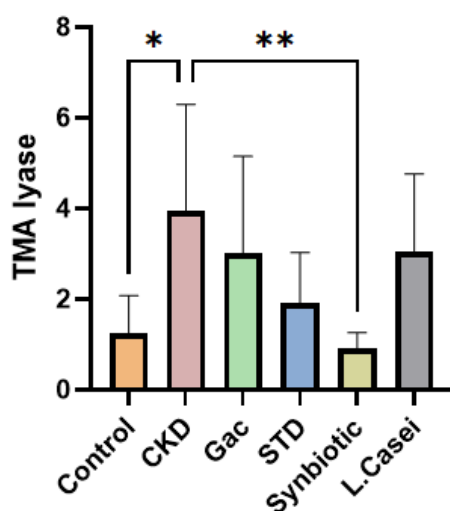


Figure 13 แสดงผลการแสดงออกของเอนไซม์ TMA Lyase

* แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ และ ** แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$

7. ผลการศึกษาสัดส่วนของน้ำหนักรูปร่างต่อน้ำหนักตัว

พบว่าหนูกลุ่ม CKD มีน้ำหนักรูปร่างที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control ในขณะที่พบว่าหนูกลุ่ม CKD ยังมีสัดส่วนของน้ำหนักรูปร่างต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ในกลุ่มการทดลองอื่นๆ ประกอบด้วย Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei พบสัดส่วนของน้ำหนักรูปร่างต่อน้ำหนักตัวที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม CKD ที่ p value 0.981, 0.889, 0.849 และ 0.586 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 14 A-B

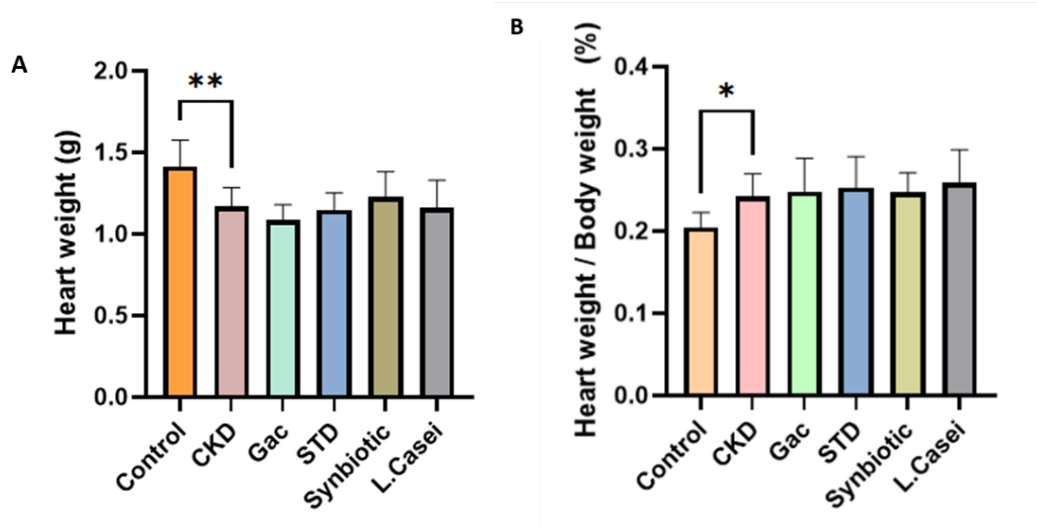


Figure 14 (A -B) แสดงน้ำหนักและสัดส่วนของน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัว

8. ผลขนาดเซลล์ cardiac myocyte ด้วยการย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin

จากศึกษาขนาดเซลล์ cardiac myocyte ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดหัว 40X ที่บริเวณหัวใจห้องล่างซ้ายที่ชั้น myocardium โดยมีเกณฑ์การวัดดังนี้ มองเห็นนิวเคลียสแบบชัดเจนอยู่ตรงบริเวณตรงกลาง ย้อมติดสีน้ำเงินและเป็นแบบ single นิวเคลียส, มีไมโทคอนเดรียล้อมรอบนิวเคลียส ย้อมติดสีชมพู และขอบเซลล์มีลักษณะชัดเจน โดยพบว่าขนาดของเซลล์ cardiac myocyte ทั้ง 6 กลุ่มการทดลองมีขนาดของเซลล์ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control ดังแสดงในภาพที่ 15 A-F

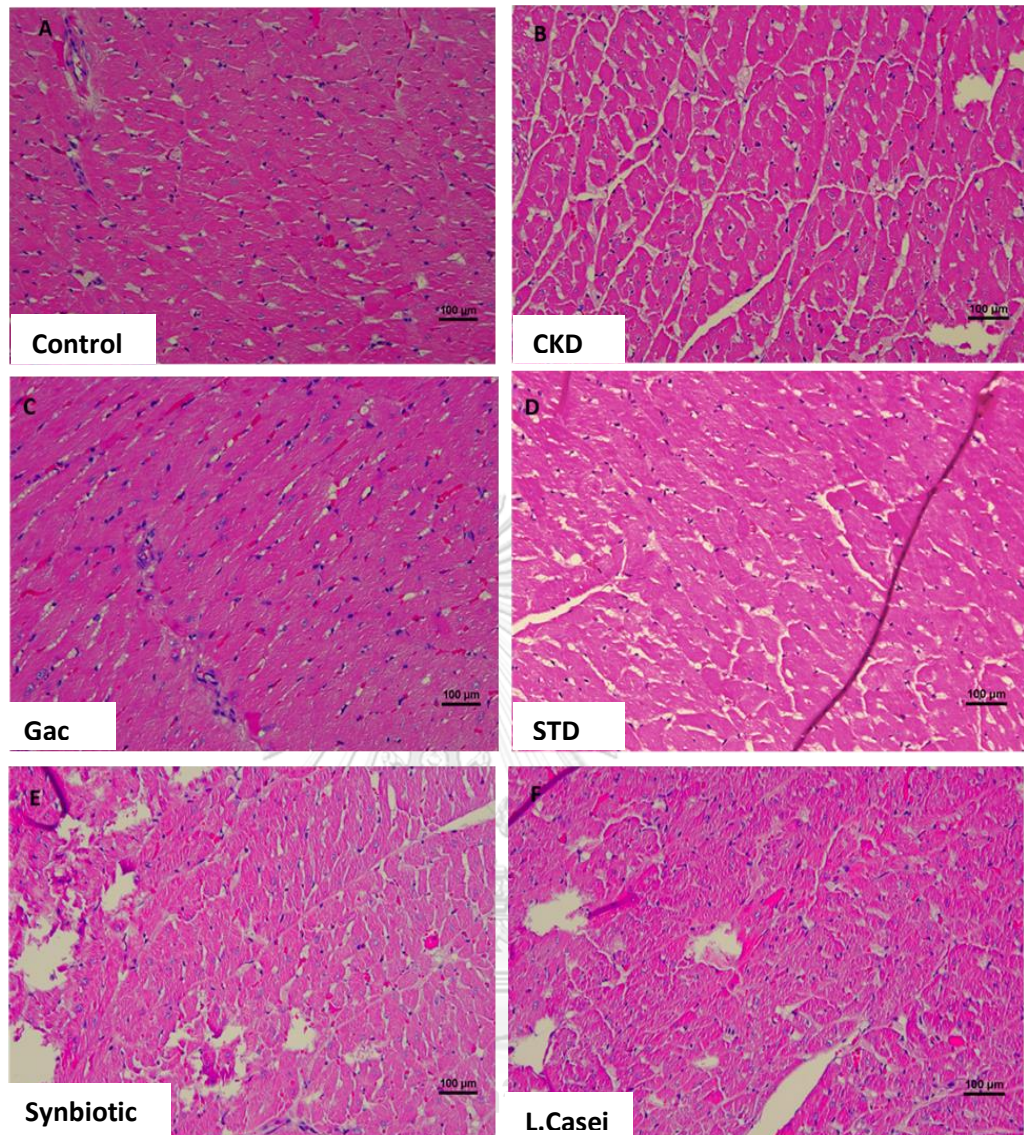


Figure 15 (A-F) แสดงขนาดเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin

9. ผล TMAO ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด vascular calcification

ผลการศึกษาหลอดเลือดบริเวณเอออร์ตาส่วนท้อง (Abdominal aorta) และส่วนโค้งเอออร์ติก (Aortic arch) โดยย้อมด้วยสี Von Kossa เพื่อศึกษาการสะสมของแคลเซียมบริเวณหลอดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาด 40X จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการสะสมของแคลเซียมที่เซลล์ผนังหลอดเลือดเอออร์ตาในหนูทดลองทุกกลุ่ม จากไม่พบการย้อมติดสี Von Kossa ดังแสดงในภาพที่ 16-17 A-F

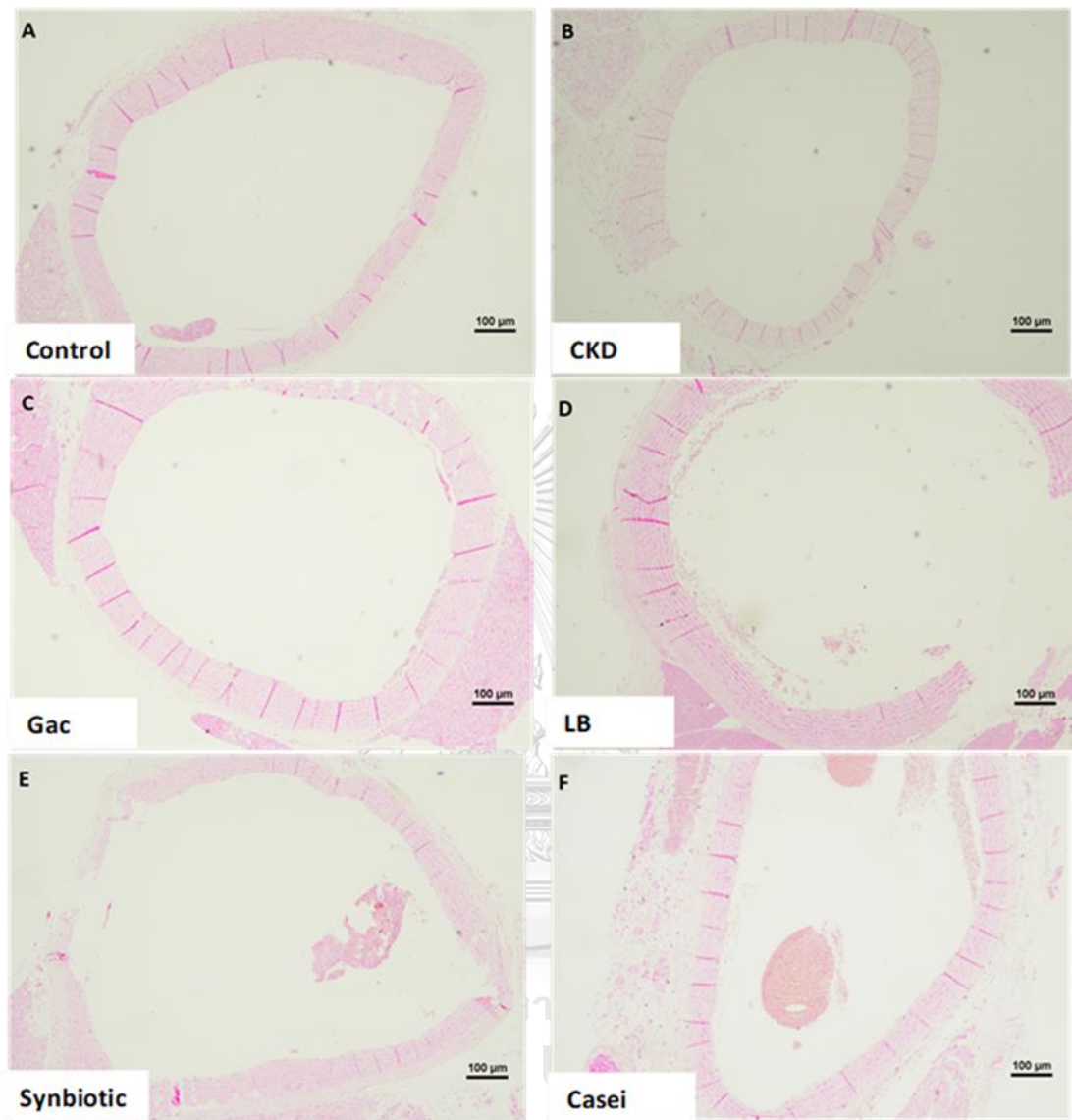


Figure 16 (A-F) แสดงผลหลอดเลือดบริเวณส่วนโค้งเอออร์ติก (Aortic arch)

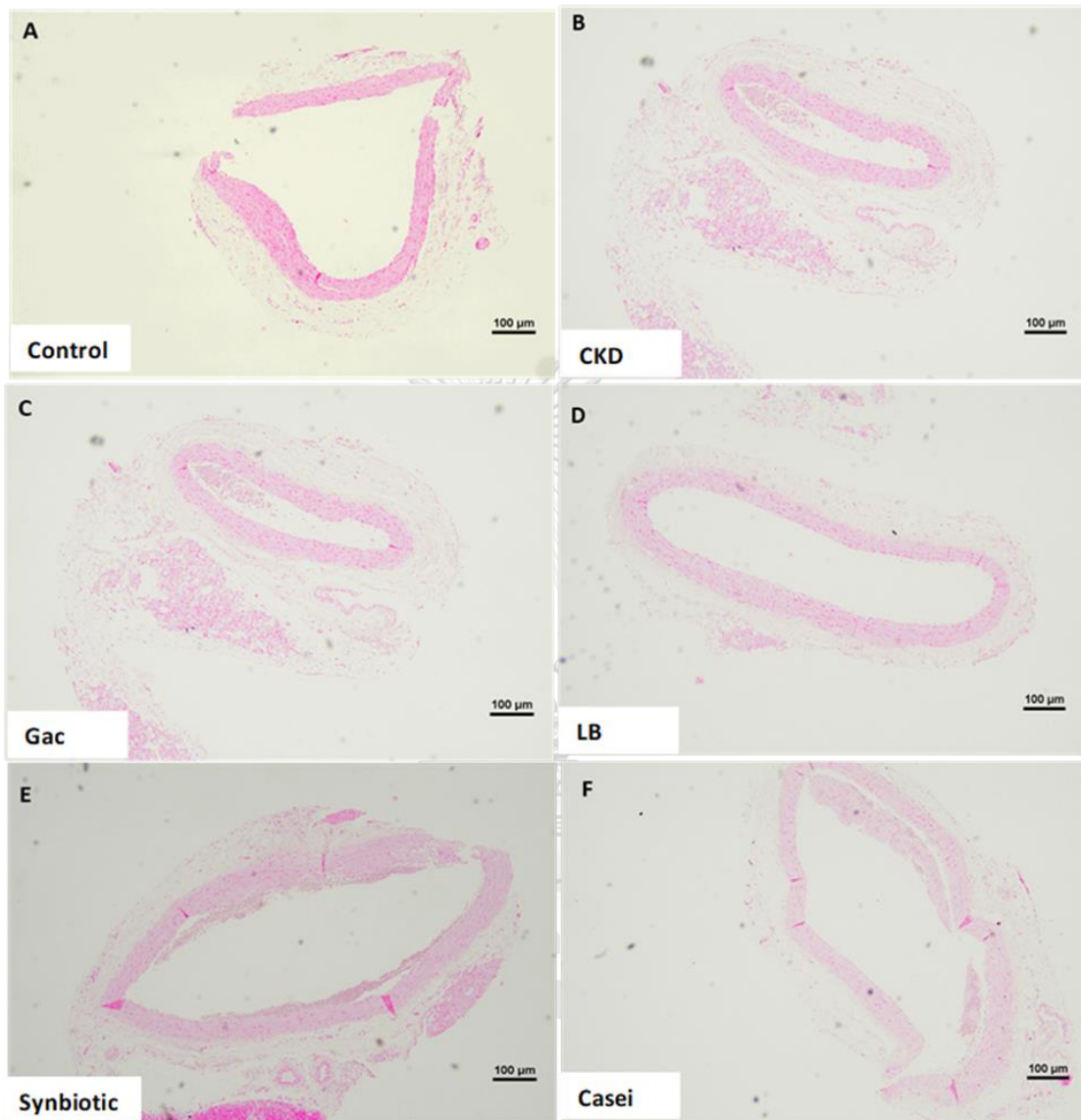


Figure 17 (A-F) แสดงผลหลอดเลือดบริเวณเออร์ตาส่วนท้อง (Abdominal aorta)

10. ผลพยาธิสภาพลำไส้ของสัตว์ทดลอง

ผลการศึกษาพยาธิสภาพของลำไส้ใหญ่ (colon) โดยดูการแสดงออกของโปรตีน zona occludens 1 (ZO-1) ซึ่งจะแสดงออกในบริเวณจำพวกเซลล์เยื่อบุผิวและบุผนังหลอดเลือด ด้วยหลักการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาด 40X พบว่าหนูทุกตัวในกลุ่มสารทดสอบ STD และ Synbiotic มีการแสดงออกของ ZO-1 ที่มากขึ้นอย่างชัดเจน โดยมีค่าการแสดงออกของ ZO-1 อยู่ที่ 75-100% (Grade 4) ในขณะที่ L.Casei และ Gac มีการแสดงออกของ ZO-1 รองลงมาตามลำดับ โดยมีค่าการแสดงออกของ ZO-1 อยู่ที่ 25-50% จนถึง 75-100% (Grade 2 ถึง Grade 4) ในขณะที่หนูกลุ่ม CKD พบว่ามีการแสดงออกของ ZO-1 ที่น้อยกว่ากลุ่มสารทดสอบอื่นๆ โดยมีค่าการแสดงออกส่วนใหญ่อยู่ที่ Less than 10 % จนถึง 50-75% (Grade 0 ถึง Grade 3) นอกจากนี้เมื่อติดตามผล ZO-1 ในหนูกลุ่ม Control พบว่ามีค่าการแสดงออกของ ZO-1 อยู่ที่ Less than 10% จนถึง 75-100%

Table 10 แสดงผลการประเมินการย้อมติด ZO-1 content ที่ลำไส้ส่วน colon ของสัตว์ทดลอง

