การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น

น.ส.พิมพ์กมล เกียรติสุรนนท์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Alteration of Gut Microbiota Diversity after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Pilot Study

Miss Phimkamon Kiatsuranon

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medicine

Department of Medicine

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น
โดย	น.ส.พิมพ์กมล เกียรติสุรนนท์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงกมลวรรณ จุติวรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงกมลวรรณ จุติวรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ นายแพทย์ชนัทธ์ กำธรรัตน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ นายแพทย์จักรพงษ์ บรูมินเหนทร์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

พิมพ์กมล เกียรติสุรนนท์ : การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น. (Alteration of Gut Microbiota Diversity after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Pilot Study) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. พญ.กมลวรรณ จุติวรกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

ที่มาและความสำคัญ การเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ส่งผลกระทบต่อผลลัพธ์และการเกิดภาวะแทรกซ้อนในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น ปัจจุบันหลักฐานดังกล่าวมีจำกัดในแถบเอเชียและยังไม่เคยมีการศึกษาในประเทศมาก่อน ผู้วิจัยจึงทำการศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้และความสัมพันธ์ต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นในประชากรไทย

วิธีการวิจัย ทำการวิจัยแบบนำร่องในผู้ป่วยอายุ $\geq$ 15 ปีที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เก็บตัวอย่างอุจจาระที่ 3 ระยะคือ ภายใน 1 สัปดาห์ก่อนได้รับยาเคมีบำบัดเพื่อรับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ภายใน 3 วันหลังร่างกายยอมรับเซลล์ต้นกำเนิดจากผู้บริจาค (engraftment) และหลังจาก engraftment แล้ว 1 เดือน นำตัวอย่างอุจจาระไปทำการวิเคราะห์ทางจุลชีวิทยาโดย 16S rRNA gene sequencing ประเมินความหลากหลายโดยใช้ Shannon diversity index เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดและดูความสัมพันธ์ระหว่างไมโครไบโอต้าในลำไส้กับการเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านต้านร่างกายชนิดเฉียบพลัน (acute graft versus host disease, acute GVHD)

ผลการศึกษา ผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นทั้งหมด 11 ราย มีผู้ป่วย 2 ราย (ร้อยละ 18.2) เกิด acute GVHD ไม่มีผู้ป่วยเสียชีวิตในระหว่าง การศึกษานี้ พบการติดเชื้อในกระแสเลือดและการติดเชื้อ *C. difficile* อย่างละ 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 27.3 จากผลการศึกษา Shannon diversity index ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม post-conditioning regimen เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ แสดงว่าช่วงที่มี engraftment จะมีความมากชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียลดลง

สรุปผล พบการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น ความหลากหลายที่ลดลงมีแนวโน้มสัมพันธ์กับการเกิดภาวะแทรกซ้อนคือการติดเชื้อและ acute GVHD สิ่งเหล่านี้บ่งชี้ว่าไมโครไบโอต้าในลำไส้นั้นอาจจะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จหรือล้มเหลวในการดูแลรักษาผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นได้

สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6270052930 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: gut microbiota, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, acute graft versus host disease

Phimkamon Kiatsuranon : Alteration of Gut Microbiota Diversity after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Pilot Study. Advisor: Asst. Prof. Kamonwan Jutivorakool, M.D. Co-advisor: TANITTHA CHATSUWAN, Ph.D.

Background: Alteration of gut microbiota effect on outcomes and complications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Currently, these findings are limited in Asia and have never been studied in Thailand before. We examined the patterns of changing in gut microbiota diversity and their association with complications after allo-HSCT in Thai population.

Methods: We performed a pilot study. Consecutive participants age $\geq$ 15 years who underwent allo-HSCT in King Chulalongkorn Memorial Hospital were enrolled. We collected fecal specimens at 3 phases: within a week before the start of pre-transplant conditioning regimen, within 3 days after stem cell engraftment and finally a month after. Microbial analysis was performed by 16S rRNA gene sequencing and diversity was estimated by the Shannon diversity index. Alteration of gut microbiota diversity after transplantation and association of the gut microbiota with acute GVHD were evaluated.

Results: Total of 11 participants were enrolled. 2 patients (18.2%) had an acute GVHD. No patient died during the study period. Bloodstream infection and *C. difficile* infection were detected in 3 patients (27.3%). The values of Shannon diversity index were significantly decreased in post-conditioning regimen group compared with other groups. These findings illustrated that the during engraftment, the bacterial richness and diversity were relatively low.

Conclusions: During allo-HSCT, the diversity and stability of the gut microbiota are disrupted. The association of lower microbiota diversity with poor survival was explained in part by higher complication with acute GVHD or infection. These indicate that the gut microbiota may be an important factor in the success or failure in allo-HSCT.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study:	Medicine	Student's Signature .....
Academic Year:	2020	Advisor's Signature .....
		Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้เนื่องจากความเมตตากรุณาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงกมลวรรณ จุติวรกุลและดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้เสียสละเวลาในการให้คำปรึกษาอย่างดีเสมอมา ซึ่งผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคุณวษมน ก่อชื่นจิตร จากบริษัท Porcinotec CO.,LTD. ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำ 16S rRNA gene sequencing ขอบพระคุณพยาบาลและเจ้าหน้าที่จากหอผู้ป่วย 20C อาคารภูมิสิริมังคลานุสรณ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูล เก็บตัวอย่างอุจจาระ และขอขอบพระคุณผู้ป่วยและผู้ดูแลทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าร่วมโครงการครั้งนี้

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณบิดามารดา ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

พิมพ์กมล เกียรติสุรนนท์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง 1

สารบัญรูปภาพ 1

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

1.2 คำถามของการวิจัย 2

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย 2

1.4 สมมติฐาน 3

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น 3

1.6 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่จะใช้ในการวิจัย 3

1.7 กรอบความคิดแนวิจัย 4

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 5

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการการแก้ไข 5

บทที่ 2 6

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 6

บทที่ 3 8

วิธีดำเนินการวิจัย 8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.1 รูปแบบการวิจัย....8
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย....8
3.3 ขนาดตัวอย่าง....8
3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย....8
11
11
3.5 การรวบรวมข้อมูล....11
3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย....12
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล....12
3.8 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม....13
บทที่ 4....14
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล....14
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล....14
1. ประชากรที่นำมาศึกษา....14
2. ข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วย....14
3. 16S rRNA gene sequencing....19
บทที่ 5....32
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ....32
5.1 อภิปรายผล....32
5.2 สรุปผลการวิจัย....35
5.3 ข้อเสนอแนะ....36
บรรณานุกรม....37
ประวัติผู้เขียน....41

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตาราง 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย 14

ตาราง 2 ข้อมูลของผู้ป่วยที่เกิดภาวะแทรกซ้อนหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด 17

ตาราง 2 ข้อมูลของผู้ป่วยที่เกิดภาวะแทรกซ้อนหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (ต่อ).....18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพ 1 แสดงหลอดทดลองปราศจากเชื้อ....9

รูปภาพ 2 แสดงตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส....10

รูปภาพ 3 แสดงเครื่องชั่งน้ำหนักตัวอย่างอุจจาระ....10

รูปภาพ 4 แสดงน้ำยา DNA/RNA ShieldTM reagent....11

รูปภาพ 5 แสดง Rarefaction curve....19

รูปภาพ 6 แสดง Box plots ของ alpha diversity ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง จุดสีดำเป็นตัวแทนของตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม....21

รูปภาพ 7 แสดง Microbiota compositions of different taxa profiles โดยแต่ละสีเป็นตัวแทนของ difference taxa compositions....23

รูปภาพ 8 แสดง Microbiota compositions of different taxa profiles โดยแต่ละสีเป็นตัวแทนของ difference taxa compositions (ต่อ)....24

รูปภาพ 9 แสดง Microbiota compositions of different taxa profiles โดยแต่ละสีเป็นตัวแทนของ difference taxa compositions (ต่อ)....25

รูปภาพ 10 แสดง Microbiota compositions of different taxa profiles โดยแต่ละสีเป็นตัวแทนของ difference taxa compositions (ต่อ)....26

รูปภาพ 11 แสดง Box plots ของการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ของ *Bacteroides, Enterococcus* และ *Faecalibacterium* ระหว่างกลุ่ม....27

รูปภาพ 12 แสดง Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) โดยแท่งกราฟเป็นตัวแทนของ effect size (LDA) for a significant taxon in a certain group ความยาวของแท่งกราฟเป็นตัวแทนของ log10 transformed LDA score แต่ละสีเป็นตัวแทนของกลุ่มที่ taxa ถูกนำเสนอมากเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ....29

รูปภาพ 13 แสดงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ระหว่างกลุ่ม aGVHD และ non-aGVHD....31

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) เป็นวิธีการรักษาที่มีความสำคัญสำหรับการรักษาโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยา รวมถึงโรคเลือดบางชนิด เนื่องจากเป็นวิธีที่เป็นที่ยอมรับแล้วว่าสามารถรักษาโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยาให้หายขาดได้ อย่างไรก็ตาม การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดนี้ก็มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะแทรกซ้อนเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อและการเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกาย (graft versus host disease, GVHD)(1) ซึ่งอวัยวะที่ได้รับผลกระทบส่วนใหญ่คืออวัยวะในระบบทางเดินอาหาร(2, 3)

ปกติแล้วในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จะประกอบไปด้วยแบคทีเรียมากมาย พบแบคทีเรียประมาณ 10^{14} ตัวและจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ประมาณ 1,000 สปีชีส์ต่อคน โดยปัจจุบันสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ประมาณ 15,000 สปีชีส์จากลำไส้ของมนุษย์(4-6) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria และ Verrucomicrobia(7) แบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เช่น ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค ช่วยย่อยอาหาร เมื่อร่างกายเกิดสภาวะเสียสมดุลของไมโครไบโอต้าในลำไส้ จะส่งผลเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรค เช่น สัมพันธ์กับการเกิดโรคอ้วน ภาวะขาดสารอาหาร Inflammatory bowel disease (IBD) โรคทางระบบประสาท โรคมะเร็ง ซึ่งมีรายงานว่าอาหาร ยา รวมถึงปัจจัยอีกหลายอย่างที่อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของไมโครไบโอต้าในลำไส้ทั้งสิ้น(8)

มีการศึกษาในทวีปยุโรปและอเมริกาพบว่าหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นนั้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ ทำให้มีความหลากหลายลดลง ซึ่งส่งผลถึงผลลัพธ์ในการรักษาและการเกิดภาวะแทรกซ้อนในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดได้ เช่น สัมพันธ์กับการติดเชื้อในกระแสเลือด สัมพันธ์กับการเกิดภาวะ

เซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกาย หรือสัมพันธ์กับอัตราตายที่สูงขึ้น(9-11) ดังนั้น การทราบถึงลักษณะความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ของผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นอาจจะเป็นตัวช่วยในการทำนายพยากรณ์โรคและช่วยเปลี่ยนแปลงการรักษาให้ดียิ่งขึ้นได้