Group	ZO-1 expression score	Grade
Control 1	Less than 25%	1
Control 2	Less than 10%	0
Control 3	50-75%	3
Control 4	75-100%	4
CKD 1	Less than 25%	1
CKD 2	50-75%	3
CKD 3	Less than 10 %	0
CKD 4	Less than 10 %	0
CKD 5	Less than 10 %	0
Gac 1	75-100%	4
Gac 2	25-50%	2
Gac 3	50-75%	3
Gac 4	75-100%	4
Gac 5	50-75%	3
Gac 6	50-75%	3
STD 1	75-100%	4
STD 2	75-100%	4
STD 3	75-100%	4
Synbiotic 1	75-100%	4
Synbiotic 2	75-100%	4
Synbiotic 3	75-100%	4
Synbiotic 4	75-100%	4
L.Casei 1	75-100%	4
L.Casei 2	75-100%	4
L.Casei 3	25-50%	2

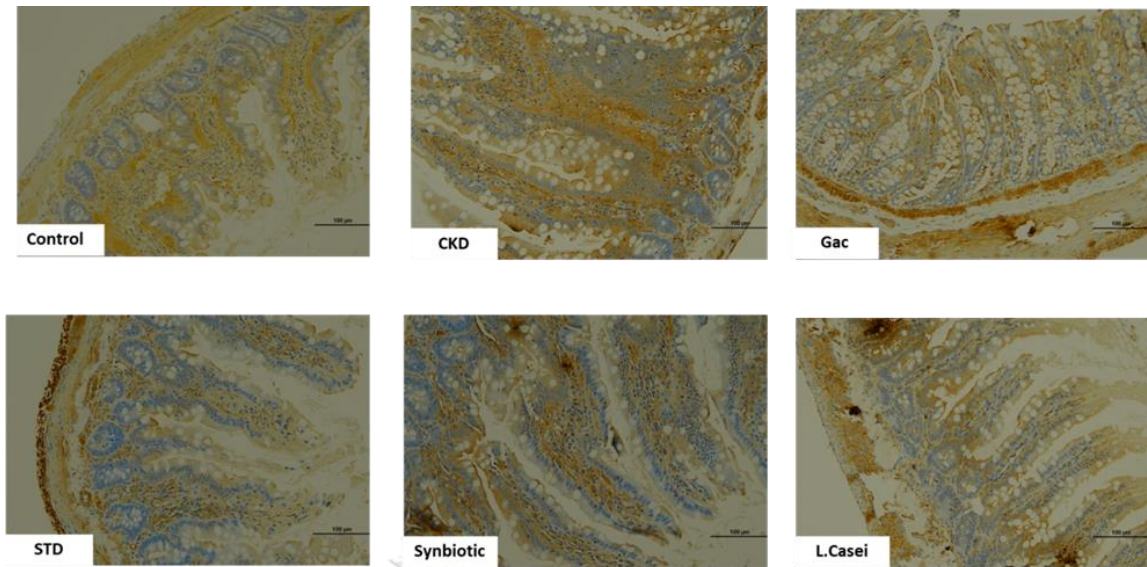


Figure 18 แสดงผลพยาธิสภาพลำไส้ส่วน colon ที่ย้อม ZO-1 ของสัตว์ทดลอง

11. ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (reads) ของยีน 16S rRNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนูทดลองบริเวณตำแหน่ง V3-V4 ของยีน 16S rRNA โดยการวิเคราะห์ข้อมูลของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม QIIME2 พบว่ามีจำนวน read depth อยู่ที่ประมาณ 40,000 (sequencing depth) และมี Interquartile Range อยู่ที่ 22624

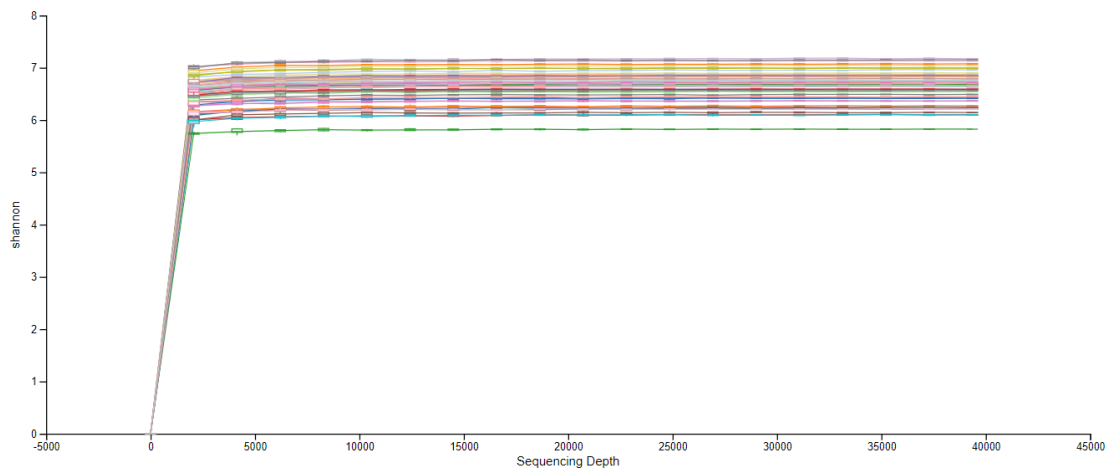
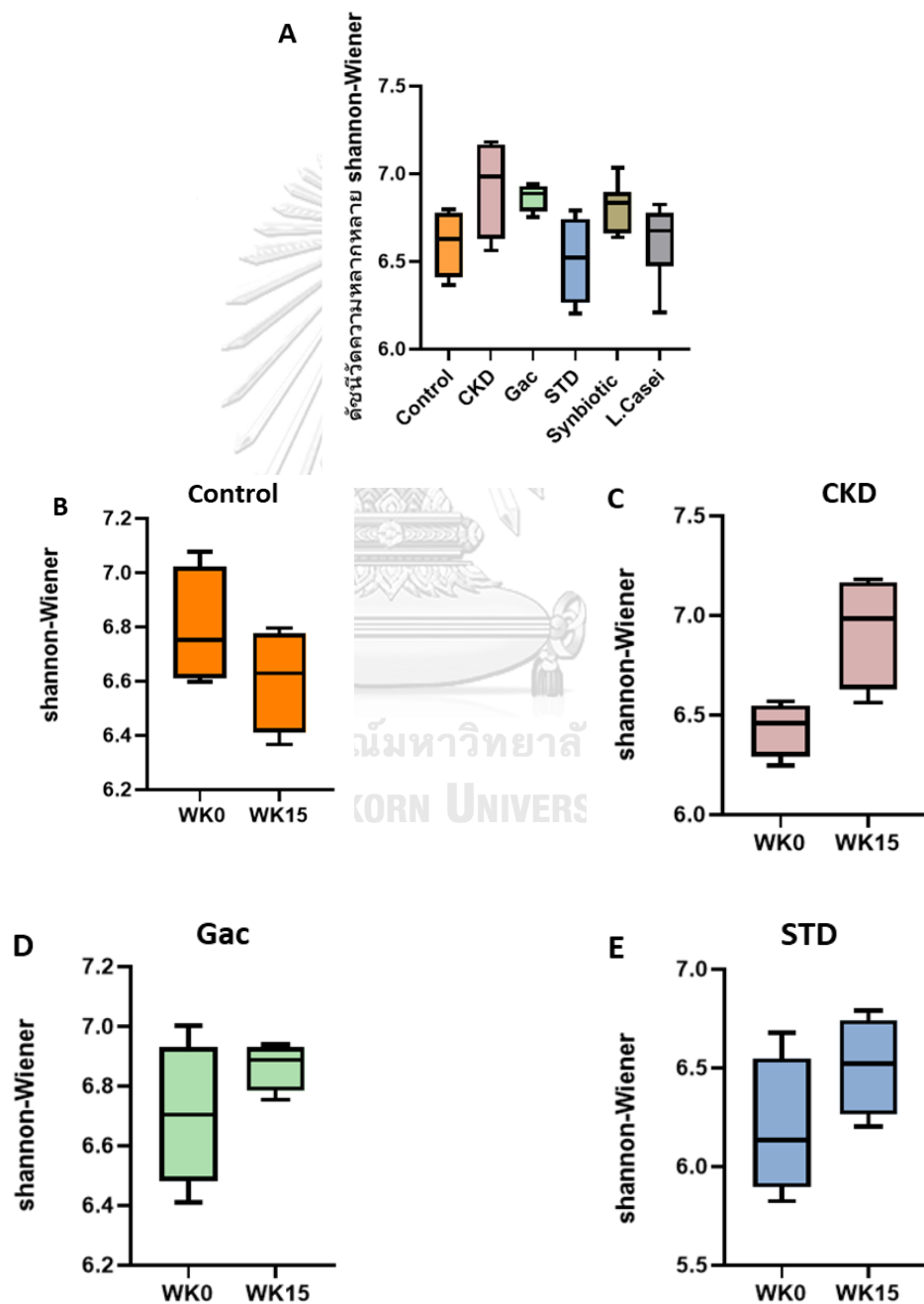


Figure 19 แสดงความลึกของนิวคลีโอไทด์สายสั้น (sequencing depth)

12. ผลความหลากหลายของแบคทีเรีย Shannon-Wiener (alpha-diversity)

ในสัปดาห์ที่ 15 พบว่าความหลากหลายของแบคทีเรียทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ Control, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control, กลุ่ม CKD และกลุ่มอื่น ๆ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 พบว่าความหลากหลายของแบคทีเรียในหนูทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ



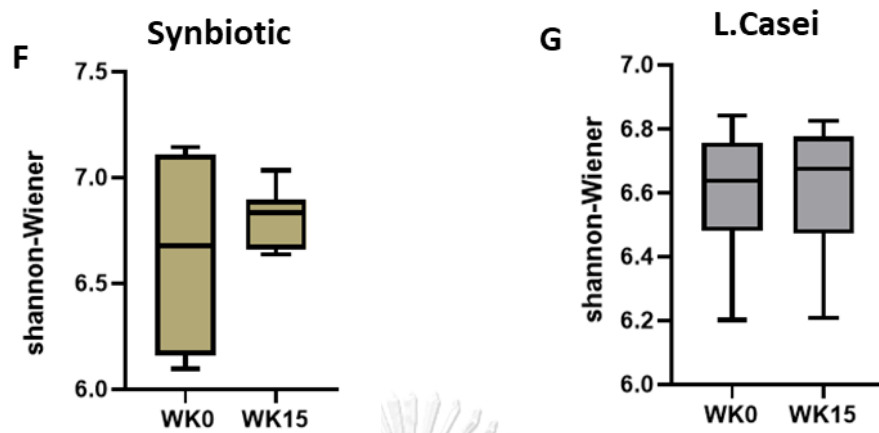
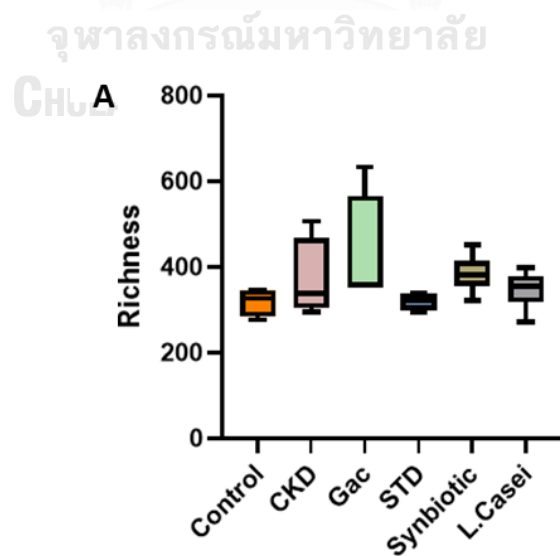


Figure 20 (A-G) แสดง Shannon - Wiener index

13. จำนวนชนิดของแบคทีเรียแต่ละชนิด (observed OUT; richness)

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียพบว่าในสัปดาห์ที่ 15 ในหนูกลุ่ม Control, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei พบว่าชนิดของแบคทีเรียไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่หนูกลุ่ม Synbiotic เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 พบว่าชนิดของแบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($p < 0.05$)



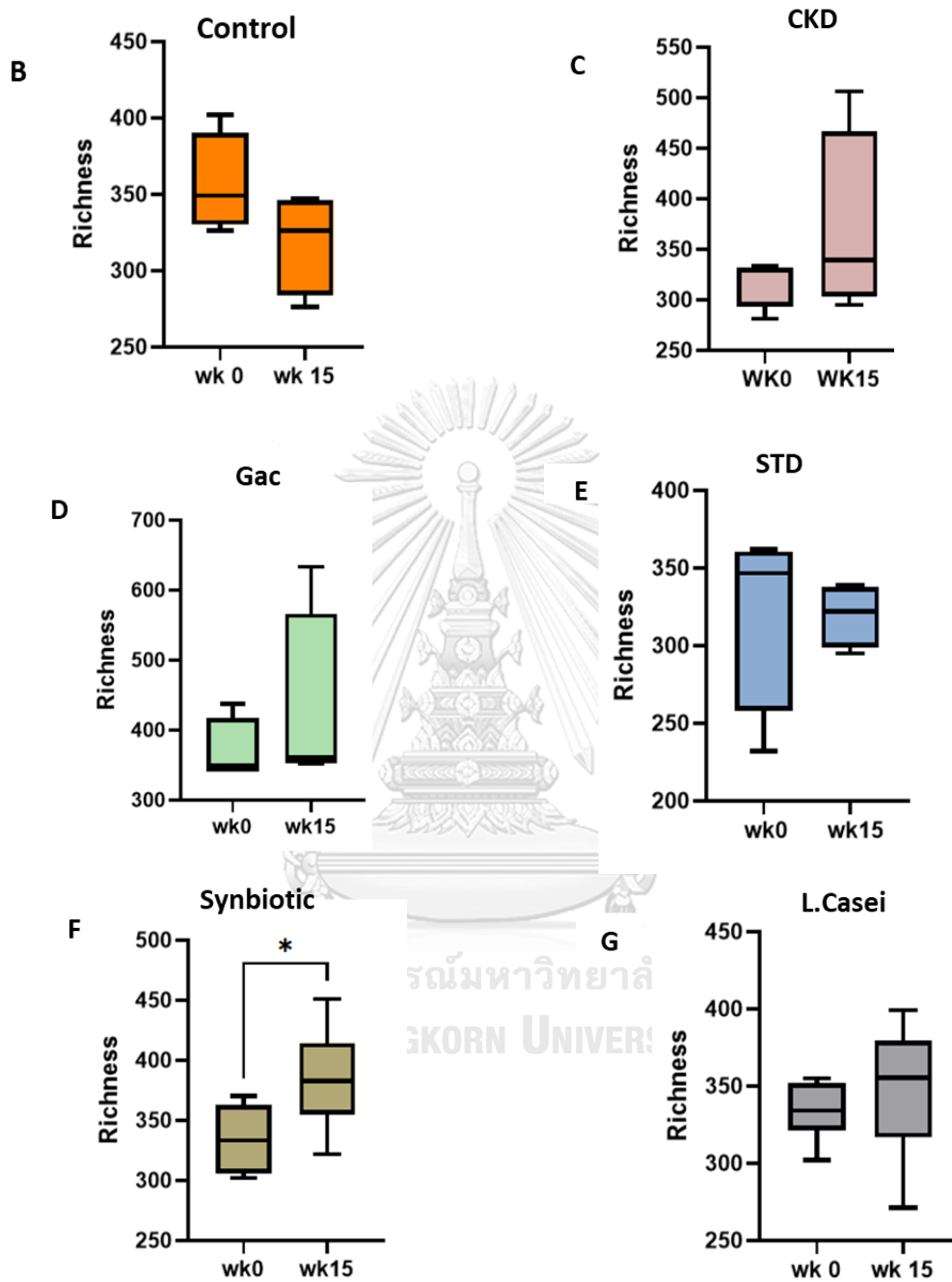
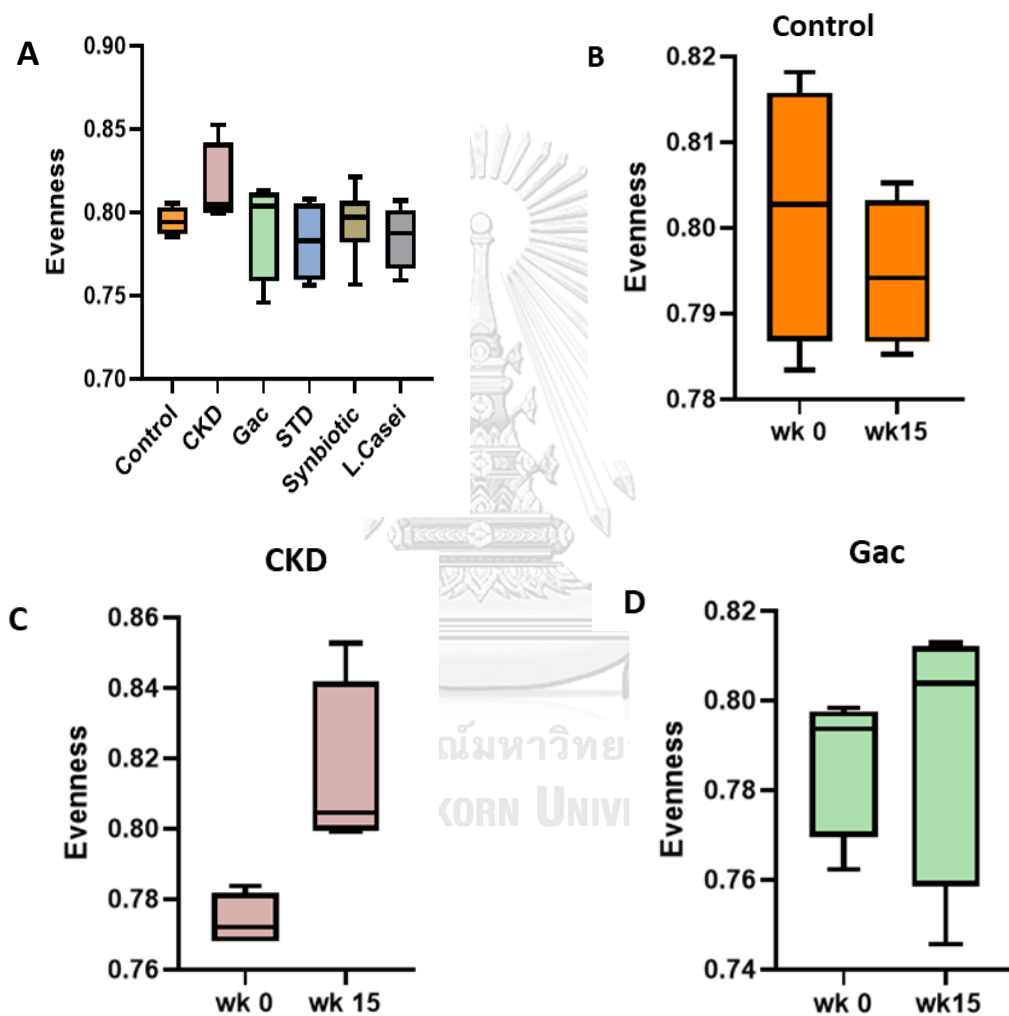


Figure 21(A-G) แสดงชนิดของแบคทีเรียแต่ละชนิด (observed OUT; richness)

* แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

14. ผลความสม่ำเสมอของชนิดแบคทีเรียแต่ละชนิด (Pielou's evenness; evenness)

เมื่อเปรียบเทียบความสม่ำเสมอของแบคทีเรียทั้ง 6 กลุ่มการทดลองพบว่าความสม่ำเสมอของแบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CKD ได้แก่ Control, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei และเมื่อเปรียบเทียบผลความสม่ำเสมอของแบคทีเรียระหว่างก่อนการได้รับสารทดสอบและหลังการได้รับสารทดสอบ พบว่าความสม่ำเสมอของแบคทีเรียในหนูทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



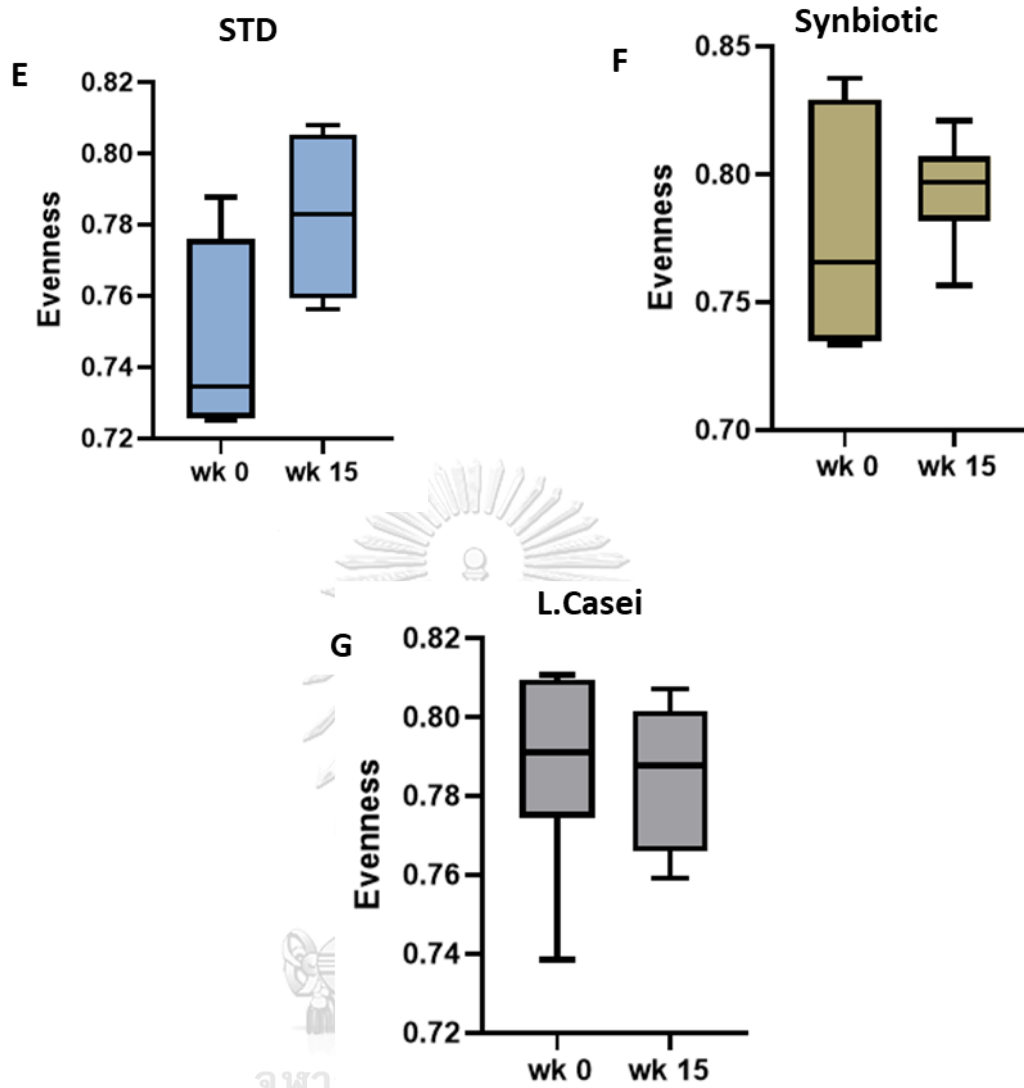


Figure 22 (A-G) แสดงความสม่ำเสมอของแบคทีเรียแต่ละชนิด (evenness)

15. ผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลอง (β -diversity)

15.1 Bray-Curtis

จากการศึกษาความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลอง โดยใช้หลักการการศึกษาค่าองค์ประกอบแกนหลัก (principal coordinate analysis; PCoA) ในการอธิบายความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ พบว่าชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ Control, CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ ($P < 0.001$) ดังแสดงในภาพ 23

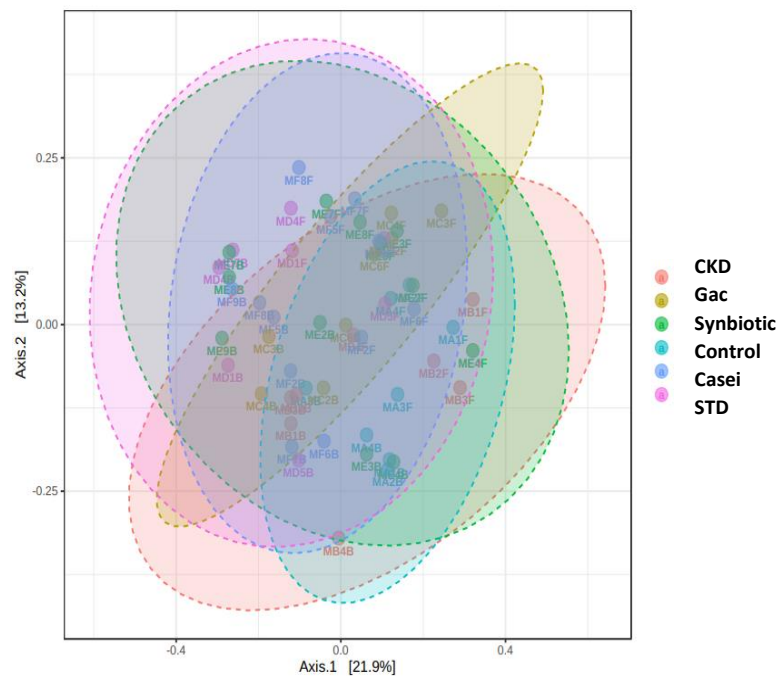


Figure 23 แสดงผล Bray-Curtis

15.2 Jaccard

พบว่าชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ทั้ง 6 กลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ ($P < 0.001$) ประกอบด้วย Control, CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ ($P < 0.001$) ดังแสดงในภาพ 24

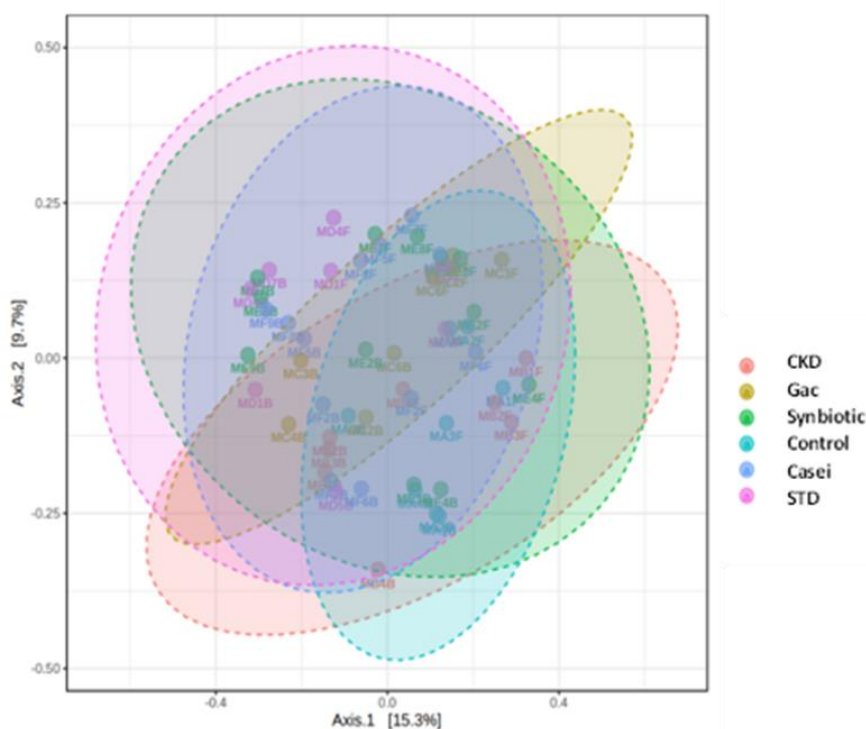


Figure 24 แสดงผล Jaccard

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

16. ผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลอง (β -diversity) ระหว่างก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15

16.1 Bray-Curtis

เมื่อเปรียบเทียบผลชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 พบว่าทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ Control, CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L. Casei มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ ($P < 0.001$) ดังแสดงในภาพ 25

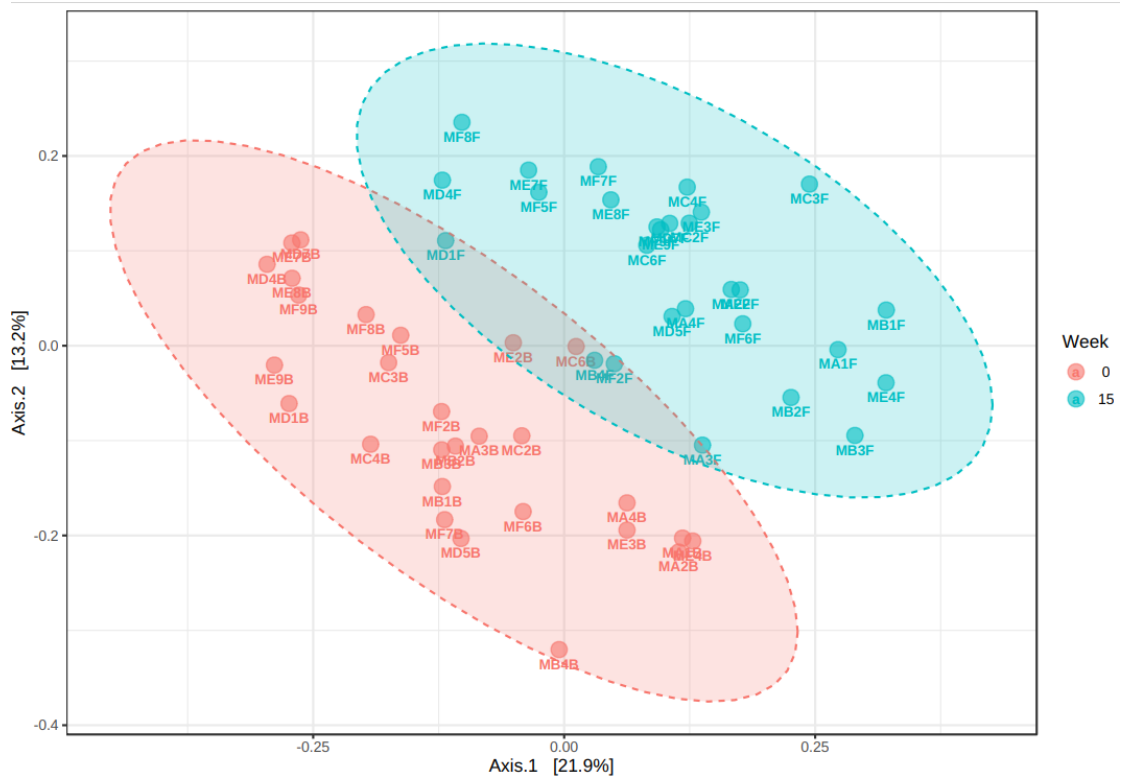


Figure 25 แสดงผล Bray-Curtis ของชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และ ภายหลังกการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15

Table 11 แสดงผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลอง (Bray-Curtis)

Control group	Compare group	Pseudo-F	P-value
CKD	Gac	2.2766	0.020*
	Synbiotic	2.3018	0.028*
	L.Casei	2.1450	0.011**
	STD	3.4214	0.005**
	Control	1.6876	0.064
Gac	Synbiotic	0.9912	0.423
	L.Casei	1.3652	0.144
	STD	1.9257	0.041*
	Control	2.4208	0.009**
Synbiotic	L.Casei	1.1621	0.267
	STD	1.4595	0.127
	Control	2.1121	0.011**
L.Casei	STD	1.4368	0.114
	Control	2.7168	0.002**
STD	Control	3.6556	0.002**

Table 12 แสดงผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลองระหว่างก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 (Bray-Curtis)

Control group	Compare group	Pseudo-F	P-value
CKD wk0	CKD wk15	4.285	0.030*
	Gac wk0	3.389	0.022*
	Gac wk15	5.735	0.034*
	Synbiotic wk 0	2.391	0.057
	Synbiotic wk 15	5.318	0.005**
	L.Casei wk 0	2.934	0.011*
	L.Casei wk 15	3.331	0.008**
	STD wk 0	3.299	0.028*
	STD wk 15	4.381	0.035*
	Control wk 0	4.107	0.035*
	Control wk 15	3.665	0.027*
CKD wk15	Gac wk 0	4.130	0.033*
	Gac wk 15	1.936	0.034*
	Synbiotic wk 0	3.291	0.024*
	Synbiotic wk 15	2.030	0.019**
	L.Casei wk 0	4.318	0.008**
	L.Casei wk 15	1.770	0.054
	STD wk 0	5.101	0.026*
	STD wk 15	2.797	0.070
	Control wk0	3.153	0.024*
	Control wk 15	1.288	0.217
Gac wk0	Gac wk 15	3.922	0.026*
	Synbiotic wk 0	1.384	0.185
	Synbiotic wk 15	3.285	0.006**
	L.Casei wk 0	1.576	0.099
	L.Casei wk 15	2.599	0.004**
	STD wk 0	2.055	0.076
	STD wk 15	2.629	0.030*
	Control wk 0	4.145	0.025*
	Control wk 15	3.397	0.038*
	Gac wk15	Synbiotic wk 0	3.069
Synbiotic wk 15		1.070	0.388
L.Casei wk 0		4.525	0.005**
L.Casei wk 15		1.196	0.244
STD wk 0		4.639	0.025*
STD wk 15		1.756	0.053
Control wk 0		4.166	0.033*
Control wk 15		1.827	0.055
Synbiotic wk0	Synbiotic wk 15	2.846	0.017**
	L.Casei wk 0	1.204	0.257
	L.Casei wk 15	1.953	0.027*
	STD wk 0	1.060	0.309

	STD wk 15	1.591	0.115
	Control wk 0	2.319	0.072
	Control wk 15	2.768	0.009**
Synbiotic wk15	L.Casei wk 0	4.416	0.003**
	L.Casei wk 15	1.173	0.272
	STD wk 0	4.718	0.006**
	STD wk 15	1.235	0.272
	Control wk 0	4.096	0.004**
	Control wk 15	1.604	0.040**
	L.Casei wk0	L.Casei wk 15	2.759
STD wk 0		1.378	0.166
STD wk 15		2.819	0.008**
Control wk 0		3.521	0.008**
Control wk 15		4.045	0.006**
L.Casei wk15	STD wk 0	2.756	0.007**
	STD wk 15	1.212	0.247
	Control wk 0	2.992	0.004**
	Control wk 15	1.733	0.014**
STD wk0	STD wk 15	2.351	0.020*
	Control wk 0	4.095	0.026*
	Control wk 15	4.022	0.032*
STD wk15	Control wk 0	4.216	0.024*
	Control wk 15	2.027	0.065
Control wk0	Control wk 15	2.737	0.040*

16.2 Jaccard

เมื่อเปรียบเทียบผลชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 พบว่าทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง พบว่าชีวนิเวศน์จุลินทรีย์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ ($P < 0.001$) ประกอบด้วย Control, CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ ($P < 0.001$) ดังแสดงในภาพ