แต่การศึกษาเหล่านี้ยังมีจำนวนค่อนข้างจำกัดทั้งในเอเชียและยังไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยมาก่อน เนื่องจากลักษณะของไมโครไบโอต้าในลำไส้น่าจะมีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากร ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นว่ามีความหลากหลายลดลงหรือไม่ และส่งผลกระทบต่อการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดได้แก่ การเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายอย่างไร

1.2 คำถามของการวิจัย

<u>คำถามหลัก</u>

ไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นมีความหลากหลายลดลงหรือไม่

<u>คำถามรอง</u>

- ความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายหรือไม่
- ชนิดของไมโครไบโอต้าในลำไส้ก่อนและหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นเป็นอย่างไร

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

<u>วัตถุประสงค์หลัก</u>

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วัตถุประสงค์รอง

- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายกับความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น
- เพื่อศึกษาชนิดของไมโครไบโอต้าในลำไส้ก่อนและหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น

1.4 สมมติฐาน

ไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นมีความหลากหลายลดลง

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น

จากสมมติฐานในการศึกษาที่ว่าไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นมีความหลากหลายลดลง ในการศึกษานี้จะเปรียบเทียบโดยนำตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นที่มีอายุ 15 ปีขึ้นไปมาสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย จากนั้นจะนำไปวิเคราะห์โดยการทำ 16S rRNA gene sequencing และวิเคราะห์ความหลากหลายโดยใช้วิธีการทางสถิติต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

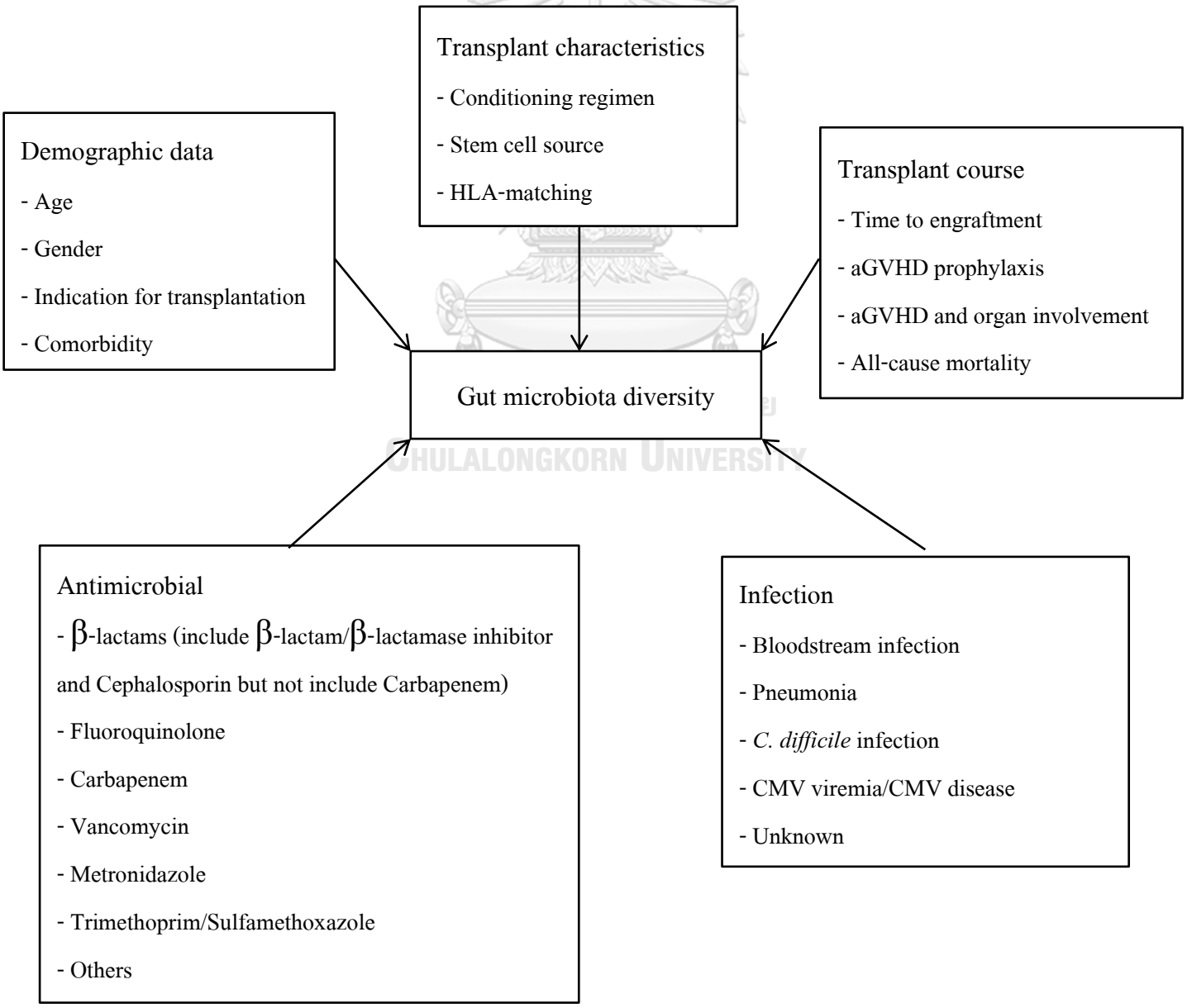
1.6 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่จะใช้ในการวิจัย

- Engraftment คือภาวะที่ร่างกายยอมรับเซลล์ต้นกำเนิดจากผู้บริจาค โดยนับจากวันแรกที่มี absolute neutrophil count มากกว่า 0.5 x 10^9/L อย่างน้อยสามวันติดกัน
- Graft versus host disease (GVHD) (12) เป็นปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังจากให้เซลล์ต้นกำเนิดเข้าไป พบได้บ่อยใน 3 อวัยวะคือ ผิวหนัง ตับ และทางเดินอาหาร วินิจฉัยจากอาการและอาการแสดง หรือผลตรวจทางพยาธิวิทยาร่วมกับไม่พบสาเหตุอื่น จำแนกชนิดและความรุนแรงตาม Modified Glucksberg หรือ Keystone criteria โดยภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิด

เฉียบพลัน (acute GVHD or aGVHD) จะเกิดภายใน 100 วันแรกของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด

- Alpha diversity(13) คือการประเมินความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง
- Amplicon sequence variant (ASV)(14) เป็นคำที่ใช้เรียก single DNA sequence ที่ได้จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งถูกสร้างขึ้นตามหลังการกำจัดลำดับของดีเอ็นเอที่ผิดพลาดในระหว่างการ polymerase chain reaction (PCR)

1.7 กรอบความคิดแนววิจัย



CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ปัจจุบันการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นนั้นเข้ามามีบทบาทในการรักษาโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยามากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ของมนุษย์ที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นส่งผลถึงผลลัพธ์ทางคลินิกและสัมพันธ์กับการเกิดภาวะแทรกซ้อนในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดได้ แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยมาก่อน การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรก ดังนั้น ถ้าเราทราบถึงลักษณะของไมโครไบโอต้าในลำไส้ของประชากรไทย ซึ่งอาจมีความแตกต่างจากกลุ่มประชากรอื่น รวมถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด อาจจะสามารถพัฒนาต่อยอดไปสู่การศึกษาที่ใหญ่ขึ้นในอนาคต เพื่อปรับปรุงการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดและการดูแลรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้ให้ดียิ่งขึ้น ลดอัตราการเสียชีวิต ลดการเกิดภาวะแทรกซ้อน และอาจนำไปสู่การศึกษาในผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายอวัยวะอื่นๆได้

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการการแก้ไข

เนื่องจากผู้เข้าร่วมวิจัยมีจำนวนค่อนข้างจำกัด และงานวิจัยนี้มีความเกี่ยวข้องกับบุคลากรหลายฝ่าย ไม่ว่าจะเป็นเจ้าหน้าที่ที่ดูแลผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดหรือเจ้าหน้าที่ที่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา จึงต้องมีการประชาสัมพันธ์ให้ข้อมูลเกี่ยวกับรายละเอียดและขั้นตอนการทำวิจัยแก่ผู้เข้าร่วมวิจัยและเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องในส่วนต่างๆ เพื่อที่จะได้ข้อมูลในการทำวิจัยครบถ้วนมากที่สุดและเกิดความผิดพลาดน้อยที่สุด ประกอบกับงานวิจัยนี้มีค่าใช้จ่ายในการทำวิจัยค่อนข้างสูง จึงต้องมีการขอทุนในการทำวิจัยเพิ่มเติม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาของ Ying Taur และคณะในปีค.ศ.2012 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นกับความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในกระแสเลือดในผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดทั้งหมด 94 ราย โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระที่ก่อนและหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดแล้วนำมาวิเคราะห์พบว่า หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นจะมีความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ลดลง ทำให้มี domination ของแบคทีเรียบางกลุ่มมากขึ้น และจากการศึกษานี้ยังพบอีกว่าการมี domination ของแบคทีเรียบางกลุ่ม ได้แก่ *Entercoccus* และ Proteobacteria นั้นจะสัมพันธ์กับการติดเชื้อในกระแสเลือดอีกด้วย(10)

ต่อมามีการศึกษาโดย Ying Taur และคณะอีกเช่นกันในปีค.ศ.2014 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นการศึกษาในผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น 80 ราย แต่เก็บตัวอย่างอุจจาระเฉพาะหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดคือตอนที่มี stem cell engraftment จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้แล้วดูอัตราการรอดชีวิตและอัตราการเสียชีวิต พบว่าหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดนั้นกลุ่มที่มีความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้น้อย (low diversity) จะสัมพันธ์กับ อัตราการรอดชีวิตที่ลดลง และมี transplant related death ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลจากการศึกษานี้ค่อนข้างสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้กล่าวไป(9)

จากการศึกษาของ Noriko Doki และคณะในปีค .ศ.2017 ที่ประเทศญี่ปุ่นในผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น 107 รายเกี่ยวกับความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้เฉพาะก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น พบว่าความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ก่อนการปลูกถ่ายนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเรื่องอัตราการรอดชีวิตและอัตราตาย พบเพียงว่าในผู้ป่วยที่เกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันจะมีแบคทีเรียกลุ่ม Firmicutes มาก ($p<0.01$) และมี Bacteroidetes น้อย ($p=0.106$) เมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่เกิด(15)

มีการศึกษาของ Elena Biagi และคณะในปีค .ศ.2019 ที่ประเทศอิตาลี เป็นการศึกษาในผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นจำนวน 36 ราย โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระที่ก่อนและหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดแล้วนำมาวิเคราะห์ พบว่าในผู้ป่วยที่เกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันจะมีความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ลดลง ร่วมกับพบแบคทีเรีย *Blautia* ลดลงและ *Fusobacterium* มากขึ้นตามลำดับ แต่การศึกษานี้ดูความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายเพียงอย่างเดียว ไม่ได้ดูผลลัพธ์ในด้านอื่นๆ(11)