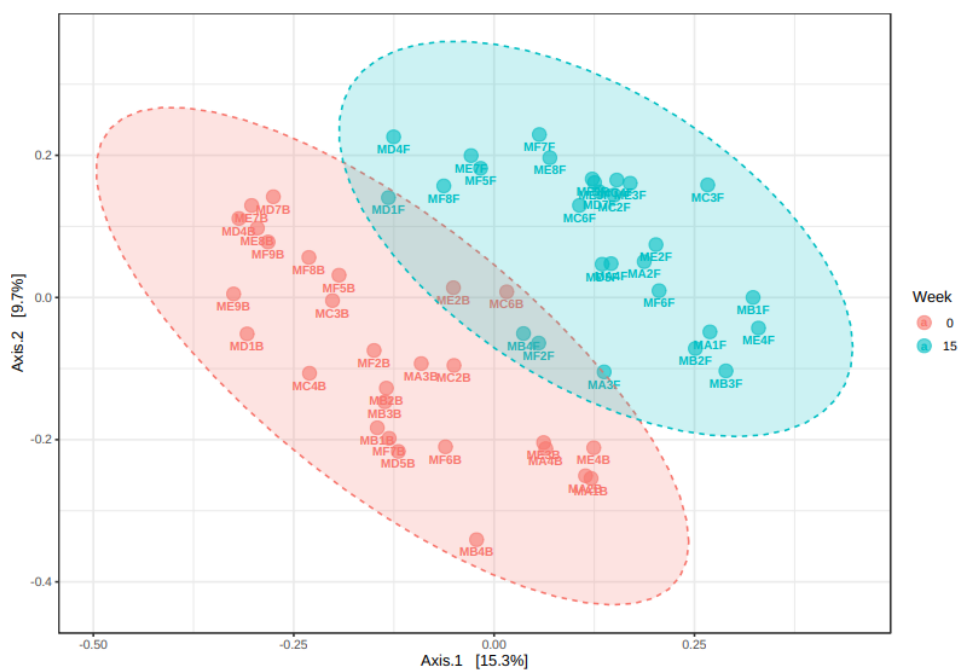


Figure 26 แสดงผล Jaccard ของชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15

Table 13 แสดงผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลอง (Jaccard)

Group 1	Group 2	Pseudo-F	P-value
CKD	Gac	1.617	0.068
	Synbiotic	1.777	0.031*
	L.Casei	1.867	0.022*
	STD	1.839	0.022*
	Control	2.058	0.017*
Gac	Synbiotic	1.285	0.163
	L.Casei	1.498	0.086
	STD	1.439	0.096
	Control	2.148	0.012
Synbiotic	L.Casei	1.461	0.086
	STD	1.502	0.080
	Control	2.042	0.015**
L.Casei	STD	1.519	0.066
	Control	2.510	0.002**
STD	Control	2.580	0.002**

Table 14 แสดงผลความแตกต่างชีวนิเวศน์จุลินทรีย์ระหว่างกลุ่มการทดลองระหว่างก่อนการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 0 และภายหลังการได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 (Jaccard)

Group 1	Group 2	Pseudo-F	P-value
CKD wk0	CKD wk 15	3.353	0.036*
	Gac wk 0	2.611	0.036*
	Gac wk 15	3.798	0.023*
	Synbiotic wk 0	2.257	0.019**
	Synbiotic wk 15	4.625	0.003**
	L.Casei wk 0	2.759	0.004**
	L.Casei wk 15	3.707	0.007**
	STD wk 0	2.360	0.024*
	STD wk 15	3.909	0.028*
	Control wk 0	3.736	0.028*
	Control wk 15	3.704	0.031*
CKD wk15	Gac wk 0	3.708	0.034*
	Gac wk 15	1.364	0.153
	Synbiotic wk 0	3.110	0.006**
	Synbiotic wk 15	1.702	0.006**
	L.Casei wk 0	3.949	0.007**
	L.Casei wk 15	1.620	0.053
	STD wk 0	3.561	0.035
	STD wk 15	1.822	0.024*
	Control wk 0	3.708	0.033*
	Control wk 15	1.556	0.035*
Gac wk0	Gac wk 15	3.579	0.038*
	Synbiotic wk 0	1.633	0.064
	Synbiotic wk 15	4.086	0.009**
	L.Casei wk 0	2.000	0.019*
	L.Casei wk 15	3.461	0.008**
	STD wk 0	1.855	0.037*
	STD wk 15	3.568	0.028*
	Control wk 0	3.237	0.033*
	Control wk 15	3.821	0.029*
Gac wk15	Synbiotic wk 0	3.310	0.015**
	Synbiotic wk 15	1.503	0.011**
	L.Casei wk 0	4.216	0.006**
	L.Casei wk 15	1.512	0.026*
	STD wk 0	3.657	0.030*
	STD wk 15	1.712	0.028*
	Control wk 0	3.953	0.033*
	Control wk 15	1.964	0.032*
Synbiotic wk0	Synbiotic wk 15	3.701	0.007**
	L.Casei wk 0	1.763	0.055*
	L.Casei wk 15	3.368	0.003**
	STD wk 0	1.581	0.076

	STD wk 15	2.891	0.005**
	Contro wk 0	2.313	0.025*
	Control wk 15	3.314	0.006**
Synbiotic wk15	L.Casei wk 0	4.982	0.002**
	L.Casei wk 15	1.339	0.131
	STD wk 0	4.552	0.009**
	STD wk 15	2.035	0.007**
	Control wk 0	4.654	0.004**
	Control wk 15	2.034	0.007**
	L.Casei wk0	L.Casei wk 15	3.921
STD wk 0		1.752	0.053
STD wk 15		3.695	0.006**
Control wk 0		3.453	0.004**
Control wk 15		4.314	0.009**
L.Casei wk15	STD wk 0	3.829	0.003**
	STD wk 15	1.825	0.012**
	Control wk 0	3.910	0.009**
	Control wk 15	1.972	0.013**
STD wk0	STD wk 15	3.330	0.022*
	Control wk 0	3.154	0.034*
	Control wk 15	3.934	0.034*
STD wk15	Control wk 0	4.563	0.030*
	Control wk 15	2.151	0.024*
Control wk0	Control wk 15	3.419	0.036*

17. ผลเปรียบเทียบร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัม

การเปรียบเทียบร้อยละ ของแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15 ในระดับไฟลัม

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบร้อยละ ของแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15 พบว่ามีการลดลงของไฟลัม *Actinobacteriota* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในกลุ่มหนู Synbiotic ภายหลังจากได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 แต่ในขณะเดียวกันพบการเพิ่มขึ้นของไฟลัม *Desulfobacterota*, *Patescibacteria* และ *Campylobacteria* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในหนูกลุ่ม Synbiotic ส่วนกลุ่ม L.Casei พบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ของไฟลัม *Campylobacteria* เช่นเดียวกัน

Table 15 แสดงผลร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียที่ลดลงระดับไฟลัมในแต่ละกลุ่มในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Treatment group	phylum	Median (IQR) Post-treatment wk 0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
Synbiotic	<i>Actinobacteriota</i>	0.834 (0.50)	0.470 (0.13)	0.028*

Table 16 แสดงผลร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นระดับไฟลัมในแต่ละกลุ่มในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Treatment group	phylum	Median (IQR) Post-treatment wk 0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
Synbiotic	<i>Desulfobacterota</i>	0.050 (0.10)	0.339 (0.43)	0.028*
	<i>Patescibacteria</i>	0.143 (0.12)	0.359 (0.19)	0.028*
	<i>Campylobacteria</i>	0.015 (0.13)	0.344 (0.42)	0.028*
L.Casei	<i>Campylobacterota</i>	0.019 (0.04)	0.363 (0.24)	0.028*

18. การเปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียระหว่างกลุ่มในระดับไฟลัม

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบร้อยละ ของแบคทีเรียระหว่างกลุ่มสารทดสอบและกลุ่มไตวายเรื้อรังในระดับไฟลัมระหว่างสัปดาห์ที่ 15 พบว่ามีการลดลงของไฟลัม *Actinobacteriota* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในกลุ่ม Control และกลุ่ม Synbiotic เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CKD ในขณะเดียวกันก็พบการเพิ่มขึ้นของไฟลัม *Desulfobacterota* และ *Elusimicrobiota* ในกลุ่ม Gac ($P < 0.05$) นอกจากนี้เมื่อติดตามผลกลุ่ม STD พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ *Desulfobacterota*, *Elusimicrobiota* และ *Verrucomicrobiota* ($P < 0.05$) นอกจากนี้กลุ่ม Synbiotic ก็พบการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียจำพวกไฟลัม *Desulfobacterota* และ

Campylobacterota ($P < 0.05$) และกลุ่มสุดท้าย *L.Casei* พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของไฟลัม *Verrucomicrobiota* และ *Campylobacterota* ($P < 0.05$)

Table 17 แสดงผลเปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียในไฟลัมที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และกลุ่มสารทดสอบ

Treatment group	Relative abundance (phylum)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (Control, Synbiotic)	P value
CKD vs Control	<i>Actinobacteriota</i>	-0.062 (0.53)	-0.226 (0.38)	0.043*
CKD vs Synbiotic	<i>Actinobacteriota</i>	-0.062 (0.53)	-0.377 (0.43)	0.011*

Table 18 แสดงผลร้อยละของแบคทีเรียในไฟลัมที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CKD ระหว่างกลุ่ม CKD และกลุ่มสารทดสอบ

Treatment group	Relative abundance (phylum)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (Gac, STD, Synbiotic, L.Casei)	P value
CKD vs Gac	<i>Desulfobacterota</i>	-0.367 (0.47)	0.204 (0.59)	0.021*
	<i>Elusimicrobiota</i>	0.020 (1.21)	2.464 (3.31)	0.043*
CKD vs STD	<i>Verrucomicrobiota</i>	-0.7660(1.11)	0.296 (1.05)	0.021*
	<i>Desulfobacterota</i>	-0.367 (0.47)	0.336 (1.50)	0.021*
	<i>Elusimicrobiota</i>	0.020 (1.21)	0.027 (1.56)	0.021*
CKD vs Synbiotic	<i>Desulfobacterota</i>	-0.367 (0.47)	0.275 (0.36)	0.011*
	<i>Campylobacterota</i>	0.014 (0.14)	0.283 (0.44)	0.033*
CKD vs L.Casei	<i>Campylobacterota</i>	0.014 (0.14)	0.357 (0.24)	0.011*

19. ผลเปรียบเทียบร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุล

19.1 การเปรียบเทียบร้อยละ ของแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15 ในระดับสกุล

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบร้อยละ ของแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15 พบว่ามีการลดลงของสกุล *Lachnospiraceae_NK4A136_group* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในกลุ่มหนู Synbiotic ภายหลังจากได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 แต่ในขณะเดียวกันพบการลดลงของแบคทีเรียสกุล *Prevotellaceae_NK3B31_group* และ *Lachnospiraceae_NK4A136_group* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในหนูกลุ่ม L.Casei แต่อย่างไรก็ตามก็พบการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียจำพวกสกุล *UCG005*, *Ruminococcus*, *Gastranaerophilales* และ *Acetitomaculum* ในกลุ่ม Synbiotic ในขณะที่กลุ่ม L.Casei ก็พบการเพิ่มขึ้นของสกุล *UCG005* เช่นเดียวกัน ($P < 0.05$)

Table 19 แสดงผลร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียที่ลดลงระดับสกุลในแต่ละกลุ่มในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Treatment group	Phylum	Genus	Median (IQR) Post-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
Synbiotic	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	2.253 (3.38)	0.684 (1.01)	0.046*
L.Casei	<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	5.194 (4.26)	0.498 (2.68)	0.028*
	<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	2.289 (1.69)	0.644 (1.19)	0.046*

Table 20 แสดงผลร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นระดับสกุลในแต่ละกลุ่มในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Treatment group	Phylum	Genus	Median (IQR) Post-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
Synbiotic	<i>Firmicutes</i>	<i>UCG005</i>	2.238 (1.94)	4.907 (3.45)	0.028*
	<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i>	1.727 (1.85)	3.727 (2.68)	0.028*
	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Gastranaerophilales</i>	0.655 (0.57)	1.305 (0.65)	0.046*
	<i>Firmicutes</i>	<i>Acetitomaculum</i>	0.559 (0.45)	1.471 (1.84)	0.046*
L.Casei	<i>Firmicutes</i>	<i>UCG005</i>	1.397 (2.25)	4.118 (1.06)	0.028*

19.2 การเปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียระหว่างกลุ่มการทดลองในระดับสกุล

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบร้อยละของแบคทีเรียระหว่างกลุ่มในระดับสกุลในสัปดาห์ที่ 15 พบว่ามีการลดลงของแบคทีเรีย *Muribaculaceae*, *Colidextribacter* และ *UCG008* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่ม Control และกลุ่ม CKD ในขณะที่เดียวกันก็พบการเพิ่มขึ้นของสกุล *Bacteroides* และ *Phascolarctobacterium* ในกลุ่ม Control และ *Gac* ($P < 0.05$) นอกจากนี้ในกลุ่มสารทดสอบ STD ก็พบการเพิ่มขึ้นของ *Bacteroides*, *Prevotellaceae_NK3B31_group* และ *Akkermansia* ($P < 0.05$) ในขณะที่กลุ่ม Synbiotic พบการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียจำพวกสกุล *Bacteroides* และ *Prevotellaceae_NK3B31_group* ($P < 0.05$) และกลุ่มสุดท้าย L.Casei พบการเพิ่มขึ้นของสกุล *Bacteroides* ($P < 0.05$)

Table 21 แสดงผลร้อยละ ของแบคทีเรียในสกุลที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และกลุ่ม สารทดสอบ

Treatment group	Phylum	Genus	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (Control)	P value
CKD vs Control	<i>Bacteroidota</i>	<i>Muribaculaceae</i>	2.355 (7.24)	-2.310 (6.05)	0.021*
	<i>Firmicutes</i>	<i>Colidextribacter</i>	0.829 (2.90)	0.716 (0.81)	0.043*
	<i>Firmicutes</i>	<i>UCG008</i>	0.379 (0.80)	-0.071 (0.49)	0.021*

Table 22 แสดงผลร้อยละของแบคทีเรียในสกุลที่เพิ่มเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และกลุ่ม สารทดสอบ

Treatment group	Phylum	Genus	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (Control, Gac, STD, Synbiotic, L.Casei)	P value
CKD vs Control	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	0.851 (1.39)	0.021*
	<i>Firmicutes</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>	-0.346 (2.25)	1.098 (2.08)	0.021*
CKD vs Gac	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	-0.376 (0.19)	0.021*
	<i>Firmicutes</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>	-0.346 (2.25)	1.098 (2.08)	0.021*
CKD vs STD	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	-0.191 (0.59)	0.021*
	<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-6.089 (2.67)	-2.949 (4.05)	
	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Akkermansia</i>	-0.780 (1.11)	0.296 (1.05)	0.021*
CKD vs Synbiotic	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	-0.027 (1.41)	0.011*
	<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-6.089 (2.67)	0.221 (3.19)	0.019*
CKD vs L.Casei	<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	-0.090 (1.28)	0.011*

20. ผลความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีเอตินินและปริมาณร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุล (relative abundance)

พบว่าระดับค่าครีเอตินินสัมพันธ์เชิงลบกับค่าร้อยละของแบคทีเรียในแบคทีเรียสกุล *Acetitomaculum* โดยมีค่า Correlation coefficient -0.552 และ P value 0.002 ดังแสดงในตาราง (ภาคผนวก)

21. ผลความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และค่าร้อยละในระดับสกุลของหนูกุ่ม Synbiotic (relative abundance)

ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มทดลอง Synbiotic ภายหลังจากได้รับสารทดสอบในสัปดาห์ที่ 15 พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับค่า TMAO กับค่าร้อยละของแบคทีเรียในแบคทีเรียสกุล *Lachnospiraceae_NK4A136_group* โดยมีค่า Correlation coefficient 0.886 และ p= 0.002

ในขณะที่สัปดาห์ที่ 0 ก่อนการได้รับสารทดสอบไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับค่าTMAO กับค่า
ร้อยละของแบคทีเรียในแบคทีเรีย ดังแสดงในตาราง (ภาคผนวก)



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

ปัจจุบันโรคไตเรื้อรังวายเรื้อรัง (chronic kidney disease) ส่งผลกระทบต่อผู้คนนับล้านทั่วโลกและสำหรับผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเพิ่มความเสี่ยงในการเหนี่ยวนำไปเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (48) เนื่องจากภาวะไตวายเรื้อรังจะส่งผลทำให้การขับถ่ายของเสียหรือสารพิษออกจากร่างกายลดประสิทธิภาพลงจนนำไปสู่ภาวะการคั่งของของเสีย ส่งผลทำให้เกิดภาวะการทำงานที่ผิดปกติของหัวใจและนำไปสู่การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจในที่สุด เช่น ภาวะหลอดเลือดแข็ง หรือภาวะหัวใจล้มเหลว เป็นต้น (49)

การอภิปรายผลสุขภาพโดยทั่วไปของสัตว์ทดลอง

จากผลการศึกษาเมื่อเหนี่ยวนำไปสัตว์ทดลองเป็นโรคไตวายเรื้อรังด้วยการฉีด Cisplatin เข้าทางช่องท้อง 4 mg/kg จากนั้นเฝ้าติดตามระดับน้ำหนักร่างกายของสัตว์ทดลองพบว่าหนูทุกกลุ่มของสารทดสอบมีน้ำหนักตัวที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L.Casei เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่าภายหลังการเหนี่ยวนำไปหนูให้เป็นไตวายเรื้อรังหนูทดลองมีสุขภาพที่แย่งตามลำดับ

การอภิปรายผลระดับค่าครีอะตินินในเลือด (Creatinine)

เมื่อติดตามระดับค่าครีอะตินิน ในเลือดพบว่าทั้ง 6 กลุ่มสารทดสอบ ได้แก่ CKD, Gac, STD, Synbiotic และ L. Casei พบว่ามีระดับค่า Cr เพิ่มขึ้นประมาณสามเท่าจากหนูกลุ่ม Control (50) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการฉีด Cisplatin เข้าทางช่องท้องสามารถไปกระตุ้นสัญญาณต่างๆ ที่เกี่ยวกับกลไกการตายของเซลล์ เช่น กระตุ้น MAPK, p53, ROS และ cytoprotective (p21) และยังไปกระตุ้นการสร้าง TNF- α ภายในท่อไตซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบและตาย และสามารถเหนี่ยวนำไปเกิดการอักเสบของหลอดเลือดที่ไตซึ่งอาจนำไปสู่การเป็นการขาดเลือดบริเวณท่อไต (ischemic tubular cell death) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นสาเหตุของการนำไปสู่ภาวะไตอักเสบเฉียบพลัน (51) ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่ามีผลสอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้า เนื่องจากการได้รับ cisplatin จะเหนี่ยวนำไปเกิดภาวะไตอักเสบเฉียบพลันและสามารถพัฒนาไปเป็นไตวายเรื้อรังได้ (52) เช่น การฉีด cisplatin เข้าทางช่องท้อง 5 mg/kg และติดตามผลอีก 20 วัน พบว่าเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง ได้แก่ การเกิดพังผืด (interstitial fibrosis) และการฝ่อของท่อไตฝ่อ (tubular atrophy) (53) นอกจากนี้มีงานวิจัยของคุณ Diwan V และคณะ ในปี 2018 (54) ที่ศึกษาในสัตว์ทดลองรายงานว่า การให้ 0.25% adenine หรือ 155.4 \pm 2.6 mg/kg ต่อวัน เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าสามารถเหนี่ยวนำไปเกิดไตวายเรื้อรังร่วมกับการเกิดโรคหัวใจ โดยพบการเพิ่มขึ้นของระดับค่า BUN, Cr, Uric acid และ Proteinuria รวมถึงพบการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิต ที่ส่งผล

ให้เกิดการโตขึ้นของหัวใจห้องล่างซ้าย (ventricular hypertrophy) การเกิดพังผืดที่เหนียวนำไปเกิด left ventricular stiffness ยิ่งไปกว่านั้นโมเดล 0.25% adenine พบว่าเป็นโมเดลที่มีความใกล้เคียงกับการนำมาใช้อธิบายกลไกการเกิดไตวายเรื้อรังในคน

การอภิปรายผลระดับค่าไลโคปีน (Lycopene) และเบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) ในเลือด

จากผลการศึกษาในระดับค่าไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในเลือด พบว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มสารทดสอบ Gac, STD และ Synbiotic เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้พบปัญหาสองประเด็นหลักๆ ได้แก่ กระบวนการและขั้นตอนในการสกัดสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนจากผักขาวบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด เนื่องจากภายในห้องปฏิบัติการใช้ตัวทำละลายประเภทเฮกเซนในการสกัดสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนจากเยื่อหุ้มเมล็ดของผักขาว ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการการระเหยเฮกเซนออกจากตัวอย่าง ก่อนการนำสารสกัดไปใช้จริงกับสัตว์ทดลอง ซึ่งขั้นตอนนี้เองทางห้องปฏิบัติการยังไม่พบวิธีการที่เหมาะสมในการกำจัดเฮกเซนออกจากสารสกัดได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้มีความกังวลเรื่องความปลอดภัยของสัตว์ทดลองเนื่องจาก การได้รับสาร n-hexane เป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดความบกพร่องของเส้นประสาทส่วนปลายอย่างร้ายแรง (55) ดังนั้นทางทีมวิจัยจึงตัดสินใจส่งสารสกัดผักขาวจากห้องตลาดที่ใช้วิธีสกัดด้วยน้ำมาใช้แทนการสกัดด้วยเฮกเซน แต่ปัญหาที่พบ คือสารสกัดผักขาวจากห้องตลาดไม่ได้ใช้ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดในการสกัดแต่ใช้ส่วนของผลผักขาวในการสกัด ซึ่งอาจส่งผลทำให้ได้ปริมาณสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนไม่เพียงพอ ประเด็นที่สองสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ เมื่อสกัดออกมาแล้วจะถูกขึ้นรูปในลักษณะผง ดังนั้นจำเป็นต้องนำไปละลายในตัวทำละลายประเภทสารกลุ่มอินทรีย์ ได้แก่กลุ่ม คลอโรฟอร์ม เฮกเซน เบนซีน เมทิลีน คลอไรด์ และอะซิโตน รวมถึงยังสามารถละลายได้เล็กน้อยในตัวทำละลาย เมธานอลหรือเอทานอล (40) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ใช้น้ำเปล่าเป็นตัวทำละลาย ทำให้ใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานในการละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและต้องใช้ตัวแม่เหล็กเป็นตัวช่วยในการละลาย ซึ่งครั้งหน้าอาจต้องใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมและปลอดภัยต่อสัตว์ทดลองมากกว่านี้

การอภิปรายผล Trimethylamine-lyase (CutC) , Trimethylamine (TMA) และ Trimethylamine N-oxide (TMAO)

ปัจจุบันมีการศึกษาที่พบว่า TMAO มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในมนุษย์ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการลดลงของเอนไซม์ trimethylamine-lyase (CutC) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับสาร trimethylamine (TMA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต TMAO โดยเริ่มจากการได้รับสารอาหารจำพวกโคลีน เช่น ไข่แดง นม และโยเกิร์ต จากนั้นอาศัยเอนไซม์ CutC ที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในลำไส้จำพวก *Firmicutes*, *Actinobacteria*, และ *Proteobacteria* ซึ่งการจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าหนูกลุ่ม Synbiotic มีการแสดงออกของ CutC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบการลดลงของไฟลัม *Actinobacteriota* นอกจากนี้ก็พบว่ากลุ่มสารทดสอบอื่นๆ ได้แก่ Gac,

STD, *L. Casei* ก็พบว่าระดับ CutC มีแนวโน้มลดลง แต่ในขณะที่กลุ่ม CKD พบการเพิ่มขึ้นของ เอนไซม์ TMA lyase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อติดตามระดับค่า TMAO พบว่าหนูในกลุ่ม Synbiotic พบว่ามีระดับ TMAO ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นอาจช่วยสามารถยืนยันได้ว่าการได้รับสารทดสอบจำพวก *Bifidobacterium longum* และ *Lactobacillus salivarius* มีผลช่วยลดระดับค่า TMAO ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของคุณ Wang และคณะในปี 2022 ที่พบว่า การเสริมโพรไบโอติกชนิด *Bifidobacterium breve* Bb4 และ *Bifidobacterium longum* BL1 และ BL7 สามารถช่วยลดระดับ TMAO ในเลือดรวมถึงสามารถลดระดับความเข้มข้นของ TMA ภายในลำไส้ (cecal trimethylamine concentrations) (46) อย่างไรก็ตามทั้งนี้หนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดฟักข้าว (Gac) ได้รับสารสกัดมาตรฐานไลโคปีนและเบต้าแคโรทีน (STD) และหนูในกลุ่มที่ได้รับ *Lactobacillus Casei* (*L. Casei*) ก็พบว่า มีแนวโน้มการลดลงของระดับค่า TMAO เช่นกัน ซึ่งประเด็นนี้ผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่าถ้ามีการเพิ่มจำนวนสัตว์ทดลองให้มากขึ้นอาจส่งผลทำให้กลุ่มสารทดสอบอื่นๆ มีระดับ TMAO ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้านี้ รายงานว่าสารสกัดไลโคปีนสามารถช่วยลดระดับ TMAO ได้มากถึง 31 % ในหนูที่มีไขมันสูง (56)

การอภิปรายผลน้ำหนักหัวใจ (Body weight) น้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัว (Heart weight/Body weight ratio) และขนาดเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac myocyte)

จากผลการศึกษาพบว่าหนูในกลุ่ม CKD มีน้ำหนักของหัวใจที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control แต่เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักหัวใจต่อสัดส่วนน้ำหนักตัวพบว่าหนูในกลุ่ม CKD มีสัดส่วนของน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control ในขณะที่กลุ่มสารทดสอบอื่นๆ ได้แก่ Gac, STD, Synbiotic และ *L. Casei* พบว่า สัดส่วนของน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CKD ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถชี้ให้เห็นว่าโรคไตวายเรื้อรังในหนูกลุ่ม CKD สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความดันที่สูงมากเกินไปหรือทำให้เกิดการคั่งของน้ำที่มากเกินไป ซึ่งส่งผลโดยตรงกับการเหนี่ยวนำให้เกิดหัวใจห้องล่างซ้ายโตมากเกินไป (Cardiac hypertrophy) (48) ในขณะที่หนูในกลุ่ม Gac, STD, Synbiotic และ *L. Casei* พบแค่เพียงแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นของสัดส่วนของน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัว นอกจากนี้เมื่อติดตามผลการศึกษาน้ำหนักเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้าย พบว่าทั้ง 6 กลุ่มการทดลองไม่พบความแตกต่างของขนาดเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคไตวายเรื้อรังที่ไม่มากพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เนื่องจากภายหลังการใช้ยา Cisplatin ในการเหนี่ยวนำให้หนูเป็นไตวายเรื้อรัง ผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่าระยะเวลาการทดลอง 15 สัปดาห์ ร่างกายของหนูทดลองมีกระบวนการที่สามารถซ่อมแซมหรือฟื้นฟูร่างกายได้ด้วยตัวเอง ดังนั้นอาจส่งผลทำให้การดำเนินของโรคไตวายเรื้อรังจะอยู่แค่ในระยะเริ่มต้นจนถึงระยะปานกลาง (mild to moderate) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยครั้งถัดไปผู้วิจัยเสนอแนะให้สัตว์ทดลองควรได้รับ Cisplatin ร่วมกับการได้รับ 0.25%

adenine เพื่อเป็นการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดการอักเสบของไตตลอดเวลาและกลายเป็นไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายในที่สุด (54)

การอภิปรายผล TMAO ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด vascular calcification

ภาวะแคลเซียมสะสมในหลอดเลือด (vascular calcification) ในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง ซึ่งมักมีสาเหตุมาจากการคั่งของของเสียที่เป็นพิษ (uremic toxin) (57) โดยจากการศึกษาในทางคลินิกพบว่าระดับค่า TMAO จะเพิ่มการสะสมของแคลเซียมบริเวณส่วนโค้งเอออร์ติก (Aortic arch) (58) ตลอดจนการศึกษาในโมเดลสัตว์ทดลองพบว่า TMAO สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมแคลเซียมบริเวณหลอดเลือดในหนูที่เป็นไตวายเรื้อรัง แต่การศึกษาของผู้วิจัยไม่พบการสะสมของแคลเซียมบริเวณ ส่วนโค้งเอออร์ติ และหลอดเลือดบริเวณเอออร์ตาส่วนท้อง (Abdominal aorta) อาจเป็นเพราะความรุนแรงของโรคไตเรื้อรังไม่มากพอ ทำให้ระดับสารพิษยูรีเมียในเลือด รวมถึง TMAO ไม่มากพอที่จะก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดแข็ง การศึกษาในอนาคตเพื่อยืนยันประโยชน์ของซินไบโอติกต่อการยับยั้งการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งอาจจำเป็นต้องศึกษาในหนูทดลองที่มีความรุนแรงของโรคไตเรื้อรังมากกว่านี้ หรือมีโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย

การอภิปรายผล zonula occludens type 1 (ZO-1)

เมื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน tight junction ที่บริเวณลำไส้ส่วน Colon พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน zonula occludens type 1 (ZO-1) ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในกลุ่ม STD และ Synbiotic และในขณะที่กลุ่ม Gac และ L. Casei มีการแสดงออกของ ZO-1 ร่องลงมา ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ รายงานว่าการได้รับโปรไบโอติกจำพวก *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus casei* LC01 สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 และ claudin-3 อีกทั้งยังสามารถลดการหลั่งสารอักเสบจำพวก IL-6 และ TNF- α (61) (62) ในโมเดลลำไส้อักเสบ นอกจากนี้ยังหลักฐานงานวิจัยที่ยืนยันว่าการได้รับสารสกัดจำพวกพรีไบโอติกในกลุ่มแคโรทีนอยด์สามารถช่วยลดการหลั่งสารอักเสบจำพวก NF-kB, MRPK, IL-6 และ TNF- α ได้เช่นกัน ในขณะที่เดียวกันผลการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 ในกลุ่ม CKD พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งก็มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของคุณ Wichapoon และคณะ ในปี 2014 ที่พบว่าภาวะไตวายเฉียบพลันมีผลต่อการลดลงของโปรตีน ZO-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (63)

การอภิปรายผลจุลินทรีย์ในลำไส้

การรักษาสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการบรรเทาอาการอักเสบและช่วยพัฒนาให้สุขภาพลำไส้ให้แข็งแรงมากขึ้น ซึ่งไฟลัมที่พบบ่อยที่สุดได้แก่ *Firmicutes* และ *Bacteroidetes* ซึ่งคิดเป็นประมาณ 90% ของแบคทีเรียในลำไส้ (59) นอกจากนี้ยังสามารถพบไฟลัมอื่นๆ ร่องลงมา ได้แก่ *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* และ *Verrucomicrobia*

ซึ่งในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังมักเผชิญปัญหาความไม่สมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ โดยผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าความหลากหลายของแบคทีเรีย alpha-diversity (Shannon index) ชนิดแบคทีเรีย (observed OUT; richness) และความสม่ำเสมอของชนิดแบคทีเรีย (Pielou's evenness; evenness) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในทุกกลุ่มการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกุ่ม Control ซึ่งแสดงให้เห็นว่าภาวะไตวายเรื้อรังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้มากกว่าในหนูกุ่มปกติ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระดับฟิแลมของกลุ่มสารทดสอบและกลุ่มไตวายเรื้อรัง พบว่าการได้รับสารทดสอบแบบโพรไบโอติกร่วมกับและพรีไบโอติก (Synbiotic) สามารถช่วยลดจำนวนแบคทีเรียประเภทก่อให้เกิดการอักเสบได้ คือ *Actinobacteriota* (60) ดังนั้นจึงสามารถชี้ให้เห็นว่าการได้รับสารทดสอบแบบ Synbiotic มีประสิทธิภาพในการช่วยลดการกระตุ้นการอักเสบ แต่อย่างไรก็ยังคงพบการเพิ่มขึ้นของ *Desulfobacterota* ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียก่อโรค โดยพบทั้งในกลุ่มโพรไบโอติกและพรีไบโอติก (60) ยกเว้นในกลุ่ม *L. Casei* และกลุ่ม STD ที่พบการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียจำพวก *Verrucomicrobiota* ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเสริมสร้างสุขภาพของลำไส้ และเพิ่มจำนวนกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acids (SCFA))

นอกจากนี้เมื่อศึกษาระดับจีโนมพบว่าหนูในกลุ่มไตวายเรื้อรังที่ได้รับ Synbiotic และ *L. Casei* พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียจำพวกที่สามารถผลิต butyrate ลดจำนวนลง ได้แก่ *Lachnospiraceae_NK4A136_group* และ *Prevotellaceae_NK3B31_group* (61) ในขณะที่พบการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรีย *UCG005*, *Ruminococcus*, *Gastranaerophilales* และ *Acetitomaculum* แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้กับภาวะไตวายเรื้อรังและโรคหลอดเลือดหัวใจ และเมื่อเปรียบเทียบระดับจีโนมของกลุ่มที่ได้สารทดสอบและกลุ่มไตวายเรื้อรังพบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีการเพิ่มขึ้นของ *Bacteroides* ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่สามารถเพิ่มการสร้างสาร TMA ยกเว้นกลุ่ม STD ที่พบแบคทีเรียจำพวก *Akkermansia* ซึ่งมีบทบาทช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับลำไส้ อีกทั้งการศึกษานี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างแบคทีเรียจีโนม *Lachnospiraceae_NK4A136_group* กับระดับ TMAO ในกลุ่มที่ได้รับ Synbiotic แต่อย่างไรยังไม่หลักฐานงานวิจัยที่สนับสนุนเพิ่มเติมระหว่าง *Lachnospiraceae_NK4A136_group* และ TMAO

สรุปผล

จากการศึกษาผลของการบริโภคผักข้าวต่อระดับไตรเมทิลามีนเอ็นออกไซด์ในเลือดและการเกิดโรคหัวใจในหนูไตวายเรื้อรัง พบว่าหนูในกลุ่ม Synbiotic ที่ได้รับสารทดสอบผักข้าวร่วมกับ *Bifidobacterium longum* และ *Lactobacillus salivarius* มีความสามารถในการช่วยชะลอภาวะการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด เนื่องจากสามารถลดระดับค่า TMA lyase และ TMAO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับกับกลุ่มสารทดสอบอื่นๆ ได้แก่ Gac, STD และ L. Casei ที่พบว่ามีแนวโน้มของระดับค่า TMA lyase และ TMAO ที่ลดลง อีกทั้งยังพบว่า การได้รับสารทดสอบผักข้าวร่วมกับ *Bifidobacterium longum* และ *Lactobacillus salivarius* (Synbiotic) และการได้รับสารทดสอบ *Lactobacillus Casei* (Casei) มีผลทำให้ลดการภาวะการรั่วของลำไส้เนื่องจากพบการแสดงออกของ ZO-1 จำนวนมากบริเวณลำไส้ใหญ่ ซึ่งมากถึง 75 -100 % (grade 4) ในขณะที่กลุ่มสารทดสอบอื่นๆ ได้แก่ Gac, STD และ L. Casei มีการแสดงออกของ ZO-1 อยู่ที่ 25-50% จนถึง 75-100 % (grade 2- grade 4) ในทางตรงกันข้ามพบว่าหนูในกลุ่ม CKD มีการแสดงออกของ ZO-1 ต่ำกว่า 10% (grade 0) ดังนั้นจากผลการวิจัยดังกล่าวทำให้ทางที่วิจัยมีการวางแผนที่จะพัฒนาสูตรโพรไบโอติกเพื่อช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง

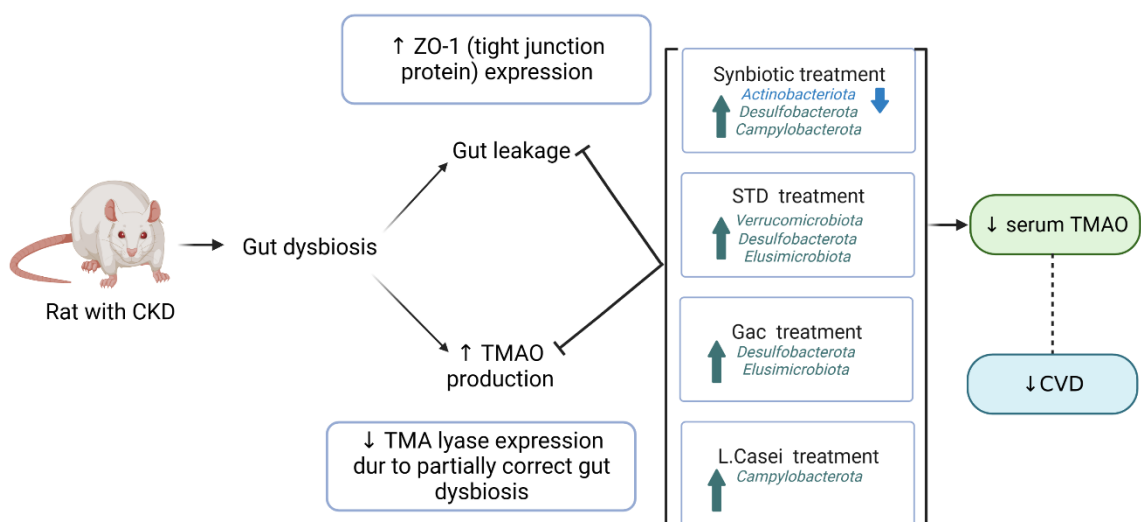


Figure 27 สรุปผลการวิจัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Table 23 แสดงสัดส่วนร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัม

uGroup	Relative abundance (phylum)	Median (IQR) Pre-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
Control	<i>Firmicutes</i>	68.327 (11.45)	70.632 (10.70)	0.273
	<i>Bacteroidota</i>	28.800 (11.97)	24.000 (11.44)	0.144
	<i>Cyanobacteria</i>	0.495 (0.22)	2.091 (2.75)	0.068
	<i>Proteobacteria</i>	0.1626 (0.13)	0.391 (0.50)	0.144
	<i>Actinobacteriota</i>	0.529 (0.34)	0.298 (0.05)	0.068
	<i>Verrucomicrobiota</i>	1.330 (1.53)	0.178 (0.07)	0.068
	<i>Desulfobacterota</i>	0.394 (0.13)	0.144 (0.40)	0.285
	<i>Patescibacteria</i>	0.161 (0.20)	0.203 (0.18)	0.715
	Elusimicrobiota	0.000 (0.00)	0.000 (0.16)	0.317
	<i>Campilobacterota</i>	0.000 (0.00)	0.184 (0.42)	0.109
CKD	<i>Firmicutes</i>	56.468 (9.13)	66.572 (10.32)	0.144
	<i>Bacteroidota</i>	39.604 (8.35)	28.835 (9.29)	0.068
	<i>Cyanobacteria</i>	0.663 (0.68)	0.885 (1.91)	0.715
	<i>Proteobacteria</i>	0.293 (0.20)	0.423 (0.13)	0.273
	<i>Actinobacteriota</i>	0.503 (0.21)	0.466 (0.38)	0.715
	<i>Verrucomicrobiota</i>	1.485 (0.93)	0.428 (0.75)	0.068
	<i>Desulfobacterota</i>	0.710 (0.21)	0.398 (0.33)	0.144
	<i>Patescibacteria</i>	0.940 (0.47)	0.336 (0.70)	0.715
	Elusimicrobiota	0.000 (0.00)	0.203 (1.21)	0.109
	<i>Campilobacterota</i>	0.123 (0.13)	0.940 (0.18)	0.465
Gac	<i>Firmicutes</i>	64.018 (5.56)	69.956 (7.78)	0.068
	<i>Bacteroidota</i>	31.176 (4.63)	20.280 (8.88)	0.068
	<i>Cyanobacteria</i>	1.112 (1.04)	1.932 (1.58)	0.465
	<i>Proteobacteria</i>	0.776 (0.53)	0.655 (0.44)	0.273
	<i>Actinobacteriota</i>	0.708 (0.96)	0.556 (0.89)	0.465
	<i>Verrucomicrobiota</i>	1.327 (0.78)	0.621 (2.45)	0.715

Group	Relative abundance (phylum)	Median (IQR) Pre-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
Gac	<i>Desulfobacterota</i>	0.000 (0.00)	0.204 (0.59)	0.068
	<i>Patescibacteria</i>	0.097 (0.13)	0.452 (0.43)	0.068
	Elusimicrobiota	0.000 (0.00)	2.464 (3.31)	0.068
	<i>Campilobacterota</i>	0.043 (0.08)	0.813 (0.12)	0.357
STD	<i>Firmicutes</i>	68.629 (18.67)	70.132 (11.76)	0.715
	<i>Bacteroidota</i>	27.512 (18.81)	25.602 (13.68)	0.715
	<i>Cyanobacteria</i>	0.523 (1.53)	1.081 (1.56)	0.273
	<i>Proteobacteria</i>	0.447 (0.018)	0.257 (0.27)	0.465
	<i>Actinobacteriota</i>	0.889 (1.99)	0.452 (0.29)	0.144
	<i>Verrucomicrobiota</i>	1.272 (0.69)	1.909 (0.94)	0.144
	<i>Desulfobacterota</i>	0.043 (0.13)	0.336 (1.46)	0.068
	<i>Patescibacteria</i>	0.194 (0.31)	0.464 (0.12)	0.144
	Elusimicrobiota	0.000 (0.00)	0.027 (1.56)	0.109
	<i>Campilobacterota</i>	0.000 (0.00)	0.326 (0.46)	0.068
Synbiotic	<i>Firmicutes</i>	72.460 (4.47)	71.731 (6.44)	0.753
	<i>Bacteroidota</i>	24.246 (2.52)	23.193 (5.33)	0.753
	<i>Cyanobacteria</i>	0.768 (0.52)	1.305 (0.65)	0.116
	<i>Proteobacteria</i>	0.390 (0.47)	0.257 (0.22)	0.116
	<i>Actinobacteriota</i>	0.834 (0.50)	0.470 (0.13)	0.028*
	<i>Verrucomicrobiota</i>	1.791 (1.04)	1.086 (2.10)	0.249
	<i>Desulfobacterota</i>	0.050 (0.10)	0.339 (0.43)	0.028*
	<i>Patescibacteria</i>	0.143 (0.12)	0.359 (0.19)	0.028*
	Elusimicrobiota	0.00 (0.00)	0.011 (2.65)	0.109
	<i>Campilobacterota</i>	0.015 (0.13)	0.344 (0.42)	0.028*
L.Casei	<i>Firmicutes</i>	67.776 (13.99)	66.986 (13.11)	0.345
	<i>Bacteroidota</i>	28.630 (13.81)	26.087 (15.64)	0.075
	<i>Cyanobacteria</i>	0.410 (0.25)	0.978 (2.12)	0.345
	<i>Proteobacteria</i>	0.393 (0.46)	0.270 (0.25)	0.917
	<i>Actinobacteriota</i>	0.774 (0.63)	0.478 (0.35)	0.173
	<i>Verrucomicrobiota</i>	1.321 (1.02)	1.795 (1.90)	0.345
	<i>Desulfobacterota</i>	0.199 (0.61)	0.443 (0.78)	0.463
	<i>Patescibacteria</i>	0.209 (0.18)	0.382 (0.32)	0.345
	Elusimicrobiota	0.000 (0.02)	0.562 (1.69)	0.080
	<i>Campilobacterota</i>	0.019 (0.04)	0.363 (0.24)	0.028*

Table 24 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรัง และกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกันกลุ่ม CKD เปรียบเทียบกับ Control

Group	Relative abundance (phylum)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (HC)	P value
CKD vs Control	<i>Firmicutes</i>	8.034 (15.19)	1.571 (6.55)	0.564
	<i>Bacteroidota</i>	-7.919 (14.64)	-2.832 (9.98)	0.564
	<i>Cyanobacteria</i>	0.143 (2.16)	1.920 (2.78)	0.083
	<i>Proteobacteria</i>	0.129 (0.33)	0.261 (0.57)	0.386
	<i>Actinobacteriota</i>	-0.062 (0.53)	-0.226 (0.38)	0.043*
	<i>Verrucomicrobiota</i>	-0.766 (1.11)	-1.312 (1.59)	0.386
	<i>Desulfobacterota</i>	-0.367 (0.47)	0.066 (0.40)	0.083
	<i>Patescibacteria</i>	0.188 (1.09)	0.085 (0.30)	0.773
	<i>Elusimicrobiota</i>	0.020 (1.21)	0.000 (0.16)	0.282
	<i>Campilobacterota</i>	0.014 (0.14)	0.184 (0.42)	0.248

Table 25 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรัง และกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกัน CKD เปรียบเทียบกับ Gac

Group	Relative abundance (phylum)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (Gac)	P value
CKD vs Gac	<i>Firmicutes</i>	8.034 (15.19)	5.207 (4.07)	1.000
	<i>Bacteroidota</i>	-7.919 (14.64)	-10.895 (4.66)	1.000
	<i>Cyanobacteria</i>	0.143 (2.16)	0.635 (2.14)	0.773
	<i>Proteobacteria</i>	0.129 (0.33)	-0.209 (0.82)	0.191
	<i>Actinobacteriota</i>	-0.062 (0.53)	-0.174 (1.79)	0.773
	<i>Verrucomicrobiota</i>	-0.766 (1.11)	-0.313 (2.45)	0.248
	<i>Desulfobacterota</i>	-0.367 (0.47)	0.204 (0.59)	0.021*
	<i>Patescibacteria</i>	0.188 (1.09)	0.359 (0.52)	0.564
	<i>Elusimicrobiota</i>	0.020 (1.21)	2.464 (3.31)	0.043*
		<i>Campilobacterota</i>	0.014 (0.14)	0.047 (0.19)

Table 26 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรัง และกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกัน CKD เปรียบเทียบกับ STD

Group	Relative abundance (phylum)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (STD)	P value
CKD vs STD	<i>Firmicutes</i>	8.034 (15.19)	1.797 (14.37)	0.248
	<i>Bacteroidota</i>	-7.919 (14.64)	-4.383 (15.40)	0.564
	<i>Cyanobacteria</i>	0.143 (2.16)	0.412 (1.16)	0.773
	<i>Proteobacteria</i>	0.129 (0.33)	-0.078 (0.31)	0.110
	<i>Actinobacteriota</i>	-0.062 (0.53)	-0.472 (1.78)	0.149
	<i>Verrucomicrobiota</i>	-0.766 (1.11)	0.296 (1.05)	0.021*
	<i>Desulfobacterota</i>	-0.367 (0.47)	0.336 (1.50)	0.021*
	<i>Patescibacteria</i>	0.188 (1.09)	0.279 (0.43)	0.885
	<i>Elusimicrobiota</i>	0.020 (1.21)	0.027 (1.56)	0.021*
	<i>Campilobacterota</i>	0.014 (0.14)	0.326 (0.46)	0.885

Table 27 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรัง และกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกัน CKD เปรียบเทียบกับ Synbiotic

Group	Relative abundance (phylum)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (Synbiotic)	P value
CKD vs Synbiotic	<i>Firmicutes</i>	8.034 (15.19)	-1.082 (9.40)	0.136
	<i>Bacteroidota</i>	-7.919 (14.64)	-1.441 (6.82)	0.136
	<i>Cyanobacteria</i>	0.143 (2.16)	0.485 (1.00)	0.670
	<i>Proteobacteria</i>	0.129 (0.33)	-0.146 (0.31)	0.055
	<i>Actinobacteriota</i>	-0.062 (0.53)	-0.377 (0.43)	0.011*
	<i>Verrucomicrobiota</i>	-0.766 (1.11)	-0.541 (1.75)	0.670
	<i>Desulfobacterota</i>	-0.367 (0.47)	0.275 (0.36)	0.011*
	<i>Patescibacteria</i>	0.188 (1.09)	0.208 (0.16)	0.831
	<i>Elusimicrobiota</i>	0.020 (1.21)	0.011 (2.65)	1.000
	<i>Campilobacterota</i>	0.014 (0.14)	0.283 (0.44)	0.033*

Table 28 แสดงร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับไฟลัมระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรัง และกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกัน CKD เปรียบเทียบกับ L.Casei

Group	Relative abundance (phylum)	Median (IQR)	Median (IQR)	P value
		Post-treatment wk15 (CKD)	Post-treatment wk15 (Pro)	
CKD vs L.Casei	<i>Firmicutes</i>	8.034 (15.19)	2.882 (11.35)	0.286
	<i>Bacteroidota</i>	-7.919 (14.64)	-5.171 (12.23)	0.748
	<i>Cyanobacteria</i>	0.143 (2.16)	0.517 (2.32)	1.000
	<i>Proteobacteria</i>	0.129 (0.33)	0.017 (0.57)	0.394
	<i>Actinobacteriota</i>	-0.062 (0.53)	-0.128 (0.58)	0.286
	<i>Verrucomicrobiota</i>	-0.766 (1.11)	0.721 (2.34)	0.055
	<i>Desulfobacterota</i>	-0.367 (0.47)	0.137 (1.30)	0.201
	<i>Patescibacteria</i>	0.188 (1.09)	0.171 (0.32)	0.915
	<i>Elusimicrobiota</i>	0.020 (1.21)	0.562 (1.76)	0.748
	<i>Campilobacterota</i>	0.014 (0.14)	0.357 (0.24)	0.011*

Table 29 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีเอตินินและค่าร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัม (relative abundance)

Relative abundance (phylum)	Correlation coefficient	P value
<i>Firmicutes</i>	0.226	0.247
<i>Bacteroidota</i>	-0.190	0.332
<i>Cyanobacteria</i>	-0.226	0.248
<i>Proteobacteria</i>	-0.093	0.639
<i>Actinobacteriota</i>	0.247	0.206
<i>Verrucomicrobiota</i>	0.305	0.115
<i>Desulfobacterota</i>	0.247	0.205
<i>Patescibacteria</i>	0.188	0.338
<i>Elusimicrobiota</i>	0.005	0.981
<i>Campilobacterota</i>	0.055	0.780

Table 30 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม Control (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	-0.632	0.368
<i>Muribaculaceae</i>	-0.949	0.051
<i>UCG008</i>	0.949	0.051

Table 31 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม Gac (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	0.000	1.000
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.000	0.800

Table 32 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม STD (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	-0.800	1.000
<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-0.400	0.800

Table 33 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละ ของแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม Synbiotic (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	-0.371	0.468
<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-0.543	0.266
<i>Akkermansia</i>	0.429	0.397

Table 34 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับไฟลัมในกลุ่ม L.Casei (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	0.143	0.787

Table 35 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับไฟลัม (relative abundance)

Relative abundance (phylum)	Correlation coefficient	P value
<i>Firmicutes</i>	0.293	0.130
<i>Bacteroidota</i>	-0.249	0.201
<i>Cyanobacteria</i>	0.273	0.160
<i>Proteobacteria</i>	0.207	0.291
<i>Actinobacteriota</i>	0.265	0.172
<i>Verrucomicrobiota</i>	-0.281	0.147
<i>Desulfobacterota</i>	-0.340	0.076
<i>Patescibacteria</i>	-0.073	0.713
<i>Elusimicrobiota</i>	-0.016	0.935
<i>Campilobacterota</i>	-0.224	0.252

Table 36 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม Control ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Phylum	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Pre-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
<i>Bacteroidota</i>	<i>Muribaculaceae</i>	15.400 (9.61)	14.253 (13.24)	0.715
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i>	6.586 (2.01)	6.225 (5.49)	0.715
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_UCG001</i>	4.510 (2.30)	5.947 (3.35)	0.273
<i>Firmicutes</i>	<i>UCG005</i>	4.824 (4.01)	5.950 (6.55)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i>	3.902 (2.67)	5.082 (3.67)	0.456
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	6.274 (2.66)	1.802 (0.91)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Romboutsia</i>	2.726 (5.19)	3.480 (6.58)	1.000
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia_UCG014</i>	3.093 (3.65)	1.673 (0.31)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Turicibacter</i>	1.633 (4.02)	1.812 (5.13)	1.000
<i>Firmicutes</i>	<i>Acetitomaculum</i>	0.565 (1.28)	2.888 (4.61)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	2.359 (2.72)	0.537 (2.32)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>	1.944 (1.58)	0.376 (3.18)	0.465
<i>Firmicutes</i>	<i>Colidextribacter</i>	1.037 (0.66)	1.899 (0.76)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Roseburia</i>	0.766 (1.07)	1.313 (3.29)	0.273
<i>Firmicutes</i>	<i>Monoglobus</i>	1.102 (0.99)	1.455 (1.47)	0.456
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	1.611 (2.24)	0.348 (1.27)	0.273
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	0.752 (0.42)	1.472 (1.23)	0.144
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Gastranaerophilales</i>	0.049 (0.22)	2.091 (2.75)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>UCG008</i>	0.852 (1.31)	0.843 (0.91)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Oscillibacter</i>	0.787 (0.53)	1.002 (1.20)	0.715

Table 37 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม CKD ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Phylum	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Pre-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
<i>Bacteroidota</i>	<i>Muribaculaceae</i>	18.427 (7.16)	21.435 (2.80)	0.273
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i>	5.224 (1.58)	5.2096 (9.52)	0.715
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	8.765 (4.77)	1.321 (4.36)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Prevotellaceae_UCG001</i>	4.879 (3.94)	3.755 (5.82)	0.456
<i>Firmicutes</i>	<i>UCG005</i>	3.193 (0.81)	5.029 (7.36)	0.144
<i>Bacteroidota</i>	<i>Turicibacter</i>	6.685 (5.79)	0.162 (2.71)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i>	1.880 (2.25)	4.715 (4.87)	0.273
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroides</i>	2.383 (3.45)	0.961 (0.49)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Blautia</i>	1.828 (1.69)	1.693 (3.15)	0.715
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia_UCG014</i>	0.658 (0.96)	2.982 (2.74)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Colidextribacter</i>	1.086 (0.70)	1.915 (2.31)	0.273
<i>Firmicutes</i>	<i>Romboutsia</i>	2.304 (3.60)	0.054 (2.33)	0.456
<i>Firmicutes</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>	1.750 (1.69)	1.031 (1.52)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	1.646 (0.74)	0.890 (1.59)	0.715
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	0.988 (1.87)	1.210 (1.16)	0.456
<i>Firmicutes</i>	<i>Acetitomaculum</i>	0.064 (0.51)	2.017 (1.73)	0.068
<i>Bacteroidota</i>	<i>Gastranaerophilales</i>	0.663(0.68)	0.885 (1.91)	0.715
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Akkermansia</i>	1.485 (0.93)	0.416 (0.75)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes_UCG008</i>	0.694 (0.20)	1.086 (0.64)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_Ga6A1_group</i>	1.515 (1.91)	0.440 (0.83)	0.273