มีการศึกษาของ Shinsuke Kusakabe และคณะที่ตีพิมพ์เมื่อเดือนกรกฎาคม ปีค .ศ.2019 ที่ประเทศญี่ปุ่น เป็นการศึกษาลักษณะของไมโครไบโอต้าในลำไส้เปรียบเทียบกันระหว่างผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น(16 ราย) กับผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของตนเอง (8 ราย) และ healthy control (10 ราย) จะเก็บตัวอย่างอุจจาระก่อนและหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด โดยเริ่มเก็บอุจจาระก่อนปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด 8 วันไปจนถึง 30 วันหลังทำ ผลปรากฏว่าพบ *Bifidobacterium* และ butyrate-producing bacteria มีสัดส่วนน้อยกว่าอย่างชัดเจนในผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นเมื่อเทียบกับ healthy control และยังพบอีกว่ากลุ่มที่มี instability of microbiota composition หลังปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น จะมีอัตราการรอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.0269)(16)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

การศึกษานี้เป็นแบบชนิด single-center pilot study (มีผู้เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น 10-15 รายต่อปี)

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

ประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

- ผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์หลังจากที่โครงการวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยแล้ว
- อายุ 15 ปีขึ้นไป

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

- ผู้ป่วยที่เคยได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมาก่อนหน้านี้
- ผู้ป่วยที่เก็บอุจจาระปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 ขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากเป็นการวิจัยแบบ observational study จะทำการรวบรวมข้อมูลจากผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นทุกรายที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในระยะเวลาประมาณ 1 ปีหลังจากที่โครงการวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมแล้ว เนื่องจากมีผู้เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์โดยเฉลี่ยประมาณ 10-15 รายต่อปี

3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย

1. ผู้ป่วยต้องได้รับการทำ informed consent ก่อนเข้าร่วมวิจัยทุกราย
2. เก็บตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นทุกราย โดยเก็บอุจจาระที่ 3 ระยะคือ

- ภายใน 1 สัปดาห์ก่อนได้รับยาเคมีบำบัดเพื่อรับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (pre-conditioning)
- ภายใน 3 วันหลังร่างกายยอมรับเซลล์ต้นกำเนิดจากผู้บริจาค (post-conditioning)
- หลังร่างกายยอมรับเซลล์ต้นกำเนิดจากผู้บริจาคแล้ว 1 เดือน (post-engraftment)

3. วิธีการเก็บตัวอย่างอุจจาระ มีดังนี้

- นำตัวอย่างอุจจาระบรรจุใส่ในหลอดทดลองปราศจากเชื้อผสมกับน้ำยา DNA/RNA Shield™ reagent ในอัตราส่วนอุจจาระ 1 กรัมต่อน้ำยา 9 มิลลิลิตร
- ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าเล็กน้อยเพื่อทำให้ส่วนผสมเข้ากัน
- จากนั้นนำหลอดที่บรรจุตัวอย่างอุจจาระไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสภายใน 24 ชั่วโมง ก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียต่อไป

4. นำตัวอย่างอุจจาระไปทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย
5. ทำการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาโดย 16S rRNA gene sequencing
6. การจัดการและทำลายตัวอย่างหลังเสร็จสิ้นการวิจัย เป็นไปตาม Standard Operating Procedures for Waste Disposal ของห้องปฏิบัติการ

รูปภาพ 1 แสดงหลอดทดลองปราศจากเชื้อ

รูปภาพ 2 แสดงตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

รูปภาพ 3 แสดงเครื่องชั่งน้ำหนักตัวอย่างอุจจาระ

รูปภาพ 4 แสดงน้ำยา DNA/RNA Shield™ reagent

3.5 การรวบรวมข้อมูล

1. เก็บข้อมูลจากผู้ป่วยและเวชระเบียน
2. เก็บข้อมูลทางด้านจุลชีววิทยาจากหน่วยจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
3. ข้อมูลที่จะทำการเก็บใน case record form มีดังนี้

- Demographic data

- Age
- Gender
- Indication for transplantation
- Comorbidity

- Transplant characteristics

- Conditioning regimen
- Stem cell source
- HLA-matching

- Transplant course

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- Time to engraftment
- aGVHD prophylaxis
- aGVHD and organ involvement
- All-cause mortality

- Antimicrobial agent (from 14 days before transplant to engraftment date)

- β-lactams (include β-lactam/β-lactamase inhibitor and Cephalosporin but not include Carbapenem)
- Fluoroquinolone
- Carbapenem
- Vancomycin
- Metronidazole
- Trimethoprim/Sulfamethoxazole
- Others

- Infection

- Bloodstream infection
- Pneumonia
- *C. difficile* infection
- CMV viremia/CMV disease
- Unknown

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย

การศึกษานี้มีข้อจำกัดบางประการคือ เป็นการศึกษาที่ทำในโรงพยาบาลเพียงแห่งเดียว และมีจำนวนผู้เข้าร่วมงานวิจัยที่ค่อนข้างจำกัด

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ความหลากหลายในแต่ละกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ alpha diversity metrics ได้แก่ ดัชนีความหลากหลาย (diversity index) เป็นค่าดัชนีที่ใช้บ่งชี้ถึงระดับความหลากหลายชนิดของแบคทีเรีย ดัชนีที่ใช้คือ Shannon diversity index
2. ใช้ statistical significance ที่ p-value < 0.05

3.8 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

1. หลักความเคารพในบุคคล ผู้เข้าร่วมวิจัยจะต้องได้รับความยินยอมในการเข้าร่วมโดยการทำ informed consent ทุกราย ซึ่งผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับข้อมูลอย่างครบถ้วนจนเข้าใจเป็นอย่างดีและตัดสินใจอย่างอิสระในการให้ความยินยอม
2. หลักการให้ประโยชน์/ไม่ก่อให้เกิดอันตราย ผลการศึกษาที่ได้จากการวิจัยจะเป็นประโยชน์ในการดูแลรักษาผู้ป่วยอื่นๆ ต่อไปในอนาคต โดยผู้เข้าร่วมวิจัยจะไม่ได้รับความเสี่ยง ใดๆ จากการทำหัตถการหรือให้ยาใดๆ เพิ่มเติมจากการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ และข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัยทุกรายจะถูกเก็บเป็นความลับ การเก็บข้อมูลในแบบบันทึกข้อมูลจะบันทึกเป็นหมายเลขสมมติของผู้เข้าร่วมวิจัย และไม่มีการระบุข้อมูลที่สามารถบ่งชี้ถึงตัวบุคคลได้
3. หลักความยุติธรรม มีเกณฑ์การคัดเข้าและออกชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน การศึกษาดีเอ็นเอทำเฉพาะในแบคทีเรียเท่านั้น ไม่ทำในมนุษย์
4. การรวบรวมข้อมูลจะดำเนินการหลังจากได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ประชากรที่นำมาศึกษา

มีผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นที่อยู่ในเกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษาและยินยอมเข้าร่วมการศึกษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2563 จนถึงวันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2564 ทั้งสิ้น 12 ราย แต่มีผู้ป่วย 1 รายที่เก็บอุจจาระไม่ครบตามกำหนด จึงไม่ได้นำมาศึกษาต่อ

2. ข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วย

ผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นทั้งหมด 11 ราย เป็นเพศชาย 6 ราย และเพศหญิง 5 ราย อายุเฉลี่ยของผู้ป่วย 33.8 ปี ข้อบ่งชี้ในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้คือ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (Acute myeloid leukemia) การเตรียมผู้ป่วยทุกรายก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดใช้ Myeloablative conditioning regimen แหล่งที่มาของเซลล์ต้นกำเนิดของผู้ป่วยทุกรายในการศึกษานี้มาจากทางเส้นเลือด (Peripheral blood stem cell, PBSC) ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ดังแสดงในตารางที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

ข้อมูลของผู้ป่วย	จำนวน (ร้อยละ)
อายุ (SD)	33.8 (9.9)
เพศชาย	6 (54.6)
Age-adjusted HCT-CI[1] (SD)	0.55 (0.8)
ข้อบ่งชี้ในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด	
- Acute myeloid leukemia	8 (72.7)
- Acute lymphoblastic leukemia	1 (9.1)
- Chronic myeloid leukemia	1 (9.1)
- Myelodysplatic syndrome	1 (9.1)

Conditioning regimen - Myeloablative	11 (100)
แหล่งที่มาของเซลล์ต้นกำเนิด - Peripheral blood	11 (100)
HLA-matching - Match-related - Match-unrelated	4 (36.4) 7 (63.6)
จำนวนวันตั้งแต่ใส่เซลล์ต้นกำเนิดจนถึงวันที่ engraftment (IQR)	18 (10)
aGVHD prophylaxis - CsA-based - Tac-based	7 (63.6) 4 (36.4)
All-cause mortality	0
ยาปฏิชีวนะ[2] - β-lactams[3] - Carbapenem - Fluoroquinolone - Vancomycin - Trimethoprim/Sulfamethoxazole[4] - Clindamycin	 10 (90.9) 4 (36.4) 1 (9.1) 5 (45.5) 11 (100) 1 (9.1)
aGVHD	2 (18.2)
การติดเชื้อ - การติดเชื้อในกระแสเลือด[5] - การติดเชื้อ *C. difficile* - CMV viremia - ไข้ไม่ทราบสาเหตุ	 3 (27.3) 3 (27.3) 5 (45.5) 8 (72.7)

[1] HCT-CI = Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

[2] ประเมินการใช้ยาปฏิชีวนะของผู้ป่วยตั้งแต่ 14 วันก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นจนถึงวันที่ engraftment

[3] β-lactams รวมทั้ง β-lactam/β-lactamase inhibitor และ Cephalosporin แต่ไม่รวม Carbapenem

[4] ผู้ป่วยทุกรายจะได้รับ Trimethoprim/Sulfamethoxazole for prophylaxis และหยุดก่อนเริ่ม conditioning regimen

[5] การติดเชื้อในกระแสเลือดมีสาเหตุมาจาก Non-MDR *E. coli* พบในผู้ป่วย 1 ราย และอีก 1 รายมีสาเหตุมาจาก MDR *E. coli*

จากผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 11 ราย มีผู้ป่วย 2 ราย (ร้อยละ 18.2) เกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลัน (aGVHD) เกิดที่บริเวณผิวหนังและทางเดินอาหาร จำนวนวันเฉลี่ยตั้งแต่ใส่เซลล์ต้นกำเนิดจนถึงวันที่ engraftment อยู่ที่ 18 วัน ไม่มีผู้ป่วยเสียชีวิตในระหว่างการศึกษานี้ ผู้วิจัยพบ CMV viremia ในผู้ป่วยเกือบครึ่งหนึ่งของทั้งหมด (ร้อยละ 45.5) พบการติดเชื้อในกระแสเลือดในผู้ป่วย 3 ราย (27.3%) ซึ่งมีจำนวนเท่ากับที่พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *C. difficile* ผู้ป่วยทุกรายที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดนั้นเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ Non-MDR *E. coli*, Non-MDR *K. pneumoniae* และ MDR *E. coli* อย่างไรก็ตาม ร้อยละ 72.7 ของผู้ป่วยทั้งหมดนั้นไม่ทราบสาเหตุของไข้ แต่ผู้วิจัยคิดว่าอธิบายได้จากการเกิดภาวะไข้จากเม็ดเลือดขาวต่ำ (febrile neutropenia) ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษานี้เกิดจากหลายข้อบ่งชี้ เช่น การให้ยาเพื่อป้องกันการติดเชื้อ การให้ยาแบบครอบคลุม (empirical therapy) และการให้ยาตรงตามเชื้อที่เป็นสาเหตุ เป็นต้น ผู้ป่วยทุกรายได้รับยาปฏิชีวนะในการศึกษานี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม β-lactams และ Trimethoprim/Sulfamethoxazole การให้ยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่นั้นให้ทางหลอดเลือดดำ ยกเว้น Vancomycin ชนิดกินสำหรับการรักษาการติดเชื้อ *C. difficile* ข้อมูลของผู้ป่วยที่เกิดภาวะแทรกซ้อนหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 แสดงข้อมูลของผู้ป่วยที่เกิดภาวะแทรกซ้อนหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด

ผู้ป่วย	อายุ	เพศ	โรคร่วม	HLA-matching	Acute GVHD prophylaxis	ยาปฏิชีวนะที่ได้รับ	การเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ช่วง engraftment	ภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อ	Acute GVHD
2	41	หญิง	-	ไม่	Tac-based	Ceftazidime Piperacillin/Tazobactam Meropenem Levofloxacin Vancomycin Co-trimoxazole	Firmicutes ลดลง Bacteriodota เพิ่มขึ้น Proteobacteria ลดลง	ติดเชื้อ *C. difficile* (วันที่ 1)	มี (วันที่ 13)
6	48	หญิง	-	ใช่	CsA-based	Ceftazidime Piperacillin/Tazobactam Vancomycin Co-trimoxazole	Firmicutes เพิ่มขึ้น Bacteriodota ลดลง Proteobacteria เพิ่มขึ้น Fusobacteriota ลดลง	ติดเชื้อ *E. coli* ในกระแสเลือด(วันที่ 10) ติดเชื้อ *C. difficile* (วันที่ 8)	ไม่มี
9	46	ชาย	ความดันโลหิตสูงและไขมันในเลือดสูง	ใช่	CsA-based	Amoxicillin/Clavualnate Ceftriaxone Tazocin Meropenem Co-trimoxazole	Firmicutes เพิ่มขึ้น Bacteriodota ลดลง Fusobacteriota ลดลง	ติดเชื้อ MDR *E. coli* ในกระแสเลือด (วันที่ 16)	ไม่มี

ตาราง 3 แสดงข้อมูลของผู้ป่วยที่เกิดภาวะแทรกซ้อนหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (ต่อ)

ผู้ป่วย	อายุ	เพศ	โรคร่วม	HLA-matching	Acute GVHD prophylaxis	ยาปฏิชีวนะที่ได้รับ	การเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ช่วง engraftment	ภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อ	Acute GVHD
10	32	ชาย	-	ใช่	CsA-based	Piperacillin/Tazobactam Vancomycin Co-trimoxazole	Firmicutes เพิ่มขึ้น Bacteriodota ลดลง	ติดเชื้อ *K. pneumonia* ในกระแสเลือด (วันที่ 10) ติดเชื้อ *C. difficile* (วันที่ 8)	ไม่มี
11	34	ชาย	-	ใช่	CsA-based	Ceftazidime Meropenem Vancomycin Clindamycin Co-trimoxazole	Firmicutes ลดลง Bacteriodota เพิ่มขึ้น	-	มี (วันที่ 22)

* วันแรกที่ทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดนับเป็นวันที่ 0

3. 16S rRNA gene sequencing

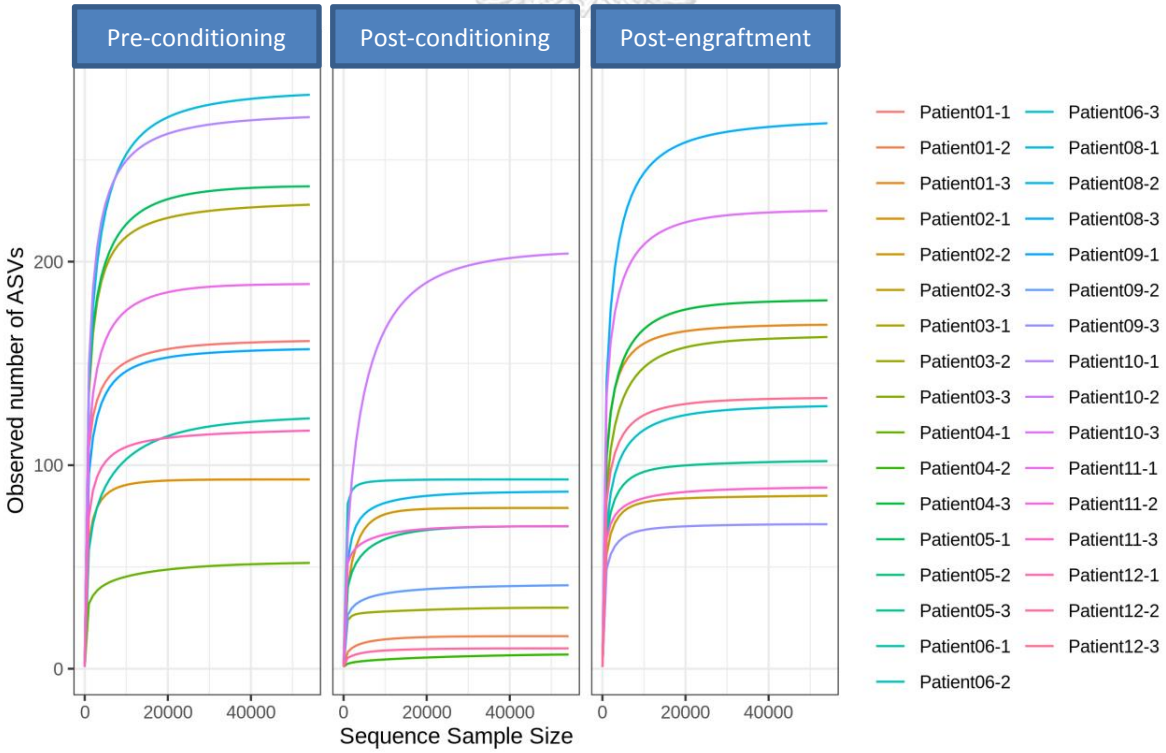
1) การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 33 ตัวอย่างถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียและการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาโดยวิธี 16S rRNA metagenomic sequencing

2) Quality profiles

ความมากชนิดของแบคทีเรีย (richness) ในตัวอย่างทั้งหมดเข้าใกล้ความอิ่มตัวของลำดับการอ่านที่ 54,172 โดยประเมินจาก rarefaction curve ซึ่งเป็นกราฟที่ใช้บ่งบอกความมากชนิดของสปีชีส์ สามารถนำมาใช้ในการประมาณจำนวนของ ASV ในขนาดที่เท่ากันได้ ตำแหน่งที่เกิด plateau curve นั้นเป็นตำแหน่งของลำดับการอ่านที่เหมาะสมในการเป็นตัวแทนขององค์ประกอบของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ซึ่งเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการประเมินโครงสร้างที่แท้จริงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ในผู้ป่วยแต่ละกลุ่มตัวอย่างได้ โดยพบว่ากลุ่ม post-conditioning regimen แสดงให้เห็นว่าจำนวนของ ASV ที่น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่ม pre-conditioning regimen และกลุ่ม post-engraftment นั้นมีความอุดมสมบูรณ์ของไมโครไบโอต้าในลำไส้ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ

รูปภาพ 5 แสดง Rarefaction curve

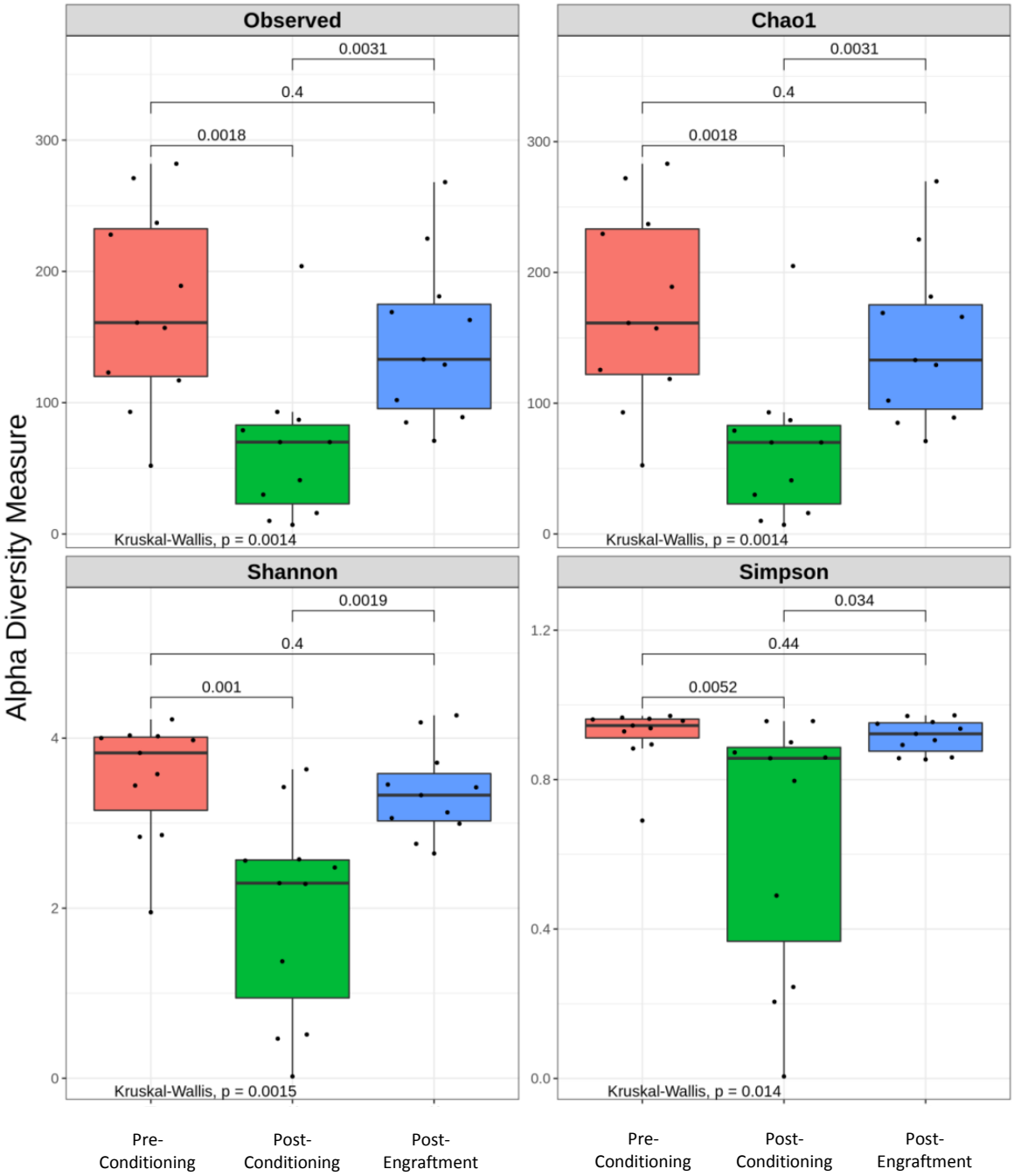


3) Alpha diversity

การประมวลผลของ 16S rRNA gene sequencing จากการอ่านทั้งสิ้น 2,222,659 ครั้ง พบว่าความอุดมสมบูรณ์ของ observed ASVs ในกลุ่ม post-conditioning regimen นั้นต่ำกว่ากลุ่ม pre-conditioning regimen และกลุ่ม post-engraftment อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.0018 และ 0.0031 ตามลำดับ) ข้อมูลนี้สอดคล้องกับ rarefaction curve ในผลการศึกษาก่อนหน้านี้ Chao1 richness index แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม post-conditioning regimen เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ($p < 0.01$) อย่างไรก็ตาม ความมากชนิดของแบคทีเรียนั้นไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม pre-conditioning regimen และ post-engraftment (p=0.4) จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่ม post-conditioning regimen มีความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียน้อยที่สุด นอกจากนี้ Shannon diversity index และ PD whole tree index ยังลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม post-conditioning regimen เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ($p < 0.01$ และ 0.05 ตามลำดับ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปภาพ 6 แสดง Box plots ของ alpha diversity ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง จุดสีดำเป็นตัวแทนของตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม



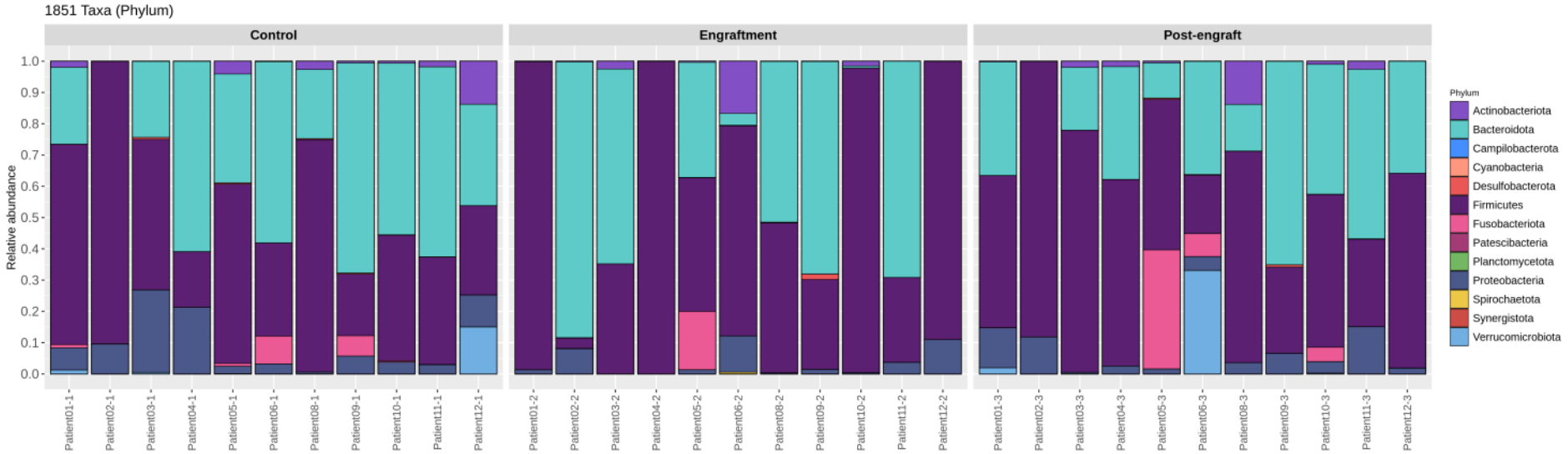
4) Taxonomic profiles

จากการศึกษานี้สามารถแยกชนิดของแบคทีเรียได้ทั้งหมด 13 ไฟลัม พบความชุกของแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes ค่อนข้างมาก (เฉลี่ย 0.52±0.007) ตามด้วยไฟลัม Bacteriodota และ Proteobacteria ตามลำดับ ในระหว่างที่มี engraftment พบว่าสัดส่วนของ Firmicutes และ Bacteriodota ในลำไส้ของผู้ป่วยทั้งหมดนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม pre-conditioning regimen แสดงให้เห็นว่าการเสียสมดุลของไมโครไบโอต้าในลำไส้นั้นมีแนวโน้มเกิดขึ้นระหว่างที่มี engraftment ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการฉายแสงหรือการใช้ยาต่างๆ อย่างไรก็ตามไมโครไบโอต้าที่เสียสมดุลไปนั้นสามารถที่จะกลับเข้าสู่สภาวะปกติได้หลังจากที่ผ่านช่วง engraftment ไปแล้วประมาณ 1 เดือน

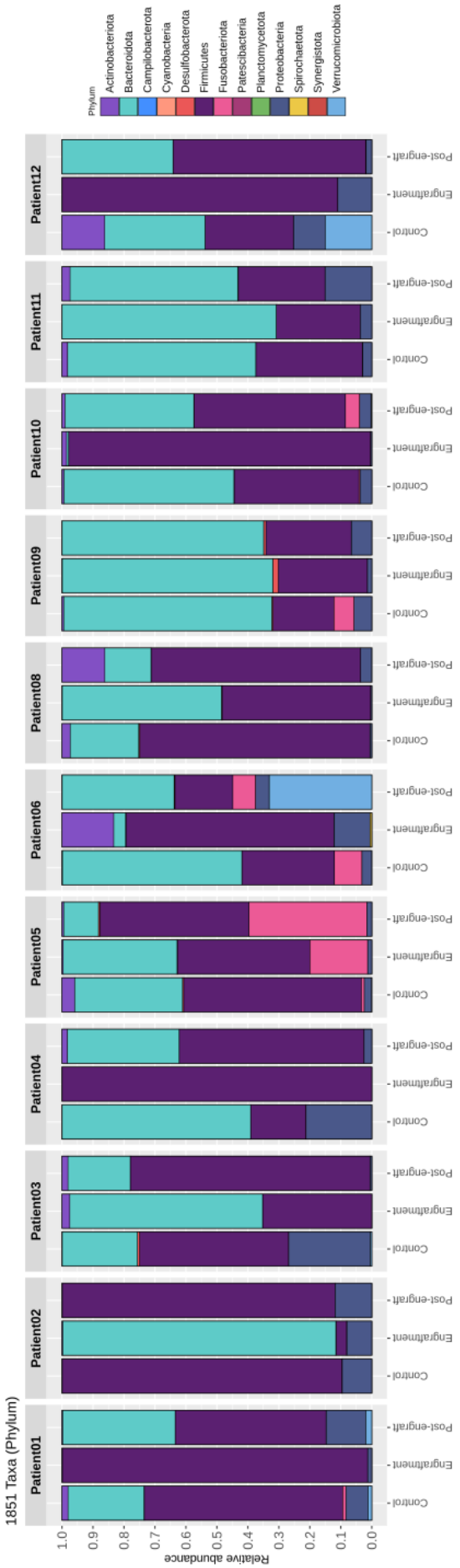
ไมโครไบโอต้าในลำไส้ของผู้ป่วยกลุ่ม pre-conditioning regimen นั้นอุดมไปด้วย *Bacteroides* และ *Faecalibacterium* พบการลดความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียในกลุ่ม post-conditioning regimen โดย *Bacteroides* นั้นมีความอุดมสมบูรณ์ลดลงในผู้ป่วยทุกรายระหว่างที่มี engraftment เทียบกับกลุ่ม pre-conditioning regimen จริงแต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.161) ส่วน *Faecalibacterium* นั้นมีความอุดมสมบูรณ์ลดลงเช่นกันและลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบระหว่างกลุ่ม pre-conditioning regimen และ post-conditioning regimen (p=0.014) ที่น่าสนใจคือจำนวนสมาชิกของ *Enterococcus* (ไฟลัม Firmicutes) นั้นเพิ่มขึ้นในกลุ่ม post-conditioning regimen เทียบกับกลุ่ม pre-conditioning regimen อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.007) โดย *E. faecalis* และ *E. faecium* นั้นเป็นสองสปีชีส์ที่พบบ่อยในลำไส้ของมนุษย์ นอกจากนี้ *Lactobacillus* ซึ่งเป็นที่รู้จักในฐานะของโพรไบโอติกส์แบคทีเรีย ในการศึกษานี้กลับไม่พบความแตกต่างของความอุดมสมบูรณ์ระหว่างกลุ่ม (p=0.163) อย่างไรก็ตามส่วนประกอบของแบคทีเรียในลำไส้เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยหลังจากผ่านช่วง engraftment โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Bacteroides* จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าไมโครไบโอต้าในลำไส้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ในระหว่างที่มี engraftment ซึ่งมีอิทธิพลมาจากการให้ยาเคมีบำบัด การฉายแสง อาหาร สถานะสุขภาพขณะนั้น และยาต่างๆ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าการเสียสมดุลของไมโครไบโอต้าในระหว่างการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นนั้นเป็นผลเพียงชั่วคราว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

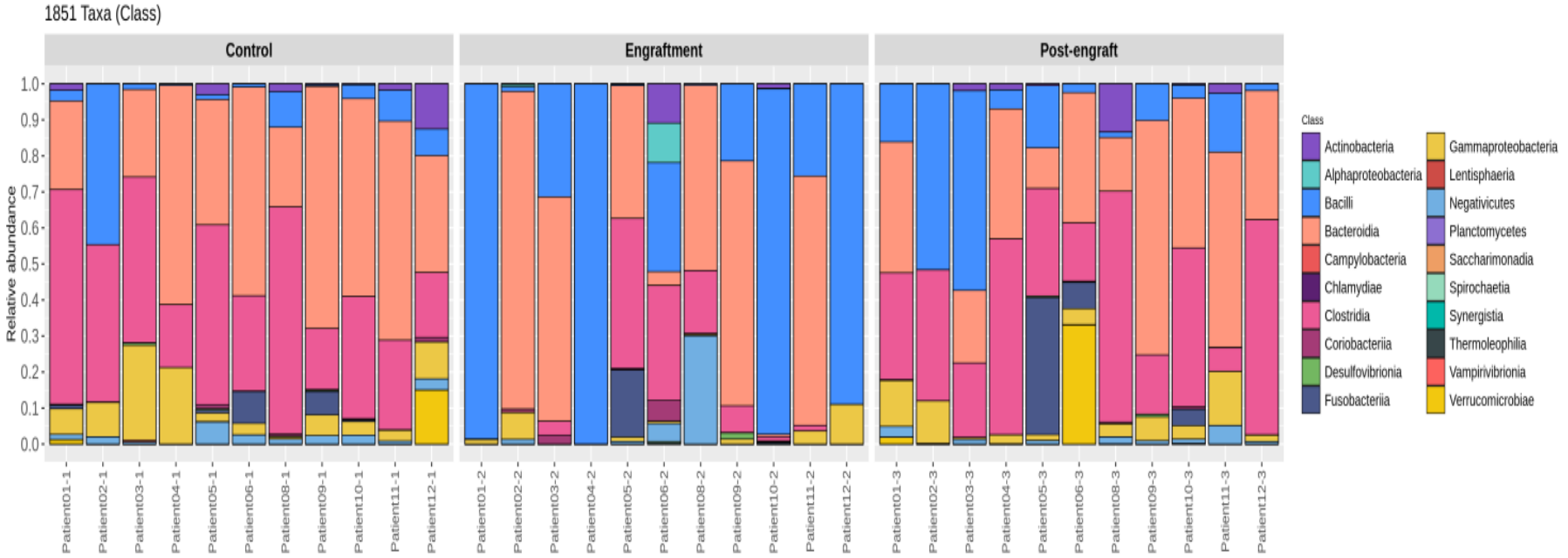
รูปภาพ 7 แสดง Microbiota compositions of different taxa profiles โดยแต่ละสีเป็นตัวแทนของ difference taxa compositions



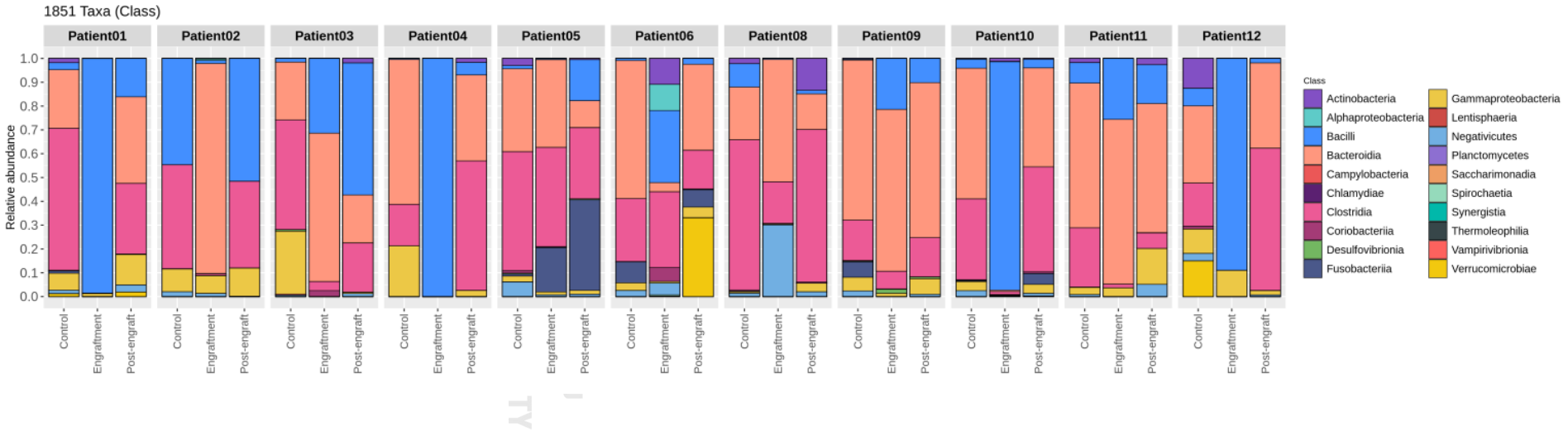
รูปภาพ 8 แสดง Microbiota compositions of different taxa profiles โดยแต่ละสีแทนความแตกต่าง difference taxa compositions (ต่อ)



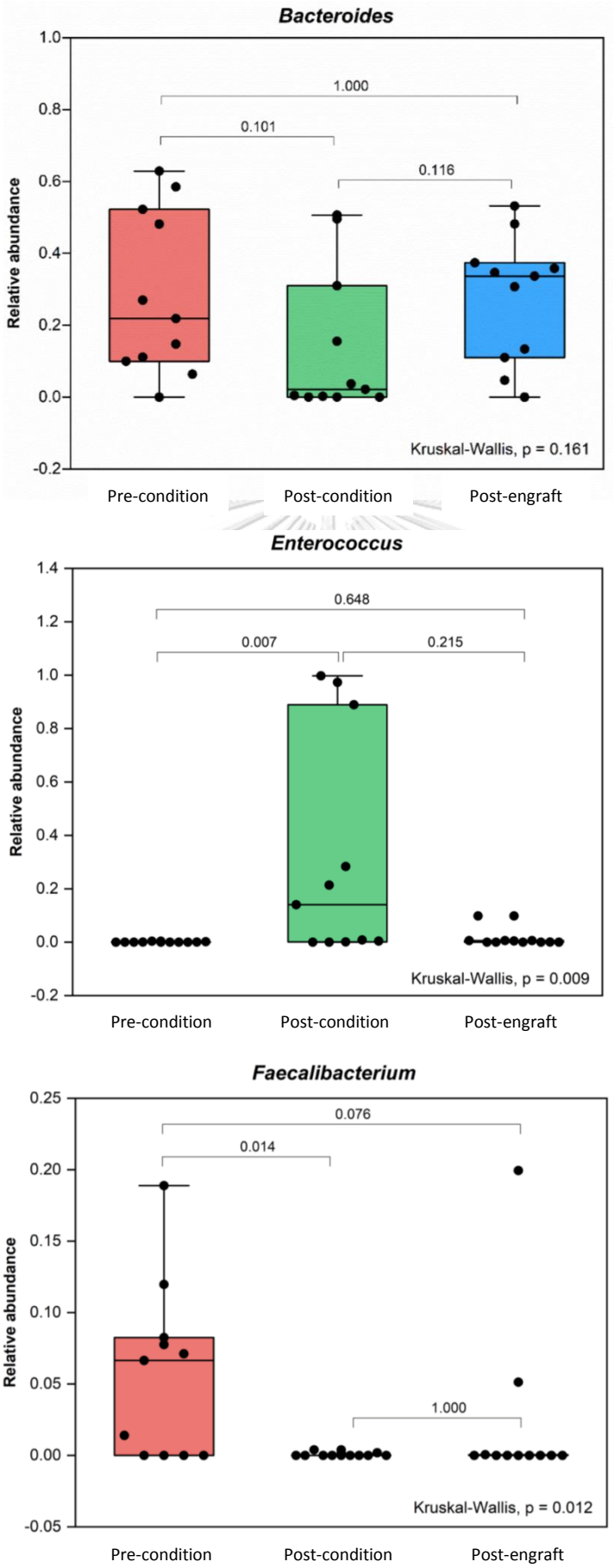
รูปภาพ 9 แสดง Microbiota compositions of different taxa profiles โดยแต่ละสีเป็นตัวแทนของ difference taxa compositions (ต่อ)



รูปภาพ 10 แสดง Microbiota compositions of different taxa profiles โดยแต่ละสีเป็นตัวแทนของ difference taxa compositions (ต่อ)



รูปภาพ 11 แสดง Box plots ของการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ของ *Bacteroides, Enterococcus* และ *Faecalibacterium* ระหว่างกลุ่ม



5) Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)

ไมโครไบโอต้าในลำไส้ที่พบเป็นหลักในกลุ่ม pre-conditioning regimen ($p < 0.05$) ได้แก่

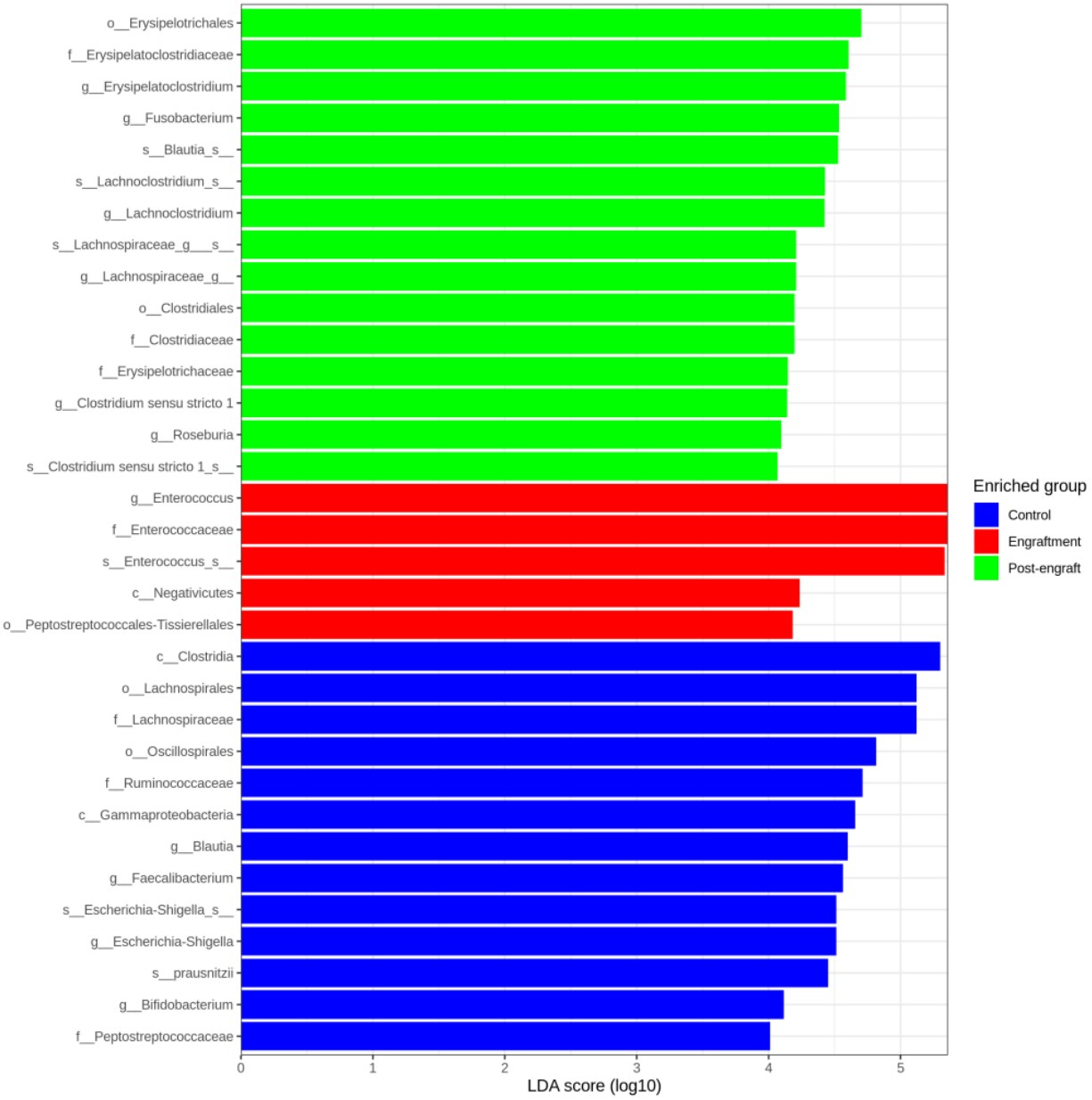
- แบคทีเรียในคลาส Clostridia ออร์เดอร์ Lachnospirales และ Oscillospirales ได้แก่ *Lachnospiraceae, Ruminococcaceae* และ *Peptostreptococcaceae* (ไฟลัม Firmicutes)
- *Escherichia-Shigella* ที่อยู่ในคลาส Gammaproteobacteria
- *Blautia, Biofidobacterium* และ *Faecalibacterium*