Table 38 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม Gac ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Phylum	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Pre-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
<i>Bacteroidota</i>	<i>Muribaculaceae</i>	20.443 (4.57)	13.061 (11.12)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Turicibacter</i>	7.292 (2.20)	5.359 (3.91)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i>	2.947 (3.70)	6.411 (4.16)	0.144
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_UCG001</i>	7.054 (3.17)	3.335 (1.33)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Romboutsia</i>	4.270 (3.13)	5.269 (4.35)	0.715
<i>Firmicutes</i>	<i>UCG005</i>	2.371 (2.86)	5.504 (4.64)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i>	1.930 (3.25)	4.234 (3.46)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia_UCG014</i>	2.423 (2.20)	2.977 (1.70)	0.465
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	2.085 (1.06)	1.826 (2.44)	0.715
<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	2.677 (3.62)	0.814 (1.68)	0.144
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	2.032 (4.60)	0.921 (2.07)	0.465
<i>Elusimicrobiota</i>	<i>Elusimicrobium</i>	0.000 (0.00)	2.464 (3.31)	0.068
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Gastranaerophilales</i>	1.112 (1.04)	1.932 (1.58)	0.465
<i>Firmicutes</i>	<i>Monoglobus</i>	0.931 (1.07)	1.544 (1.32)	0.273
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	0.889 (1.74)	1.203 (0.91)	0.715
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	1.352 (0.27)	0.951 (0.40)	0.068
<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Akkermansia</i>	1.327 (0.78)	0.609 (2.44)	0.715
<i>Firmicutes</i>	<i>Blautia</i>	0.447 (0.22)	1.643 (0.75)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Colidextribacter</i>	1.053 (0.60)	0.796 (0.64)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>UCG008</i>	0.440 (1.12)	1.011 (0.80)	0.068

Table 39 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม STD ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Phylum	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Pre-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
<i>Bacteroidota</i>	<i>Muribaculaceae</i>	15.184 (6.21)	18.657 (12.73)	0.715
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i>	13.653 (8.78)	12.544 (8.28)	1.000
<i>Firmicutes</i>	<i>Turicibacter</i>	10.008 (7.37)	8.577 (4.42)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Romboutsia</i>	8.081 (6.11)	5.616 (1.66)	0.273
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_UCG001</i>	5.500 (6.69)	3.954 (4.30)	0.465
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	5.029 (2.99)	2.732 (1.92)	0.068
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	4.340 (5.71)	1.183 (1.87)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i>	2.017 (2.31)	3.418 (2.92)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>UCG005</i>	0.965 (1.44)	2.696 (4.44)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia_UCG014</i>	1.463 (1.84)	2.371 (1.56)	0.465
<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Akkermansia</i>	1.272 (0.69)	1.909 (0.94)	0.144
<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	1.126 (3.83)	0.406 (0.44)	0.068
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Gastranaerophilales</i>	0.523 (1.53)	1.081 (1.56)	0.273
<i>Firmicutes</i>	<i>Colidextribacter</i>	1.091 (0.49)	0.725 (0.93)	0.715
<i>Firmicutes</i>	<i>Monoglobus</i>	0.310 (0.50)	1.124 (2.00)	0.065
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	0.927 (0.43)	0.871 (0.19)	0.465
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	0.942 (0.79)	0.759 (0.21)	0.465
<i>Firmicutes</i>	<i>Blautia</i>	0.764 (0.18)	0.414 (0.26)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>UCG00</i>	0.104 (0.31)	0.716 (1.74)	0.068
<i>Firmicutes</i>	<i>Oscillibacter</i>	0.503 (0.88)	0.287 (0.56)	0.465

Table 40 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม Synbiotic ใน สัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Phylum	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Pre-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
<i>Bacteroidota</i>	<i>Muribaculaceae</i>	14.791 (9.43)	14.490 (8.14)	0.600
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i>	9.964 (11.15)	8.672 (8.86)	0.463
<i>Firmicutes</i>	<i>Turicibacter</i>	4.018 (8.00)	5.693 (5.60)	0.753
<i>Firmicutes</i>	<i>Romboutsia</i>	4.245 (8.16)	4.470 (3.64)	0.753
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_UCG001</i>	4.279 (2.76)	3.323 (3.86)	0.753
<i>Firmicutes</i>	<i>UCG005</i>	2.238 (1.94)	4.907 (3.45)	0.028*
<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i>	1.727 (1.85)	3.727 (2.68)	0.028*
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia_UCG014</i>	1.872 (1.37)	2.498 (1.26)	0.249
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	0.661 (5.74)	1.560 (2.07)	0.600
<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	2.253 (3.38)	0.684 (1.01)	0.046*
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	0.988 (2.52)	1.187 (1.16)	0.917
<i>Firmicutes</i>	<i>Monoglobus</i>	0.874 (1.26)	1.576 (1.02)	0.116
<i>Firmicutes</i>	<i>Roseburia</i>	0.395 (2.27)	1.069 (1.23)	0.600
<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Akkermansia</i>	1.396 (1.14)	1.086 (2.11)	0.735
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	0.8714(0.57)	1.048 (0.84)	0.345
<i>Firmicutes</i>	<i>Colidextribacter</i>	0.791 (1.06)	0.772 (1.05)	0.463
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Gastranaerophilales</i>	0.655 (0.57)	1.305 (0.65)	0.046*
<i>Firmicutes</i>	<i>Acetitomaculum</i>	0.559(0.45)	1.471 (1.84)	0.046*
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium_ruminantium_group</i>	0.135 (2.01)	0/885 (0.48)	0.917
<i>Firmicutes</i>	<i>RF39</i>	0.863 (1.02)	0.654 (0.39)	0.917

Table 41 แสดงค่าร้อยละ (relative abundance) ของแบคทีเรียระดับสกุลในกลุ่ม L.Casei ใน สัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 15

Phylum	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Pre-treatment wk0	Median (IQR) Post-treatment wk15	P value
<i>Bacteroidota</i>	<i>Muribaculaceae</i>	17.995 (4.00)	9.070 (6.39)	0.463
<i>Firmicutes</i>	<i>Lactobacillus</i>	5.158 (5.26)	4.250 (7.35)	0.753
<i>Firmicutes</i>	<i>Turicibacter</i>	8.433 (6.23)	4.250 (7.35)	0.463
<i>Firmicutes</i>	<i>Romboutsia</i>	6.222 (5.26)	4.577 (4.65)	0.600
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_UCG001</i>	3.653 (5.18)	3.788 (1.14)	0.249
<i>Bacteroidota</i>	<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	5.194 (4.26)	0.498 (2.68)	0.028*
<i>Firmicutes</i>	<i>UCG005</i>	1.397 (2.25)	4.118 (1.06)	0.028*
<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	2.289 (1.69)	0.644 (1.19)	0.046*
<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus</i>	2.976 (2.55)	2.296 (2.02)	0.753
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia_UCG014</i>	2.555 (1.23)	2.135 (1.34)	0.753
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	3.172 (3.06)	0.829 (2.81)	0.249
<i>Firmicutes</i>	<i>Blautia</i>	0.791 (1.37)	0.480 (7.82)	0.463
<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Akkermansia</i>	1.321 (1.02)	1.795 (1.90)	0.345
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	1.227 (0.52)	1.243 (0.92)	0.917
<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	1.194 (1.03)	1.125 (0.89)	0.600
<i>Firmicutes</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>	1.227 (0.77)	1.121 (1.58)	0.600
<i>Firmicutes</i>	<i>Colidextribacter</i>	1.248 (0.38)	0.783 (0.78)	0.249
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Gastranaerophilales</i>	0.410 (0.25)	0.978 (2.12)	0.345
<i>Firmicutes</i>	<i>Monoglobus</i>	0.296 (0.58)	1.112 (1.66)	0.116
<i>Firmicutes</i>	<i>Roseburia</i>	0.384 (1.12)	0.580 (0.52)	0.917

Table 42 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่ต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ Control ในระดับสกุล

Control group	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (HC)	P value
CKD vs Control	<i>Bacteroidota_Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	0.851 (1.39)	0.021*
	<i>Bacteroidota_Muribaculaceae</i>	2.355 (7.24)	-2.310 (6.05)	0.021*
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_Ga6A1_group</i>	-1.170 (2.35)	-0.022 (0.19)	0.083
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-6.089 (2.67)	-4.467 (2.57)	0.248
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_UCG001</i>	-2.761 (6.04)	1.807 (5.14)	0.149
	<i>Cyanobacteria_Gastranaerophilales</i>	0.143 (2.16)	1.920 (2.78)	0.149
	<i>Firmicutes_Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	0.410 (1.69)	-1.183 (3.34)	0.083
	<i>Firmicutes_Acetitomaculum</i>	1.994 (2.17)	2.328 (3.69)	0.248
	<i>Firmicutes_Blautia</i>	0.495 (4.21)	0.605 (0.58)	0.773
	<i>Firmicutes_Clostridia_UCG014</i>	2.592 (3.16)	-1.544 (3.71)	1.000
	<i>Firmicutes_Colidextribacter</i>	0.829 (2.90)	0.716 (0.81)	0.043*
	<i>Firmicutes_Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	-0.851 (2.11)	-1.092 (1.69)	1.000
	<i>Firmicutes_Lactobacillus</i>	0.693 (8.93)	0.416 (5.03)	0.248
	<i>Firmicutes_Phascalactobacterium</i>	-0.346 (2.25)	-0.985 (2.76)	1.000
	<i>Firmicutes_Romboutsia</i>	-0.191 (3.34)	1.173 (10.93)	0.773
	<i>Firmicutes_Ruminococcus</i>	2.486 (5.96)	0.992 (6.15)	0.773
	<i>Firmicutes_Turicibacter</i>	-6.523 (8.43)	1.205 (7.09)	0.386
	<i>Firmicutes_UCG005</i>	2.084 (7.67)	3.122 (5.62)	1.000
	<i>Firmicutes_UCG008</i>	0.379 (0.80)	-0.071 (0.49)	0.021
	<i>Verrucomicrobiota_Akkermansia</i>	-0.780 (1.11)	-1.330 (1.59)	0.386

Table 43 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสาร
ทดสอบที่ต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ Gac ในระดับสกุล

Control group	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (Gac)	P value
CKD vs Gac	<i>Bacteroidota__Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	-0.3760 (0.19)	0.021*
	<i>Bacteroidota__Muribaculaceae</i>	2.355 (7.24)	-7.773 (13.51)	0.083
	<i>Bacteroidota__Prevotellaceae_Ga6A1_group</i>	-1.170 (2.35)	0.355 (1.26)	0.149
	<i>Bacteroidota__Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-6.089 (2.67)	-0.498 (6.06)	0.083
	<i>Bacteroidota__Prevotellaceae_UCG001</i>	-2.761 (6.04)	-3.892 (4.33)	0.386
	<i>Cyanobacteria__Gastranaerophilales</i>	0.143 (2.16)	0.635 (2.14)	0.773
	<i>Firmicutes__Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	0.410 (1.69)	0.313 (2.65)	0.773
	<i>Firmicutes__Acetitomaculum</i>	1.994 (2.17)	1.272 (1.55)	0.248
	<i>Firmicutes__Blautia</i>	0.495 (4.21)	1.222 (0.55)	1.000
	<i>Firmicutes__Clostridia_UCG014</i>	2.592 (3.16)	0.331 (2.01)	0.083
	<i>Firmicutes__Colidextribacter</i>	0.829 (2.90)	-0.276 (0.53)	0.248
	<i>Firmicutes__Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	-0.851 (2.11)	-2.465 (4.23)	0.149
	<i>Firmicutes__Lactobacillus</i>	0.693 (8.93)	3.025 (6.86)	0.386
	<i>Firmicutes__Phascolarctobacterium</i>	-0.346 (2.25)	1.098 (2.08)	0.021*
	<i>Firmicutes__Romboutsia</i>	-0.191 (3.34)	1.598 (6.36)	0.386
	<i>Firmicutes__Ruminococcus</i>	2.486 (5.96)	2.276 (0.81)	0.773
	<i>Firmicutes__Turicibacter</i>	-6.523 (8.43)	-1.417 (5.52)	0.564
	<i>Firmicutes__UCG005</i>	2.084 (7.67)	3.771 (6.54)	1.000
	<i>Firmicutes__UCG008</i>	0.379 (0.80)	0.325 (0.85)	0.564
	<i>Verrucomicrobiota__Akkermansia</i>	-0.780 (1.11)	-0.321 (2.45)	0.248

Table 44 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ STD ในระดับสกุล

Control group	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (STD)	P value
CKD vs. STD	<i>Bacteroidota_Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	-0.191 (0.59)	0.021*
	<i>Bacteroidota_Muribaculaceae</i>	2.355 (7.24)	0.608 (13.22)	0.564
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_Ga6A1_group</i>	-1.170 (2.35)	0.373 (1.53)	0.149
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-6.089 (2.67)	-2.949 (4.05)	0.021*
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_UCG001</i>	-2.761 (6.04)	-0.193 (3.91)	0.564
	<i>Cyanobacteria_Gastranaerophilales</i>	0.143 (2.16)	0.412 (1.16)	0.773
	<i>Firmicutes_Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	0.410 (1.69)	-0.021 (0.57)	0.386
	<i>Firmicutes_Acetitomaculum</i>	1.994 (2.17)	0.592 (1.99)	0.248
	<i>Firmicutes_Blautia</i>	0.495 (4.21)	-0.283 (0.33)	1.000
	<i>Firmicutes_Clostridia_UCG014</i>	2.592 (3.16)	0.908 (3.04)	0.149
	<i>Firmicutes_Colidextribacter</i>	0.829 (2.90)	-0.365 (1.31)	0.386
	<i>Firmicutes_Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	-0.851 (2.11)	-0.790 (3.55)	1.000
	<i>Firmicutes_Lactobacillus</i>	0.693 (8.93)	0.602 (14.57)	0.773
	<i>Firmicutes_Phascalactobacterium</i>	-0.346 (2.25)	0.209 (1.39)	0.248
	<i>Firmicutes_Romboutsia</i>	-0.191 (3.34)	-1.979 (6.66)	0.386
	<i>Firmicutes_Ruminococcus</i>	2.486 (5.96)	1.035 (1.14)	0.248
	<i>Firmicutes_Turicibacter</i>	-6.523 (8.43)	-1.985 (3.90)	0.248
	<i>Firmicutes_UCG005</i>	2.084 (7.67)	1.869 (3.92)	1.000
	<i>Firmicutes_UCG008</i>	0.379 (0.80)	0.630 (1.53)	0.773
<i>Verrucomicrobiota_Akkermansia</i>	-0.780 (1.11)	0.296 (1.05)	0.021*	

Table 45 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสาร
ทดสอบที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ Synbiotic ในระดับสกุล

Control group	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (Synbiotic)	P value
CKD vs. Synbiotic	<i>Bacteroidota_Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	-0.027 (1.41)	0.011*
	<i>Bacteroidota_Muribaculaceae</i>	2.355 (7.24)	0.895 (10.08)	0.394
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_Ga6A1_group</i>	-1.170 (2.35)	-0.095 (0.55)	0.286
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-6.089 (2.67)	0.221 (3.19)	0.019*
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_UCG001</i>	-2.761 (6.04)	-0.142 (4.01)	0.136
	<i>Cyanobacteria_Gastranaerophilales</i>	0.143 (2.16)	0.618 (0.80)	0.394
	<i>Firmicutes_Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	0.410 (1.69)	0.500 (0.93)	1.000
	<i>Firmicutes_Acetitomaculum</i>	1.994 (2.17)	1.356 (1.65)	0.394
	<i>Firmicutes_Blautia</i>	0.495 (4.21)	0.673 (0.94)	1.000
	<i>Firmicutes_Clostridia_UCG014</i>	2.592 (3.16)	0.901 (2.31)	0.136
	<i>Firmicutes_Colidextribacter</i>	0.829 (2.90)	0.250 (0.91)	0.670
	<i>Firmicutes_Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	-0.851 (2.11)	-0.966 (2.12)	0.522
	<i>Firmicutes_Lactobacillus</i>	0.693 (8.93)	-1.764 (8.32)	0.522
	<i>Firmicutes_Phascolarctobacterium</i>	-0.346 (2.25)	-0.085 (0.87)	0.286
	<i>Firmicutes_Romboutsia</i>	-0.191 (3.34)	-1.457 (7.70)	0.831
	<i>Firmicutes_Ruminococcus</i>	2.486 (5.96)	2.486 (5.96)	0.522
	<i>Firmicutes_Turicibacter</i>	-6.523 (8.43)	-0.616 (11.08)	0.088
	<i>Firmicutes_UCG005</i>	2.084 (7.67)	3.111 (3.73)	0.522
	<i>Firmicutes_UCG008</i>	0.379 (0.80)	0.578 (0.81)	1.000
<i>Verrucomicrobiota_Akkermansia</i>	-0.780 (1.11)	0.045 (1.37)	0.201	

Table 46 แสดงค่า Relative abundance (genus) ระหว่างกลุ่มไตวายเรื้อรังและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบที่ต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CKD และ L.Casei ในระดับสกุล