แบคทีเรียในคลาส Negativicutes ได้แก่ *Enterococcaceae* และ *Enterococcus* (ไฟลัม Firmicutes) ยังเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญที่เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ ในกลุ่ม post-conditioning regimen ($p < 0.05$)

นอกจากนี้แบคทีเรียในออร์เดอร์ Erysipelotrichales แฟมิลี *Erysipelotrichaceae, Erysipelatoclostridiaceae* และ *Clostridiaceae* จีนัส *Erysipelatoclostridium, Fusobacterium, Lachnoclostridium, Lachnospiraceae, Roseburia* และ *Clostridium sensu stricto 1* เป็นไมโครไบโอต้าในลำไส้ที่มีความชุกสูงหลังจากผ่านช่วง engraftment ($p < 0.05$) จากผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าไมโครไบโอต้าในลำไส้นั้นมีความแตกต่างกันในผู้ป่วยทั้งระหว่างและหลัง engraftment ไปแล้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปภาพ 12 แสดง Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) โดยแท่งกราฟเป็นตัวแทนของ effect size (LDA) for a significant taxon in a certain group ความยาวของแท่งกราฟเป็นตัวแทนของ log10 transformed LDA score แต่ละสีเป็นตัวแทนของกลุ่มที่ taxa ถูกนำเสนอมากเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ



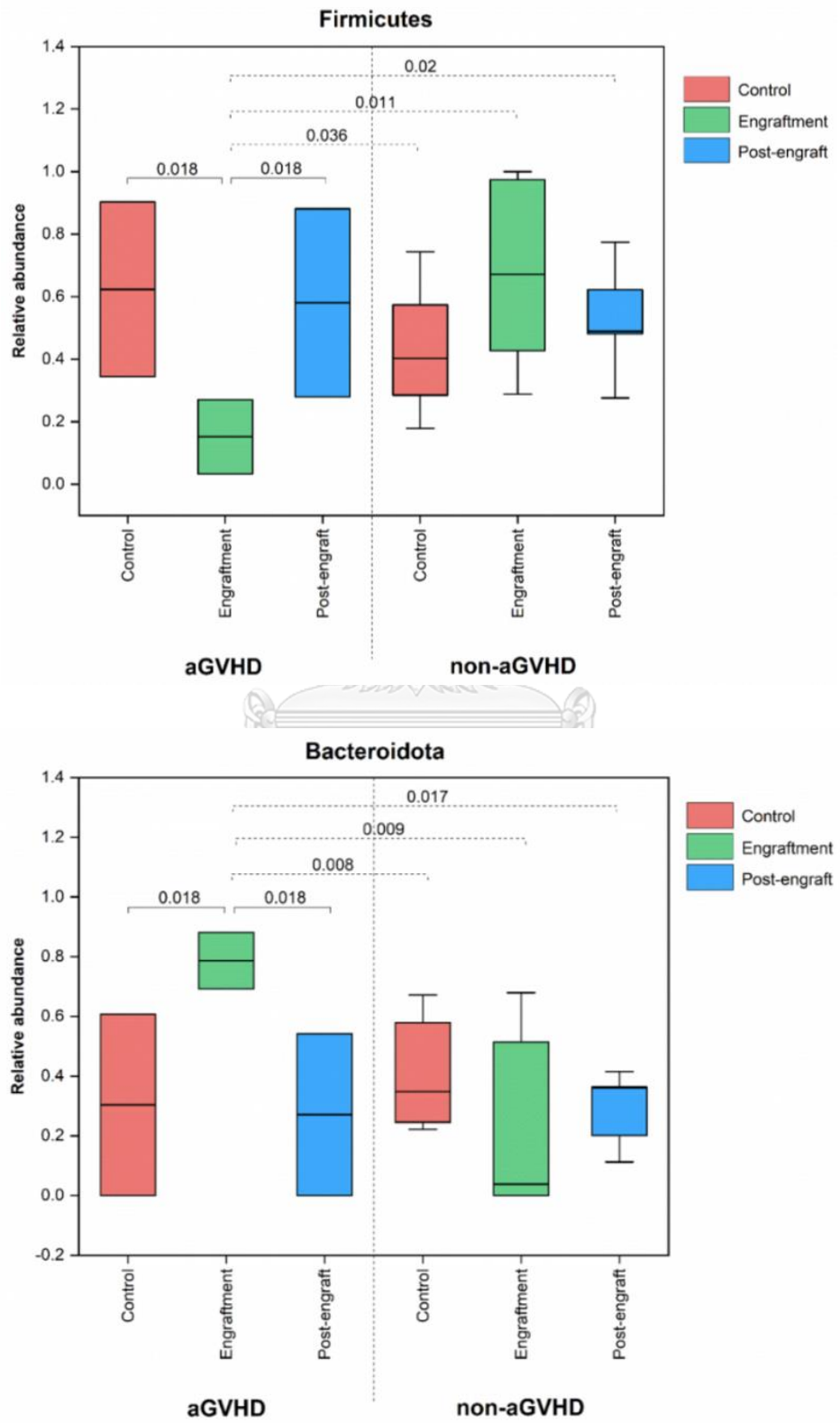
6) ความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มีภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลัน (aGVHD และ non-aGVHD)

ในผู้ที่เกิด aGVHD พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes และ Bacteriodota ในกลุ่ม post-conditioning regimen เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น (p=0.018) ซึ่งไม่พบความแตกต่างนี้ในกลุ่ม non-aGVHD

เมื่อเปรียบเทียบในช่วงที่มี engraftment หรือในกลุ่ม post-conditioning regimen นั้น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้ โดยพบไฟลัม Firmicutes ลดลงและ Bacteriodota เพิ่มขึ้น ในกลุ่ม aGVHD ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม non-aGVHD (p=0.011 และ p=0.009 ตามลำดับ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปภาพ 13 แสดงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ระหว่างกลุ่ม aGVHD และ non-aGVHD ของไฟลัม Firmicutes และ Bacteriodota



บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

จากการศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผลการศึกษาของเราแสดงให้เห็นว่ามีผู้ป่วย 2 รายจากทั้งหมด 11 ราย (ร้อยละ 18.2) เกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันในขณะที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบอัตราการเกิดภาวะนี้สูงกว่า ยกตัวอย่างเช่น Jessica และคณะ พบภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันที่ลำไส้จากการติดตามไป 6 เดือนหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดคิดเป็นร้อยละ 36 จากผู้ป่วยทั้งสิ้น 44 ราย(17) อีกหนึ่งการศึกษาในประเทศอิตาลีของ Biagi และคณะ พบผู้ป่วยเด็ก 36 รายที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเกิดภาวะแทรกซ้อนจากภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันสูงถึงร้อยละ 52.8(11) ผู้วิจัยสังเกตว่าอุบัติการณ์การเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันในการศึกษาของเรานั้นต่ำกว่าประเทศทางตะวันตกค่อนข้างมาก จากการศึกษาในประชากรไทยก่อนหน้านี้ พบอุบัติการณ์การเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันในผู้ที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดค่อนข้างน้อยเช่นกัน ประมาณร้อยละ 15-20 โดยพบภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันที่มีความรุนแรงมากกว่าเกรด 2 น้อยกว่าร้อยละ 10(18) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในประเทศไต้หวันของ Bai และคณะ พบอัตราการเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันร้อยละ 19.2 จากผู้ป่วยโรคไขกระดูกฝ่อชนิดรุนแรง (severe aplastic anemia) ที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดอีกด้วย(19) ผู้วิจัยคิดว่าอัตราการเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันที่ต่ำกว่านั้นอาจจะสัมพันธ์กับเรื่องของเชื้อชาติได้ นอกจากนี้ยังอาจเกี่ยวข้องกับการสูญเสียความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งในการศึกษาของเราพบว่าในช่วง engraftment มี *Enterococcus* (ไฟลัม Firmicutes) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่พบแบคทีเรียอื่นๆ ลดลงอย่างชัดเจน จากการศึกษาในผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น 31 ราย โดย Holler และคณะได้ใช้ broad-range 16S rRNA gene PCR with pyrosequencing ในการทดสอบ พบความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของ *Enterococcus* กับภาวะเซลล์ต้นกำเนิดต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลัน(20) ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาของเรา ในส่วนผลการศึกษาของ Biagi และคณะที่ประเทศอิตาลี พบว่าในผู้ป่วยที่เกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันจะมีความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ลดลง ร่วมกับพบ *Blautia* ลดลงและ

Fusobacterium มากขึ้น(11) มีหลักฐานเพิ่มขึ้นเรื่อยๆว่าการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้นั้นสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกาย มีการศึกษาล่าสุดพบว่าความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ที่เพิ่มขึ้น ร่วมกับการมีปริมาณของ *Blautia* ที่มากขึ้นจะลดอัตราตายจากภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายและมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น(21) กล่าวโดยสรุปคือปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกายชนิดเฉียบพลันได้แก่ ความหลากหลายของไมโครไบโอต้าที่ลดลงร่วมกับการลดลงของจุลินทรีย์ประจำถิ่นโดยเฉพาะไฟลัม Firmicutes

จากการศึกษาก่อนหน้า พบการติดเชื้อในกระแสเลือดภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นร้อยละ 23.4ความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ที่ลดลง ส่งผลให้พบแบคทีเรียบางกลุ่มมากขึ้น โดยเฉพาะ *Enterococcus* และ Proteobacteria ที่จะรุกล้ำเข้าสู่กระเลือดได้ โดยการพบ Proteobacteria ที่มากขึ้นจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในกระแสเลือดมากขึ้นถึง 5 เท่า (p=0.047)(10) แต่ผู้วิจัยพบผลการศึกษาที่ต่างออกไป โดยพบอัตราการติดเชื้อในกระแสเลือดที่ต่ำกว่า และพบการติดเชื้อเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียดื้อยามากกว่าแบคทีเรียไม่ดื้อยา สิ่งที่น่าสนใจคือ *Enterococcus* นั้นเพิ่มขึ้นในกลุ่ม post-conditioning regimen แทน โดยที่ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกในกระแสเลือดเลย แต่เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่น้อยเกินไป ประกอบกับผู้ที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดส่วนใหญ่จะได้รับยาปฏิชีวนะชนิดออกฤทธิ์ครอบคลุม (empirical antibiotics) เช่น Piperacillin/Tazobactam และ Carbapenem ในการรักษาไข้ไม่ทราบสาเหตุ ซึ่งในการศึกษาของเรา ผู้เข้าร่วมวิจัยได้รับยาปฏิชีวนะทุกรายตามข้อบ่งชี้ต่างๆ จึงอาจทำให้ยังไม่เห็นผลการศึกษาที่คล้ายกันได้ แต่สิ่งที่คล้ายคลึงกับการศึกษาที่มีก่อนหน้าคือ พบความอุดมสมบูรณ์ของ *Bacteroides* และ *Faecalibacterium* ลดลงไปจากสภาวะปกติ(22) แต่ข้อจำกัดคือยังไม่สามารถระบุช่วงเวลาที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ได้อย่างชัดเจน ผู้วิจัยคิดว่าการเก็บตัวอย่างอุจจาระในช่วงเวลาที่ถี่มากขึ้นมาทำการวิเคราะห์นั้นจะทำให้เห็นจุดที่มีเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ได้ชัดเจนมากขึ้น

หลายการศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น การให้ยาเคมีบำบัดหรือการฉายแสงก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดนั้นจะทำลายเยื่อบุทางเดินอาหาร ในขณะที่การให้ยาปฏิชีวนะจะเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของไมโครไบโอต้า ทำให้เพิ่มความไวต่อการติดเชื้อของร่างกายมากขึ้น ภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ถูกโจมตีโดย graft-derived T lymphocytes ทำให้เยื่อบุของลำไส้ถูกทำลายเช่นกัน สิ่งเหล่านี้อาจจะอธิบายได้ว่าเหตุใดภาวะแทรกซ้อนจากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดนั้นมักจะมีความเกี่ยวข้องหรือเกิดขึ้นที่ทางเดิน

อาหารเป็นส่วนใหญ่(10, 25, 26) จากผลการศึกษาของผู้วิจัยเองพบว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายในสถาบันของเรา ดังนั้นผลลัพธ์ที่ได้จึงควรมีความใกล้เคียงกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ที่ว่าความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้นั้นได้รับผลกระทบจากทั้งยาเคมีบำบัด การฉายแสง อาหาร ความเครียด การเจ็บป่วยขณะนั้น และการได้รับยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ

จากผลการศึกษานี้ ผู้วิจัยพบความชุกของแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes Bacteriodota และ Proteobacteria ค่อนข้างมากในช่วงก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด แบคทีเรียส่วนใหญ่ในไฟลัมดังกล่าวถูกจัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ประจำถิ่นซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายจากที่ได้กล่าวไปแล้วในตอนต้น โดยเฉพาะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค โดยกลไกป้องกันการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคของไมโครไบโอต้าในลำไส้นั้น มีหลายกลไก ยกตัวอย่างเช่น ไมโครไบโอต้าในลำไส้สามารถแย่งอาหารจากแบคทีเรียก่อโรค ทำให้เป็นการยังยั้งการเพิ่มจำนวนได้ เช่น *Citrobacter rodentium* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นหลักในการดำรงชีพ ซึ่งจุลินทรีย์ประจำถิ่น เช่น *E. coli* นั้นก็เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ใช้สารประกอบของคาร์โบไฮเดรตเป็นหลักเช่นกัน หรือการสร้าง bactericin ของจุลินทรีย์ประจำถิ่นบางชนิด เช่น *Bacillus thuringiensis* สามารถสร้าง bacteriocin ซึ่งเป็น antimicrobial peptide ช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์ประจำถิ่นบางชนิดยังมี type VI secretion system ซึ่งทำหน้าที่หลั่งโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ไซโทพลาซึม (cytoplasm)(23) แต่ในระหว่างที่มี engraftment พบว่าสัดส่วนของ Firmicutes และBacteriodota ในลำไส้ของผู้ป่วยลดลง แสดงให้เห็นว่าการเสียสมดุลของไมโครไบโอต้าในลำไส้นั้นมีแนวโน้มเกิดขึ้นระหว่างที่มี engraftment ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการให้ยาเคมีบำบัด การฉายแสง อาหาร ความเครียด การเจ็บป่วย หรือการใช้ยาต่างๆ อย่างไรก็ตาม ความมากชนิดและความหลากหลายของไมโครไบโอต้าที่เสียสมดุลไปนั้นสามารถที่จะกลับเข้าสู่สภาวะปกติได้หลังจากที่ผ่านช่วง engraftment ไปแล้วประมาณ 1 เดือน ซึ่งความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ก็จะมีความใกล้เคียงกับช่วง pre-conditioning regimen ดังแสดงในผลการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

พบการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในทุกการศึกษาที่ผ่านมา ผลจากงานวิจัยเชิงสังเกตขนาดใหญ่ที่มีก่อนหน้าพบการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าโดยมีลักษณะที่สูญเสียซึ่งความหลากหลายและถูกครอบคลุมโดยแบคทีเรียเพียงกลุ่มเดียว ความหลากหลายที่ลดลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้มีความสัมพันธ์กับอัตราตายที่สูงขึ้น และผลดังกล่าวมีความคล้ายกันระหว่างศูนย์การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดและภูมิภาคต่างๆ(23) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเหล่านี้ดำเนินการเฉพาะในทวีปยุโรป ประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศญี่ปุ่นเท่านั้น ยังไม่เคยมีการศึกษาในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมว่าผลลัพธ์จะออกมาในรูปแบบเดียวกันหรือไม่ จึงเป็นที่มาของการทำวิจัยนี้

งานวิจัยของเรามีข้อจำกัดหลายประการ ผู้วิจัยทำการศึกษาแบบนำร่อง (pilot study) ภายในสถาบันเดียวที่ทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นประมาณ 10-15 รายต่อปีเท่านั้น ทำให้มีจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับงานวิจัยของต่างประเทศ ทำให้ไม่สามารถแยกระดับความหลากหลายของกลุ่มตัวอย่างออกเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายมาก ปานกลาง หรือน้อยได้ ไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ รวมทั้งยังไม่สามารถแสดงถึงภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในระยะยาวได้ เนื่องจากระยะเวลาในการศึกษาที่สั้นเกินไป จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมากขึ้นและมีการติดตามไปนานขึ้น

ปัจจุบันการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นเข้ามามีบทบาทในการรักษาโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยามากขึ้นเรื่อยๆ จากการศึกษาที่มีในปัจจุบันพบว่าการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้นั้นมีผลต่อผลลัพธ์ทางคลินิกในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด หากแต่ยังไม่เคยมีการศึกษาในประเทศไทยมาก่อน นับเป็นการศึกษาแรกในประเทศไทยและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หากเราทราบถึงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอต้าในลำไส้ของประชากรไทย ซึ่งอาจจะมีความแตกต่างจากภูมิภาคอื่นๆในโลก จะทำให้เราสามารถพัฒนาและปรับปรุงการดูแลรักษาผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดและลดภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการดูแลผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายอวัยวะชนิดอื่นได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.2 สรุปผลการวิจัย

ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ระหว่างการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ทำให้เสียความสมดุลของแบคทีเรีย มีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเสียสมดุล เช่น การให้ยาเคมีบำบัดหรือการฉายแสงก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด อาหาร ความเครียด การเจ็บป่วยขณะนั้น และยาปฏิชีวนะที่ใช้ ความหลากหลายของไมโครไบโอต้าในลำไส้ที่ลดลงนั้นมีแนวโน้มสัมพันธ์กับการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญคือการติดเชื้อและภาวะเซลล์ต้นกำเนิดใหม่ต่อต้านร่างกาย สิ่งเหล่านี้บ่งชี้ว่าไมโครไบโอต้าในลำไส้อาจจะเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จหรือล้มเหลวในการดูแลรักษาผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ของผู้อื่นได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้มีข้อจำกัดบางประการคือ เป็นการศึกษาที่ทำในโรงพยาบาลเพียงแห่งเดียว ทำให้มีจำนวนตัวอย่างค่อนข้างน้อย ไม่สามารถแยกระดับความหลากหลายของกลุ่มตัวอย่างได้ รวมทั้งไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ และผลการศึกษาดังกล่าวอาจจะไม่ได้เป็นตัวแทนของประชากรไทยได้ทั้งหมด เนื่องจากแต่ละสถาบันอาจจะมีขั้นตอนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

.1 Hatzimichael E, Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation. Stem Cells Cloning. 2010;.17-3:105

.2 Shono Y, van den Brink MRM. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Nat Rev Cancer. 2018;.95-283:(5)18

.3 Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Jenq RR. Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease. Int J Hematol. 2015;.37-428:(5)101

.4 Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010;.65-59:(7285)464

.5 Salzman NH, de Jong H, Paterson Y, Harmsen HJM, Welling GW, Bos NA. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. Microbiology (Reading). 2002;)148Pt .60-3651:(11

.6 Murphy S, Nguyen VH. Role of gut microbiota in graft-versus-host disease. Leuk Lymphoma. 2011;.56-1844:(10)52

.7 Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012;.30-220:(7415)489

.8 Chang CS, Kao CY. Current understanding of the gut microbiota shaping mechanisms. J Biomed Sci. 2019;.59:(1)26

.9 Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2014;.82-1174:(7)124

.10 Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis. 2012;.14-905:(7)55

.11 Biagi E, Zama D, Rampelli S, Turroni S, Brigidi P, Consolandi C, et al. Early gut microbiota signature of aGvHD in children given allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological disorders. BMC Med Genomics. 2019;.49:(1)12

.12 Schoemans HM, Lee SJ, Ferrara JL, Wolff D, Levine JE, Schultz KR, et al. EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

host disease assessment. Bone Marrow Transplant. 2018;.15-1401:(11)53

.13 Willis AD. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. Front Microbiol. 2019;.10:2407

.14 Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. ISME J. 2017;.43-2639:(12)11

.15 Doki N, Suyama M, Sasajima S, Ota J, Igarashi A, Mimura I, et al. Clinical impact of pre-transplant gut microbial diversity on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Ann Hematol. 2017;.23-1517:(9)96

.16 Kusakabe S, Fukushima K, Maeda T, Motooka D, Nakamura S, Fujita J, et al. Pre- and post-serial metagenomic analysis of gut microbiota as a prognostic factor in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. Br J Haematol. 2020;.49-438:(3)188

.17 Galloway-Pena JR, Peterson CB, Malik F, Sahasrabhojane PV, Shah DP, Brumlow CE, et al. Fecal Microbiome, Metabolites, and Stem Cell Transplant Outcomes: A Single-Center Pilot Study. Open Forum Infect Dis. 2019;:(5)6ofz.173

.18 Issaragrisil S. Hematopoietic stem cell transplantation in Thailand. Bone Marrow Transplant. 2008;42 Suppl :1S-137S.8

.19 Bai LY, Chiou TJ, Liu JH, Yen CC, Wang WS, Yan MH, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for severe aplastic anemia--experience of an institute in Taiwan. Ann Hematol. 2004;.43-38:(1)83

.20 Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsrucker C, Koestler J, Peter K, et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;.5-640:(5)20

.21 Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, et al. Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2015;.83-1373:(8)21

.22 Golob JL, Pergam SA, Srinivasan S, Fiedler TL, Liu C, Garcia K, et al. Stool Microbiota at Neutrophil Recovery Is Predictive for Severe Acute Graft vs Host Disease After Hematopoietic Cell Transplantation. Clin Infect Dis. 2017;.91-1984:(12)65

.23 Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. Immunol Rev. 2017;.105-90:(1)279

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พิมพ์กมล เกียรติสุรนนท์
วัน เดือน ปี เกิด	5 พฤษภาคม 2532
สถานที่เกิด	อุบลราชธานี
วุฒิการศึกษา	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	378 ถ.ชยางกูร ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University