Control group	Relative abundance (genus)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (CKD)	Median (IQR) Post-treatment wk15 (L.Casei)	P value
CKD vs L.Casei	<i>Bacteroidota_Bacteroides</i>	-1.190 (3.66)	-0.090 (1.28)	0.011*
	<i>Bacteroidota_Muribaculaceae</i>	2.355 (7.24)	-3.231 (10.14)	0.201
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_Ga6A1_group</i>	-1.170 (2.35)	0.233 (1.09)	0.136
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-6.089 (2.67)	-3.071 (5.28)	0.088
	<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_UCG001</i>	-2.761 (6.04)	-1.157 (4.71)	1.000
	<i>Cyanobacteria_Gastranaerophilales</i>	0.143 (2.16)	0.517 (2.32)	1.000
	<i>Firmicutes_Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	0.410 (1.69)	0.068 (1.91)	0.831
	<i>Firmicutes_Acetitomaculum</i>	1.994 (2.17)	0.584 (1.14)	0.088
	<i>Firmicutes_Blautia</i>	0.495 (4.21)	0.276 (8.63)	0.522
	<i>Firmicutes_Clostridia_UCG014</i>	2.592 (3.16)	-0.167 (1.47)	0.055
	<i>Firmicutes_Colidextribacter</i>	0.829 (2.90)	-0.428 (1.05)	0.394
	<i>Firmicutes_Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	-0.851 (2.11)	-1.675 (2.35)	0.055
	<i>Firmicutes_Lactobacillus</i>	0.693 (8.93)	2.863 (10.60)	0.522
	<i>Firmicutes_Phascalactobacterium</i>	-0.346 (2.25)	-0.372 (1.77)	0.670
	<i>Firmicutes_Romboutsia</i>	-0.191 (3.34)	-1.208 (7.60)	0.670
	<i>Firmicutes_Ruminococcus</i>	2.486 (5.96)	-1.035 (4.44)	0.136
	<i>Firmicutes_Turicibacter</i>	-6.523 (8.43)	-3.564 (9.75)	0.522
	<i>Firmicutes_UCG005</i>	2.084 (7.67)	2.577 (2.26)	0.831
	<i>Firmicutes_UCG008</i>	0.379 (0.80)	0.574 (0.87)	0.831
	<i>Verrucomicrobiota_Akkermansia</i>	-0.780 (1.11)	0.715 (2.34)	0.055

Table 47 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและส่วนร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุล (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	-0.191	0.330
<i>Muribaculaceae</i>	-0.110	0.578
<i>Bacteroidota_Prevotellaceae_Ga6A1_group</i>	0.309	0.110
<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	0.051	0.798
<i>Prevotellaceae_UCG001</i>	-0.373	0.051
<i>Gastranaerophilales</i>	-0.217	0.267
<i>Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	0.197	0.315
<i>Acetitomaculum</i>	-0.552**	0.002*
<i>Blautia</i>	-0.033	0.868
<i>Clostridia_UCG014</i>	0.174	0.376
<i>Colidextribacter</i>	-0.261	0.179
<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	0.076	0.701
<i>Lactobacillus</i>	-0.191	0.329
<i>Phascolarctobacterium</i>	0.081	0.683
<i>Romboutsia</i>	0.198	0.313
<i>Ruminococcus</i>	0.011	0.955
<i>Firmicutes_Turicibacter</i>	0.253	0.194
<i>Firmicutes_UCG005</i>	-0.262	0.179
<i>UCG008</i>	0.171	0.384
<i>Verrucomicrobiota_Akkermansia</i>	0.330	0.086

Table 48 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม Control (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	-0.632	0.368
<i>Muribaculaceae</i>	-0.949	0.051
<i>UCG008</i>	0.949	0.051

Table 49 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม Gac (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	0.000	1.000
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.000	0.800

Table 50 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม STD (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	-0.800	1.000
<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-0.400	0.800

Table 51 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม Synbiotic (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	-0.371	0.468
<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-0.543	0.266
<i>Akkermansia</i>	0.429	0.397

Table 52 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่างค่าครีอะตินินและร้อยละของแบคทีเรียระดับสกุลของหนูกลุ่ม L.Casei (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	0.143	0.787

Table 53 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับสกุล (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroidota_Bacteroides</i>	-0.209	0.287
<i>Bacteroidota_Muribaculaceae</i>	-0.099	0.617
<i>Prevotellaceae_Ga6A1_group</i>	-0.216	0.270
<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-0.318	0.099
<i>Prevotellaceae_UCG001</i>	-0.134	0.495
<i>Gastranaerophilales</i>	0.253	0.195
<i>Eubacterium_coprostanoligenes_group</i>	-0.071	0.721
<i>Acetitomaculum</i>	0.069	0.728
<i>Blautia</i>	-0.080	0.685
<i>Clostridia_UCG014</i>	0.010	0.960
<i>Firmicutes_Colidextribacter</i>	0.232	0.234
<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	0.147	0.455
<i>Firmicutes_Lactobacillus</i>	-0.218	0.266
<i>Phascolarctobacterium</i>	-0.311	0.107
<i>Romboutsia</i>	0.276	0.154
<i>Ruminococcus</i>	0.308	0.110
<i>Turicibacter</i>	0.109	0.579
<i>Firmicutes_UCG005</i>	-0.114	0.565
<i>UCG008</i>	-0.061	0.759
<i>Akkermansia</i>	-0.346	0.071

Table 54 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละ ในระดับสกุลของหนูกุ่ม Synbiotic ในสัปดาห์ที่ 0 (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>UCG005</i>	-0.029	0.957
<i>Ruminococcus</i>	0.600	0.208
<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	0.714	0.111
<i>Gastranaerophilales</i>	0.143	0.787
<i>Acetitomaculum</i>	0.116	0.827

Table 55 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละ ในระดับสกุลของหนูกุ่ม Synbiotic ในสัปดาห์ที่ 15 (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>UCG005</i>	-0.257	0.623
<i>Ruminococcus</i>	-0.029	0.957
<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>	0.886	0.019*
<i>Gastranaerophilales</i>	-0.257	0.623
<i>Acetitomaculum</i>	0.543	0.266

Table 56 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละ ในระดับสกุลของหนูกุ่ม Control (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	-0.600	0.400
<i>Muribaculaceae</i>	-0.400	0.600
<i>UCG008</i>	0.400	0.600

Table 57 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละ ในระดับสกุลของหนูกุ่ม Gac (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	0.400	0.400
<i>Phascolarctobacterium</i>	0.600	0.200

Table 58 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับสกุลของหนูกลุ่ม STD (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	0.200	1.000

Table 59 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับสกุลของหนูกลุ่ม Synbiotic (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	-0.029	0.957
<i>Prevotellaceae_NK3B31_group</i>	-0.543	0.266
<i>Akkermansia</i>	-0.771	0.072

Table 60 แสดงค่าผลต่างความสัมพันธ์ระหว่าง TMAO และร้อยละในระดับสกุลของหนูกลุ่ม L.Casei (relative abundance)

Relative abundance (genus)	Correlation coefficient	P value
<i>Bacteroides</i>	0.200	0.704

บรรณานุกรม

1. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349(9064):1498-504.
2. Zhang W, Miikeda A, Zuckerman J, Jia X, Charugundla S, Zhou Z, et al. Inhibition of microbiota-dependent TMAO production attenuates chronic kidney disease in mice. *Scientific Reports*. 2021;11(1):518.
3. Chen M-l, Yi L, Zhang Y, Zhou X, Ran L, Yang J, et al. Resveratrol Attenuates Trimethylamine-N-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota. *mBio*. 2016;7(2):e02210-e2215.
4. Janeiro MH, Ramírez MJ, Milagro FI, Martínez JA, Solas M. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target. *Nutrients*. 2018;10(10):1398.
5. Roberts AB, Gu X, Buffa JA, Hurd AG, Wang Z, Zhu W, et al. Development of a gut microbe-targeted nonlethal therapeutic to inhibit thrombosis potential. *Nat Med*. 2018;24(9):1407-17.
6. Chang YC, Chu YH, Wang CC, Wang CH, Tain YL, Yang HW. Rapid Detection of Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide for Chronic Kidney Disease Prevention. *Biosensors (Basel)*. 2021;11(9).
7. Borges NA, Stenvinkel P, Bergman P, Qureshi AR, Lindholm B, Moraes C, et al. Effects of Probiotic Supplementation on Trimethylamine-N-Oxide Plasma Levels in Hemodialysis Patients: a Pilot Study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2019;11(2):648-54.
8. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6):1265-71.
9. Gammone MA, Pluchinotta FR, Bergante S, Tettamanti G, D'Orazio N. Prevention of cardiovascular diseases with Carotenoids. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2017;9:165-71.
10. Rissanen T, Voutilainen S, Nyssönen K, Salonen JT. Lycopene, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(10):900-7.

11. Kritchevsky SB. β -Carotene, Carotenoids and the Prevention of Coronary Heart Disease. *The Journal of Nutrition*. 1999;129(1):5-8.
12. Pinthong S, Judprasong K, Tangsuphoom N, Jittinandana S, Nakngamanong Y. Effect of different drying processes on physical properties and carotenoid content of Gac fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng.). 2019;5:61-70.
13. Liu Y, Dai M. Trimethylamine N-Oxide Generated by the Gut Microbiota Is Associated with Vascular Inflammation: New Insights into Atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2020;2020:4634172.
14. Cheng M, Ning K. Stereotypes About Enterotype: the Old and New Ideas. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2019;17(1):4-12.
15. Kalnins G, Kuka J, Grinberga S, Makrecka-Kuka M, Liepinsh E, Dambrova M, et al. Structure and Function of CutC Choline Lyase from Human Microbiota Bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2015;290(35):21732-40.
16. Bodea S, Funk MA, Balskus EP, Drennan CL. Molecular Basis of C-N Bond Cleavage by the Glycyl Radical Enzyme Choline Trimethylamine-Lyase. *Cell Chem Biol*. 2016;23(10):1206-16.
17. Fennema D, Phillips IR, Shephard EA. Trimethylamine and Trimethylamine N-Oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-Mediated Host-Microbiome Metabolic Axis Implicated in Health and Disease. *Drug Metab Dispos*. 2016;44(11):1839-50.
18. Jameson E, Quareshy M, Chen Y. Methodological considerations for the identification of choline and carnitine-degrading bacteria in the gut. *Methods*. 2018;149:42-8.
19. Massmig M, Reijerse E, Krausze J, Laurich C, Lubitz W, Jahn D, et al. Carnitine metabolism in the human gut: Characterization of the two-component carnitine monooxygenase CntAB from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295:jbc.RA120.014266.
20. Papandreou C, Moré M, Bellamine A. Trimethylamine N-Oxide in Relation to Cardiometabolic Health-Cause or Effect? *Nutrients*. 2020;12(5):1330.
21. Pelletier CC, Croyal M, Ene L, Aguesse A, Billon-Crossouard S, Krempf M, et al. Elevation of Trimethylamine-N-Oxide in Chronic Kidney Disease: Contribution of

Decreased Glomerular Filtration Rate. *Toxins*. 2019;11(11):635.

22. Ufnal M, Jazwiec R, Dadlez M, Drapala A, Sikora M, Skrzypecki J. Trimethylamine-N-Oxide: A Carnitine-Derived Metabolite That Prolongs the Hypertensive Effect of Angiotensin II in Rats. *Canadian Journal of Cardiology*. 2014;30(12):1700-5.

23. Naghipour S, Cox AJ, Peart JN, Du Toit EF, Headrick JP. Trimethylamine N-oxide: heart of the microbiota-CVD nexus? *Nutr Res Rev*. 2021;34(1):125-46.

24. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472(7341):57-63.

25. Chen K, Zheng X, Feng M, Li D, Zhang H. Gut Microbiota-Dependent Metabolite Trimethylamine N-Oxide Contributes to Cardiac Dysfunction in Western Diet-Induced Obese Mice. *Front Physiol*. 2017;8:139.

26. Li T, Chen Y, Gua C, Li X. Elevated Circulating Trimethylamine N-Oxide Levels Contribute to Endothelial Dysfunction in Aged Rats through Vascular Inflammation and Oxidative Stress. *Front Physiol*. 2017;8:350.

27. Boini KM, Hussain T, Li P-L, Koka S. Trimethylamine-N-Oxide Instigates NLRP3 Inflammasome Activation and Endothelial Dysfunction. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(1):152-62.

28. Zhao W-Y, Zhang L, Sui M-X, Zhu Y-H, Zeng L. Protective effects of sirtuin 3 in a murine model of sepsis-induced acute kidney injury. *Scientific Reports*. 2016;6(1):33201.

29. Chen D, Huang C, Chen Z. A review for the pharmacological effect of lycopene in central nervous system disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;111:791-801.

30. Sun X, Jiao X, Ma Y, Liu Y, Zhang L, He Y, et al. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;481(1-2):63-70.

31. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biology*. 2015;4:296-307.

32. Ma G, Pan B, Chen Y, Guo C, Zhao M, Zheng L, et al. Trimethylamine N-oxide in atherogenesis: impairing endothelial self-repair capacity and enhancing monocyte

adhesion. *Bioscience Reports*. 2017;37(2):BSR20160244.

33. Yang G, Lin C-C, Yang Y, Yuan L, Wang P, Wen X, et al. Nobiletin Prevents Trimethylamine Oxide-Induced Vascular Inflammation via Inhibition of the NF- κ B/MAPK Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(22):6169-76.

34. Monsalve B, Concha-Meyer A, Palomo I, Fuentes E. Mechanisms of Endothelial Protection by Natural Bioactive Compounds from Fruit and Vegetables. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(1 Suppl 0):615-33.

35. Csepanyi E, Czompa A, Haines D, Lekli I, Bakondi E, Balla G, et al. Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model. *Pharmacological Research*. 2015;100:148-56.

36. Bohn T, Desmarchelier C, Dragsted LO, Nielsen CS, Stahl W, Rühl R, et al. Host-related factors explaining interindividual variability of carotenoid bioavailability and tissue concentrations in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(6).

37. Lessin WJ, Catigani GL, Schwartz SJ. Quantification of cis-trans Isomers of Provitamin A Carotenoids in Fresh and Processed Fruits and Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997;45(10):3728-32.

38. Yamagata K. Carotenoids Regulate Endothelial Functions and Reduce the Risk of Cardiovascular Disease. 2017.

39. Andersen K, Kesper MS, Marschner JA, Konrad L, Ryu M, Kumar Vr S, et al. Intestinal Dysbiosis, Barrier Dysfunction, and Bacterial Translocation Account for CKD-Related Systemic Inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(1):76-83.

40. Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(2):79-87.

41. Li J, Zhao F, Wang Y, Chen J, Tao J, Tian G, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017;5(1):14.

42. Caesar R, Reigstad CS, Bäckhed HK, Reinhardt C, Ketonen M, Lundén G, et al. Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut*. 2012;61(12):1701-7.

43. Malard F, Dore J, Gaugler B, Mohty M. Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease. *Mucosal Immunol*. 2021;14(3):547-54.

44. Rastogi S, Singh A. Gut microbiome and human health: Exploring how the probiotic genus *Lactobacillus* modulate immune responses. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13.
45. Abdi M, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H, Ranjbar R. *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* as anti-atherosclerotic agents. *Iran J Basic Med Sci*. 2022;25(8):934-46.
46. Wang Q, Guo M, Liu Y, Xu M, Shi L, Li X, et al. *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium longum* Attenuate Choline-Induced Plasma Trimethylamine N-Oxide Production by Modulating Gut Microbiota in Mice. *Nutrients*. 2022;14(6).
47. Carozzi V, Chiorazzi A, Canta A, Oggioni N, Gilardini A, Rodriguez-Menendez V, et al. Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel in a rat model of peripheral neurotoxicity. *European Journal of Cancer*. 2009;45(4):656-65.
48. Patel N, Yaqoob MM, Aksentijevic D. Cardiac metabolic remodelling in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2022;18(8):524-37.
49. Matsushita K, Ballew SH, Wang AY, Kalyesubula R, Schaeffner E, Agarwal R. Epidemiology and risk of cardiovascular disease in populations with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2022;18(11):696-707.
50. Hoek J, Bloemendal KM, van der Velden LA, van Diessen JN, van Werkhoven E, Klop WM, et al. Nephrotoxicity as a Dose-Limiting Factor in a High-Dose Cisplatin-Based Chemoradiotherapy Regimen for Head and Neck Carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2016;8(2).
51. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*. 2008;73(9):994-1007.
52. Shi M, McMillan KL, Wu J, Gillings N, Flores B, Moe OW, et al. Cisplatin nephrotoxicity as a model of chronic kidney disease. *Lab Invest*. 2018;98(8):1105-21.
53. Behling EB, Sendão MC, Francescato HD, Antunes LM, Costa RS, Bianchi Mde L. Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacol Rep*. 2006;58(4):526-32.
54. Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology*. 2018;23(1):5-11.
55. Li X, Yu T, Wang S, Wang Q, Li M, Liu Z, et al. Diallyl sulfide-induced attenuation of n-hexane-induced peripheral nerve impairment is associated with metabolic inhibition of n-hexane. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;137:111167.

56. Wu T, Gao Y, Hao J, Yin J, Li W, Geng J, et al. Lycopene, amaranth, and sorghum red pigments counteract obesity and modulate the gut microbiota in high-fat diet fed C57BL/6 mice. *Journal of Functional Foods*. 2019;60:103437.
57. Stubbs JR, House JA, Ocque AJ, Zhang S, Johnson C, Kimber C, et al. Serum Trimethylamine-N-Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):305-13.
58. Zhang X, Li Y, Yang P, Liu X, Lu L, Chen Y, et al. Trimethylamine-N-Oxide Promotes Vascular Calcification Through Activation of NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3) Inflammasome and NF- κ B (Nuclear Factor κ B) Signals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(3):751-65.
59. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GA, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* [Internet]. 2019; 7(1).
60. Voroneanu L, Burlacu A, Brinza C, Covic A, Balan GG, Nistor I, et al. Gut Microbiota in Chronic Kidney Disease: From Composition to Modulation towards Better Outcomes—A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine* [Internet]. 2023; 12(5).
61. Hu S, Wang J, Xu Y, Yang H, Wang J, Xue C, et al. Anti-inflammation effects of fucosylated chondroitin sulphate from *Acaudina molpadioides* by altering gut microbiota in obese mice. *Food Funct*. 2019;10(3):1736-46.
62. Ling X, Linglong P, Weixia D, Hong W. Protective Effects of Bifidobacterium on Intestinal Barrier Function in LPS-Induced Enterocyte Barrier Injury of Caco-2 Monolayers and in a Rat NEC Model. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161635.
63. Wichapoon B, Punsawad C, Chaisri U, Viriyavejakul P. Glomerular changes and alterations of zonula occludens-1 in the kidneys of *Plasmodium falciparum* malaria patients. *Malaria Journal*. 2014;13(1):176.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ภานุมาศ เข้มแข็ง
วัน เดือน ปี เกิด	11-08-2537
สถานที่เกิด	กาญจนบุรี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ที่อยู่ปัจจุบัน	589 หมู่ 1 ต.หนองปรือ อ. หนองปรือ จ.กาญจนบุรี 71220



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY