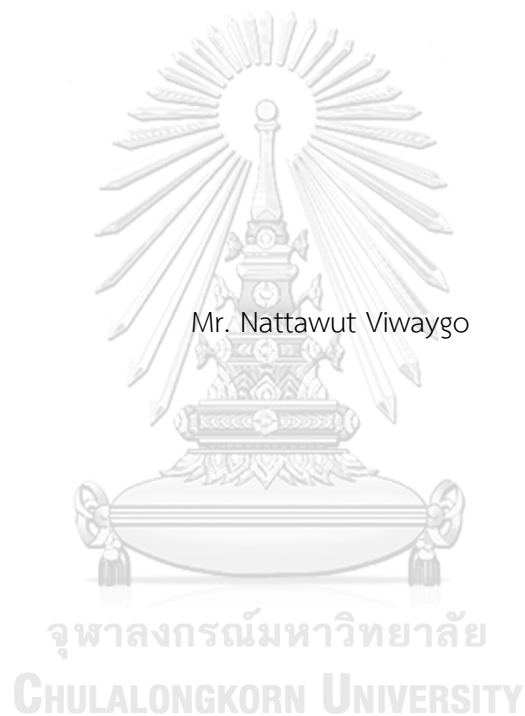


ผลกระทบของยีน *flaA* และ *fljD* ของเชื้อ *Helicobacter pylori* ต่อการตายของเซลล์มะเร็งเยื่อ
กระเพาะอาหาร



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECTS OF *flaA* AND *fljD* GENES OF *Helicobacter pylori* ON HUMAN GASTRIC
ADENOCARCINOMA CELLS DEATH



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> ของเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> ต่อการตายของเซลล์มะเร็งเยื่อบุกระเพาะอาหาร
โดย	นายณัฐรัฐภูมิ วิเวโก
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.ศิริพร จิตแก้ว

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.पालนี อัมรานนท์)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ศิริพร จิตแก้ว)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์)	

ณัฐรุณี วิเวโก : ผลกระทบของยีน *flaA* และ *flid* ของเชื้อ *Helicobacter pylori* ต่อการตายของเซลล์มะเร็งเยื่อ
 กระเพาะอาหาร. (THE EFFECTS OF *flaA* AND *flid* GENES OF *Helicobacter pylori* ON HUMAN GASTRIC
 ADENOCARCINOMA CELLS DEATH) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร.
 ศิริพร จิตแก้ว

เชื้อ *Helicobacter pylori* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่มีความสำคัญทางคลินิก การติด
 เชื้อ *H. pylori* มีความสัมพันธ์กับการเกิดเป็นโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร เนื่องจากเชื้อมีปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคหลายชนิด
 อาทิ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสปริมาณมาก การสร้างสารพิษประเภท CagA และ VacA การใช้แฟลเจลลาในการ
 เคลื่อนที่แบบคางส่วนเข้าสู่ชั้นเยื่อเมือกของกระเพาะอาหาร การยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร รวมทั้งการกระตุ้นให้เซลล์
 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสที่นำมาสู่การพัฒนากลายเป็นโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้ แฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* มีส่วนช่วย
 ในการเคลื่อนที่และเป็นสารที่ใช้ในการยึดเกาะที่สำคัญของเชื้อ อีกทั้งยังถูกสันนิษฐานว่าอาจมีส่วนกระตุ้นในการทำให้เซลล์เยื่อบุผิว
 เกิดการตาย การควบคุมการสร้างและการทำงานของแฟลเจลลาเกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันของยีนหลายชนิด โดยมียีน *flaA* ทำ
 หน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนแฟลเจลลินหลักของแฟลเจลลา และยีน *flid* ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง capping protein หุ้มส่วน
 ปลายของแฟลเจลลา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของยีน *flaA* และยีน *flid* ของเชื้อ *H. pylori* ต่อการเคลื่อนที่
 ของเชื้อ การยึดเกาะและการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เยื่อบุผิว Human gastric adenocarcinoma (AGS)
 โดยทำการศึกษาลักษณะของสายแฟลเจลลาวิธีย้อมด้วยสี leifson-tannic acid fuchsin และด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ
 ส่องผ่าน เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์
 ของยีน *flaA* และ ยีน *flid* เชื้อดังกล่าวทั้งหมดยังถูกนำมาทดสอบการเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์
 AGS เพื่อทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์ด้วยวิธี adhesion assay และการกระตุ้นให้เซลล์ที่ติดเชื้อตายด้วยการย้อมสี Annexin/ PI
 และวัดสัญญาณด้วย flow cytometry พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างสายแฟลเจลลาที่มี
 รูปร่างสมบูรณ์ได้ ทั้งนี้เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการยึดเกาะกับเซลล์ AGS
 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* สามารถยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ
 เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับเซลล์ AGS ที่ 24 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของ
 การตายของเซลล์ AGS อย่างไรก็ตามที่ 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* สามารถกระตุ้นให้เซลล์
 AGS ตายได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่พบความแตกต่างในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* จากการศึกษา
 แสดงให้เห็นว่ายีน *flaA* อาจมีผลกระทบต่อตายของเซลล์ AGS และมีผลต่อความสมบูรณ์ของรูปร่างของแฟลเจลลา การ
 เคลื่อนที่และการยึดเกาะต่อเซลล์ ซึ่งล้วนเป็นกระบวนการที่สำคัญที่นำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพของเซลล์เยื่อบุผิวได้ ในขณะที่ยีน
flid มีผลต่อความสมบูรณ์ของรูปร่างของแฟลเจลลา และพบว่าเมื่อถูกรบกวนการแสดงออกของยีน กลับส่งผลให้เชื้อ *H. pylori* ยึด
 เกาะกับเซลล์ได้มากขึ้น ทั้งนี้ควรมีศึกษาด้วยเชื้อสายพันธุ์ที่มีการทดแทนด้วยยีนดังกล่าวทั้งสอง รวมไปถึงการทดสอบกลไกระดับ
 โมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการตายเพิ่มเติมในอนาคต เพื่อระบุผลกระทบของยีนทั้งสองอย่างชัดเจนต่อไป

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
	ทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5976658837 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Helicobacter pylori, flaA, fliD, Flagella

Nattawut Viwaygo : THE EFFECTS OF *flaA* AND *fliD* GENES OF *Helicobacter pylori* ON HUMAN GASTRIC ADENOCARCINOMA CELLS DEATH . Advisor: Asst. Prof. PANAN RATTHAWONGJIRAKUL, Ph.D. Co-advisor: Siriporn Jitkaew, Ph.D.

Helicobacter pylori is one of the significant enteric pathogens in human. Infection with *H.pylori* associates with gastric cancer due to the bacterium exhibits several virulent factors. These include massive urease production, CagA and VacA cytotoxin production, cock-screw liked motility through gastric mucosa using flagella, adherence on gastric epithelial cells, and apoptosis induction that leading to gastric cancer. Flagella of *H. pylori* facilitates bacterial movement and serves as an essential bacterial adhesin, and is also assumed to trigger epithelial cells apoptosis. The interplay of several genes has regulated flagellar control and synthesis. While *flaA* controls major flagellin production, *fliD* controls capping protein at the flagella terminal production. This study aimed to examine the effect of *flaA* and *fliD* genes of *H. pylori* on bacterial motility, epithelial cells adherence and human gastric adenocarcinoma (AGS) cells apoptosis induction. The bacterial flagella were investigated by leifson-tannic acid fuchsin and transmission electron microscope (TEM) comparing between *H. pylori* ATCC 43504 and *H. pylori flaA* and *fliD* mutants. All the bacterial strains were tested for motility using semisolid agar, and co-cultured with AGS cells for adhesion assay and cell death assay using Annexin/ PI staining and flow cytometry. Both *flaA* and *fliD* mutants failed to produce mature flagella. Compared to the wild-type, the bacterial motility and adhesion of *flaA* mutant have been decreased significantly, whereas, *fliD* mutant showed more significant adhesion percentage. After 24-hour co-cultivation, no significant difference in the levels of cell death has been observed. However, after 48-hour co-cultivation, *flaA* mutant had a significantly lower potential to induce cells death rather than the wild-type. While *fliD* mutant showed no significant difference in the levels of cell death. In conclusion, *flaA* probably affected AGS cells death, as well as flagellar maturation, motility and adhesion of *H. pylori*, which are essential factors predisposing to epithelial cells pathogenesis. While *fliD* gene exhibited an effect on flagellar maturation, and a *fliD* gene interruption likely promoted bacterial adhesion. Studies with *flaA* and *fliD* complementary strains as well as a molecular mechanism involving cell death should be further established in future in order to clarify the effect of these genes in-depth.

Field of Study: Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาให้คำแนะนำ และเป็นแรงผลักดันให้งานวิจัยลุล่วงและ กราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ศิริพร จิตแก้ว ในความกรุณาของการเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์พิทักษ์ สันตนิรันดร์ กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ ให้ข้อมูล ให้คำปรึกษาและแก้ไขปัญหาตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณการสนับสนุน ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ

ขอขอบคุณครอบครัว และเพื่อนที่มีค่ายิ่ง สำหรับกำลังใจที่ประเมินค่าไม่ได้

ขอขอบคุณทุกความสัมพันธ์ และสวัสดีแต่ทุกการจากลา

ณัฐรุฑฒิ วิเวโก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 คำถามงานวิจัย.....	4
1.5 สมมติฐาน.....	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	5
2.1 การค้นพบ <i>H. pylori</i>	5
2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>H. pylori</i>	6
2.3 พยาธิสภาพจากการติดเชื้อ <i>H. pylori</i>	7
2.4 การติดต่อ.....	8
2.5 ปัจจัยในการก่อโรค.....	8
2.6 ระบาดวิทยา.....	10
2.7 การรักษา.....	11

2.8	แฟลเจลลาของเชื้อ <i>H. pylori</i>	13
2.9	การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส	17
2.10	บทบาทของ Caspases และ Bcl-2 familyต่อการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์	19
2.11	ความสัมพันธ์ของการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร ...	20
2.12	แฟลเจลลากับการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์.....	22
2.13	การเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เมื่อติดเชื้อ <i>H. pylori</i>	23
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	25
3.1.	สารเคมี น้ำยา และ วัสดุทางวิทยาศาสตร์.....	25
3.2	เครื่องมือ.....	26
3.3.	การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>H. pylori</i>	27
3.2	การทำให้เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 กลายพันธุ์ที่ยีน <i>flaA</i> และ <i>fljD</i> ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis (IPCRM).....	27
3.3	การทำให้เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ได้รับยีน <i>flaA</i> และ <i>fljD</i> ทดแทน.....	28
3.3.1	การออกแบบ primer สำหรับสร้างพลาสมิดตัวนำของยีน <i>flaA</i> และ <i>fljD</i> ที่มีลำดับเบสสมบูรณ์.....	28
3.3.2	การสกัดสารพันธุกรรม	29
3.3.3	การเพิ่มปริมาณยีน <i>flaA</i> และ <i>fljD</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	29
3.3.4	การแยกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส.....	30
3.3.5	การทำให้ผลผลิตจาก PCR บริสุทธิ์.....	31
3.3.6	การโคลนยีน <i>flaA</i> และ <i>fljD</i> เข้าสู่ pGEM® T-Easy vector	31
3.3.7	การทำ colony PCR amplification	32
3.3.8	การสกัดพลาสมิด.....	33
3.3.9	การทำ restriction enzyme analysis.....	34

3.3.10 การนำพลาสมิดที่มียีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยเทคนิค natural transformation.....	34
3.4 การทดสอบการมีชีวิตและการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i>	35
3.4.1 เทคนิค MTT assay	35
3.4.2 การนับจำนวนโคโลนี.....	36
3.5 การทดสอบผลกระทบของยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> ต่อลักษณะของแฟลเจลลา และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ <i>H. pylori</i>	36
3.5.1 การศึกษาลักษณะของแฟลเจลลาโดยการย้อมสี Leifson tannic acid-fuchsin staining (123).....	37
3.5.2 การศึกษาลักษณะโครงสร้างของแฟลเจลลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	37
3.5.3 การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ด้วย motility assay	37
3.6 การเตรียมเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร AGS	38
3.6.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	38
3.6.2 การนับเซลล์	38
3.7 การทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในการยึดเกาะเซลล์ AGS ด้วยเทคนิค adhesion assay	39
3.7.1 การวัดความสามารถของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในการยึดเกาะเซลล์ AGS ด้วยวิธีการวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์	39
3.7.2 การวัดความสามารถของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในการยึดเกาะเซลล์ AGS โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์	41
3.7.3 การวัดความสามารถของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในการยึดเกาะเซลล์ AGS ด้วยวิธีการนับโคโลนี	42
3.8 การศึกษาผลของเชื้อ <i>H. pylori</i> แต่ละสายพันธุ์ต่อการตายของเซลล์ AGS.....	43
3.8.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>H. pylori</i> ร่วมกับเซลล์ AGS.....	43

3.8.2 การวัดปริมาณเซลล์ AGS ที่ตายด้วยการย้อมสี annexin-V และ PI และตรวจสอบด้วย flow cytometry.....	44
บทที่ 4 ผลการทดลอง	46
4.1 เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> และสายพันธุ์ที่ได้รับยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> ทดแทน	46
4.1.1 การเพิ่มปริมาณยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	46
4.1.2 การโคลนยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> เข้าสู่ pGEM [®] -T-Easy vector	46
4.1.3 ผลการตรวจสอบยีนที่ถูกโคลนด้วยวิธี colony PCR amplification.....	48
4.1.4 ผลการตรวจสอบยีนที่ถูกโคลนด้วยวิธี restriction enzyme analysis	48
4.1.5 การนำพลาสมิดที่มียีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยเทคนิค natural transformation.....	50
4.2 ผลการทดสอบการมีชีวิตและการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i>	51
4.2.1 ผลทดสอบการมีชีวิตด้วยเทคนิค MTT assay.....	51
4.2.2 ผลการทดสอบการเจริญด้วยการนับจำนวนโคโลนี.....	52
4.3 ผลกระทบของยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> ต่อลักษณะของแฟลเจลลา และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ <i>H. pylori</i>	54
4.3.1 ลักษณะของแฟลเจลลาเมื่อย้อมสีด้วย Leifson tannic acid-fuchsin staining.....	54
4.3.2 โครงสร้างของแฟลเจลลาเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	55
4.4 ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วย motility assay	55
4.5 ความสามารถของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในการยึดเกาะเซลล์ AGS	58
4.5.1 การวัดความสามารถของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในการยึดเกาะเซลล์ AGS ด้วยวิธีการวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์	58
4.5.2 การวัดความสามารถของเชื้อ <i>H. pylori</i> ในการยึดเกาะเซลล์ AGS โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์	63
4.6 การศึกษาผลของเชื้อ <i>H. pylori</i> แต่ละสายพันธุ์ต่อการตายของเซลล์ AGS.....	70

4.6.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>H. pylori</i> ร่วมกับเซลล์ AGS ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	70
4.6.2 การวัดปริมาณเซลล์ AGS ที่ตายด้วยการย้อมสี annexin-V / FITC และ PI และ ตรวจสอบด้วย flow cytometry.....	70
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	78
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	92
บทที่ 7 ภาคผนวก.....	94
7.1 แผนที่ยีนของพลาสมิดที่ใช้ในการสร้าง <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่ได้รับยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> ทดแทน	94
7.2 ข้อมูลการเจริญของเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ 10 % FBS.....	96
7.3 ผลการทดสอบ Adhesion assay ด้วยวิธีการวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ และการนับ จำนวนโคโลนี ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์.....	98
7.4 ผลการทดสอบการตายของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยการย้อมสี AnnexinV/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometry.....	101
บรรณานุกรม.....	105
ประวัติผู้เขียน.....	123

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ปัจจัยความรุนแรงที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ <i>H. pylori</i>	12
ตารางที่ 2 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในงานวิจัย	28
ตารางที่ 3 ปฏิกริยาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> ด้วยเทคนิค PCR และการทำปฏิกริยา colony PCR.....	30
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ 10 % FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	96
ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ 10 % FBS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	97
ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากการทดสอบ Adhesion ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	98
ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากการทดสอบ Adhesion ที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	99
ตารางที่ 8 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นับได้จากการทดสอบ Adhesion ที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	100
ตารางที่ 9 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นับได้จากการทดสอบ Adhesion ที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	100
ตารางที่ 10 แสดงร้อยละของประชากรเซลล์แยกตามจุดภาคจากการทดสอบการตายของเซลล์ AGS ด้วย flow cytometry ที่เวลาเพาะเลี้ยงร่วม 24 ชั่วโมง	101
ตารางที่ 11 แสดงร้อยละของประชากรเซลล์แยกตามจุดภาคจากการทดสอบการตายของเซลล์ AGS ด้วย flow cytometry ที่เวลาเพาะเลี้ยงร่วม 48 ชั่วโมง	103

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงรูปร่างของ <i>H. pylori</i> ภายหลังกการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	6
รูปที่ 2 ลักษณะและโครงสร้างของแฟลเจลลา.....	13
รูปที่ 3 การแบ่งจุดภาคของผล Scattergram ที่ได้จาก flow cytometry.....	45
รูปที่ 4 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>flaA</i> และ <i>flid</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ด้วยเทคนิค PCR.....	47
รูปที่ 5 ผลผลิต colony PCR จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน <i>flaA</i> และ <i>flid</i> เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification.....	49
รูปที่ 6 ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน <i>flid</i> และ <i>flaA</i> เข้าสู่ พลาสมิดภายหลังกการตัดด้วยเอนไซม์ <i>NotI</i> ตรวจสอบผลผลิต restriction enzyme analysis.....	50
รูปที่ 7 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตรที่วัดได้จากปฏิกิริยา MTT ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์.....	52
รูปที่ 8 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่ได้จากการทดสอบการเจริญด้วยวิธีการนับโคโลนีของ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์.....	53
รูปที่ 9 ลักษณะแฟลเจลลาของ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อย้อมด้วยวิธี Leifson tannic acid-fuchsin staining และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	54
รูปที่ 10 ลักษณะแฟลเจลลาของ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ภายใต้กำลังขยาย 8,000-25,000 เท่า.....	56
รูปที่ 11 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่ จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว.....	57
รูปที่ 12 แผนภูมิเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>H. pylori</i> ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยึดเกาะเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี Adhesion assay โดยการวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์.....	61

รูปที่ 13 แผนภูมิเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยึดเกาะเซลล์ AGS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Adhesion assay โดยการวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ 62

รูปที่ 14 ลักษณะของเชื้อ *H. pylori* ที่ยึดเกาะบนเซลล์ AGS ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อถ่ายภาพด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า 66

รูปที่ 15 ลักษณะของเชื้อ *H. pylori* ที่ยึดเกาะบนเซลล์ AGS ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อถ่ายภาพด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า 67

รูปที่ 16 แผนภูมิเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยึดเกาะเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี Adhesion assay โดยการนับโคโลนี 68

รูปที่ 17 แผนภูมิเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยึดเกาะเซลล์ AGS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Adhesion assay โดยการนับโคโลนี 69

รูปที่ 18 ลักษณะของเซลล์ AGS ภายหลังถูกเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase Contrast ที่กำลังขยาย 400 เท่า .. 71

รูปที่ 19 Scattergram ของเซลล์ AGS เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังการย้อมด้วยสี Annexin V/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometer 73

รูปที่ 20 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายของเซลล์ AGS เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังการย้อมด้วยสี Annexin V/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometer..... 74

รูปที่ 21 Scattergram ของเซลล์ AGS เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังการย้อมด้วยสี Annexin V/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometer 76

รูปที่ 22 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายของเซลล์ AGS เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังการย้อมด้วยสี Annexin V/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometer..... 77

รูปที่ 23 แสดงโครงสร้างของ complementary พลาสมิด pGEM®T-Easy vector ที่มีชิ้นส่วนของยีน *flaA* ที่ใช้ในการสร้างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ได้รับยีน *flaA* ทดแทน..... 94

รูปที่ 24 แสดงโครงสร้างของ complementary พลาสมิด pGEM[®]T-Easy vector ที่มีชิ้นส่วนของ ยีน *fliD* ที่ใช้ในการสร้างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ได้รับยีน *fliD* ทดแทน 95



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเกลียว สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนเจือจาง (1) ในสภาวะปัจจุบันมีประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกที่ติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวนี้ (2) โดยพบอัตราความชุกของโรคในประเทศไทยสูงถึง 57 % (3) การติดเชื้อ *H. pylori* นำมาซึ่งพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น แผลในกระเพาะอาหาร กระเพาะอาหารอักเสบ และ B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) เป็นต้น (1) การศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับเชื้อ *H. pylori* บ่งชี้ว่าการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าว มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ส่งผลให้องค์การอนามัยโลกจัดกลุ่มให้เชื้อ *H. pylori* เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 (Class I carcinogen) การศึกษาพบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคมะเร็งกระเพาะอาหารที่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อ *H. pylori* คือ การที่เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารที่มีการติดเชื้อเกิดการตอบสนองโดยเกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง ทำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารบริเวณดังกล่าว เกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (4, 5) จากการสำรวจประชากรทั่วโลกที่ป่วยด้วยโรคมะเร็ง พบว่า มะเร็งกระเพาะอาหารเป็นโรคมะเร็งประเภทที่มีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยมากเป็นอันดับที่ 2 รองจากมะเร็งปอด สำหรับในประเทศไทยพบว่ามะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเป็นอันดับที่ 6 ในผู้ป่วยเพศชาย และ เป็นอันดับที่ 9 ในผู้ป่วยเพศหญิง ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตในช่วง 5 ปี ประมาณ 5 ถึง 15 % ซึ่งถือเป็นอัตราการรอดชีวิตที่ค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับกลไกระดับโมเลกุลที่อธิบายถึงการเกิดพยาธิสภาพของมะเร็งกระเพาะอาหารยังมีอยู่อย่างจำกัด โดยในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ภายหลังจากติดเชื้อ *H. pylori* จะทำให้เซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารถูกทำลาย เนื่องจากเชื้อกระตุ้นให้เซลล์เกิด oxidative stress เซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารที่ตายไม่สามารถซ่อมแซมตนเองและเพิ่มจำนวนทดแทนได้ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสมดุลระหว่างการตายแบบอะพอโทซิสและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ เป็นต้น (6-8)

หนึ่งในกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพในระดับเซลล์จากการติดเชื้อ *H. pylori* คือ การที่เซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยทั่วไปการตายแบบอะพอพโทซิส เป็นกระบวนการตายของเซลล์อย่างมีแบบแผนที่เกิดขึ้นได้ตามปกติและสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ (9) การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสมีลักษณะจำเพาะที่มีความแตกต่างจากการตายของเซลล์แบบเนโครซิส ซึ่งเป็นการตายของเซลล์ที่ไม่ใช้รูปแบบการตายตามธรรมชาติ (10) ในกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส มีการกระตุ้นด้วยสัญญาณทั้งจากภายในเซลล์ เช่น การตอบสนองต่อภาวะเครียดของเซลล์ และจากภายนอกเซลล์ เช่น การได้รับฮอร์โมนหรือไซโตไคน์บางประเภท (11) และนำไปสู่กลไกควบคุมหลักคือการกระตุ้นการหลั่ง cytochrome c จากไมโทคอนเดรีย ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นต่อไปยังเอนไซม์กลุ่ม pro-caspase ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น active-caspase หากเซลล์ถูกกระตุ้นจากสัญญาณภายนอกเซลล์จะมี caspase 8 ทำหน้าที่เป็นโปรตีนเริ่มต้น ในขณะที่หากเป็นการกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสเกิดขึ้นจากสัญญาณภายในเซลล์จะนำไปสู่การกระตุ้น caspase 9 เป็นโปรตีนเริ่มต้น และเกิดกระตุ้นสัญญาณต่อเนื่องโดยมี caspase 3 เป็น effector caspase ซึ่งเป็นจุดร่วมของการรับสัญญาณจากทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เมื่อเกิดการกระตุ้นครบสมบูรณ์เซลล์จะเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (12) จากการศึกษาชีววิทยาของเซลล์ในระดับโมเลกุล พบว่าภายในเซลล์มียีนมากมายที่ควบคุมการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิส เช่น ยีน *bcl-2* และกลุ่มที่กระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิส เช่น *bax* โดยกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนต่าง ๆ เหล่านี้ได้รับอิทธิพลมาจากการรับและส่งสัญญาณต่าง ๆ ในระดับเซลล์ (10)

การศึกษาถึงปัจจัยที่ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารที่ติดเชื้อ *H. pylori* เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส พบว่าโมเลกุล lipopolysaccharide บนผิวเซลล์และโปรตีน CagA ซึ่งเป็นสารพิษที่หลั่งจากเชื้อ *H. pylori* มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (4) การที่เซลล์ติดเชื้อมีการหลั่งไซโตไคน์ เช่น interferon และ tumor necrosis factor สามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสได้เช่นกัน (11) อีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ คือการยึดเกาะระหว่างเชื้อ *H. pylori* และเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (5) แพลเจลลาคือปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *H. pylori* ที่เป็นหนึ่งในปัจจัยก่อโรคที่สำคัญและมีส่วนช่วยในการยึดเกาะระหว่างเชื้อกับเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (1) แพลเจลลาคทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่และมีความสัมพันธ์กับการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวนำมาซึ่งการเกิด colonization ในกระเพาะอาหารและลำไส้ มีการศึกษาความสัมพันธ์ของ

แฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* กับการเกิดอะพอพอโทซิส พบว่า โปรตีนของแฟลเจลลาบางชนิด เกี่ยวข้องกับการลดระดับการเกิดอะพอพอโทซิสของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่องตามมา (13)

จากปัจจัยต่าง ๆ ข้างต้นที่กล่าวมานี้ ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาชิ้นที่ควบคุมการสร้างแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นและเกี่ยวข้องกับการบวนการตายของเซลล์เยื่อบุผิวมะเร็งกระเพาะอาหารของมนุษย์ (Human gastric adenocarcinoma หรือ AGS) โดยในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษายีน *flaA* มีหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน FlaA ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแฟลเจลลินหลัก และยีน *fliD* มีหน้าที่ควบคุมการสร้าง capping protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโพลีเมอไรเซชันของโปรตีนหน่วยย่อย flagellin (1) ยินดีกล่าวทั้งสองอาจมีความเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพอโทซิสของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบ คุณสมบัติการเคลื่อนที่ การยึดเกาะและการกระตุ้นการตายของเซลล์ AGS ในหลอดทดลอง ระหว่างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์บริเวณยีน *flaA* และ *fliD* กับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลกระทบของยีน *flaA* และ *fliD* ของเชื้อ *Helicobacter pylori* ต่อการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ Human gastric adenocarcinoma (AGS)

1.2.2 เพื่อศึกษาผลกระทบของยีน *flaA* และ *fliD* ของเชื้อ *Helicobacter pylori* ต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ และการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ในหลอดทดลอง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษา เชื้อ *H. pylori* ทั้งสิ้น 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ทดสอบเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตด้วยวิธีการนับจำนวนโคโลนี เปรียบเทียบการมีชีวิตรอดของเชื้อด้วยเทคนิค MTT เปรียบเทียบลักษณะของแฟลเจลลาด้วยการย้อมสี Leifson tannic acid fuchsin และ การถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เปรียบเทียบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อด้วย motility assay ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ในหลอดทดลอง

ด้วย Adhesion assay ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นอกจากนี้เชื้อทั้งหมดถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร AGS เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการกระตุ้นการตายของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมด้วยสี Annexin V/FITC และ PI และตรวจสอบด้วย flow cytometry

1.4 คำถามงานวิจัย

ยีน *flaA* และ ยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างผลกระทบต่อรูปร่างแฟลเจลลา ความสามารถในการเคลื่อนที่ ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS และ ความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์ AGS ตาย หรือไม่

1.5 สมมติฐาน

จากการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสายแฟลเจลลา พบว่า นอกจากแฟลเจลลาจะมีหน้าที่ในการควบคุมการเคลื่อนที่ของจุลชีพแล้วนั้น ยังพบว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแฟลเจลลา เช่น ยีน *flaA* มีผลลดความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เป้าหมาย โดยพบผลการทดลองรูปแบบเดียวกันในยีน *fliD* ดังนั้น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแฟลเจลลา คือ *flaA* และ *fliD* อาจมีผลกระทบต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ การยึดเกาะกับเซลล์เป้าหมาย และ กระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเยื่อบุกระเพาะอาหาร

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบผลกระทบของยีน *flaA* และ *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* ที่มีต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS และ ความสามารถในการกระตุ้นการตายของเซลล์ AGS

1.4.2 ได้เพิ่มเติมองค์ความรู้เกี่ยวกับโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ต่อการเกิดพยาธิสภาพในระดับเซลล์

บทที่ 2

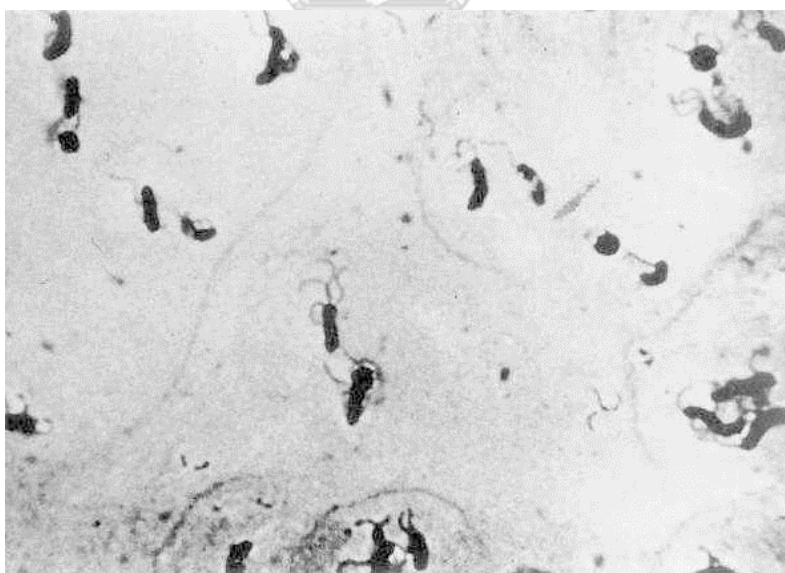
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 การค้นพบ *H. pylori*

ในปี ค.ศ. 1886 Jaworski W นักวิจัยสัญชาติโปแลนด์ ได้ทำการศึกษาเชื้อจุลชีพที่พบในเยื่อเมือกบริเวณกระเพาะอาหารของผู้ป่วยเพศชายรายหนึ่ง โดยได้สังเกตลักษณะพบว่า เป็นเชื้อแบคทีเรีย ที่มีรูปร่างเป็นเกลียว และตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวว่า เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพในกระเพาะอาหาร และให้ชื่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Vibrio rugula* จากการมีลักษณะรูปร่างเป็นเกลียว ต่อมาเขาได้ทำการศึกษาและทำการบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง และมีการเผยแพร่ข้อมูลความรู้เกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวลงในหนังสือชื่อ Handbook of Gastric Disease (14) ต่อมาในปี ค.ศ. 1970 Warren JR นักพยาธิวิทยาชาวออสเตรเลียได้ศึกษาเยื่อเมือกกระเพาะอาหารของผู้ป่วยที่มีการอักเสบและพบเชื้อแบคทีเรียที่มีรูปร่างลักษณะเป็นเกลียวเช่นกัน (15) จากนั้นในปี ค.ศ. 1975 Steer HW ได้ทำการทดลองนำแบคทีเรียที่พบในเยื่อเมือกกระเพาะอาหารไปทำการเพาะเลี้ยง แต่พบเพียงเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่เจริญเท่านั้น จึงมีนักวิทยาศาสตร์ และนักพยาธิวิทยาพยายามศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวนี้จนกระทั่ง (16) ปี ค.ศ. 1982 มีการรายงานการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวสำเร็จเป็นครั้งแรกจากชิ้นเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดย Warren JR และ Marshall BJ โดยระยะแรกของการค้นพบ เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวถูกจัดอยู่ในจีโนส *Campylobacter* และถูกแยกออกมาเป็นจีโนส *Helicobacter* ในภายหลังเนื่องจากความแตกต่างในลักษณะทางพันธุกรรมที่จำเพาะ และให้ชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Helicobacter pylori* (17) จากการศึกษาที่กล่าวไปข้างต้นนับเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการก่อโรค และพยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวนี้

2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *H. pylori*

H. pylori เป็นเชื้อแบคทีเรียติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นเกลียว อาจพบรูปร่างลักษณะอื่นได้ ขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญอยู่ เช่น การพบเชื้อมีรูปร่างโค้งงอ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานอาจพบเชื้อมีลักษณะเป็นรูปร่างแท่งได้ เป็นต้น โคโลนีมีลักษณะแข็งมีสีเหลืองจนถึงเทาขุ่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-2 มิลลิเมตร (18) ไม่พบการสร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยโครงสร้างแฟลเจลลาที่มีปลอกหุ้ม (sheathed flagella) ที่มีจำนวน 4-7 เส้น อยู่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งแต่ละเส้นมีความยาวประมาณ 3 ไมโครเมตร (1) เชื้อ *H. pylori* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนเจือจาง โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ประกอบด้วย ออกซิเจน 5 % คาร์บอนไดออกไซด์ 10 % และไนโตรเจน 85 % เชื้อ *H. pylori* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คาตาเลส เอนไซม์ออกซิเดส และ เอนไซม์ ยูรีเอส ซึ่งถือเป็นหนึ่งปัจจัยความรุนแรงของเชื้อชนิดนี้ เชื้อ *H. pylori* มีความสามารถในการอยู่รอดได้ในน้ำทะเลและน้ำจืดนานหลายสัปดาห์ (18)



รูปที่ 1 แสดงรูปร่างของ *H. pylori* ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งสามารถมองเห็นรูปร่างที่โค้งงอของเชื้อ และแสดงแฟลเจลลาของเชื้อที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (19)

2.3 พยาธิสภาพจากการติดเชื้อ *H. pylori*

เชื้อ *H. pylori* สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้ในคนสุขภาพดี (1) โดยจะพบลักษณะการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน จากคุณสมบัติของเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้ ทำให้เชื้อสามารถนำเอา ยูเรีย ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำย่อยของมนุษย์ มาทำการย่อยให้เกิดเป็นแอมโมเนีย และไบคาร์บอเนต ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของกระเพาะอาหารทำให้มีความเป็นกรดลดลง ซึ่งช่วยให้เชื้อสามารถเจริญอยู่ได้สภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหาร (5, 20) ภายหลังจากเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดต่างของกระเพาะอาหาร ร่างกายจะถูกกระตุ้นให้เกิดการหลั่งน้ำย่อยออกมาปริมาณมาก ซึ่งนำไปสู่การเกิด epigastric discomfort และจะมีอาการอาเจียนตามมา หากมีอาการต่อเนื่องจะส่งผลต่อการเกิดภาวะ achlorhydria หรือ ภาวะไร้กรดเกลือในกระเพาะอาหาร โดยภาวะดังกล่าวนี้ยังเป็นภาวะที่ไม่ทราบพยาธิกำเนิดโดยละเอียด (21) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงต่าง ๆ จากตัวเชื้อ เช่น การสร้างสารชีวพิษที่กระตุ้นให้เซลล์หลังซัยโตไคน์กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ และการเพิ่มปริมาณของแอมโมเนีย ทำให้สมดุลกรดเบสในกระเพาะอาหารถูกรบกวน จากการย่อยยูเรียโดยเอนไซม์ยูรีเอส เป็นต้น (18) หากผู้ป่วยไม่ได้เข้ารับการรักษาในระยะการติดเชื้อเฉียบพลันนี้ จะนำไปสู่โรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง โดยจะยังไม่พบอาการแสดงในระยะแรก และในผู้ป่วยบางรายจะมีการแสดงอาการรุนแรงของโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังตามมา (14, 22) ซึ่งพยาธิสภาพที่สามารถพบได้ของโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังจากการติดเชื้อ *H. pylori* ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร เนื่องมาจากการสูญเสียสมดุลระหว่างการเพิ่มจำนวน และการตายของเซลล์โดยพบว่าเป็นการตายแบบอะพอพโทซิส (23) และมีการศึกษา รายงานถึงระดับการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อ โดยพบว่าหากมีอัตราส่วนระหว่างแคทีเรียต่อเซลล์มากกว่า 100 ขึ้นไป จะส่งผลให้เซลล์มีระดับการตายแบบอะพอพโทซิสสูงขึ้น นอกจากการสูญเสียสมดุลของจำนวนเซลล์ แล้วนั้น ยังมีการศึกษาที่พบว่าการติดเชื้อ *H. pylori* ยังส่งผลต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ โดยมีผลทำให้เซลล์ถูกหยุดการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 (24) นอกจากพยาธิสภาพในกระเพาะอาหารแล้วนั้น การติดเชื้อ *H. pylori* ยังสามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหารส่วนบน เช่น autoimmune gastritis และ ยังเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโรคไปเป็นมะเร็ง เช่น gastric adenocarcinoma และ มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) เป็นต้น (22, 25, 26)

2.4 การติดต่อ

เชื้อ *H. pylori* สามารถติดต่อจากคนสู่คนได้โดยตรง โดยสามารถแบ่งเป็นรูปแบบได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ oral-oral fecal-oral และ gastro-oral โดยมีการติดต่อผ่าน fecal-oral เป็นหลัก (27) มีการศึกษาการเพาะแยกเชื้อ *H. pylori* จากสิ่งตัวอย่างของผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อ *H. pylori* โดยใช้สิ่งตัวอย่างเป็น น้ำลาย น้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร และอุจจาระ มาทำการเพาะแยกเชื้อ และวิเคราะห์จีโนมไทป์ของเชื้อ *H. pylori* ที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยแต่ละราย พบว่า ผู้ป่วยหนึ่งรายสามารถพบเชื้อ *H. pylori* ได้มากกว่า 1 จีโนมไทป์ โดยแหล่งกักเก็บเชื้อภายในร่างกายของผู้ป่วยที่สำคัญ ได้แก่ อวัยวะในระบบทางเดินอาหารเช่น กระเพาะอาหาร ลำไส้ และช่องปาก (28) และมีรายงานว่า ต่อมทอนซิลสามารถเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อ *H. pylori* ได้เช่นกัน (27)

มนุษย์สามารถติดเชื้อ *H. pylori* ได้จากการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการปนเปื้อนอุจจาระที่มีเชื้อ *H. pylori* ระหว่างกระบวนการผลิต นอกจากนี้ แหล่งน้ำธรรมชาติยังพบว่า ยังเป็นอีกหนึ่งแหล่งกักเก็บเชื้อตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อมายังมนุษย์ได้ (29) ซึ่งมีรายงานถึงความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *H. pylori* ของประชากรที่ดื่มน้ำจากแม่น้ำ หรือบ่อน้ำ ที่ไม่ใช่ น้ำประปา ว่ามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง ดังนั้น การติดเชื้อจึงมักพบในประเทศกำลังพัฒนา หรือบริเวณชุมชนที่มีสุขอนามัยไม่ดี หรือประเทศที่มีระบบการจัดการแหล่งน้ำดื่มไม่ถูกสุขลักษณะ (30)

2.5 ปัจจัยในการก่อโรค

เชื้อ *H. pylori* มีปัจจัยการก่อโรคมกมายโดย ปัจจัยการก่อโรคที่สำคัญที่เอื้อให้เชื้อสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหารได้คือ การที่เชื้อมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสในปริมาณมาก (20) ซึ่งเอนไซม์ยูรีเอสมีคุณสมบัติในการย่อยสลายยูเรียที่พบได้ในน้ำย่อยของกระเพาะอาหารของมนุษย์ ให้กลายเป็นแอมโมเนีย และ ไบคาร์บอเนต ซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่าง ทำให้เมื่อเชื้อเข้าสู่กระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดสูง ความเป็นกรดรอบตัวเชื้อจะลดลงจากแอมโมเนียและไบคาร์บอเนตที่ได้จากการย่อยสลายยูเรียที่กล่าวข้างต้น ส่งผลให้เชื้อสามารถอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหารได้ (1, 5)

นอกจากการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสแล้วนั้น แพลเจลลาของเชื้อยังถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ โดยแพลเจลลาของ *H. pylori* จะมีลักษณะเป็นแพลเจลลาแบบมีปลอกหุ้ม อยู่บริเวณด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ โดยพบได้ 4-7 เส้นต่อหนึ่งเซลล์ ซึ่งแพลเจลลาที่มีความแข็งแรงนี้ทำให้เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้รวดเร็วในลักษณะคางสาวาน (31) ซึ่งการเคลื่อนที่ลักษณะดังกล่าวนี้ทำให้เชื้อสามารถเคลื่อนที่ผ่านชั้นเยื่อเมือกของเยื่อบุผิวกระเพาะอาหารซึ่งเป็นชั้นเยื่อเมือกที่มีความหนาและเหนียวสูง การเคลื่อนที่ทะลุผ่านชั้นเยื่อเมือกทำให้เชื้ออาศัย และเพิ่มจำนวนภายใต้เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารได้ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเป็นกรดน้อยกว่า (32) มีการศึกษาในหลอดทดลองเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงขึ้น เชื้อจะเคลื่อนที่มากขึ้น และในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงจะรบกวนความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ (33) ความสามารถดังกล่าวทำให้เชื้อมีโอกาสสัมผัสกับเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารมากขึ้น แต่ในร่างกายจะไม่พบการเกาะของเชื้อที่เยื่อเมือกของลำไส้ (18) แพลเจลลา ยังมีส่วนช่วยในการอยู่อาศัยของเชื้อ โดยพบว่า หากเชื้อที่มีลักษณะของแพลเจลลาที่มีความผิดปกติทำให้เชื้อไม่สามารถอาศัยในกระเพาะอาหารของหนูได้ (34, 35) ซึ่งเชื้อที่มีแพลเจลลาสมบูรณ์ และเคลื่อนที่ได้สามารถอยู่อาศัยในกระเพาะอาหารได้ปริมาณมากและเป็นเวลานาน (36)

ปัจจัยความรุนแรงต่อมาคือ เชื้อ *H. pylori* มีความหลากหลายของโปรตีนช่วยยึดเกาะ โดยโปรตีนช่วยยึดเกาะที่พบบ่อยเช่น กลุ่ม outer membrane protein (OMPs) (37) และ neuraminyl-lactose-binding hemagglutinins (NLBH) เป็นต้น (38) โดยเชื้อใช้โปรตีนต่าง ๆ เหล่านี้ในการยึดเกาะกับตัวรับที่มีความจำเพาะบนผิวเซลล์ เช่น Lewis B และ antigen phosphatidylethanolamine เป็นต้น นอกจากโปรตีนช่วยยึดเกาะบนผิวเซลล์แล้วนั้น เชื้อยังสามารถสร้างโปรตีนบางประเภทที่มีลักษณะความเป็นแอนติเจนคล้ายกับแอนติเจนบางประเภทในร่างกายโฮสต์ ส่งผลให้เชื้อสามารถหลบหนีการทำงานจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ เช่น Lewis X antigen (18, 25)

การติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการสร้างปัจจัยความรุนแรง CagA สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรง เนื่องจาก CagA เป็นโปรตีน ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ถูกควบคุมโดยยีน cytotoxin-associated gene A ที่อยู่บน *cagA* pathogenicity island (*cag*-PAI) โดยการติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่สร้าง CagA นั้น จะมีการส่งผ่าน CagA เข้าสู่เซลล์ผ่านโครงสร้าง type IV secretory system (T4SS) เข้าสู่เซลล์ (39) และส่งผลกระทบต่อกิจกรรมภายในเซลล์ พร้อมทั้ง

กระตุ้นให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบต่าง ๆ เช่น เกิดความผิดปกติในการเรียงตัวของ Cytoskeleton ภายในเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงในการเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์ มีรายงานว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการสร้างโปรตีน CagA นั้น จะตรวจพบการถูกทำลายของเยื่อเมือกกระเพาะอาหาร และเกิดการอักเสบมากกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างโปรตีน CagA (5, 40) นอกจากนี้ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *H. pylori* คือ การที่เชื้อสามารถสร้างโปรตีน VacA ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์อีกประเภทหนึ่ง ซึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดช่องว่างภายในเซลล์ (41) รวมทั้งกระตุ้นการเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ รบกวนการทำงานของออร์แกเนลล์หลายประเภทภายในเซลล์เช่น ไกลโซโซม นำมาสู่การตายของเซลล์ (1, 18) และ โปรตีนดังกล่าวนี้ยังก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (40) ซึ่งถือเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของพยาธิสภาพในกระเพาะอาหาร และกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้โรคกระเพาะอักเสบมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น ซึ่งปัจจัยความรุนแรงของ *H. pylori* ยังมีอีกมาก ซึ่งล้วนเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหาร เช่น phospholipase A ที่มีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น (8)

2.6 ระบาดวิทยา

จากการศึกษาความชุกของการพบเชื้อ *H. pylori* อยู่ในกลุ่มประชากรโลก พบว่า มากกว่า 50% ของประชากรโลกสามารถตรวจพบเชื้อ *H. pylori* ในร่างกายได้ (5) เมื่อพิจารณาถึงภูมิภาคที่สามารถพบการระบาดมาก จะพบว่า พื้นที่ในทวีปเอเชีย พบอัตราการติดเชื้อ *H. pylori* ที่สูงกว่าทวีปอื่น ๆ โดยพบการติดเชื้อได้มากในประเทศญี่ปุ่น และประเทศไต้หวัน (42) ในประเทศไทย พบอัตราการติดเชื้อ *H. pylori* เท่ากับ 57 % หากแบ่งตามวัยที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* จะพบว่าวัยเด็กมีอุบัติการณ์การพบเชื้อ *H. pylori* ที่สูงกว่าช่วงวัยอื่น (3) ซึ่งมีสาเหตุมาจากการรับเชื้อ ผ่านทางการรับประทานอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนไม่เหมาะสม หรือมีสุขอนามัยไม่ดีเพียงพอ (43) ทั้งนี้จำนวนแสดงความชุกของการติดเชื้อ *H. pylori* ที่สูง ไม่ได้สะท้อนถึงจำนวนผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่สูงขึ้น เนื่องจากพบว่า ผู้ที่มีเชื้อ *H. pylori* อยู่ในร่างกาย มักเป็นผู้ไม่แสดงอาการป่วย ส่งผลให้ผู้ที่มีเชื้อ *H. pylori* ในร่างกาย สามารถตรวจพบการติดเชื้อ *H. pylori* ได้เป็นเวลานาน โดยเชื้อไม่ได้ถูกกำจัดด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย หรือ ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม (44)

เชื้อ *H. pylori* ได้ถูกจัดให้อยู่ในสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 คือ เป็นสารหรือสารผสมที่ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ (45, 46) โดย *H. pylori* มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับมะเร็งกระเพาะอาหาร (47) ซึ่งมะเร็งกระเพาะอาหาร จัดเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับที่ 4 ในอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ ของประชากรโลก สามารถพบผู้ป่วยใหม่ด้วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหารประมาณ 1 ล้านรายต่อปีของประชากรโลก (48) นอกจากนี้มะเร็งกระเพาะอาหารยังจัดเป็นโรคมะเร็งที่มีพยากรณ์โรคไม่ดี เนื่องจาก มะเร็งกระเพาะอาหารเป็นสาเหตุที่นำไปสู่การเสียชีวิตของผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งมากเป็นอันดับที่ 2 (49) ในสถานการณ์โรคมะเร็งของประเทศไทย หากแบ่งประเภทตามเพศ จะพบว่าในเพศชาย มีผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหารมากเป็นอันดับที่ 6 จากจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งทั้งหมด และในเพศหญิง มีผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร เป็นอันดับที่ 9 (50) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า เพศชายมีอัตราผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหารสูงกว่าเพศหญิง ซึ่งนอกจากการติดเชื้อ *H. pylori* แล้ว ปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ทั้งพันธุกรรม พฤติกรรมการสูบบุหรี่ และ สุขอนามัยในการรับประทานอาหารร่วมด้วย (21, 49, 51)

2.7 การรักษา

สืบเนื่องจากอุบัติการณ์การติดเชื้อ *H. pylori* ที่สูงจากที่กล่าวไปข้างต้น และพบว่า ผู้ติดเชื้อ *H. pylori* มักไม่แสดงอาการป่วยทำให้ขาดการได้รับการรักษาที่เหมาะสม แต่ในรายที่มีพยาธิสภาพในกระเพาะอาหารเกิดขึ้น การรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากในการรักษาผู้ป่วยที่เกิดแผลในกระเพาะอาหาร ซึ่งแนวโน้มจะเกิดการอักเสบเรื้อรังและพัฒนาไปเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารในที่สุด (52, 53) ในปี ค.ศ. 2005 การรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธีการใช้ยาปฏิชีวนะสามขนาน (triple therapy) ได้ถูกเสนอเป็นทางเลือกแรกของการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *H. pylori* โดย European Helicobacter Study Group (EHSg) (54) ซึ่งเป็นการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ amoxicillin หรือ metronidazole ร่วมกับ ยา clarithromycin และยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งกรด หรือ proton pump inhibitor (PPI) โดยพบว่า หากรักษาด้วยแผนการรักษาดังกล่าวยังให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพต่ำ American College of Gastroenterology ได้เป็นคณะผู้เสนอการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะแบบสี่ขนาน (quadruple therapy) (55) โดยใช้ยาปฏิชีวนะได้แก่ ยา metronidazole และยา tetracycline ร่วมกับการให้ยายับยั้งการหลั่งกรด และยา bismuth (56) จากแนวทางการรักษาที่กล่าวข้างต้น ส่งผลให้ในปัจจุบัน พบอุบัติการณ์ของเชื้อ

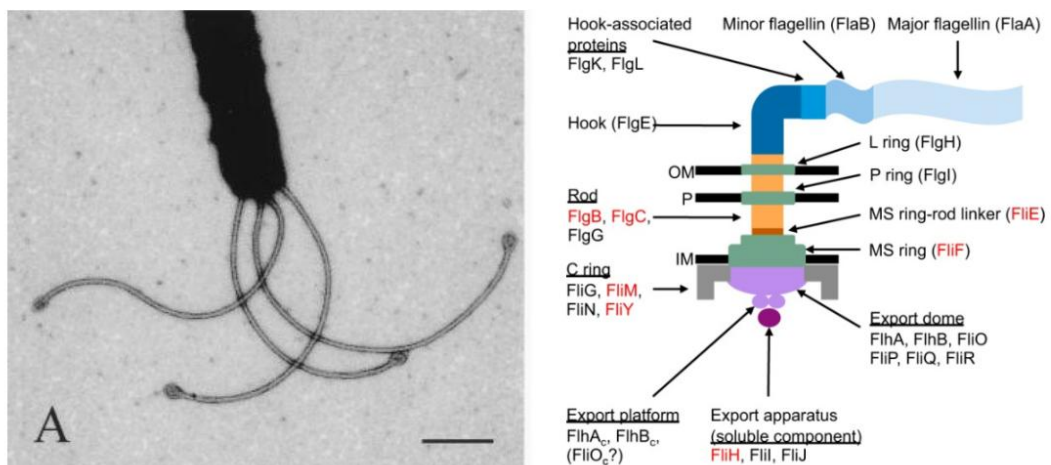
H. pylori ที่มีการดื้อต่อยา clarithromycin และ ยา metronidazole เพิ่มขึ้น โดยพบความชุกของเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวสูงขึ้นทั่วโลก จากสถานการณ์ข้างต้นทำให้การรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* ได้มีการเพิ่มการใช้ยาปฏิชีวนะอีก 1 ชนิด คือ nitroimidazole โดยจะใช้ร่วมกับการรักษาที่เป็นการใช้ยาแบบสามขนาน ซึ่งให้ผลการรักษาที่มีโอกาสประสบความสำเร็จสูงขึ้น (57) นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาพบว่า ยาปฏิชีวนะอีก 1 ชนิดที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้แทนยา clarithromycin คือ ยา levofloxacin เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาของการพบเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา clarithromycin (58)

ตารางที่ 1 ปัจจัยความรุนแรงที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* (59)

ประเภทของปัจจัยความรุนแรง	หน้าที่ หรือ โรคที่เกี่ยวข้อง
1. กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการ colonization - ยูรีเอส - แฟลเจลลา - โปรตีนช่วยในการยึดเกาะ เช่น BabA และ SabA	เจือจางความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร การเคลื่อนที่ผ่านชั้นเยื่อเมือกของเซลล์เยื่อบุ ยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร
2. กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกัน - LPS และ แฟลเจลลา - CagA และ T4SS - VacA -Catalase Superoxide dismutase	กระตุ้นการอักเสบของเซลล์ติดเชื้อ ยับยั้งการเกิดฟาโกไซโตซิส และการส่งสัญญาณของ effector T cell ยับยั้งการเกิดฟาโกไซโตซิส และการส่งสัญญาณของ effector T cell ยับยั้ง ROS และ NO
3. กลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพ - CagA และ T4ss - VacA - BabA	Gastric adenocarcinoma, MALT B-cell lymphoma และ Peptic ulcer disease (PUD) Gastric adenocarcinoma และ PUD Gastric adenocarcinoma และ PUD

2.8 แฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori*

เชื้อ *H. pylori* มีความสามารถในการสร้างแฟลเจลลา 4-7 เส้น โดยอยู่บริเวณปลายด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (60, 61) แฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ถูกใช้ในการเคลื่อนที่ ซึ่งเป็น 1 ในปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *H. pylori* โดยเชื้อ *H. pylori* จะใช้แฟลเจลลาในการเคลื่อนที่แบบคางสาวนเข้าสู่ basal layer ของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ที่มี pH ใกล้เคียง 7.0 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต (32) แฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ประกอบไปด้วย 3 องค์ประกอบ ได้แก่ ส่วนที่อยู่ภายในผนังเซลล์ คือ basal body ส่วนต่อมา คือ flagellar hook ที่ทำหน้าที่เป็น ข้อต่อเชื่อมระหว่าง basal body และ flagellar filament และส่วนสุดท้ายที่ทำหน้าที่เป็นใบพัด คือ flagellar filament (61)



รูปที่ 2 ลักษณะและโครงสร้างของแฟลเจลลา รูป A แสดงแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* บันทึกภาพโดยใช้ Transmission electron microscope (34) รูป B แสดงโครงสร้างและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของการสร้างแฟลเจลลาในเชื้อ *H. pylori* (62)

แฟลเจลลาเป็นองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียที่มีความซับซ้อนสูง การสร้างสายแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ของเชื้อ *H. pylori* ประกอบไปด้วยโปรตีนสำคัญกว่า 30 ชนิด โดยมีโครงสร้างที่เรียกว่ามอเตอร์ ควบคุมทิศทางการหมุนของแฟลเจลลา (63) การเคลื่อนที่ของแบคทีเรียอาศัย โปรตีน methyl-accepting chemotaxis proteins (MCP) ซึ่งแทรกตัวอยู่ระหว่างชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ โดยยื่นส่วนหนึ่งของโปรตีนเข้าด้านใน ไซโทพลาสซึม เรียกส่วนดังกล่าวว่า cytoplasmic domain เป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน CheA (histidine kinase) และ CheW (adaptor protein) (60) โดยการหมุนของมอเตอร์ของแฟลเจลลา เกิดจากการถูกเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน CheA ด้วยโปรตีน MCP เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต โปรตีน CheA จะส่งต่อหมู่ฟอสเฟตไปยังโปรตีน CheY ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นมอเตอร์ของแฟลเจลลา ให้ควบคุมการเคลื่อนที่ไปในทิศทางตามเข็มนาฬิกา (61) ไบพัตและสเตเตอร์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ มอเตอร์ (60) ส่วนของไบพัตประกอบด้วยโปรตีนสำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ โปรตีน FlIF ทำหน้าที่เป็นวงแหวน MS อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (64, 65) โปรตีน FlIG FlIM และ FlIN ประสานกันเป็นวงแหวน C เกาะกับวงแหวน MS ในฝั่งไซโทพลาสซึม (66, 67) ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนทิศทางของไบพัต และควบคุมการหมุนทั้งแบบทวนเข็มนาฬิกา และตามเข็มนาฬิกา (68) โปรตีน MotA และ MotB ทำหน้าที่เป็นสเตเตอร์ คือโครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็น proton channel (69-71) เพื่อให้โปรตอนสามารถไหลผ่านและกระตุ้นปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน MotA และ FlIG (72) เกิดเป็น force generating element (torque) (70) ซึ่งเป็นแรงที่ทำให้เกิดการหมุนของแฟลเจลลา (73)

องค์ประกอบลำดับต่อมาในโครงสร้างแฟลเจลลา คือ export apparatus ซึ่งทำหน้าที่ เป็นจุดขนส่งโปรตีนแฟลเจลลาในกระบวนการโพลีเมอเรชันต่อไป (60) โครงสร้างของ export apparatus ที่สมบูรณ์ถูกควบคุมโดยยีนที่สำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ ยีน *fliH fliI fliQ fliL flip fliR flhA* และ *flhB* (74) มีการศึกษาถึงความสำคัญของยีนที่เกี่ยวข้องกับ export apparatus ที่มีต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ โดยเมื่อ ยีน *fliI* และ *flhA* เกิดการกลายพันธุ์ไป เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ดังกล่าวจะสูญเสียความสามารถในการสร้างแฟลเจลลา และการเคลื่อนที่ (75) โดยพบผลการศึกษาเช่นเดียวกันกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliQ* และ *flhB* โดยทั้ง 2 ยีนดังกล่าวยังส่งผลกระทบต่อความสามารถในการยึดเกาะและอาศัยในกระเพาะอาหารของหนู โดยยีน *fliQ* ยังส่งผลกระทบต่อความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์มะเร็งเยื่อบุกระเพาะอาหาร (AGS) ทำให้มีประสิทธิภาพลดลง (76)

โปรตีน FlgE เป็นส่วนประกอบของ flagellar filament ที่เชื่อมต่อกับ basal body โดยเป็นโปรตีนที่สานกันเป็นท่อน มีรูปร่างโค้ง เรียกโครงสร้างที่เชื่อมกันนี้ว่า basal body-hook complex (60) โดยมีโปรตีน FliK ควบคุมปริมาณการสร้างของโปรตีน FlgE นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าโปรตีน FliK มีคุณสมบัติในการหยุดการทำงานของ σ^{54} ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนประเภทต่าง ๆ ระหว่างกระบวนการสร้างแฟลเจลลา (77) เมื่อโปรตีน FlgE ประสานเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์แล้ว โปรตีน FlgD จะเป็นโปรตีนที่มาเติมส่วนปลายของโปรตีน FlgE เพื่อเป็นโครงสร้าง hook ที่สมบูรณ์ รอรับการเติมด้วยโปรตีน FlgK และ FlgL เกิดเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่เป็นข้อต่อระหว่าง hook และ filament (hook-filament junction) (78) โปรตีน FlgR เป็นอีกหนึ่งโปรตีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน FlgE และยังมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมยีนที่เป็นองค์ประกอบการทำงานของแฟลเจลลาภายใต้ การทำงานของ σ^{54} (60)

โปรตีน FlgK (HAP1) โปรตีน FliD (HAP2) ซึ่งถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีน *fliD* และโปรตีน FlgL (HAP3) ทำหน้าที่ประสานกันเป็นโครงสร้าง hook-associated proteins (HAPs) ซึ่งทำหน้าที่เชื่อม flagellar hook กับ flagellar filament นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นโปรตีนที่หุ้มส่วนปลายของเส้นแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ โดยการทำงานจะเริ่มจากโปรตีน FlgK และ FlgL ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นข้อต่อระหว่าง hook และ filament โปรตีน FliD จะถูกเติมไปยังข้อต่อดังกล่าวแล้วกระตุ้นกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน ของ flagellin monomer ทำให้เกิดการประกอปกันสร้างเป็นสาย filament ที่สมบูรณ์ (34, 78) องค์ประกอบของ flagellar filaments สร้างขึ้นจาก flagellin monomer ที่มีโปรตีน 2 ชนิดเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ โปรตีน FlaA ที่ทำหน้าที่เป็นแฟลเจลลินหลัก และ โปรตีน FlaB ที่ทำหน้าที่เป็น แฟลเจลลินรอง ทั้ง 2 โปรตีนถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *flaA* และ *flaB* ตามลำดับ (79) มีการศึกษาถึงผลกระทบของยีน *flaA* และ *flaB* ที่มีต่อเชื้อ *H. pylori* พบว่า เมื่อยีน *flaA* ถูกทำให้กลายพันธุ์ พบว่าส่งผลให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถสร้างสายแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ได้ และส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้น้อยลง (80) และเมื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *flaB* ส่งผลให้ เชื้อ *H. pylori* สูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่เช่นกัน แต่ไม่พบผลกระทบต่อรูปร่างของแฟลเจลลา (79) แต่เมื่อศึกษาเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ทั้งยีน *flaA* และ *flaB* ทำให้สูญเสียความสามารถในการสร้างแฟลเจลลาโดยสมบูรณ์ และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ รวมไปถึงมีผลต่อการ colonize ในสัตว์ทดลองที่ลดลง (81)

การสร้างแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ถูกควบคุมโดย RNA polymerase sigma factor ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ประกอบด้วย class 1 คือ กลุ่มยีนที่ถูกควบคุมภายใต้ housekeeping sigma factor σ^{80} (60) ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของแฟลเจลลา ได้แก่ ยีน HP0244 ควบคุมการสร้าง histidine kinase (FlgS) โพรตีน FlgR ที่ถูกควบคุมโดยยีน *flgR* ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมยีนในกลุ่ม alternative sigma factors σ^{54} ที่จัดอยู่ในกลุ่ม class 2 โดยยีนต่าง ๆ ที่ถูกควบคุมภายใต้โพรตีน FlgR เกี่ยวข้องกับการสร้าง basal body และ hook ของแฟลเจลลา และยังสามารถยับยั้งการถอดรหัสเพื่อสร้างโพรตีน FlaA ได้ (82) กลุ่มต่อมาคือ class 2 หรือ alternative sigma factors σ^{54} โดยเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ RpoN regulon (83) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโพรตีนส่วนแกนกลางของแฟลเจลลา ประกอบด้วย hook ได้แก่ โพรตีน FlgK และ FlgE โพรตีนแฟลเจลลินรอง FlaB และส่วนปลอกหุ้มส่วนท้ายของแฟลเจลลา โพรตีน FlgS และ FlgR เป็นกลุ่มโพรตีนที่สามารถควบคุมการทำงานของ σ^{54} ได้ (60) เมื่อโพรตีน FlgR ถูกควบคุมการแสดงออกไป จะส่งผลกระทบต่อถอดรหัสโพรตีนของยีนใน class 2 ได้ (82, 84) และ class 3 คือ flagellar sigma factor σ^{28} (85) ซึ่งประกอบด้วย ยีนที่ควบคุมการสร้างโพรตีนแฟลเจลลินหลัก FlaA และกลุ่ม intermediate class ได้แก่ โพรตีน *polag* flagellin FlgG โพรตีน chaperone ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน ของสายแฟลเจลลาโดยยีน *flis* โพรตีน chaperone regulator โดยยีน *flIT* โพรตีน capping protein โดยยีน *fliD* (86) ยีน *flgB* และ *flgC* ควบคุมการสร้าง rod และ ยีน *flgD* ควบคุมการสร้าง hook นอกจากนี้ที่กล่าวมาข้างต้น ยังมียีนที่ถูกค้นพบใหม่อีกมาก ได้แก่ ยีน HP0366 HP0165 HP0488 และ HP1440 เป็นต้น ซึ่งโพรตีนของแฟลเจลลา นอกจากจะเป็นที่สนใจในการศึกษาถึงผลกระทบต่อเคลื่อนที่ ยังเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึงผลกระทบด้านอื่น ๆ เช่น การทำให้เกิดพยาธิสภาพในเซลล์ที่ติดเชื้อ และควรมีการนำไปศึกษาเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้โพรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแฟลเจลลา ได้แก่ โพรตีน FlaA และ FliD สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโพรตีนดังกล่าวได้ (87-89)

2.9 การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

เซลล์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งเซลล์แต่ละประเภทจะมีการเจริญไปทำหน้าที่เฉพาะแตกต่างกันไปตามคุณสมบัติของเซลล์ ซึ่งเซลล์บางประเภทจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ตลอดเวลา เช่น เซลล์ผิวหนัง ซึ่งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์นี้ทำให้ร่างกายต้องมีการควบคุมสมดุลปริมาณของเซลล์แต่ละประเภทให้มีระดับพอเหมาะ เพื่อให้การทำงานของร่างกายเป็นไปได้อย่างมีระบบ (10) จึงมีการค้นพบโปรแกรมการตายของเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัด และทำลายเซลล์ที่ไม่จำเป็นกับร่างกายออกไป โดยทั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์และโปรแกรมการตายของเซลล์มีความจำเป็นอย่างยิ่งในพัฒนาการทางร่างกายของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ และการรักษาสมดุลของปริมาณเซลล์ โปรแกรมการตายของเซลล์ หรือ การตายแบบอะพอพโทซิส (12) เป็นการกระตุ้นการตายของเซลล์โดยการชักนำให้เกิดการตายภายในเซลล์ผ่านการรับสัญญาณกระตุ้นทั้งจากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ เช่น การกลายพันธุ์ โรคมะเร็ง การติดเชื้อไวรัส โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน และโรคทางระบบประสาท (90) ดังนั้นการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ในร่างกาย จึงเป็นหนึ่งในสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ในมนุษย์เช่นกัน (91) โดยรูปแบบของเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสนั้นจะต้องใช้พลังงานจากแหล่งพลังงานภายในเซลล์ (92) จะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงทำให้เกิดการหดของเซลล์ มีการหดตัวของสายใยโครมาติน เกิดกระบวนการ DNA fragmentation และเซลล์จะค่อยๆถูกแยกสลายออกมาเป็น apoptotic bodies ซึ่งจะถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเช่น Macrophage หรือถูกกินโดยเซลล์ข้างเคียง (10) ในร่างกายมนุษย์ปกติมีอัตราการตายของเซลล์ เฉลี่ย 10^9 เซลล์ ต่อวัน (92) โดยกระบวนการหลักทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสอย่างสมบูรณ์ ได้แก่ การเชื่อมโยงสัญญาณภายในเซลล์ (cascade of cell signaling) และการกระตุ้นโดยใช้เอนไซม์ caspase เป็นตัวกลาง (caspase mediated events) ภายใต้การควบคุมของโปรตีนที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตาย (proapoptotic protein) เช่น Bid และ Bax และ โปรตีนที่ยับยั้งการเกิดการตาย (antiapoptotic protein) เช่น Bcl-2 (93) โดยโปรตีนทั้งสองประเภทนี้ ถูกเหนี่ยวนำโดยวิธีหลัก 2 วิธี ได้แก่วิธีภายนอกเซลล์ที่เหนี่ยวนำโดย death receptor (94) ซึ่งประกอบด้วยลิแกนด์ เช่น tumor necrosis factor- α (TNF- α) , Fas ligand และ TNF related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) และตัวรับลิแกนด์ที่จำเพาะกับลิแกนด์แต่ละตัว โดย death receptor จะมีส่วนประกอบของ death domain อยู่บริเวณด้านในไซโทพลาสซึม ซึ่ง death domain จะทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณจาก

ผิวเซลล์ เข้ามายังภายในเซลล์ ด้วยการช่วยเหลือของ adaptor protein ภายในเซลล์ (95) ซึ่งเมื่อเกิดการจับกันระหว่างลิแกนด์ death receptor และ death domain แล้วนั้น จะเกิดการกระตุ้น caspase-8 ให้อยู่ในสถานะ active และมาที่ death receptor เกิดเป็น death-inducing signaling complex (DISC) และเกิดการกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 (92) โดยในเซลล์บางประเภทพบว่ากรณีที่ caspase-8 จะกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 ได้นั้น จะต้องอาศัยการทำงานของ mitochondrial amplification loop กระตุ้นการทำงานของ proapoptotic protein ภายในไมโทคอนเดรีย เพื่อกระตุ้นการปล่อย apoptogenic protein จากไมโทคอนเดรียในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (96) โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกของ antiapoptotic protein ในระดับสูง จะพบว่ามีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสลดลง (9, 10, 97)

การตายแบบอะพอพโทซิสอีกวิธีหนึ่งคือ วิธีภายในเซลล์ที่มีไมโทคอนเดรียและอะพอพโทโซมเป็นตัวกลาง ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการที่เซลล์ใช้ตอบสนองต่อความเครียด การถูกกระตุ้น หรือการเกิดความผิดปกติในเมตาบอลิซึมของเซลล์ (10) จากการถูกเหนี่ยวนำสัญญาณให้เซลล์ตาย ยา สารพิษ ความร้อน รังสี และการขาดออกซิเจน เป็นต้น (9) ซึ่งตัวกระตุ้นต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นนี้ มีผลเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียสูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้า-ออกของสารทำให้มี proapoptotic protein หลุดออกมา ประกอบด้วย cytochrome c (96) ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของ caspase-9 และเข้าจับกับ adaptor protein คือ Apaf-1 และ procaspase-9 เกิดเป็น apoptosome โดยการทำงานของ caspase-9 สามารถถูกยับยั้งได้ โดย inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) (92, 98) ซึ่ง IAPs จะถูกยับยั้งความสามารถเมื่อมีการหลั่ง Smac/DIABLO และ HtrA2/Omi จากไมโทคอนเดรียพร้อม cytochrome c โดยการทำงานของ caspase-9 จะกระตุ้น caspase ประเภทอื่น ๆ อย่างเป็นลำดับขั้นต่อเนื่องจนถึงการกระตุ้น caspase-3 และเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (96) นอกจาก cytochrome c แล้วนั้น ไมโทคอนเดรียยังหลั่ง proapoptotic protein อื่นๆ เช่น AIF, endonuclease G และ caspase-activated DNase (CAD) การกระตุ้นสัญญาณสามารถถูกยับยั้งได้โดยการแสดงออกของ antiapoptotic protein เช่นกลุ่มโปรตีน Bcl-2 (93)

2.10 บทบาทของ Caspases และ Bcl-2 family ต่อการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์

Caspases เป็นโปรตีนในกลุ่ม cystein protease ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการตัดสายพอลิเปปไทด์ของโปรตีนที่จำเพาะ โดยจะตัดที่ตำแหน่งหลังกรดอะมิโน aspartic acid (99) ซึ่งโปรตีนในกลุ่ม caspases สามารถจำแนกได้เป็นกลุ่ม initiator caspases เช่น caspase-8 และ caspase-9 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนตัวทำงานตัวต่อไปในการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ และ effector caspases เช่น caspase-3 และ caspase-7 ซึ่งจะถูกระตุ้นการทำงานจากการถูกตัดโปรตีนบางส่วนโดย initiator caspase และทำให้ effector caspase อยู่ในสภาวะถูกระตุ้น และจะทำงานโดยการกระตุ้นโปรตีนตัวอื่นต่อไป (90) จากการศึกษาการทำลายการแสดงออกของ caspases ในหนูพบว่า เซลล์ของหนูดังกล่าวมีอัตราการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสของเซลล์ลดลง (100) แสดงให้เห็นว่า caspases ถือเป็นกลุ่มโปรตีนทำงานที่สำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ โดยบทบาทสำคัญของการทำงานของ caspases คือ จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดการปล่อย cytochrome c ภายในเซลล์และเกิดการสร้าง เป็น apoptosome ร่วมกับ caspase-9 และเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส(10)

Bcl-2 family เป็นกลุ่มโปรตีนภายในเซลล์ที่ช่วยควบคุมการทำงานของ procaspase โดยโปรตีนในกลุ่มนี้ เช่น Bcl-2 (10) มีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการเกิดอะพอพโทซิสภายในเซลล์ โดยการขัดขวางการปล่อย cytochrome c จากไมโทคอนเดรียของเซลล์ ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม caspase ตามมา ในขณะที่โปรตีนบางชนิดใน Bcl-2 family กลับมีหน้าที่ตรงข้าม เช่น Bax และ Bak ที่กระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิส โดยการกระตุ้นการปล่อย cytochrome c จากไมโทคอนเดรีย โดยผ่านการกระตุ้นของ Bid และโปรตีนอีกประเภท คือ Bad ที่มีความสามารถในการจับกับตัวยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิสภายในเซลล์ ดังนั้นกระบวนการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของโปรตีนในหลายกลุ่ม จึงเป็นที่มาของการตรวจวัดการตายแบบอะพอพโทซิส ในหลอดทดลอง ซึ่งจะใช้การตรวจติดตามปริมาณของโปรตีนหรือ สัญญาณต่าง ๆ ดังที่กล่าวข้างต้น เพื่อเป็นการแสดงถึงการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ในหลอดทดลอง (101)

2.11 ความสัมพันธ์ของการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร

ในการศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคมะเร็งในปัจจุบัน ทำให้เกิดความรู้พื้นฐานมากมายเกี่ยวกับกลไกในการเกิดโรคมะเร็งโดยเฉพาะกลไกการเกิดมะเร็งระดับเซลล์ และการเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในสารพันธุกรรมของเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็ง หนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผู้ศึกษาเป็นจำนวนมาก คือ ความสัมพันธ์ระหว่างการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ กับการเกิดโรคมะเร็ง โดยการศึกษาพบว่ายีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิส มีอิทธิพลกับการเกิดมะเร็งเป็นอย่างมาก (102, 103) โดยมีหลักฐานว่า การเกิดการกลายพันธุ์บริเวณยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสภายในเซลล์ นำไปสู่การเกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง เนื่องจากเซลล์มะเร็งนั้นจะเป็นเซลล์ที่มีความต้านทานต่อการเกิดอะพอพโทซิสส่งผลให้เซลล์ไม่เกิดการตายตามโปรแกรมของเซลล์ และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น จนเกิดเป็นเนื้อเยื่อของมะเร็ง และแพร่กระจายไปยังเซลล์บริเวณอื่นทั่วร่างกาย (104) ดังนั้นจึงเกิดเป็นแนวคิดในการพัฒนาแนวทางการกำจัดเซลล์มะเร็งโดยการกระตุ้นให้เซลล์ที่เป็นมะเร็งนั้นเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (100) ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่า การสูญเสียความสามารถในการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ นำไปสู่การพัฒนาเป็นมะเร็งของเซลล์ ซึ่งการศึกษาต่อมาที่มีผู้สนใจคือ ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมของเซลล์ ซึ่งมีผู้ศึกษาสารเคมี หรือ รังสีหลายประเภทที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการกลายพันธุ์ของเซลล์ หรือ มิวตาเจน เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต ที่กระตุ้นการกลายพันธุ์ของยีนทั้งในเซลล์แบคทีเรีย และเซลล์เพาะเลี้ยง การรับรังสี หรือสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นมิวตาเจนเป็นเวลานาน สามารถทำให้เกิดความเสียหายที่นำไปสู่การกลายพันธุ์ของเซลล์ และพัฒนาเป็นมะเร็งในอนาคต ซึ่งมีผู้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสารไมโตเจน กับการเกิดเป็นมะเร็งหลายประเภท โดยสารที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดเป็นมะเร็ง จะเรียกว่า สารก่อมะเร็ง หรือ carcinogen ซึ่งในมะเร็งกระเพาะอาหารนั้น มีสารหลายประเภทที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง รวมทั้งจุลชีพอย่าง *H. pylori* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์ในหลายรูปแบบ ทั้งกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ ซึ่งทำให้เซลล์ปลดปล่อยสารประเภท Reactive oxygen species ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์และนำมาซึ่งการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทดแทน ส่งผลให้เกิดเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร (4, 105) โดยพบว่ามากกว่า 90% ของผู้ติดเชื้อ *H. pylori* จะเป็นมะเร็งของเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร นอกจากการกระตุ้นการอักเสบแล้วนั้น การติดเชื้อ *H. pylori* ยังสามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพในอีกรูปแบบหนึ่งคือ การกระตุ้นให้เซลล์เป้าหมายเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (5) ซึ่ง

การตายแบบอะพอพโทซิสที่ไม่ใช่การตายตามโปรแกรมการตายปกติของเซลล์ จะมีการตายของเซลล์ในปริมาณมาก ทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงในการรักษาสสมดุลปริมาณเซลล์ (105) เนื่องจากร่างกายจะมีระบบการรักษาสสมดุลปริมาณการเกิดและการตายของเซลล์ให้มีจำนวนคงที่ ดังนั้นเมื่อถูกกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายเป็นปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เกิดความเสียหายขึ้นมาทดแทน ซึ่งการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ปริมาณมาก ประกอบกับการเกิดการอักเสบของเซลล์และได้รับสารประเภทไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อส่งผลให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นเกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นใหม่นั้น เกิดความเปลี่ยนแปลงในสารพันธุกรรม ซึ่งมักพบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ p53 gene (102) ซึ่งเป็น tumor suppressor gene โดยความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น ทำให้ p53 มีการแสดงออกน้อยลง ซึ่งในสภาวะปกติ p53 จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส เมื่อสูญเสียยีนที่กระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสไป เซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นมาใหม่ มีแนวโน้มที่จะเป็นเซลล์ที่ไม่เกิดการตายตามธรรมชาติ และพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์มะเร็ง (106) โดยนอกจากการเปลี่ยนแปลงที่ p53 แล้วนั้น ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารยังมีอีกหลายส่วน เช่น การแสดงออกมากขึ้นของ cyclin E และ CDK ซึ่งควบคุมวัฏจักรของเซลล์ให้เกิดความผิดปกติ และนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้เช่นกัน (49, 51) ดังนั้น ในมะเร็งของเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารนั้น การเกิดการกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิส ถือเป็นหนึ่งปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการพัฒนาของโรคทางกระเพาะอาหาร ไปเป็นมะเร็งในระบบทางเดินอาหาร (107)

2.12 แพลเจลลากับการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์

แพลเจลลาของแบคทีเรียถือเป็นหนึ่งในปัจจัยความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด นอกจากจะมีหน้าที่หลักในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย ยังมีการศึกษาถึงผลกระทบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแพลเจลลาต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าในโฮสต์ที่เป็นกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถตอบสนองต่อแพลเจลลาของแบคทีเรียผ่าน ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด โดยโฮสต์จะมี Toll-like receptors 5 (TLR5) ที่จดจำ pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ได้แม้ไม่เคยมีการติดเชื้อแบคทีเรียประเภทนี้มาก่อน (108) ความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน นำมาซึ่งการกระตุ้นไซโตไคน์ เช่น interleukin-6 และเกิดการหลั่งสารตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์เช่น nuclear factor kappaB และ tumor necrosis factor alpha เป็นต้น (109) ในการศึกษาผลกระทบของยีน *flhD* และ *fliR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างแพลเจลลาของเชื้อ *Serratia marcescens* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมโครฟาจของหนู พบว่ายีนทั้งสองนี้มีความสามารถในการกระตุ้นการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์แมโครฟาจ และมีผลลดการตอบสนองผ่านระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของ TLR5 (110) ในขณะเดียวกันผลการศึกษาผลกระทบของโปรตีนแพลเจลลาชนิด FliC ของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ พบว่า แพลเจลลามีความสามารถในการกระตุ้น Mcl-1 ซึ่งเป็น antiapoptotic protein ผ่าน TLRs-5 และลดการแสดงออกของ caspase-3 ส่งผลให้นิวโทรฟิลล์มีการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสลดลง (13) และในการศึกษาผลของ *fliC* ของเชื้อ *S. typhimurium* ต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ของหนู จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง ควบคู่กับการศึกษาในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ของหนูชนิด IEC-6 พบว่า เชื้อ *S. typhimurium* ที่ขาดการแสดงออกของยีน *fliC* ส่งผลให้หนูทดลองมีพยากรณ์ของโรคแย่กว่าหนูที่ติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน เนื่องจากเชื้อ *S. typhimurium* ที่ขาดการแสดงออกของยีน *fliC* สามารถกระตุ้นให้หนูที่ติดเชื้อเกิดพยาธิสภาพได้มากขึ้น (108) และพบว่าในการทดสอบผลกระทบต่อเซลล์ IEC-6 ร่วมกับแบคทีเรียที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *fliC* เปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการแสดงออกของ *fliC* พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ขาดการแสดงออกของ *fliC* ทำให้เซลล์ IEC-6 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสมากกว่ากลุ่มเปรียบเทียบ ซึ่งเมื่อทำการทดสอบในยีน *flyB* และ *fliD* ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน ดังนั้นแพลเจลลาของเชื้อ *S. typhimurium* มีผลในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และมีฤทธิ์ต้านการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์เยื่อบุผิว (111) และจากการศึกษา

ผลกระทบของแฟลเจลลาในแง่ของการตอบสนองระดับเซลล์ และพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส จึงมีผู้ทำการศึกษาโปรตีนแฟลเจลลาชนิด FlaA จากเชื้อ *Legionella pneumophila* ถึงผลกระทบที่มีต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของหนูชนิด 4T1 ร่วมกับการใช้รังสีบำบัดเซลล์มะเร็ง พบว่า โปรตีน FlaA มีความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของ NF- κ B ทำให้เซลล์มีความไวต่อการใช้รังสีบำบัดเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้พบว่า การให้ FlaA กับเซลล์ 4T1 ก่อนรับรังสีบำบัด มีผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสมากขึ้น และมีการแสดงออกของ Bax และ Bid ที่เป็น proapoptotic protein มากขึ้น และลดการแสดงออกของ Bcl-2 ที่เป็น antiapoptotic protein ลง (112) จะเห็นได้ว่า การศึกษาผลกระทบของแฟลเจลลากับการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์นั้น จะพบว่า แฟลเจลลาของเชื้อแบคทีเรียมีผลทั้งกระตุ้นและยับยั้งการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งยังขาดการศึกษาในเชื้อ *H. pylori* ที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์โดยการตายแบบอะพอพโทซิสเช่นเดียวกัน

2.13 การเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์เมื่อติดเชื้อ *H. pylori*

ในการศึกษาชิ้นเนื้อที่ได้จากการเก็บตัวอย่างของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารเรื้อรัง ได้ทำการศึกษารูปร่างของเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป โดยมีลักษณะของเซลล์คล้ายคลึงกับเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส จึงนำเอาชิ้นเนื้อดังกล่าวมาทำการย้อมด้วยสี histochemical ที่จับกับ 3' end ของสาย DNA และค้นพบลักษณะการสลายตัวของ DNA ของเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร และเซลล์ในบริเวณ lamina propria ซึ่งพบลักษณะดังกล่าวมากถึงหนึ่งในสามส่วนของชิ้นเนื้อทั้งหมด (113) โดยการศึกษาแล้วยังพบอีกว่า เชื้อ *H. pylori* คนละสายพันธุ์มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสต่างกัน โดยมีการศึกษาพบว่าในสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้าง Cag A ได้นั้น มีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสที่สูงกว่าสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง Cag A (114) แต่เมื่อเปรียบเทียบในอัตราส่วนระหว่างการตายแบบอะพอพโทซิส ต่อการแบ่งตัวของเซลล์จะพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในสายพันธุ์ที่สร้าง และไม่สร้าง Cag A (115) และเมื่อนำเอาเชื้อ *H. pylori* ไปศึกษาการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสในหลอดทดลอง พบว่า เชื้อ *H. pylori* สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ภายใน 1-2 ชั่วโมงเท่านั้น และหากทำการแยกเชื้อออกจากเซลล์ทดลอง พบว่าเซลล์ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้ตายแบบอะพอพโทซินำมาสู่สมมติฐานในการศึกษาที่ว่า

กระบวนการ adherence หรือการเกาะติดเป็นกระบวนการสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ตายแบบอะพอพโทซิส (116) ซึ่งผลจากการศึกษาผลกระทบของ *H. pylori* ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ในหลอดทดลองนั้น ยังมีความแปรปรวนอยู่มากทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากสถานะในการเพาะเลี้ยง การศึกษาต่อมาที่มีการศึกษาถึงกลไกระดับเซลล์ที่เชื้อ *H. pylori* ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยพบว่า *H. pylori* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α และ Fas ligand ซึ่งเป็นหนึ่งในลิแกนด์ของ death receptor ได้ (95) และยังพบการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม proapoptotic protein เช่น Bak มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* แต่การศึกษาทั้งหมดนั้นยังไม่สามารถศึกษาถึงยีนทั้งระบบของเชื้อ *H. pylori* ที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำเซลล์ให้ตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้เกิดความสนใจในการศึกษาถึงผลของปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *H. pylori* ต่อการการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย (113)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. สารเคมี น้ำยา และ วัสดุทางวิทยาศาสตร์

สารเคมี น้ำยา และ วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ มีรายละเอียดดังนี้

สารเคมี น้ำยา และ วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion (BHI) broth วัุ้น Agar base เบอร์ 2 ซื้อมาจากบริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักร ยา kanamycin ซื้อมาจาก บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา เลือดแกะซื้อมาจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย งานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร AnaeroPack® ซื้อมาจาก Mitsubishi Gas Chemical จำกัด สหรัฐอเมริกา

สารเคมี น้ำยา และ วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการทำการทำให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ได้รับยีน *flaA* และ *flhD* ทดแทน ประกอบด้วย Tris-base ซื้อมาจากบริษัท BioRad จำกัด สหรัฐอเมริกา EDTA disodium salt ซื้อมาจากบริษัท Merck จำกัด สหรัฐอเมริกา MyFi™ DNA polymerase ซื้อมาจากบริษัท Meridian Bioscience สหรัฐอเมริกา อะกาโรสเจล Ethidium Bromide ซื้อมาจากบริษัท Thermo Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit ซื้อมาจากบริษัท Favorgen จำกัด ประเทศไต้หวัน pGEM® T-Easy vector T4 DNA ligase ซื้อมาจากบริษัท Promega สหรัฐอเมริกา เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* ซื้อมาจากบริษัท New England Biolabs จำกัด สหราชอาณาจักร อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Luria-bertani Broth อาหารเลี้ยงเชื้อ SOC medium สาร isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside สาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside Taq DNA polymerase ซื้อมาจากบริษัท New England Biolabs จำกัด สหราชอาณาจักร ยา ampicillin ซื้อมาจาก บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา QIAprep Spin Miniprep Kit ซื้อมาจากบริษัท Qiagen สหรัฐอเมริกา

สารเคมี น้ำยา และ วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร AGS ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 Fetal bovine serum เอนไซม์ trypsin และ Phosphate buffer saline (PBS) ซื้อมาจากบริษัท HyClone จำกัด สหรัฐอเมริกา ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์

พลาสติกขนาด 25 mL (T25) 6-well plate 12-well plate Centrifuge tube ขนาด 15 mL และ serological pipette พลาสติกขนาด 5 mL และ 10 mL ซื้อจากบริษัท Thermo Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา Trypan Blue Solution 0.4 % ซื้อจากบริษัท Gibco จำกัด สหรัฐอเมริกา

สารเคมี น้ำยา และวัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการเจริญ การทดสอบการเคลื่อนที่ และการย้อมสีแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ *Brucella* broth ซื้อจากบริษัท Beckton Dickinson จำกัด สหรัฐอเมริกา, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide ซื้อจากบริษัท BioChemica จำกัด สหรัฐอเมริกา, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ซื้อจากบริษัท BioRad จำกัด สหรัฐอเมริกา, Tannic acid ได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.ดร. จิรารัช กิตนะ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย Basic fuchsin Sodium Chloride ซื้อจากบริษัท Sigma Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา sodium chloride, 95% เอธิลแอลกอฮอล์ ซื้อจากบริษัท ALCoH-A จำกัด ประเทศไทย ขวด พลาสติกชนิดมีฝาปิดขนาด 25 mL ซื้อจากบริษัท Beckton Dickinson จำกัด สหรัฐอเมริกา 96 well microtiter plate ซื้อจากบริษัท Thermo Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา

สารเคมี น้ำยา และวัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการทดสอบการตายของเซลล์ AGS ประกอบด้วย ชุดทดสอบการตายแบบอะพอโทซิส ApoAlert® ซื้อจากบริษัท Takara Bio จำกัด ประเทศญี่ปุ่น

เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 และเซลล์ AGS ซื้อจาก American Type Culture Collection สหรัฐอเมริกา เชื้อ *E. coli* DH5- α competent cells ซื้อจากบริษัท New England Biolabs จำกัด สหราชอาณาจักร

3.2 เครื่องมือ

เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) จากบริษัท Genie2 จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่องปั่นตกตะกอน ความเร็วสูง จากบริษัท Vision จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer) จากบริษัท Thermo scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่อง Thermal cycler จากบริษัท Biometra จำกัด ประเทศเยอรมนี เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากบริษัท SynGene จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่องทำ electrophoresis จากบริษัท Myrun จำกัด ประเทศญี่ปุ่น เครื่องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เครื่อง FACScan flow cytometry จาก

บริษัท Beckton Dickinson จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่องวัดปฏิกิริยาจากเฟลท Synergy™ H1 จาก
บริษัท Biotek จำกัด สหรัฐอเมริกา

3.3. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori*

เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 ถูกเพาะเลี้ยงบน brain heart infusion (BHI) agar ที่มีส่วนผสมของเลือดแกะ 7% (v/v) ขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ถูกเพาะเลี้ยงบน BHI agar ที่มีส่วนผสมของเลือดแกะ 7% (v/v) และมีการเติมยา kanamycin 20 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจางโดยใช้ AnaeroPack®

3.2 การทำให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 กลายพันธุ์ที่ยีน *flaA* และ *fliD* ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis (IPCRM)

เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 กลายพันธุ์ที่ยีน *flaA* และ *fliD* ได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาวรฤทัย ทองเกิด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (117) ซึ่งมีขั้นตอนการสร้างเชื้อสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ ดังนี้ สกัดสารพันธุกรรมจากเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง มาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองโดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *flaA* และ *fliD* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นนำผลผลิตที่ได้โคลนเข้าสู่ DNA พาหะ และ transform เข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* DH5- α competent cells ทำการสกัดพลาสมิด และนำมาทำ inverse polymerase chain reaction mutagenesis (IPCRM) ด้วย primer ที่ออกแบบให้ผลผลิตของการทำปฏิกิริยามีลำดับเบสขาดหายไปจากต้นแบบประมาณ 10 คู่เบส และนำ kanamycin cassette มาเชื่อมต่อกับผลผลิตข้างต้น นำพลาสมิดที่ได้ transform เข้าสู่เชื้อ *H. pylori* ATCC43504 ทำให้ได้เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* วิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อยืนยันการกลายพันธุ์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing (117)

ตารางที่ 2 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อ Primer	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)	เทคนิคที่นำไปใช้
<i>flaA</i> WF	ATGGCTTTCAGGTCAATAC	1,533	การทำให้เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ได้รับยีน <i>flaA</i> และ <i>fliD</i> ทดแทน
<i>flaA</i> WR	CTAGTTAAAAGCCTTAAGATATTT		
<i>fliD</i> WF	ATGGCAATAGGTTCCATTAAGC	2,054	Colony PCR
<i>fliD</i> WR	TTAATTCTTTTTAGCCGC		
SP6 promotor	ATTTAGGTGACACTATAGAA	175	
T7 promotor	AATACGACTCACTATAGGG		

3.3 การทำให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ได้รับยีน *flaA* และ *fliD* ทดแทน

เพื่อทำให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ได้รับยีน *flaA* และ *fliD* กลับเข้ามาในตัวเชื้อ โดยใช้วิธีการทำให้เชื้อรับยีน *flaA* และ *fliD* ที่มีลำดับเบสสมบูรณ์กลับเข้าไปด้วยวิธี Natural Transformation เนื่องจากเป็นเทคนิคการนำสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ที่ให้ประสิทธิภาพดีกับเชื้อ *H. pylori* และเป็นที่ยอมรับในหลายงานวิจัยที่ศึกษากับเชื้อดังกล่าว (118-121) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 การออกแบบ primer สำหรับสร้างพลาสมิดตัวนำของยีน *flaA* และ *fliD* ที่มีลำดับเบสสมบูรณ์

ลำดับเบสของยีน *flaA* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (Genbank accession number AY319298) ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อทั้งยีน *flaA* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 19 ลำดับแรกของยีน *flaA* สำหรับ forward primer และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 24 ลำดับสุดท้ายของยีน *flaA* สำหรับ reverse primer ลำดับเบสของยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (Genbank accession number

NZ_AIHX01000054) ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ ทั้งชิ้นยีน *fliD* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 21 ลำดับแรกของยีน *fliD* สำหรับ forward primer และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 19 ลำดับสุดท้ายของยีน *fliD* สำหรับ reverse primer ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 2 ตรวจสอบคุณสมบัติ และความจำเพาะของ primer ด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.3.2 การสกัดสารพันธุกรรม

ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถูกใช้เป็นต้นแบบ สำหรับกระบวนการสร้างพลาสมิดที่มียีน *flaA* และ *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* โดยมีขั้นตอน สกัดสารพันธุกรรมดังนี้ ขูดโคลนของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ที่ เจริญครบเวลา 72 ชั่วโมงแล้ว ปริมาณ 1 ไร่ ปล่อยให้ตายก่อนเชื้อใน Tris-EDTA buffer ปริมาตร 200 μ L ผสมให้เข้ากันดี นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุม อุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นตกตะกอนที่ 7,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ตูดแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใส วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดโดย เครื่อง Nanodrop™ 1000 spectrophotometer และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3 การเพิ่มปริมาณยีน *flaA* และ *fliD* ด้วยเทคนิค PCR

ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1 ถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *flaA* และ *fliD* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น 400 นาโนกรัมในปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรรวม 100 μ L ประกอบด้วย *flaA* WF primer หรือ *fliD* WF primer และ *flaA* WR primer หรือ *fliD* WR primer ปริมาณอย่างละ 50 pmol สารละลาย MyFi mix ความเข้มข้น 2 เท่าซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์ MyFi DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates dNTPs และ $MgCl_2$ ปริมาตร 50 μ L ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 μ L ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ทำปฏิกิริยา ภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาดังแสดงในตารางที่ 3 โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวอย่าง ควบคุมลบ นำผลผลิต PCR ปริมาตร 20 μ L มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน

เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 % โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส
ผลิตดีเอ็นเอของการเพิ่มปริมาณยีน *flaA* ควรมีขนาดเท่ากับ 1,533 คู่เบสและยีน *fliD*
ควรมีขนาดเท่ากับ 2,058 คู่เบส

ตารางที่ 3 ปฏิบัติการและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *flaA* และ *fliD* ด้วย
เทคนิค PCR และการทำปฏิบัติการ colony PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และเวลา			
	PCR (<i>flaA</i>)	PCR (<i>fliD</i>)	Colony PCR	จำนวนรอบ
Pre-Denature	93 °C, 5 นาที	93 °C, 5 นาที	93 °C, 5 นาที	1
Denature	93 °C, 1 นาที	93 °C, 1 นาที	93 °C, 1 นาที	x35
Annealing	54 °C, 1 นาที	52 °C, 1 นาที	50 °C, 1 นาที	
Extension	72 °C, 2 นาที	72 °C, 2 นาที	72 °C, 1 นาที	
Final extension	72 °C, 10 นาที	72 °C, 10 นาที	72 °C, 10 นาที	1
Hold temp	4			-

3.3.4 การแยกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส

นำผลผลิตจากปฏิบัติการ PCR ของยีน *flaA* และ *fliD* ปริมาตร 3 μ L ผสมกับ
loading dyes ความเข้มข้น 6 เท่าปริมาตร 5 μ L และนำไปเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าด้วย
เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 % ที่มีส่วนผสมของ Ethidium
bromide ความเข้มข้น 1 μ g/ μ L ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์เป็นเวลา 40 ถึง 50 นาที
โดยใช้ชุด อิเล็กโตรโฟรีซิส i-MyRun electrophoresis system สังเกตแถบดีเอ็นเอ
ภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน
ขนาด 10 กิโลเบส บันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

3.3.5 การทำให้ผลผลิตจาก PCR บริสุทธิ์

ผลผลิตดีเอ็นเอส่วนที่เหลือจากข้อ 3.3.3 ปริมาตร 80 μ L ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิตเพื่อเป็นการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับใช้ในกระบวนการต่อไป นำผลผลิตดีเอ็นเอมาผสมกับบัฟเฟอร์ FADF ปริมาตร 500 mL ปิดเตตสิ่งตัวอย่างทั้งหมดลงใน FADF column จากนั้นนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที และทิ้งส่วนใสที่อยู่ก้นหลอดเติมบัฟเฟอร์ wash buffer ปริมาตร 750 μ L ลงใน FADF column แล้วนำไปปั่น 30 วินาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ก้นหลอดปั่นต่ออีก 3 นาที เพื่อให้ column แห่งนี้ FADF column มาวางบน microcentrifuge tube หลอดใหม่ขนาด 1.5 mL และเติมบัฟเฟอร์ elution buffer ปริมาตร 40 μ L ลงที่กลางเมมเบรนของ FADF column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยเครื่อง Nanodrop™ 1000 spectrophotometer และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 การโคลนยีน *flaA* และ *fliD* เข้าสู่ pGEM® T-Easy vector

นำผลผลิต PCR ของยีน *flaA* และ *fliD* ปริมาณ 10 μ g โคลนใส่เข้าไปใน pGEM® T-Easy vector ปริมาณ 50 ng เติมบัฟเฟอร์ ligation buffer ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 5 μ L และเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 unit ปริมาตร 1 μ L เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 10 μ L จากนั้นทำการบ่มเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ligation ที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation ที่มียีน *flaA* และ *fliD* บรรจุอยู่ในพลาสติกถูกนำไปเข้าสู่ *E. coli* DH5- α competent cells ด้วยวิธี heat-shock transformation ซึ่งมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ ละลายเชื้อ *E. coli* DH5- α competent cells ปริมาตร 50 μ L โดยวางหลอดใส่เชื้อบนน้ำแข็งจนกว่าสารละลายในหลอดจะละลายทั้งหมด เติมผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 5 μ L ลงในหลอด ผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบา ๆ จากนั้นตั้งหลอดดังกล่าวทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ

42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที นำหลอดเชื้อที่ผ่านความร้อนแล้ว มาตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งโดยทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC medium ปริมาตร 950 μL ลงในหลอดดังกล่าวและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปิเปิดสารละลายในหลอดปริมาณ 100 μL มาทำการเกลี่ยลงบน luria-bertani agar ที่มียา ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สาร isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เพื่อทำการคัดเลือก competent cells ที่มีพลาสมิดบรรจุอยู่ด้วยวิธี blue/white colony screening assay โดยบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง โคลนินของ competent cells ที่มีพลาสมิดบรรจุอยู่จะมีโคโลนีสีขาว เลือกโคโลนีของเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าวไป streak ลงบน luria-bertani agar ที่มียา ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยืนยันความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลนเข้าไปด้วยวิธี colony PCR amplification และวิธี restriction enzyme analysis

3.3.7 การทำ colony PCR amplification

สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลนเริ่มจากเชื้อเชื้อจากโคโลนีของ competent cells ที่ให้โคโลนีสีขาวมาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 100 μL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารและนำไปให้ความร้อนโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสนำมาเพิ่มจำนวนยีน *flaA* และ *fliD* โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 Promoter ดังแสดงในตารางที่ 2 ปฏิกริยา colony PCR amplification มีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 25 μL ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอปริมาณ 1 μL primer ที่จำเพาะกับ SP6 และ T7 promoter ปริมาณอย่างละ 50 pmol deoxynucleotide triphosphates ความเข้มข้น 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า MgCl_2 ความเข้มข้น 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ และเอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1 unit โดยนำกลั่นปราศจากเชื้อถูกนำมาใช้เพื่อเป็นตัวอย่างควบคุมลบ ปฏิกริยาเกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาตามที่แสดงในตารางที่ 3 นำผลผลิตจากปฏิกริยา colony PCR amplification มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 % โดยเทียบขนาด

กัปติเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ผลผลิตดีเอ็นเอของการเพิ่มปริมาณยีน *flaA* และ *fliD* ควรมีขนาดเท่ากับ 1,708 และ 2,233 คู่เบส ตามลำดับ

3.3.8 การสกัดพลาสมิด

เชื้อโคโลนีของ competent cells ที่ตรวจพบยีน *flaA* และ *fliD* โดยวิธี colony PCR มาเพาะเลี้ยงใน luria-bertani broth ปริมาตร 10 mL ที่มี ampicillin 100 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้การเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาแยกเอาส่วนน้ำใสทิ้ง และ นำส่วนตะกอนไปสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำส่วนตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 µL และ ปิเปตสารละลายดังกล่าวลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 µL และบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 µL และผสมโดยกลับหลอดขึ้นลง 4 ถึง 6 ครั้งทันทีนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที และปิเปตเฉพาะส่วนสารละลายใสลงใน QIAprep Spin column ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนสารละลายใสและนำ column ไปปั่นต่ออีกครั้งเพื่อทิ้งบัฟเฟอร์ที่ค้างอยู่จากนั้นนำ column ไปวางบนหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ทำการชะพลาสมิดดีเอ็นเอโดยเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 µL ซึ่งมีส่วนประกอบของ Tris-HCl ความเข้มข้น 10 mmol/L pH 8.5 ลงตรงกลาง column และนำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ทำการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop™ 1000 spectrophotometer ยืนยันความถูกต้องของชิ้นส่วนยีน *flaA* และ *fliD* ที่โคลนเข้าไปด้วยวิธี restriction enzyme analysis

3.3.9 การทำ restriction enzyme analysis

นำพลาสมิดที่บรรจุยีน *flaA* และ *fliD* ซึ่งถูกสกัดในขั้นตอน 3.3.8 มาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* พลาสมิดที่บรรจุยีน *flaA* และ *fliD* ปริมาตร 1 μL บ่มร่วมกับ เอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 1 เท่าและบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 % โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส ขนาดของชิ้นส่วนของยีน *flaA* และ *fliD* ที่ได้ควรมีขนาดเท่ากับ 1,568 และ 2,093 คู่เบสตามลำดับ และขนาดของพลาสมิดที่ถูกตัดออกมาควรมีขนาดเท่ากับ 2,980 คู่เบส

3.3.10 การนำพลาสมิดที่มียีน *flaA* และ *fliD* เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค natural transformation

เกลี่ยเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ปริมาณ 1 ลูบ (ประมาณ 10^8 ถึง 10^9 เซลล์) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ที่เย็นซึ่งมีส่วนประกอบของเลือดแกะ และ fetal bovine serum ที่กล่าวไว้ในขั้นตอน 3.2.1 ให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมงภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง ปิเปิดพลาสมิดที่มียีน *flaA* และ *fliD* จากขั้นตอน 3.3.8 ปริมาณ 2 μg ลงบนเชื้อและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจางจากนั้นดูดเอาเชื้อทั้งหมดที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth ปริมาตร 500 μL และ ปิเปิดเชื้อ ปริมาตร 100 μL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ซึ่งมีส่วนประกอบของ เลือดแกะ fetal bovine serum บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วันภายใต้สภาวะ ออกซิเจนเจือจางโดยใช้ AnaeroPack®

ทดสอบยืนยันความสำเร็จในการทำ natural transformation ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีที่ขึ้นมาทั้งหมดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ซึ่งมีส่วนประกอบของ 7% (v/v) เลือดแกะและ 10% (v/v) fetal bovine serum โดยไม่ใส่ยาปฏิชีวนะควบคู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา kanamycin ความเข้มข้น 20 µg/mL บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วัน ภายใต้สภาวะออกซิเจนเจือจาง โดยเชื้อที่ได้รับยีน *flaA* และ *fliD* ทดแทนจะสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะเท่านั้น

3.4 การทดสอบการมีชีวิตและการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

เพื่อเป็นการทดสอบว่าการทำให้เชื้อคลายพันธุ์ มีผลต่อการมีชีวิตและการเจริญของเชื้อหรือไม่ จึงนำเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการคลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* มาทดสอบด้วยวิธี MTT assay และการนับจำนวนโคโลนี และทำการเปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504

3.4.1 เทคนิค MTT assay

นำโคโลนีของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการคลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง มาเจือจางใน 1x phosphate buffer saline (PBS) โดยใช้ปริมาณเชื้อ 5×10^8 เซลล์ ปิเปตเชื้อใส่ลงใน 96 well-microtiter plate ปริมาตรหลุมละ 90 µL เติมสารละลาย Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide ที่ละลายใน PBS ความเข้มข้น 5 µg/µL ปริมาตร 10 µL ลงในหลุมปฏิบัติการที่มีเชื้อแต่ละหลุม ทำการบ่มปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เติม 20% w/v SDS ปริมาตร 100 µL และบ่มปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปอ่านผลด้วย spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการคลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.4.2 การนับจำนวนโคโลนี

นำโคโลนีของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปรับความเข้มข้นสุดท้ายให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1×10^8 CFU/mL จากนั้นทำการเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่า โดยปิเปตสารละลายเชื้อ 100 μ L ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ปราศจากเชื้อ 900 μ L เจือจางเชื้อจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$ CFU/mL ปิเปตเชื้อความเข้มข้นดังกล่าว 100 μ L ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่ผสม 7% (v/v) เลือดแกะ และใช้ spreader ปราศจากเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำ 2 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยเชื้อเรียบร้อยแล้ว ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนเจือจางเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมานับโคโลนีที่เจริญบนผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ และคำนวณปริมาณโคโลนีเฉลี่ยเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.5 การทดสอบผลกระทบของยีน *flaA* และ *fliD* ต่อลักษณะของแฟลเจลลา และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori*

เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ถูกนำมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยง BHI agar ที่มีส่วนผสมของ 7% (v/v) เลือดแกะในหลอดทดลอง ซึ่งที่มีผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเอียง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนเจือจางเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ปิเปตน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ไม่มีประจุให้ท่วมผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (122)

3.5.1 การศึกษาลักษณะของแฟลเจลลาโดยการย้อมสี Leifson tannic acid-fuchsin staining (123)

ดูดส่วนน้ำใสจากข้อ 3.5 หยดลงบนสไลด์ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยการแช่ใน 95% เอธิลแอลกอฮอล์ที่มีส่วนผสมของ 3% กรดไฮโดรคลอริก เพื่อขจัดคราบไขมัน เป็นเวลา 2 วัน และนำมาผ่านเปลวไฟก่อนใช้งาน รอให้เชื้อที่หยดลงบนสไลด์แห้งสนิท นำไปย้อมด้วยสีที่มีส่วนประกอบของ 0.2% (w/v) basic fuchsin 1% (w/v) tannic acid และ 0.5% (w/v) sodium chloride โดยปิเปตสีย้อม 1 mL ใส่ลงบนผิวหน้าให้ท่วมสไลด์ เป็นเวลา 12 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำสะอาด ซับผิวหน้าสไลด์ให้แห้ง นำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า เปรียบเทียบลักษณะแฟลเจลลาระหว่างแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ทำซ้ำ 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

3.5.2 การศึกษาลักษณะโครงสร้างของแฟลเจลลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ดูดส่วนน้ำใสจากข้อ 3.5 หยดลงบน Transmission electron microscope (TEM) grid ซับของเหลวส่วนเกินออกโดยใช้กระดาษกรองสะอาด หยด 1% (w/v) phosphotungstic acid ลงบน TEM grid ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ซับของเหลวส่วนเกินออกโดยใช้กระดาษกรองสะอาดอีกครั้ง นำตัวอย่างไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น JEM-2100 ที่กำลังขยาย 8,000 – 25,000 เท่า และบันทึกภาพแฟลเจลลาของเชื้อแต่ละสายพันธุ์

3.5.3 การศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ด้วย motility assay

เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC43504 และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ถูกนำมาเจือจางใน BHI broth โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 ที่การดูดกลืนแสงภายใต้ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600nm}) ปิเปตเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่มีความเข้มข้นของ 0.3% (w/v) วุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีส่วนผสมของ Brucella broth และ 10% (v/v) fetal bovine serum บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเจือจางเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตการเคลื่อนที่ของเชื้อโดยดูจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวงกลมรอบจุดที่ปิเปตลงไป วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.6 การเตรียมเซลล์เยื่อปุระเพาะอาหาร AGS

3.6.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์เยื่อปุระเพาะอาหาร AGS ใน T25 tissue culture flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ 10% (v/v) Fecal Bovine Serum และ 1% (v/v) ยาปฏิชีวนะชนิด Penicillium/Streptomycin ปริมาตร 4 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Phase Contrast ที่กำลังขยาย 200 เท่า เมื่อเซลล์มีความหนาแน่น 80-90% ถ้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ตั้งขึ้นตอนต่อไปนี้ เทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกทั้งหมด ล้างเซลล์ด้วย 1x phosphate buffered-saline (PBS) ที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเติม 1% (v/v) Trypsin/EDTA ปริมาตร 1 mL ใน T25 tissue culture flask บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา นำมาเติม RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ 10% (v/v) Fecal Bovine Serum และ 1% (v/v) ยาปฏิชีวนะชนิด Penicillium/Streptomycin ปริมาตร 2 เท่าของ 1% (v/v) Trypsin/EDTA เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ trypsin นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,800 rpm ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลา เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม RPMI 1640 ปริมาตร 10 mL ลงไปในตะกอนเซลล์ที่เหลืออยู่ในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยดูดขึ้นลง ทำการนับจำนวนของเซลล์เพื่อให้มีจำนวนที่เหมาะสมในการนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ตามขั้นตอนต่อไป

3.6.2 การนับเซลล์

เพื่อให้ได้ปริมาณของเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงและการทดลองขั้นตอนต่อไป จึงทำการนับเซลล์โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ ดูดตะกอนเซลล์ภายหลังกระบวนการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ trypsin ที่ละลายอยู่ใน RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ 10% (v/v) Fecal Bovine Serum และ 1% (v/v) ยาปฏิชีวนะชนิด Penicillium/Streptomycin ปริมาตร

20 μ L ละลายใน Trypan blue ปริมาตร 80 μ L ผสมให้เข้ากันดี และตั้งทิ้งไว้ 3 ถึง 5 นาที จากนั้นดูดตะกอนเซลล์ดังกล่าวถ่ายลงใน hemocytometer-counting chamber ปิดแผ่น coverslip ทับ นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยนับเฉพาะเซลล์ที่ไม่ติดสี trypan blue ซึ่งเป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยนับเซลล์ที่อยู่ในช่องกลางและช่องมุมทั้ง 4 ช่องของ hemocytometer-counting chamber คำนวณปริมาณเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สูตรดังที่แสดงต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตใน 1 mL (เซลล์ต่อ mL)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี} \times 10^4 \times df^*}{5}$$

*df หมายถึง dilution factor

คำนวณปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงต่อไป โดยการเพาะเลี้ยงใน T25 tissue culture flask ใช้เซลล์ตั้งต้นจำนวน 5×10^5 เซลล์

3.7 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะเซลล์ AGS ด้วยเทคนิค adhesion assay

3.7.1 การวัดความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะเซลล์ AGS ด้วยวิธีการวัดความเข้มข้นของฟลูออเรสเซนซ์

ดูดตะกอนเซลล์ภายหลังกระบวนการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ trypsin เพาะเลี้ยงลงใน 12-well plate ที่มี RPMI 1640 ปริมาตร 1 mL โดยให้แต่ละหลุมมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 5×10^4 เซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% หลังครบเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นเจือจางเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง ลงใน PBS ปริมาตร 1 mL เติมน้ำ 1% (w/v) สีฟลูออเรสเซนซ์ fluorescein isothiocyanate (FITC) ที่ละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 10 μ L ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้แสงเป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อด้วย PBS ปริมาตร 1 mL นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm

เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใส่ทิ้งและทำซ้ำอีก 1 รอบ ละลายตะกอนเชื้อที่ปั่นล้างเรียบร้อยแล้วด้วย PBS ปริมาตร 1 mL ดูดเชื้อปริมาณ 5×10^6 เซลล์ ใส่ในแต่ละหลุมที่มีเซลล์ AGS ปรับปริมาตรแต่ละหลุมให้ได้เท่ากับ 1 mL ด้วย RPMI 1640 โดยหลุมควบคุมลบเป็นเซลล์ AGS ที่ถูกเติมด้วย RPMI 1640 และปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 mL นำเซลล์ AGS ทุกกลุ่มไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลา ดูด RPMI 1640 ในแต่ละหลุมทิ้ง และล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย PBS ปริมาตร 2 mL ทำซ้ำ 2 รอบ เพื่อล้างเอาแบคทีเรียที่ไม่ได้เกาะกับเซลล์ออก และเติม PBS ปริมาตร 1 mL ลงในแต่ละหลุมก่อนนำไปวัดอัตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ FITC ด้วยเครื่องวัดปฏิกิริยาจากเพลท รุ่น Synergy™ H1 ในการวัดปฏิกิริยาความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยโปรแกรม Area Scanning ซึ่งมีหน่วยวัดเป็น Relative Fluorescent Unit (RFU) และใช้ความยาวคลื่นในการกระตุ้นสัญญาณ (adsorption wavelength) ที่ 487 nm และวัดสัญญาณถูกกระตุ้น (emission wavelength) ที่ความยาวคลื่น 528 nm ทำการทดสอบซ้ำ 4 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย นำค่าความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการทดสอบของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ลบออกด้วยค่าความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากหลุมควบคุมลบ และนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์ AGS เปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 โดยให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีค่าเท่ากับ 100% โดยใช้สูตรการคำนวณดังแสดงด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยของความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ของเชื้อ } H. \text{pylori} \text{ สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504}}$$

3.7.2 การวัดความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะเซลล์ AGS โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์

ดูดตะกอนเซลล์ภายหลังกระบวนการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ trypsin เเพาะเลี้ยงลงใน 12-well plate ที่มี RPMI 1640 ปริมาตร 1 mL และกระຈกปิดสไลด์ชนิดแผ่นกลมปราศจากเชื้อที่กั้นหลุม โดยให้แต่ละหลุมมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 5×10^4 เซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% หลังครบเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นเจือจางเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง ลงใน PBS ปริมาตร 1 mL เติม 1% (w/v) สีฟลูออเรสเซนซ์ fluorescein isothiocyanate (FITC) ที่ละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 10 μ L ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้แสงเป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อด้วย PBS ปริมาตร 1 mL นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้งและทำซ้ำอีก 1 รอบ ละลายตะกอนเชื้อที่ปั่นล้างเรียบร้อยแล้วด้วย PBS ปริมาตร 1 mL ดูดเชื้อปริมาณ 5×10^6 เซลล์ ใส่ในแต่ละหลุมที่มีเซลล์ AGS ปรับปริมาตรแต่ละหลุมให้ได้เท่ากับ 1 mL ด้วย RPMI 1640 โดยหลุมควบคุมลบเป็นเซลล์ AGS ที่ถูกเติมด้วย RPMI 1640 และปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 mL นำเซลล์ AGS ทุกกลุ่มไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อครบเวลา ดูด RPMI 1640 ในแต่ละหลุมทิ้ง และล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย PBS ปริมาตร 2 mL ทำซ้ำ 2 รอบ เพื่อล้างเอาแบคทีเรียที่ไม่ได้เกาะกับเซลล์ออก ใช้ปากคีบปราศจากเชื้อ คีบเอากระຈกปิดสไลด์ที่กั้นหลุมปิดทับลงบนสไลด์แก้วที่หยด Permout ไว้แล้ว 3-4 หยด รอให้ Permout แห้ง นำไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ Olympus BX50 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.7.3 การวัดความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะเซลล์ AGS ด้วยวิธีการนับโคโลนี

ดูดตะกอนเซลล์ภายหลังกระบวนการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ trypsin เเพาะเลี้ยงลงใน 12-well plate ที่มี RPMI 1640 ปริมาตร 1 mL โดยให้แต่ละหลุมมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 5×10^4 เซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% หลังครบเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นเจือจางเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *flid* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง ลงใน PBS ปริมาตร 1 mL ดูดเชื้อปริมาณ 5×10^6 เซลล์ ใส่ในแต่ละหลุมที่มีเซลล์ AGS ปรับปริมาตรแต่ละหลุมให้ได้เท่ากับ 1 mL ด้วย RPMI 1640 โดยหลุมควบคุมลบเป็นเซลล์ AGS ที่ถูกเติมด้วย RPMI 1640 และปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 mL นำเซลล์ AGS ทุกกลุ่มไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลา ดูด RPMI 1640 ในแต่ละหลุมทิ้ง และล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วย PBS ปริมาตร 2 mL ทำซ้ำ 2 รอบ เพื่อล้างเอาแบคทีเรียที่ไม่ได้เกาะกับเซลล์ออก เติมน้ำปราศจากไอออนที่ถูกทำให้ปราศจากเชื้อปริมาตร 1 mL ลงในแต่ละหลุมเพื่อทำลายเซลล์ AGS เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา ดูดเอาสารละลายในแต่ละหลุมออกไปปั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ละลายตะกอนเชื้อด้วย PBS ปริมาตร 1 mL จากนั้นทำการเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่า โดยปิเปตสารละลายเชื้อ 100 μ L ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ปราศจากเชื้อ 900 μ L เจือจางเชื้อจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1 \times 10^2 - 1 \times 10^3$ CFU/mL ปิเปตเชื้อความเข้มข้นดังกล่าว 100 μ L ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่ผสม 7% (v/v) เลือดแกะ และใช้ spreader ปราศจากเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำ 2 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยเชื้อเรียบร้อยแล้ว ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีออกซิเจนเจือจางเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมานับโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และคำนวณปริมาณโคโลนีเฉลี่ยเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย

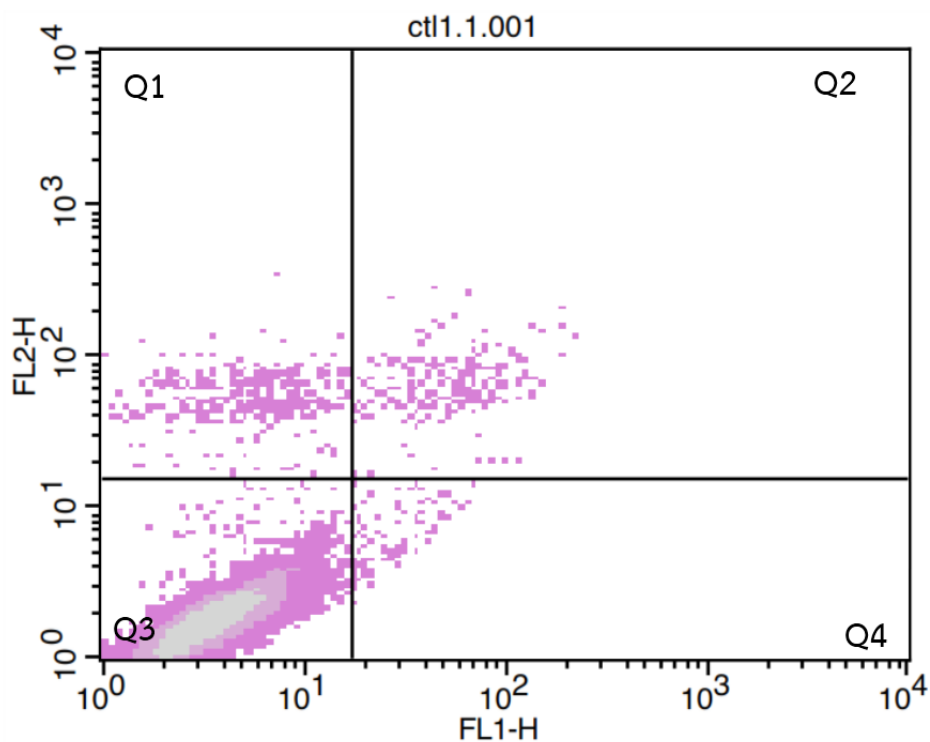
3.8 การศึกษาผลของเชื้อ *H. pylori* แต่ละสายพันธุ์ต่อการตายของเซลล์ AGS

3.8.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ร่วมกับเซลล์ AGS

เพาะเลี้ยงเซลล์ AGS ลงใน 6-well plate ที่มี RPMI 1640 ปริมาตร 2 mL โดยให้แต่ละหลุมมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 5×10^5 เซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% หลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วย 1x PBS เจือจางเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *flhD* ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง ใน 1x PBS เติมเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ปริมาณ 5×10^7 เซลล์ ลงในแต่ละหลุมที่มีเซลล์ AGS โดยมีค่า Multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 100 ปรับปริมาตรแต่ละหลุมให้ได้เท่ากับ 2 mL ด้วย RPMI 1640 โดยหลุมควบคุมบวกเป็นเซลล์ AGS ที่ถูกเติมด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 200 μMol ปริมาตร 100 μL เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการวิเคราะห์ เพื่อทำการกระตุ้นเซลล์ AGS ให้เกิดการตาย (124) และหลุมควบคุมลบเป็นเซลล์ AGS ที่ถูกเติมด้วย RPMI 1640 ปรับปริมาตรหลุมควบคุมบวก และลบแต่ละหลุมให้ได้เท่ากับ 2 mL ด้วย RPMI 1640 นำเซลล์ AGS ทุกกลุ่มไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาที่ผ่านมาก่อนหน้า (125) จากนั้นล้างเซลล์ด้วย 1x PBS สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase Contrast โดยสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ คือมีการหดตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะกลม หรือ ยืดยาวออก ซึ่งแสดงถึงการที่เซลล์เกิดพยาธิสภาพ เลือกใช้ระยะเวลาการบ่มเชื้อร่วมกับเซลล์ AGS ที่สามารถสังเกตเห็นเซลล์ AGS ที่เปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 60% ของปริมาณเซลล์ทั้งหมด มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3.8.2 การวัดปริมาณเซลล์ AGS ที่ตายด้วยการย้อมสี annexin-V และ PI และตรวจสอบด้วย flow cytometry

นำเซลล์ AGS ที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ข้างต้น เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างด้วย 1x PBS 2 ครั้ง เติม 1% (v/v) Trypsin/EDTA ปริมาตร 200 μ L ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เมื่อครบเวลาเติม RPMI1640 ที่มีส่วนผสมของ 10% (v/v) fetal bovine serum ปริมาตร 1 mL ดูดเก็บเซลล์และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง และนำไปปั่นล้างเซลล์ด้วย 1x DPBS ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง และนำตะกอนที่ได้ไปย้อมด้วย Annexin V- fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (Annexin V-FITC/PI) ด้วยชุดทดสอบ ApoAlert (Takara bio, USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1X binding buffer 500 μ L จากนั้นดูดเซลล์ปริมาณ 5×10^5 เซลล์ ปรับปริมาตรด้วย 1X binding buffer ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 μ L เติม Annexin V-FITC ปริมาตร 5 μ L ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยหลีกเลี่ยงการโดนแสง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาเติม Propidium iodide (PI) 5 μ L ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องภายใต้ที่มืด เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำมาปรับปริมาตรด้วย 1X binding buffer ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 mL และนำเซลล์ที่ย้อมเรียบร้อยแล้ว ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACScan flow cytometry (Beckton Dickinson, USA) นับจำนวนเซลล์ที่ตาย ซึ่งอยู่ในจุดภาค (Q) ที่ 1 2 และ 4 ของกราฟแสดงการกระจายตัวของกลุ่มประชากรเซลล์ (Scattergram) (รูปที่ 3) คำนวณจำนวนเซลล์ที่ตายโดยเทียบเป็นสัดส่วนเปอร์เซ็นต์กับประชากรเซลล์ทั้งหมดที่อยู่ในหลุม ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย



รูปที่ 3 การแบ่งจุดภาคของผล Scattergram ที่ได้จาก flow cytometry

- โดยประชากรในจุดภาค Q1 เป็นประชากรเซลล์ที่ไม่ติดสี Annexin V/FITC แต่ติดสี PI แสดงประชากรกลุ่มเซลล์ที่ตายแบบเนโครซิส และอะพอพโทซิสระยะปลาย (late apoptosis)
- ประชากรในจุดภาค Q2 เป็นประชากรเซลล์ที่ติดสี Annexin V/FITC และสี PI แสดงประชากรกลุ่มเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสในระยะปลาย
- ประชากรในจุดภาค Q3 เป็นประชากรเซลล์ที่ไม่ติดสี Annexin V/FITC และสี PI แสดงประชากรกลุ่มเซลล์ที่เป็นเซลล์มีชีวิต
- ประชากรในจุดภาค Q4 เป็นประชากรเซลล์ที่ติดสี Annexin V/FITC แต่ไม่ติดสี PI แสดงประชากรกลุ่มเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น (early apoptosis)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* และสายพันธุ์ที่ได้รับยีน *flaA* และ *fliD* ทดแทน

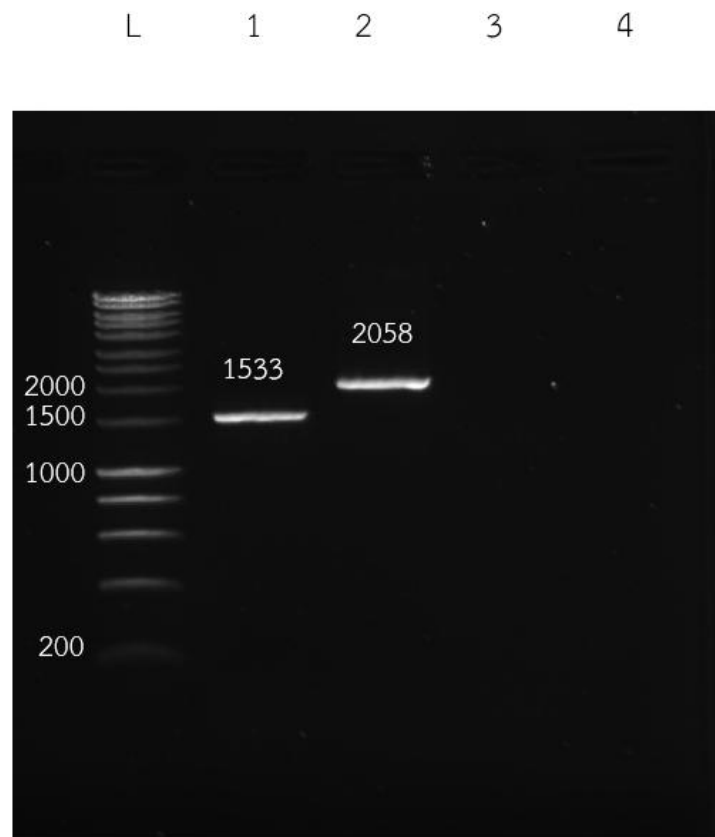
การสร้างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ได้รับยีน *flaA* และ *fliD* ทดแทน โดยมีผลการสร้างเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าว ตามรายละเอียดด้านล่าง

4.1.1 การเพิ่มปริมาณยีน *flaA* และ *fliD* ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณยีน *flaA* และ *fliD* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *flaA* ได้แก่ *flaA* WF และ *flaA* WR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *fliD* ได้แก่ *fliD* WF และ *fliD* WR ทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.3 ตรวจสอบผลผลิต PCR บนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 % โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พบแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของยีน *flaA* มีขนาดเท่ากับ 1,533 คู่เบส และยีน *fliD* มีขนาด 2,058 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4

4.1.2 การโคลนยีน *flaA* และ *fliD* เข้าสู่ pGEM[®]T-Easy vector

ผลผลิต PCR ของยีน *flaA* และ *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ถูกโคลนเข้าสู่ pGEM[®]T-Easy vector ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 3,015 คู่เบส ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.6 ผลผลิตจากปฏิกิริยา ligation ถูกนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5- α competent cells และคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดที่มียีน *flaA* และ *fliD* บรรจุอยู่ด้วยเทคนิค blue/white colony screening assay โดยเลือกโคโลนีมีสีขาวภายหลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่ถูกโคลนด้วยวิธี colony PCR amplification และวิธี restriction enzyme analysis



รูปที่ 4 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *flaA* และ *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบผลผลิตด้วยอิเล็กโตรฟอเรซิสบนเจล อะกาโรสความเข้มข้น 1 % L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1 คือผลผลิต PCR ของยีน *flaA* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 แถวที่ 2 คือ ผลผลิต PCR ของ ยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 แถวที่ 3 คือ ตัวควบคุมลบของปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนยีน *flaA* และ แถวที่ 4 คือตัวควบคุมลบของปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนยีน *fliD*

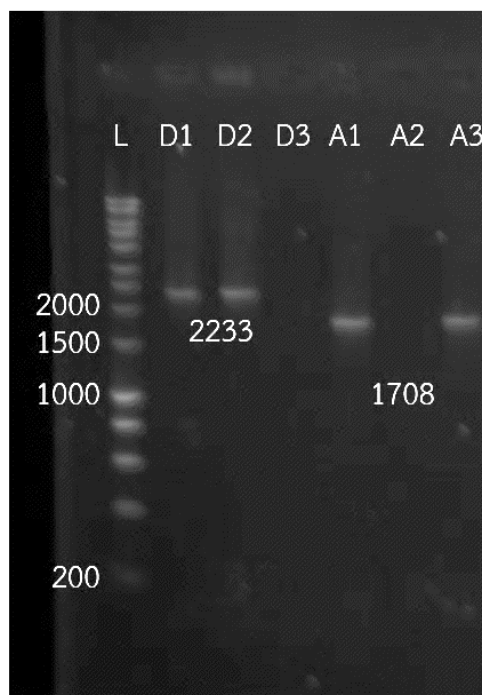
4.1.3 ผลการตรวจสอบยีนที่ถูกโคลนด้วยวิธี colony PCR amplification

โคโลนีสีขาวถูกเลือกมาจำนวน 3 โคโลนีในแต่ละยีน และกำหนดให้โคโลนีสีขาวจากการโคลนยีน *flaA* มีรหัส A1 ถึง A3 และ โคโลนีสีขาวจากการโคลนยีน *fljD* มีรหัส D1 ถึง D3 นำมายืนยันความถูกต้องด้วยวิธี colony PCR amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promoter และทำปฏิกิริยา colony PCR ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.7 ตรวจสอบผลผลิต colony PCR บนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 % โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พลาสมิด D1 และ D2 ที่มียีน *fljD* บรรจุอยู่ พบแถบดีเอ็นเอของผลผลิต colony PCR ของยีน *fljD* ขนาด 2,233 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วย ยีน *fljD* ขนาด 2,058 คู่เบส และลำดับเบสที่เกิดจาก SP6-T7 promoter มีขนาดเท่ากับ 175 คู่เบส และ พลาสมิด A1 และ A3 ที่มียีน *flaA* บรรจุอยู่ พบแถบดีเอ็นเอของผลผลิต colony PCR ของยีน *fljD* ขนาด 1,708 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วย ยีน *flaA* ขนาด 1,533 คู่เบส และลำดับเบสที่เกิดจาก SP6-T7 promoter มีขนาดเท่ากับ 175 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 5

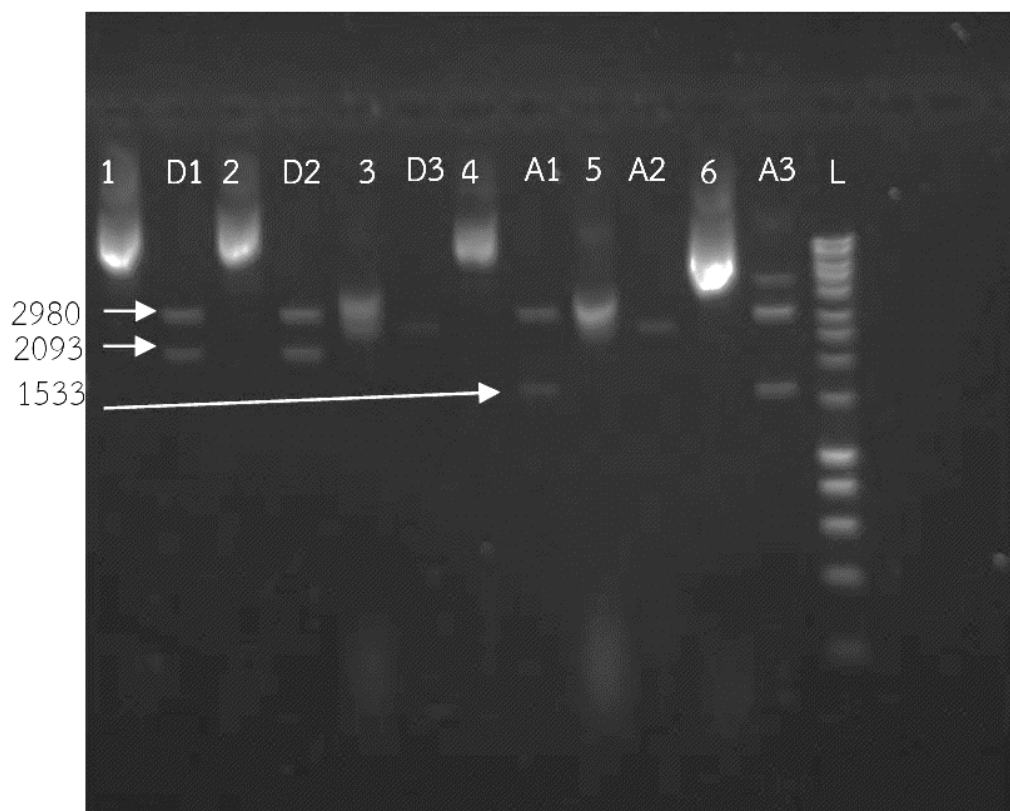
4.1.4 ผลการตรวจสอบยีนที่ถูกโคลนด้วยวิธี restriction enzyme analysis

โคโลนีสีขาวของพลาสมิด D1 D2 A1 และ A3 ที่ได้รับการยืนยันความถูกต้องของการโคลนยีน *fljD* และ *flaA* เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification ถูกนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธี restriction enzyme analysis ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.8 และ 3.3.9 พลาสมิดของยีน *fljD* ที่ได้มีขนาด 5,073 คู่เบส ประกอบไปด้วย ยีน *fljD* ขนาด 2,058 คู่เบสและพลาสมิดมีขนาด 3,015 คู่เบส ตามลำดับ และ พลาสมิดของยีน *flaA* ที่ได้มีขนาด 4,548 คู่เบส ประกอบไปด้วย ยีน *flaA* ขนาด 1,533 คู่เบส และพลาสมิดมีขนาด 3,015 คู่เบส ตามลำดับ ภายหลังจากบ่มพลาสมิดร่วมกับเอนไซม์ *NotI* ตรวจสอบผลผลิต restriction enzyme analysis บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 % โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10 กิโลเบส พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากพลาสมิด D1 และ D2 ได้แก่ แถบของยีน *fljD* มีขนาดเท่ากับ 2,093 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *fljD* ขนาด 2,058 คู่เบส และลำดับเบสบางส่วนของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* ขนาด 35 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดมีขนาด 2,980 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากพลาสมิด A1 และ A3 ได้แก่ แถบของยีน *flaA* มีขนาดเท่ากับ

1,568 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *flaA* ขนาด 1,533 คู่เบส และลำดับเบสบางส่วนของพลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* ขนาด 35 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดมีขนาด 2,980 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5 ผลผลิต colony PCR จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน *flaA* และ *flid* เข้าสู่พลาสมิดด้วยวิธี colony PCR amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ SP6 และ T7 promotor ตรวจสอบผลผลิต colony PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 % L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ D1 ถึง D3 คือผลผลิต colony PCR ของพลาสมิดที่มียีน *flid* และ แถวที่ A1 ถึง A3 คือผลผลิต colony PCR ของพลาสมิดที่มียีน *flaA*



รูปที่ 6 ผลผลิต restriction enzyme analysis จากการตรวจสอบความถูกต้องของการโคลนยีน *fliD* และ *flaA* เข้าสู่ พลาสมิดภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* ตรวจสอบผลผลิต restriction enzyme analysis ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 % L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 กิโลเบส แถวที่ 1 ถึง 6 คือ พลาสมิดที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI* แถวที่ D1 ถึง A3 คือ ผลผลิต restriction enzyme analysis ของพลาสมิดที่มียีน *fliD* และ *flaA* ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *NotI*

4.1.5 การนำพลาสมิดที่มียีน *flaA* และ *fliD* เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค natural transformation

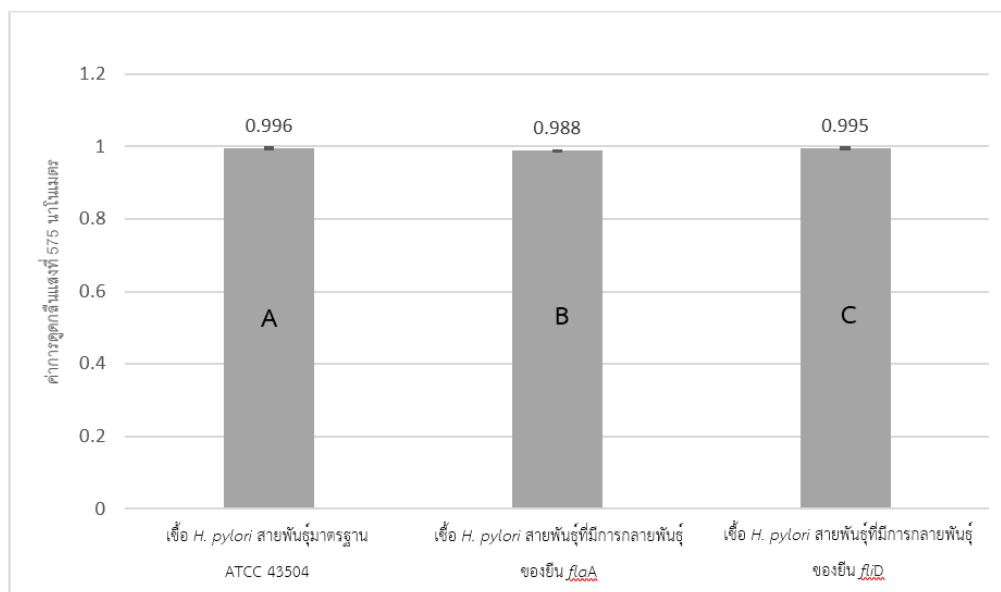
เลือกพลาสมิด D1 และ D2 ที่มียีน *fliD* บรรจุยูนัมนำมาโคลนเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* และเลือกพลาสมิด A1 และ A3 ที่มียีน *flaA* บรรจุยูนัมนำมาโคลนเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.10 ของบทวัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย โดยผลการทำการทดลอง ยีน *fliD* ได้โคลนขึ้นมาบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มากกว่า 300 โคลนี ทำการสุ่มเลือก

โคโลนีจากทั้ง 300 โคโลนีมา 105 โคโลนี ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบคุณสมบัติความไวต่อยา kanamycin เมื่อสูญเสีย kanamycin resistant cassette จากการเกิด allelic exchange พบว่าเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 105 โคโลนี สามารถขึ้นได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของยา kanamycin และ ยีน *flaA* ให้โคโลนีขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 24 โคโลนี นำทั้ง 24 โคโลนีมาทดสอบคุณสมบัติความไวต่อยา kanamycin เมื่อสูญเสีย kanamycin resistant cassette จากการเกิด allelic exchange พบว่าเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 24 โคโลนี สามารถขึ้นได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ ส่งผลให้การทำ natural transformation ยังไม่ประสบความสำเร็จในงานวิจัยนี้

4.2 ผลการทดสอบการมีชีวิตและการเจริญของเชื้อ *H. pylori*

4.2.1 ผลทดสอบการมีชีวิตด้วยเทคนิค MTT assay

จากการทดสอบการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค MTT วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับปริมาณของเชื้อ *H. pylori* ที่ยังมีชีวิต พบว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สามารถให้ค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 0.985 – 1.012 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.996) เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 0.982 – 0.999 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.988) เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 0.981 – 1.017 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.995) เมื่อนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่า เชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์มีอัตราการมีชีวิตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.354) ดังแสดงในรูปที่ 7



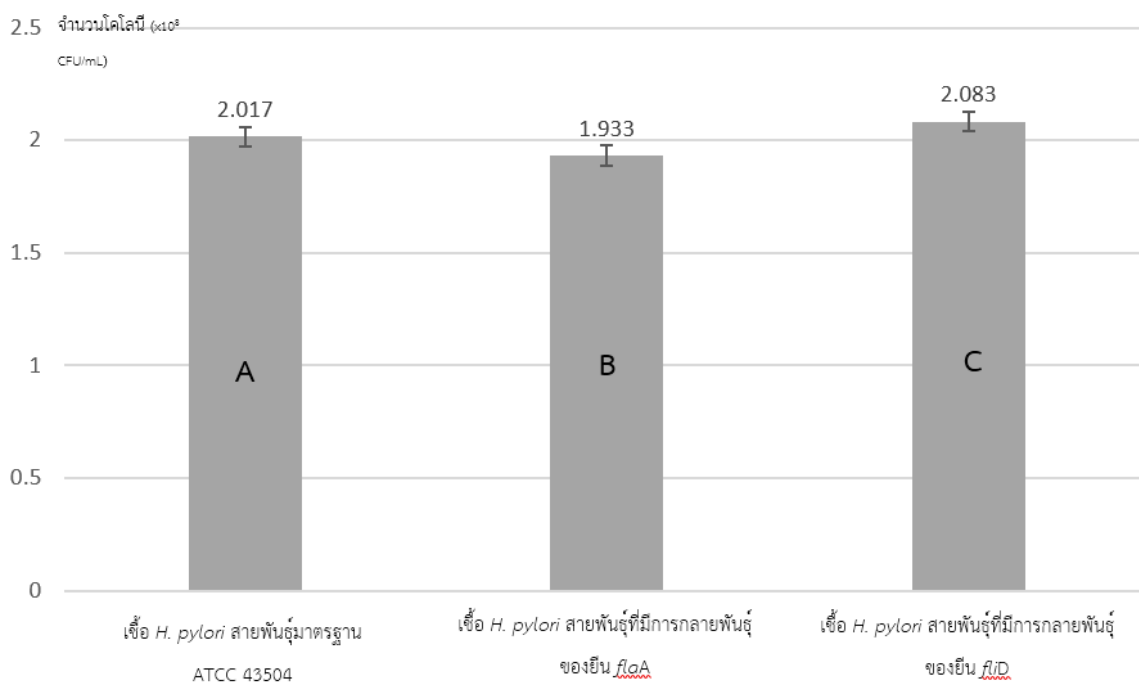
รูปที่ 7 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตรที่วัดได้จากปฏิกิริยา MTT ของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ กราฟแห่ง (A) (B) และ (C) แสดงค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากปฏิกิริยา MTT ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่วัดได้แปรผันตรงกับปริมาณเชื้อที่มีชีวิต การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย (p -value = 0.354)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 ผลการทดสอบการเจริญด้วยการนับจำนวนโคโลนี

ผลการทดสอบเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการนับจำนวนโคโลนีภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไป 72 ชั่วโมง ซึ่งค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้แปรผันตรงกับความสามารถในการเจริญของเชื้อ *H. pylori* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สามารถนับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยได้เท่ากับ 2.017×10^8 CFU/mL เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* สามารถนับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยได้เท่ากับ 1.933×10^8 CFU/mL และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* สามารถนับจำนวนโคโลนีเฉลี่ยได้เท่ากับ 2.083×10^8 CFU/mL นำค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่ได้จากการทดสอบทั้งหมด 3 สายพันธุ์ มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่า

เชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งได้ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.696) ดังแสดงในรูปที่ 8

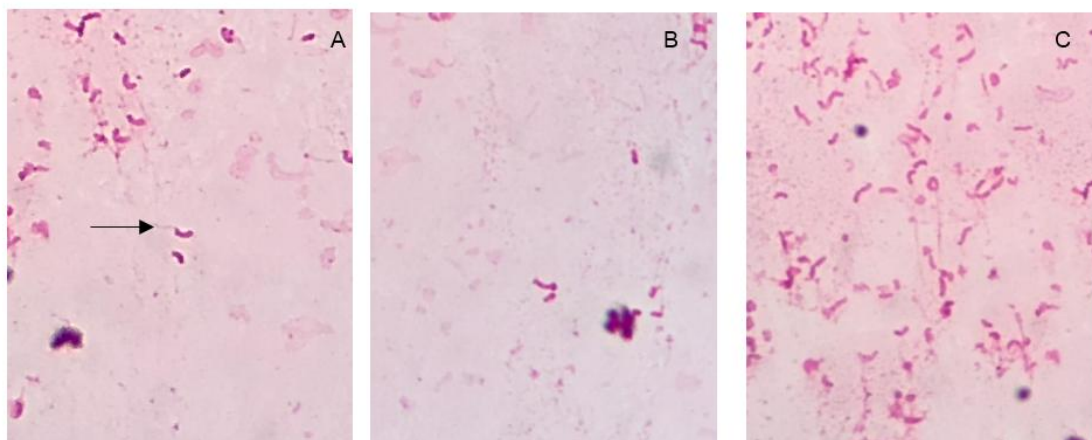


รูปที่ 8 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่ได้จากการทดสอบการเจริญด้วยวิธีการนับโคโลนีของ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ กราฟแท่ง (A) (B) และ (C) แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อที่ได้จากการทดสอบการเจริญด้วยวิธีการนับโคโลนี ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้แปรผันตรงกับความสามารถในการเจริญของเชื้อ *H. pylori* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย (p-value = 0.696)

4.3 ผลกระทบของยีน *flaA* และ *fljD* ต่อลักษณะของแฟลเจลลา และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori*

4.3.1 ลักษณะของแฟลเจลลาเมื่อย้อมสีด้วย Leifson tannic acid-fuchsin staining

เมื่อนำเชื้อ *H. pylori* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีผิวหน้าเอียง มาทำการย้อมแฟลเจลลาด้วยวิธี Leifson tannic acid-fuchsin staining พบว่า เซลล์ของ *H. pylori* และแฟลเจลลาติดสีชมพูแดงของสี basic fuchsin รูปที่ 9 แสดงเซลล์และแฟลเจลลาของเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สามารถสังเกตเห็นสายแฟลเจลลายื่นออกจากส่วนท้ายของเซลล์เป็นจำนวน 20 % ของเชื้อทั้งหมด ในขณะที่เชื้อ *H. pylori* ทั้งสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ ยีน *fljD* ไม่สามารถสังเกตเห็นลักษณะเส้นแฟลเจลลาที่ยื่นออกจากส่วนของเซลล์เชื้อ



รูปที่ 9 ลักษณะแฟลเจลลาของ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อย้อมด้วยวิธี Leifson tannic acid-fuchsin staining และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (A) *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สามารถสังเกตเห็นแฟลเจลลาที่ยื่นออกมาจากเซลล์ของแบคทีเรีย บริเวณลูกศรชี้ (B) *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ (C) *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ไม่พบแฟลเจลลาที่ยื่นออกมาจากจากเซลล์แบคทีเรีย

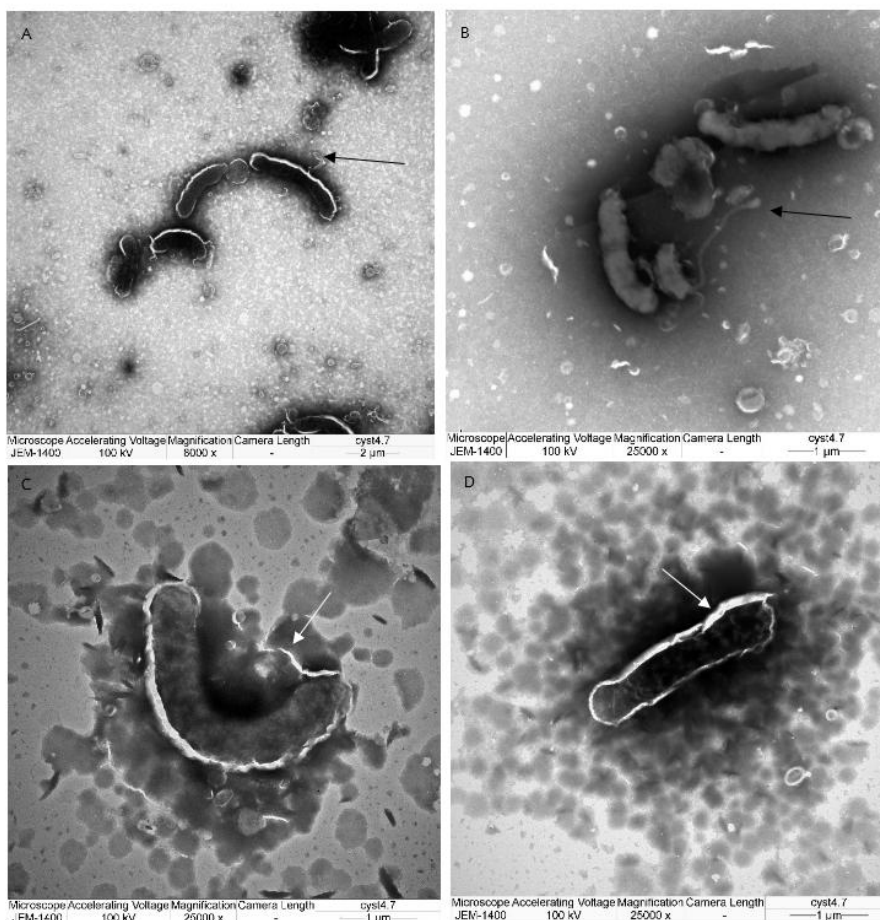
4.3.2 โครงสร้างของแฟลเจลลาเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เมื่อนำตัวอย่างของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์มาย้อมแบบ Negative stain ด้วย 1% (w/v) phosphotungstic acid และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน สามารถสังเกตเห็นลักษณะโมเลกุลสี่ที่จับตัวรอบเชื้อ หรือแฟลเจลลา โดยบริเวณที่โมเลกุลสี่มีความเข้มข้นสูงจะสังเกตเห็นเป็นสีเข้ม และบริเวณที่มีความเข้มของสีเข้าไปจับน้อย จะสังเกตเห็นเป็นสีขาว ดังที่แสดงในรูปที่ 10 เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 สามารถสังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียที่มีแฟลเจลลายื่นออกมาจากส่วนท้ายของเซลล์ ส่วนปลายของแฟลเจลลามีลักษณะพองออกเป็น terminal bulb และแฟลเจลลามีขนาดยาวเมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์เชื้อ ในขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *flaD* สามารถสังเกตเห็นเซลล์แบคทีเรียที่มีแฟลเจลลายื่นออกมาจากส่วนท้ายของเซลล์ มีขนาดสั้นเมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์ โดยทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่พบลักษณะของ terminal bulbs เช่นเดียวกับที่พบใน *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504

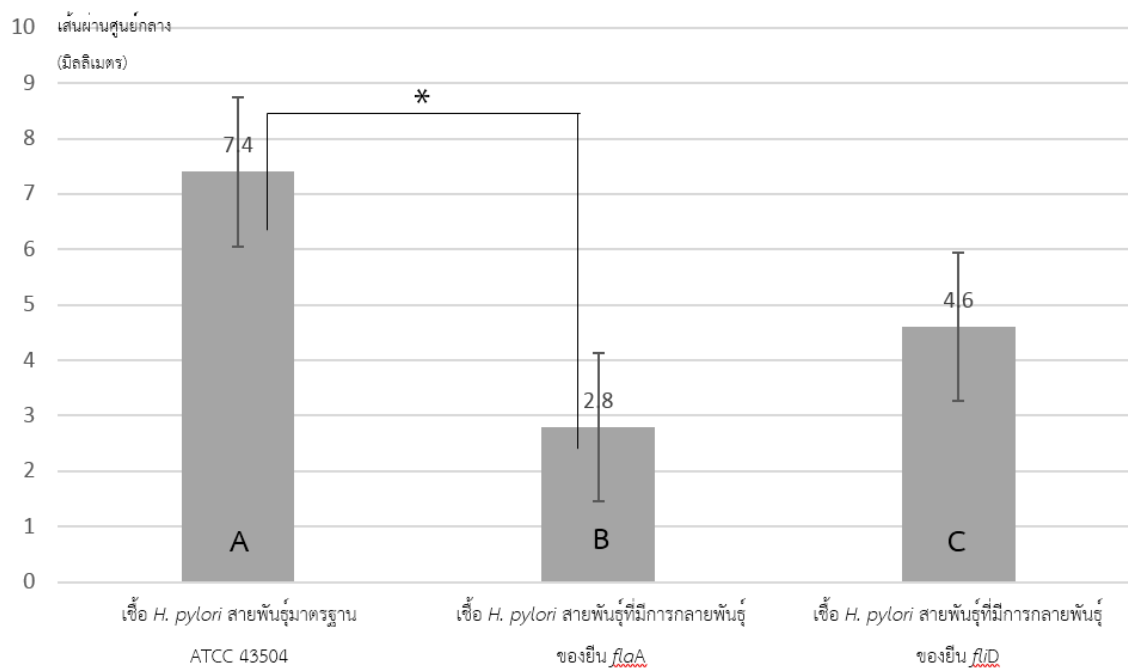
4.4 ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ด้วย motility assay

เมื่อทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนที่เชื้อเคลื่อนที่ออกจากจุดกึ่งกลางที่ทำการเพาะเชื้อ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางแปรผันตรงกับความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สามารถเคลื่อนที่ออกจากจุดกึ่งกลางที่ทำการเพาะเชื้อ เป็นระยะทางของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5 – 9 มิลลิเมตร (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.4 มิลลิเมตร) เชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* สามารถเคลื่อนที่ออกจากจุดกึ่งกลางที่ทำการเพาะเชื้อ เป็นระยะทางของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2 – 4 มิลลิเมตร (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.8 มิลลิเมตร) และเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* สามารถเคลื่อนที่ออกจากจุดกึ่งกลางที่ทำการเพาะเชื้อ เป็นระยะทางของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2 – 9 มิลลิเมตร (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร) เมื่อนำค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่ มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่ามีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* อย่างน้อย 2 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.017) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อทำการทดสอบต่อเนื่องด้วยวิธี

จับคู่แบบพหุคูณด้วยสถิติ Scheffe พบว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เคลื่อนที่ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0002) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่ระหว่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์อื่น ๆ (รูปที่ 11)



รูปที่ 10 ลักษณะแฟลเจลลาของ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ภายใต้กำลังขยาย 8,000-25,000 เท่า (A) และ (B) ภาพกำลังขยายที่ 8,000 และ 25,000 เท่า ตามลำดับ ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สามารถสังเกตเห็นลักษณะของเส้นแฟลเจลลาที่มีขนาดยาว และมี terminal bulbs อยู่ส่วนท้ายของแฟลเจลลา (ลูกศรชี้) (C) และ (D) ภาพกำลังขยายที่ 25,000 แสดงลักษณะของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fljD* ตามลำดับ โดยพบลักษณะแฟลเจลลาที่มีขนาดสั้นและไม่มี terminal bulbs (ลูกศรชี้)



รูปที่ 11 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่ จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว กราฟแท่ง (A) (B) และ (C) แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่แปรผันตรงกับความสามารถในการเคลื่อนที่ การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย *หมายถึงเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เคลื่อนที่ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0002)

4.5 ความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะเซลล์ AGS

4.5.1 การวัดความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะเซลล์ AGS ด้วยวิธีการวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์

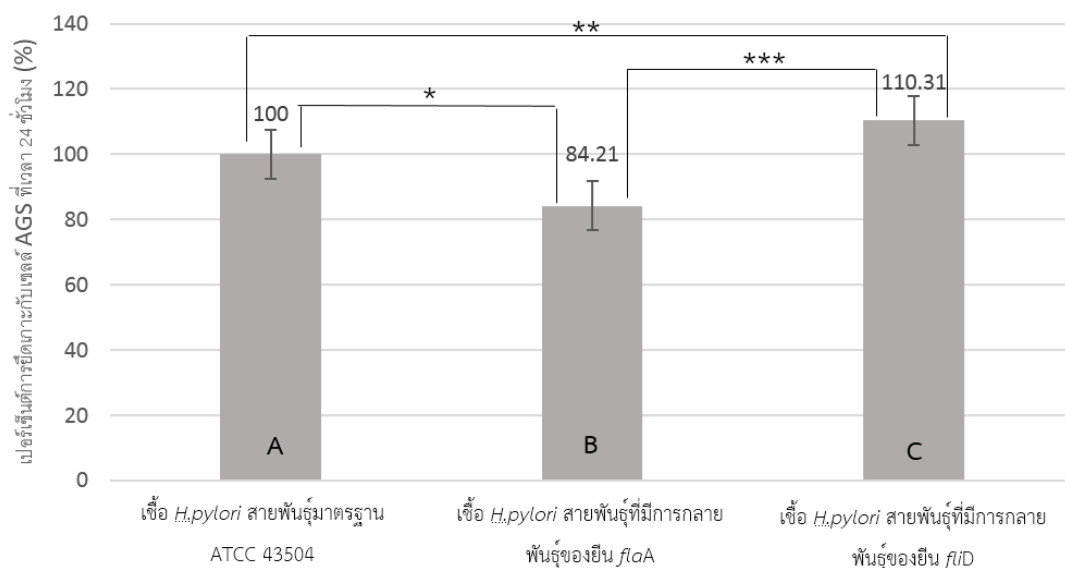
ภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* แต่ละสายพันธุ์ร่วมกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำไปวัดปริมาณแบคทีเรียที่ยึดเกาะเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธีการวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยโปรแกรม Area Scanning ซึ่งมีหน่วยวัดเป็น RFU ค่าเฉลี่ยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์แปรผันตรงกับความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* ผลการทดสอบเป็นดังนี้ ค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ของหลุมควบคุมซึ่งมีเฉพาะเซลล์ AGS มีค่าเท่ากับ 360.5 RFU เมื่อนำไปลบกับค่าเฉลี่ยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของหลุมทดสอบที่มีเชื้อแต่ละสายพันธุ์ พบว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 4,775.50 RFU เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 4,014.75 RFU และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* มีค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 5,264.625 RFU เมื่อนำค่าเฉลี่ยของความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการทดสอบของเชื้อทั้งหมด 3 สายพันธุ์ มาคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์ AGS เปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ผลการคำนวณเป็นดังนี้ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เฉลี่ย เท่ากับ 84.21 % เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เฉลี่ยเท่ากับ 110.32 % เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่ามีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของ *H. pylori* อย่างน้อย 2 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0001) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อทำการทดสอบต่อเนื่องด้วยวิธีจับคู่แบบพหุคูณด้วยสถิติ Scheffe พบว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0001) เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid*

ยัดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มาตรฐาน ATCC 43504 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยัดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0001) และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ยัดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยัดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0001) (รูปที่ 12)

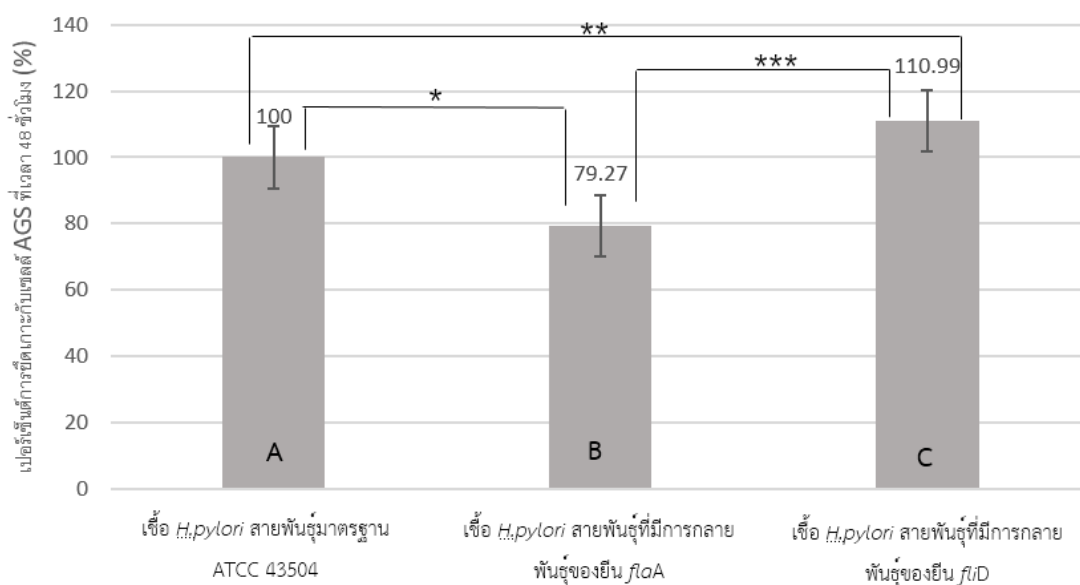
ภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* แต่ละสายพันธุ์ร่วมกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำไปวัดปริมาณแบคทีเรียที่ยัดเกาะเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธีการวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ ด้วยโปรแกรม Area Scanning ซึ่งมีหน่วยวัดเป็น RFU ค่าเฉลี่ยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์แปรผันตรงกับความสามารถในการยัดเกาะเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* ผลการทดสอบเป็นดังนี้ ค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ของหลุมควบคุมซึ่งมีเฉพาะเซลล์ AGS มีค่าเท่ากับ 345.25 RFU เมื่อนำไปลบกับค่าเฉลี่ยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของหลุมทดสอบที่มีเชื้อแต่ละสายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 5,678.63 RFU เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 4,500.38 RFU และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* มีค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 6,298.38 RFU เมื่อนำค่าเฉลี่ยของความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการทดสอบของเชื้อทั้งหมด 3 สายพันธุ์ มาคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์การยัดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์ AGS เปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ผลการคำนวณเป็นดังนี้ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีเปอร์เซ็นต์การยัดเกาะกับเซลล์ AGS เฉลี่ยเท่ากับ 79.27 % ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* มีเปอร์เซ็นต์การยัดเกาะกับเซลล์ AGS เฉลี่ยเท่ากับ 110.99 % ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 นำเปอร์เซ็นต์การยัดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่ามีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยัดเกาะกับเซลล์ AGS ของ *H. pylori* อย่างน้อย 2 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0001)

ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อทำการทดสอบต่อเนื่องด้วยวิธีจับคู่แบบพหุคูณด้วยสถิติ Scheffe พบว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0001) เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0001) และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0001) (รูปที่ 13)





รูปที่ 12 แผนภูมิเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยึดเกาะเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี Adhesion assay โดยการวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ กราฟแท่ง (A) (B) และ (C) แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ได้จากการทดสอบของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fltD* ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS แปรผันตรงกับความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 4 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย *หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) **หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fltD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) และ) *** หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fltD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001)



รูปที่ 13 แผนภูมิเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยึดเกาะเซลล์ AGS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Adhesion assay โดยการวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ กราฟแท่ง (A) (B) และ (C) แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ได้จากการทดสอบของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS แปรผันตรงกับความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 4 ครั้ง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย * หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) ** หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) และ) *** หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001)

4.5.2 การวัดความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะเซลล์ AGS โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์

ภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* แต่ละสายพันธุ์ร่วมกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อนำไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ได้ในช่วงเวลาเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยสามารถมองเห็นเซลล์ของ *H. pylori* เปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ FITC เกาะอยู่รอบนอกของเซลล์ AGS ที่ไม่เปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ และพบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* สามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS น้อยกว่า *H. pylori* สายพันธุ์อื่น ๆ โดยพบปริมาณเชื้อ *H. pylori* ที่เปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เกาะอยู่บนเซลล์ AGS ได้น้อยกว่า *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และ สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ซึ่งสามารถพบลักษณะดังกล่าวทั้งในการเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 14 และ 15 ตามลำดับ

4.5.3 การวัดความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะเซลล์ AGS ด้วยวิธีการนับโคโลนี

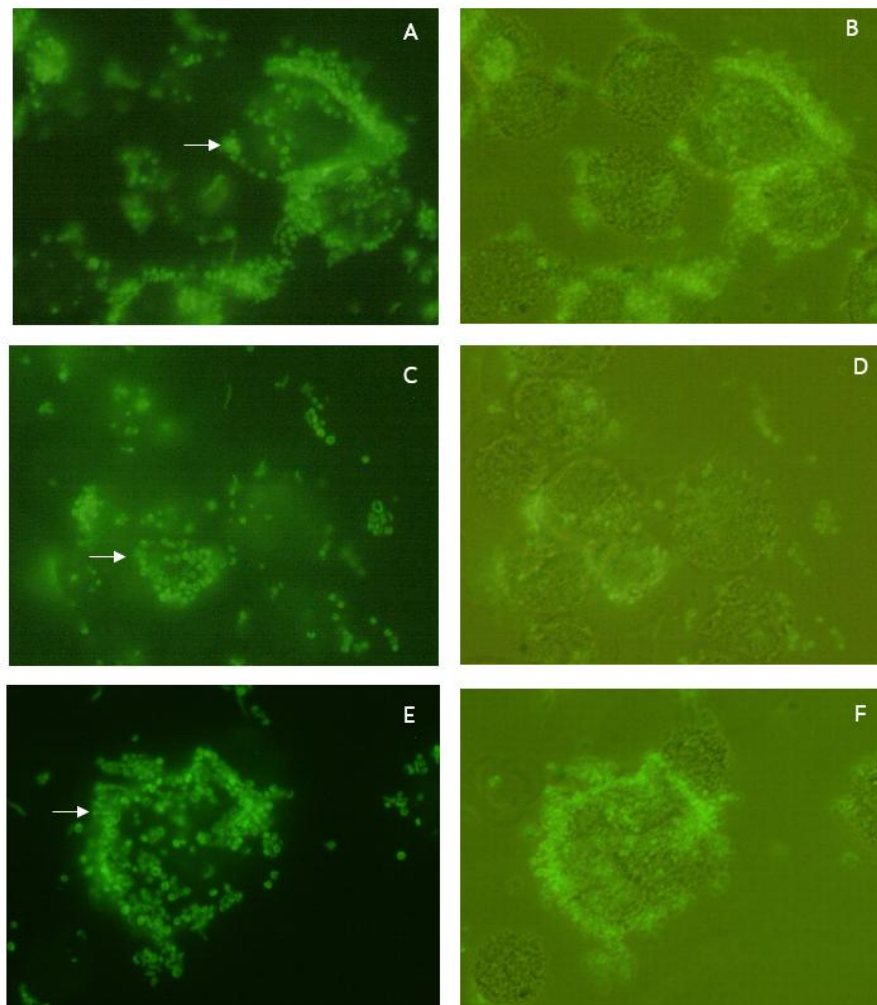
ภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* แต่ละสายพันธุ์ร่วมกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำไปวัดปริมาณแบคทีเรียที่ยึดเกาะเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธีการนับโคโลนี ผลการทดสอบเป็นดังนี้ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่เกาะกับเซลล์ AGS 5.90×10^5 CFU/mL เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่เกาะกับเซลล์ AGS 4.45×10^5 CFU/mL และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* มีค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่เกาะกับเซลล์ AGS 6.60×10^5 CFU/mL RFU เมื่อนำค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่ได้จากการทดสอบของเชื้อทั้งหมด 3 สายพันธุ์ มาคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์ AGS เปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ผลการคำนวณเป็นดังนี้ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เฉลี่ย 75.74 % เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เฉลี่ย 112.09 %

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่ามีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของ *H. pylori* อย่างน้อย 2 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 0.001$) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อทำการทดสอบต่อเนื่องด้วยวิธีจับคู่แบบพหุคูณด้วยสถิติ Scheffe พบว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 0.017$) และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 0.001$) (รูปที่ 16)

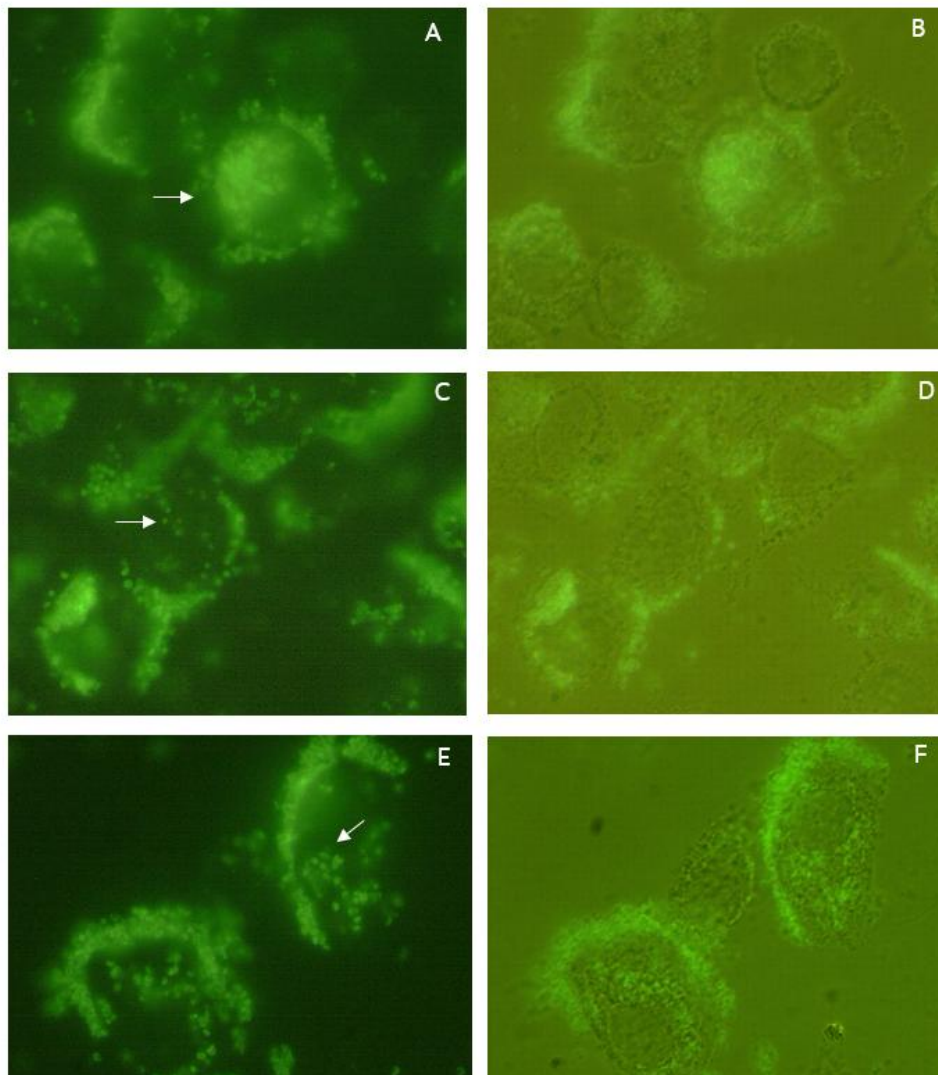
ภายหลังเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* แต่ละสายพันธุ์ร่วมกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำไปวัดปริมาณแบคทีเรียที่ยึดเกาะเซลล์ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธีการนับโคโลนี ผลการทดสอบเป็นดังนี้ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่เกาะกับเซลล์ AGS 6.20×10^5 CFU/mL เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่เกาะกับเซลล์ AGS 4.70×10^5 CFU/mL และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่เกาะกับเซลล์ AGS 6.85×10^5 CFU/mL RFU เมื่อนำค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่ได้จากการทดสอบของเชื้อทั้งหมด 3 สายพันธุ์ มาคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ต่อเซลล์ AGS เปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ผลการคำนวณเป็นดังนี้ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เฉลี่ย 76.45 % เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เฉลี่ย 110.75 % นำเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่ามีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของ *H. pylori* อย่างน้อย 2 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} = 0.001$) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อทำการทดสอบต่อเนื่องด้วยวิธีจับคู่แบบ

พหุคูณด้วยสถิติ Scheffe พบว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.004) และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.0001) (รูปที่ 17)



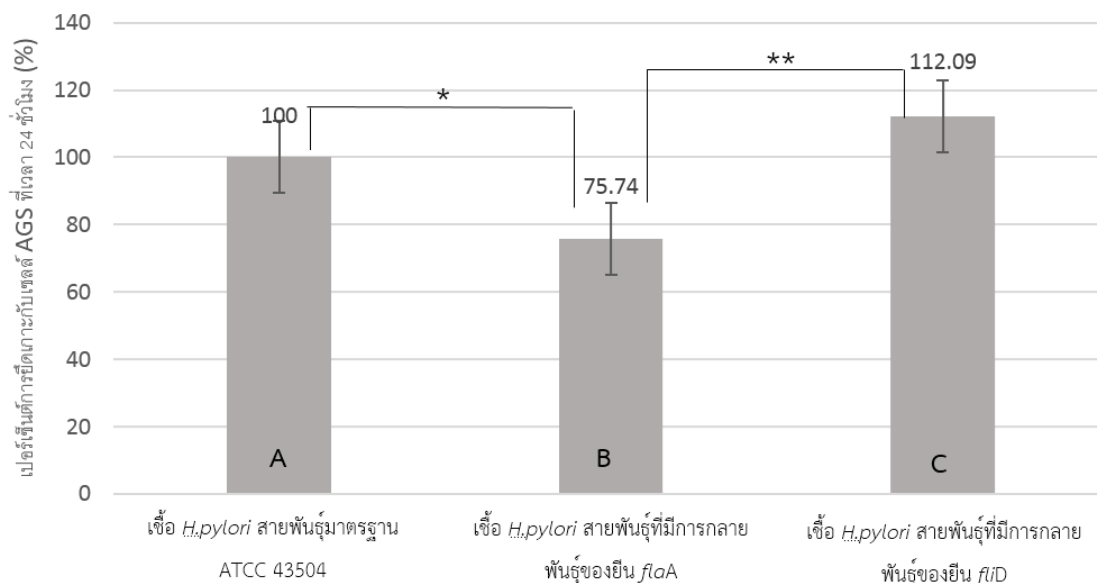


รูปที่ 14 ลักษณะของเชื้อ *H. pylori* ที่ยึดเกาะบนเซลล์ AGS ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อถ่ายภาพด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ภาพ (A) และ (B) แสดงการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ภาพ (C) และ (D) แสดงแสดงการยึดเกาะกับเซลล์ AGS เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และภาพ (E) และ (F) แสดงการยึดเกาะกับเซลล์ AGS เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* โดยภาพ (A) (C) และ (E) แสดงภาพที่ถูกถ่ายเมื่อมีเฉพาะสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งจากเชื้อ *H. pylori* ที่ถูกย้อมด้วย FITC (ลูคifer) และภาพ (B) (D) และ (F) แสดงภาพที่ถูกถ่ายเมื่อมีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ร่วมกับภาพจากการใช้แสงปกติ ซึ่งเห็นลักษณะขอบเขตของเซลล์ AGS ร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ที่ยึดเกาะบนเซลล์

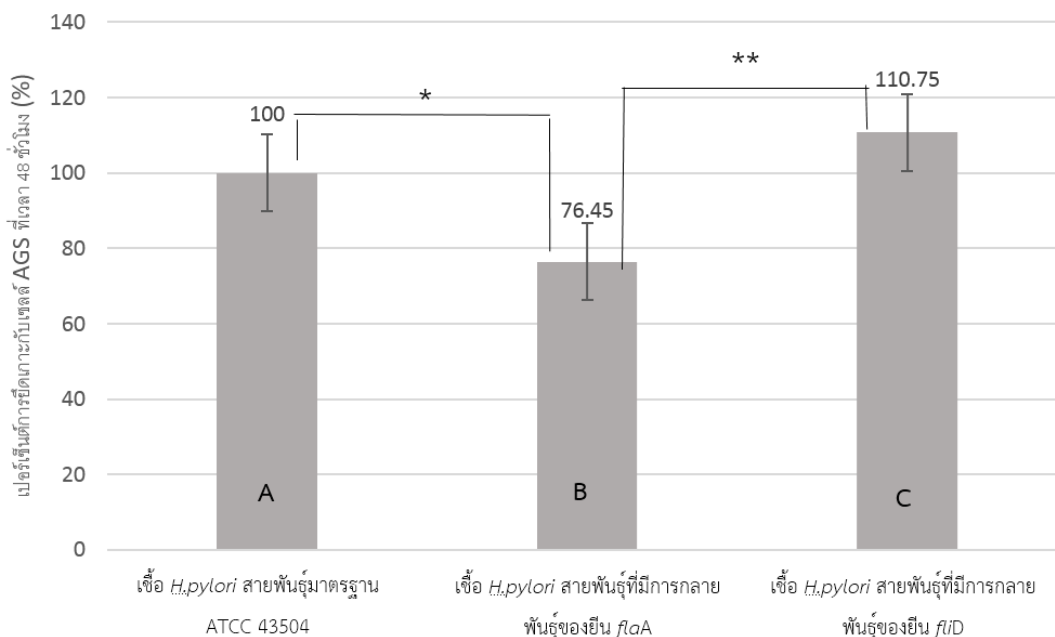


CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 15 ลักษณะของเชื้อ *H. pylori* ที่ยึดเกาะบนเซลล์ AGS ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อถ่ายภาพด้วย กล้องฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ภาพ (A) และ (B) แสดงการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ภาพ (C) และ (D) แสดงแสดงการยึดเกาะกับ เซลล์ AGS เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ ภาพ (E) และ (F) แสดงแสดง การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* โดยภาพ (A) (C) และ (E) แสดงภาพที่ถูกถ่ายเมื่อมีเฉพาะสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งจากเชื้อ *H. pylori* ที่ถูกย้อม ด้วย FITC (ลูกศรชี้) และภาพ (B) (D) และ (F) แสดงภาพที่ถูกถ่ายเมื่อมีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ร่วมกับภาพจากการใช้แสงปกติ ซึ่งเห็นลักษณะขอบเขตของเซลล์ AGS ร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ที่ยึด เกาะบนเซลล์



รูปที่ 16 แผนภูมิเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยึดเกาะเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี Adhesion assay โดยการนับโคโลนี กราฟแท่ง (A) (B) และ (C) แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ได้จากการทดสอบของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS แปรผันตรงกับความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 2 ครั้ง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย * หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.017) ** หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.001)



รูปที่ 17 แผนภูมิเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในการยึดเกาะเซลล์ AGS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Adhesion assay โดยการนับโคโลนี กราฟแท่ง (A) (B) และ (C) แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ได้จากการทดสอบของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะกับเซลล์ AGS แปรผันตรงกับความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ AGS ของเชื้อ *H. pylori* การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 2 ครั้ง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย * หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.004) ** หมายถึง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ยึดเกาะเซลล์ AGS ได้มากกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001)

4.6 การศึกษาผลของเชื้อ *H. pylori* แต่ละสายพันธุ์ต่อการตายของเซลล์ AGS

4.6.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ร่วมกับเซลล์ AGS ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ร่วมกับเซลล์ AGS ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ AGS เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ที่สังเกตเห็นได้จากรูปร่างปกติที่เซลล์มีลักษณะคล้ายกระสวย และแผ่เกาะอยู่บนพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมที่ 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จำนวนมากมีการยืดออกยาวขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่บางส่วนของเซลล์มีลักษณะกลม เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามากกว่า 70% ของเซลล์ทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และพบเซลล์ที่หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง (รูปที่ 18)

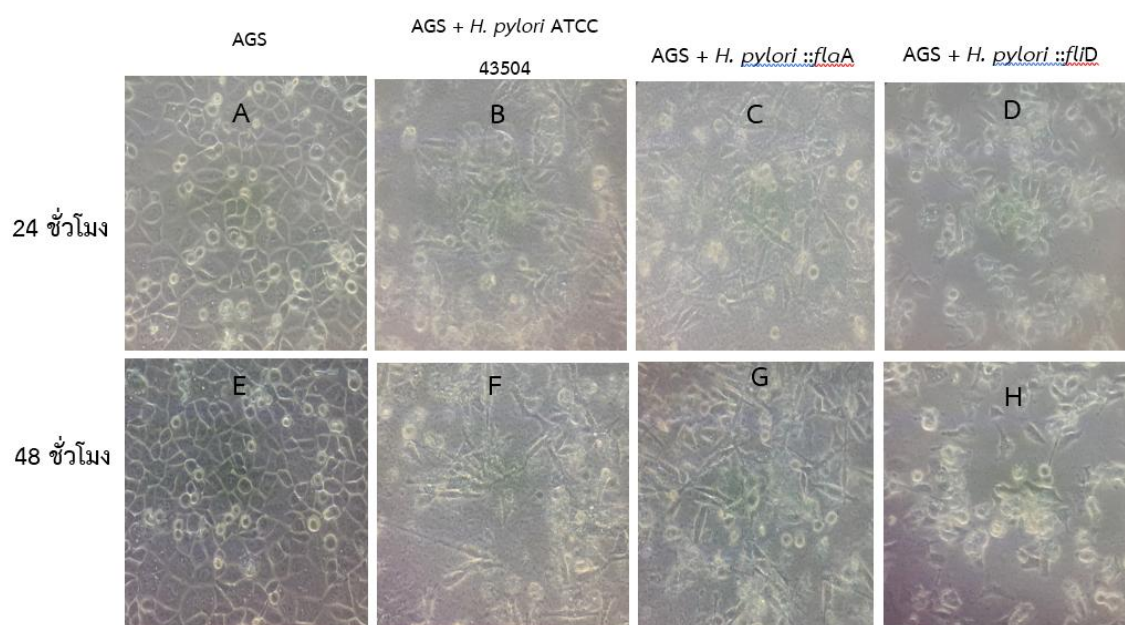
4.6.2 การวัดปริมาณเซลล์ AGS ที่ตายด้วยการย้อมสี annexin-V / FITC และ PI และตรวจสอบด้วย flow cytometry

เมื่อนำเซลล์ AGS ที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาทดสอบการตายของเซลล์ด้วยการย้อมด้วยสี Annexin V/FITC และ PI และตรวจวัดสัญญาณด้วย Flow cytometry ได้กราฟแสดงการกระจายตัวของกลุ่มประชากรเซลล์ (Scattergram) ดังนี้

- กลุ่มเซลล์ AGS ที่ติดสีของ PI แต่ไม่ติดสีของ Annexin V หมายถึง เซลล์ที่มีการตายแบบเนโครซิส และอะพอพโทซิสระยะปลาย(Late apoptosis) มีการกระจายตัวอยู่ในจุดภาคที่ 1 (Q1 ด้านซ้าย บน ของกราฟ)
- กลุ่มเซลล์ AGS ที่ติดสีของ Annexin V และ PI หมายถึง เซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะปลาย มีการกระจายตัวอยู่ในจุดภาคที่ 2 (Q2 ด้านขวา บน ของกราฟ)
- กลุ่มเซลล์ AGS ที่ไม่ติดสีของ Annexin V และ PI หมายถึง เซลล์ AGS ที่เป็นเซลล์มีชีวิต มีการกระจายตัวอยู่ในจุดภาคที่ 3 (Q3 ด้านซ้าย ล่าง ของกราฟ)

- กลุ่มเซลล์ AGS ที่ติดสีของ Annexin V แต่ไม่ติดสี PI หมายถึง เซลล์ AGS ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิสในระยะเริ่มต้น (Early apoptosis) มีการกระจายตัวอยู่ในจตุภาคที่ 4 (Q4 ด้านขวา ล่าง ของกราฟ)

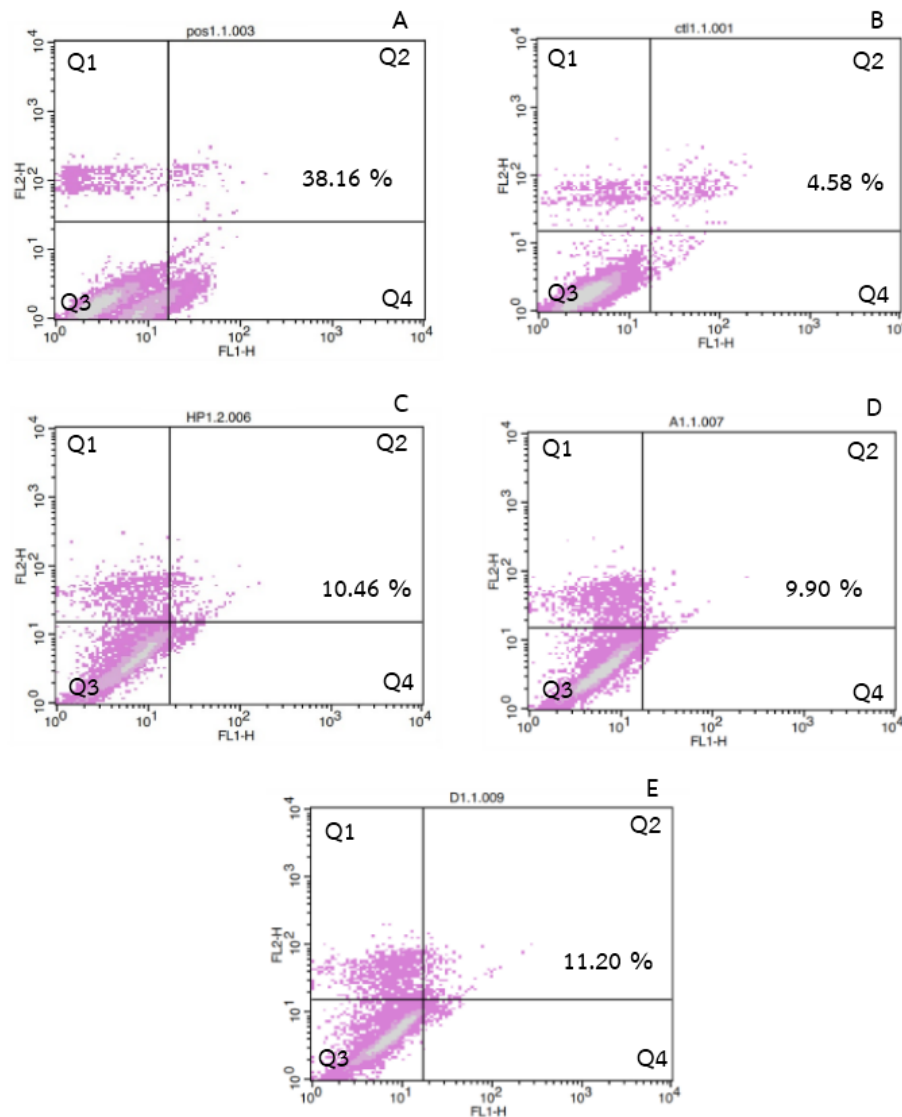
ดังนั้นเซลล์ที่แสดงลักษณะการตายของเซลล์ ที่ถูกนำมาคำนวณในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ เซลล์ที่ ติดสีของ PI อย่างเดียว (จตุภาคที่ 1) เซลล์ที่ติดสีของ Annexin V ร่วมกับติดสี PI (จตุภาคที่ 2) และเซลล์ที่ติดสีของ Annexin V อย่างเดียว (จตุภาคที่ 4)



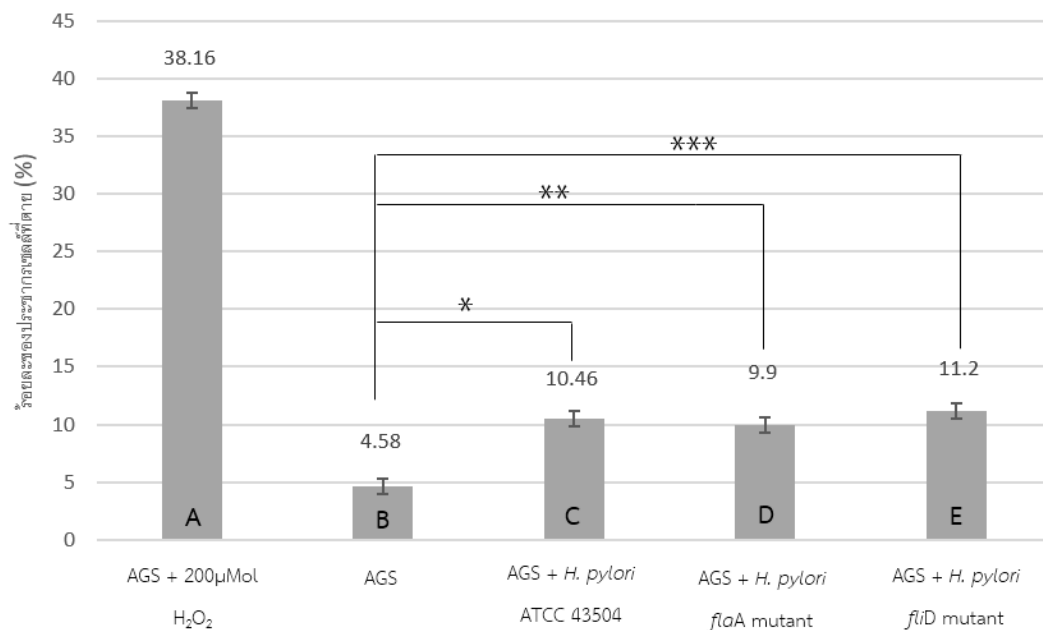
รูปที่ 18 ลักษณะของเซลล์ AGS ภายหลังจากเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase Contrast ที่กำลังขยาย 400 เท่า ภาพ (A) และ (E) แสดงลักษณะของเซลล์ AGS ที่ไม่ได้ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ภาพ (B) และ (F) แสดงลักษณะของเซลล์ AGS ที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ภาพ (C) และ (G) แสดงลักษณะของเซลล์ AGS ที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ภาพ (D) และ (H) แสดงลักษณะของเซลล์ AGS ที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flID* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เซลล์ AGS ที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เริ่มพบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยพบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนมากขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง และเริ่มพบการหลุดของเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลุมควบคุมบวกที่มีเซลล์ AGS และ H₂O₂ ความเข้มข้น 200 µMol มีจำนวนเซลล์ที่ตายเท่ากับ 38.16 % ของประชากรเซลล์ หลุมควบคุมลบที่มีเพียงเซลล์ AGS มีจำนวนเซลล์ที่ตายเท่ากับ 4.58 % ของประชากรเซลล์ หลุมทดสอบที่มีเซลล์ AGS เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 430504 มีจำนวนเซลล์ที่ตายเท่ากับ 10.46 % ของประชากรเซลล์ เซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีจำนวนเซลล์ที่ตายเท่ากับ 9.90 % ของประชากรเซลล์ เซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีจำนวนเซลล์ที่เกิดอะพอพโทซิสเท่ากับ 11.20 % ของประชากรเซลล์ (รูปที่ 19)

เมื่อนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายที่ได้จากการทดสอบของเชื้อทั้งหมด 3 สายพันธุ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่ามีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ตายของเซลล์ AGS อย่างน้อย 2 กลุ่มที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value=0.0001) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อทำการทดสอบต่อเนื่องด้วยวิธีจับคู่แบบพหุคูณด้วยสถิติ Scheffe พบว่า หลุมควบคุมลบที่มีเพียงเซลล์ AGS มีปริมาณเซลล์ที่ตายน้อยกว่าหลุมทดสอบที่มีเซลล์ AGS เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) ในขณะที่เซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีจำนวนเซลล์ที่ตาย ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* (p-value= 0.871 และ p-value = 0.723 ตามลำดับ) และเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีจำนวนเซลล์ที่ตายไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* (p-value = 0.293) (รูปที่ 20)



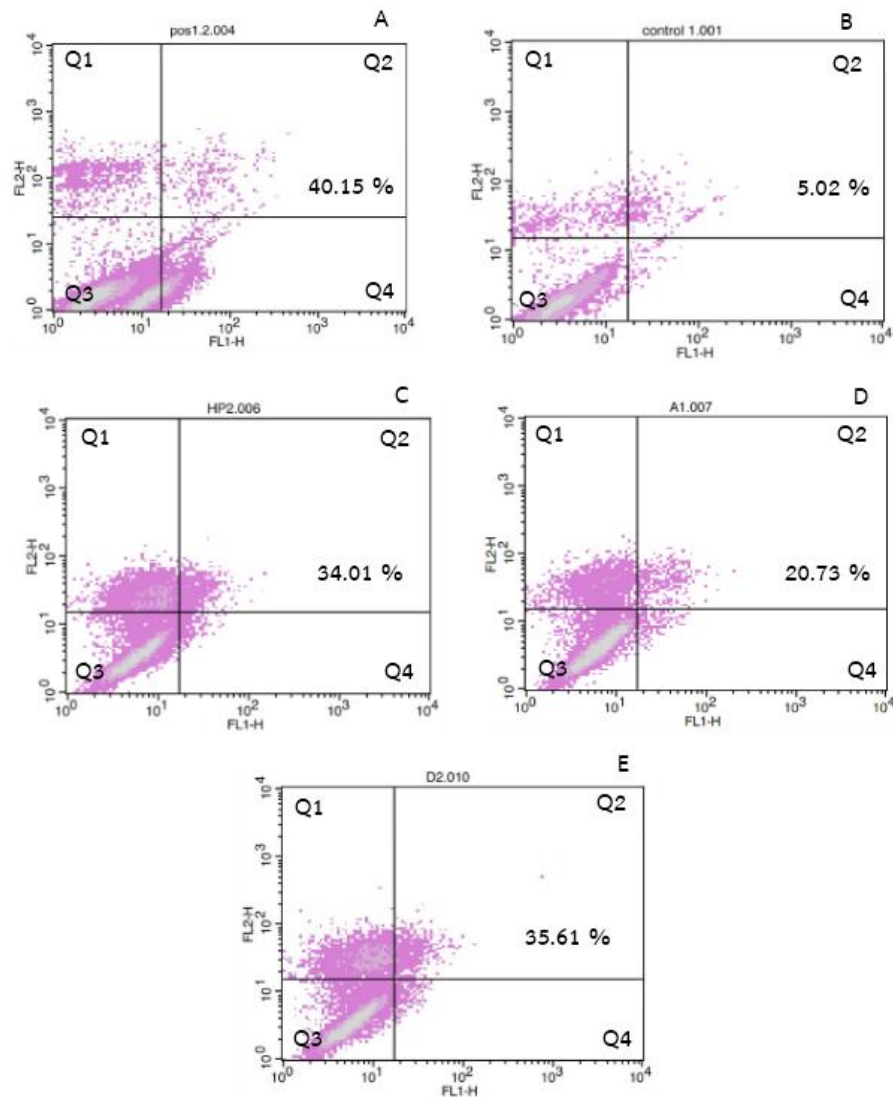
รูปที่ 19 Scattergram ของเซลล์ AGS เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากย้อมด้วยสี Annexin V/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometer ภาพ (A) แสดง Scattergram ของเซลล์ AGS ควบคุมบวก ภาพ (B) แสดง Scattergram ของเซลล์ AGS ควบคุมลบ ภาพ (C) (D) และ (E) แสดง Scattergram ของเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ตามลำดับ ตัวเลขบนกราฟแสดง ค่าเฉลี่ยร้อยละของผลรวมประชากร ใน Q1 Q2 และ Q4 ของแต่ละ Scattergram การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย



รูปที่ 20 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายของเซลล์ AGS เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากย้อมด้วยสี Annexin V/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometer กราฟแท่ง (A) (B) (C) (D) และ (E) แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายเมื่อเทียบกับประชากรเซลล์ทั้งหมดของเซลล์ AGS จากหลุมควบคุมบวก หลุมควบคุมลบ หลุมที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* ตามลำดับ การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้ง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย * หมายถึง เซลล์ AGS หลุมควบคุมลบมีจำนวนเซลล์ที่ตายน้อยกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) ** หมายถึง เซลล์ AGS หลุมควบคุมลบมีจำนวนเซลล์ที่ตายน้อยกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) *** หมายถึง เซลล์ AGS หลุมควบคุมลบมีจำนวนเซลล์ที่ตายน้อยกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) หมายถึง เซลล์ AGS หลุมควบคุมลบมีจำนวนเซลล์ที่ตายน้อยกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001)

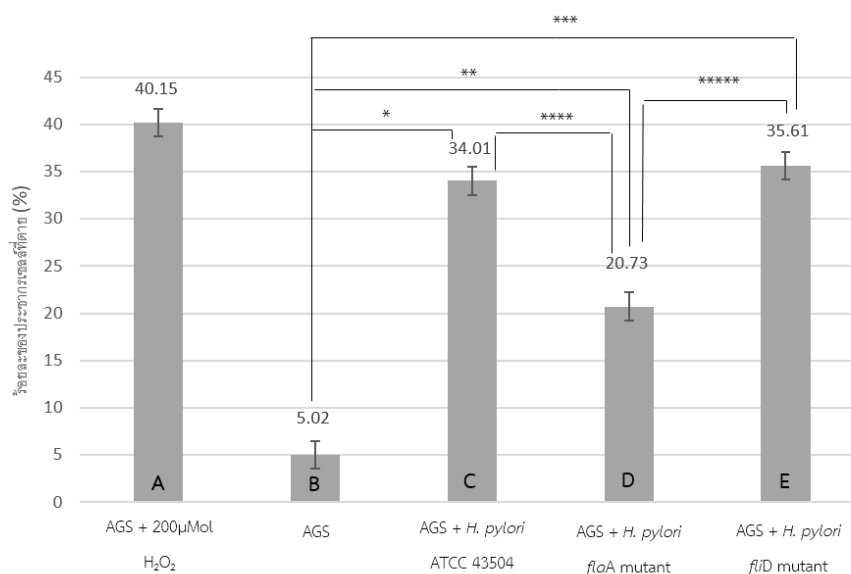
ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลุมควบคุมบวกที่มีเซลล์ AGS และ H₂O₂ ความเข้มข้น 200 µMol มีจำนวนเซลล์ที่ตายเท่ากับ 40.15 % ของประชากรเซลล์ หลุมควบคุมลบที่มีเพียงเซลล์ AGS มีจำนวนเซลล์ที่ตายเท่ากับ 5.02 % ของประชากรเซลล์ หลุมทดสอบที่มีเซลล์ AGS เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 430504 มีจำนวนเซลล์ที่ตายเท่ากับ 34.01 % ของประชากรเซลล์ เซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีจำนวนเซลล์ที่ตายเท่ากับ 20.73 % ของประชากรเซลล์ เซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีจำนวนเซลล์ที่ตายเท่ากับ 35.61% ของประชากรเซลล์ (รูปที่ 21)

เมื่อนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายที่ได้จากการทดสอบของเชื้อทั้งหมด 3 สายพันธุ์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว พบว่ามีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ตายของเซลล์ AGS อย่างน้อย 2 กลุ่มที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value=0.0001) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อทำการทดสอบต่อเนื่องด้วยวิธีจับคู่แบบพหุคูณด้วยสถิติ Scheffe หลุมควบคุมลบที่มีเพียงเซลล์ AGS มีปริมาณเซลล์ที่ตายน้อยกว่าหลุมทดสอบที่มีเซลล์ AGS เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) เซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีจำนวนเซลล์ที่ตายมากกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value= 0.0001) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* (p-value = 0.758) และเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* จำนวนเซลล์ที่ตายน้อยกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) (รูปที่ 22)



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 21 Scattergram ของเซลล์ AGS เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังจากย้อมด้วยสี Annexin V/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometer ภาพ (A) แสดง Scattergram ของเซลล์ AGS ควบคุมบวก ภาพ (B) แสดง Scattergram ของเซลล์ AGS ควบคุมลบ ภาพ (C) (D) และ (E) แสดง Scattergram ของเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flid* ตามลำดับ ตัวเลขบนกราฟแสดง ค่าเฉลี่ยร้อยละของผลรวมประชากร ใน Q1 Q2 และ Q4 ของแต่ละ Scattergram การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย



รูปที่ 22 แผนภูมิเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายของเซลล์ AGS เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังจากย้อมด้วยสี Annexin V/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometer กราฟแห่ง (A) (B) (C) (D) และ (E) แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายเมื่อเทียบกับประชากรเซลล์ทั้งหมดของเซลล์ AGS จากหลุมควบคุมบวก หลุมควบคุมลบ หลุมที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ตามลำดับ การทดลองดังกล่าวทำทั้งหมด 3 ครั้ง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย เครื่องหมาย error bar หมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย * หมายถึง เซลล์ AGS หลุมควบคุมลบมีจำนวนเซลล์ตายน้อยกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) ** หมายถึง เซลล์ AGS หลุมควบคุมลบมีจำนวนเซลล์ที่ตายน้อยกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) *** หมายถึง เซลล์ AGS หลุมควบคุมลบมีจำนวนเซลล์ที่ตายน้อยกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) **** หมายถึง เซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 มีจำนวนเซลล์ที่ตายมากกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001) ***** หมายถึง เซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีจำนวนเซลล์ที่ตายน้อยกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* อย่างมีนัยสำคัญ (p-value = 0.0001)

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

เชื้อ *H. pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่มีความสำคัญทางคลินิก เนื่องจากพบว่าประชากรโลกมากกว่า 50 % สามารถถูกตรวจพบเชื้อ *H. pylori* ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มประชากรที่ไม่แสดงอาการ และกลุ่มผู้ป่วยที่แสดงอาการของโรค เช่น แผลในกระเพาะอาหาร กระเพาะอาหารอักเสบแบบฉับพลันและเรื้อรัง จนถึงการพัฒนาของโรคลายเป็นโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (126) ในการศึกษาของ Tomohisa และ คณะ ในปี ค.ศ. 2015 ซึ่งศึกษาตัวอย่างผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารจากหลายพื้นที่ในประเทศไทย จำนวน 1,546 ราย พบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 710 ราย หรือคิดเป็น 45.9 % ที่สามารถตรวจพบเชื้อ *H. pylori* และพบว่าผู้ป่วยจำนวน 662 จาก 710 ราย หรือคิดเป็น 93.2% สามารถตรวจพบการแสดงออกของปัจจัยความรุนแรงประเภท CagA (127) จากข้อมูลดังกล่าวเห็นได้ว่าเชื้อ *H. pylori* เป็นหนึ่งในปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

โรคมะเร็งกระเพาะอาหาร เป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับที่ 4 ในประชากรโลก โดยพบอุบัติการณ์กว่า 1 ล้านรายในแต่ละปี โดยพบว่ามะเร็งกระเพาะอาหารเป็นมะเร็งชนิดที่นำไปสู่การเสียชีวิตได้มากเป็นอันดับที่ 2 ของจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งในแต่ละปี และเมื่อศึกษาพื้นที่ที่พบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งกระเพาะอาหารที่สูง พบว่าในทวีปเอเชีย มีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งกระเพาะอาหารสูงเป็นอันดับที่ 1 ของจำนวนโรคมะเร็งทั้งหมด (47, 50) การศึกษาของ Mahachai และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 พบว่าอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งกระเพาะอาหารในประเทศไทย สูงเป็นอันดับที่ 6 ในเพศชาย และอันดับที่ 9 ในเพศหญิง เมื่อเปรียบเทียบกับอุบัติการณ์ของมะเร็งประเภทอื่น (50) การติดเชื้อ *H. pylori* เป็นหนึ่งในปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร เนื่องด้วยปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *H. pylori* ทั้งการสร้างสารพิษประเภท CagA ที่สามารถถูกฉีดเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย และเกิดปฏิกริยากับโปรตีนภายในเซลล์ ทำให้เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณที่ผิดปกติภายในเซลล์ เช่น Ras/mitogen-activated protein kinase (MEK)/ extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway(128, 129), nuclear factor-KB (NF-KB) pathway (130) และ β -catenin pathway (131, 132) ซึ่งกระตุ้นการ proliferation ของเซลล์เป้าหมาย

(133, 134) สารพิษ VacA ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการสร้าง vacuole ภายในเซลล์ (41, 135, 136) นอกจากนี้ยังเป็นสารพิษที่สามารถเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย และกระตุ้นการหลั่ง cytochrome c (137, 138) และกระตุ้น pro-apoptotic factor เช่น Bcl-2 ร่วมกับโปรตีน X (Bax) (139, 140) ซึ่งส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส การติดเชื้อ *H. pylori* ยังก่อให้เกิดการกระตุ้นการอักเสบเรื้อรังใน gastric mucosa นอกจากนี้ยังพบว่า *H. pylori* ยังกระตุ้นให้เกิด inflammatory response ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ (141) โดยพบการหลั่ง pro-inflammatory cytokines หลายชนิด เช่น interleukin(IL)-1, IL-6, IL-8 และ TNF- α สูงขึ้น ทำให้เซลล์เกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน (142) ตลอดจนความผิดปกติของการตาย และการรักษาสมดุลของเซลล์ ทำให้เกิดการพัฒนากลายเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร (5, 49, 51, 134)

แฟลเจลลาเป็นหนึ่งในปัจจัยความรุนแรงที่สำคัญของเชื้อ *H. pylori* โดยมีหน้าที่หลักในการควบคุมการเคลื่อนที่และทำให้เชื้อ *H. pylori* เคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มกระเพาะอาหารได้ การศึกษานี้เลือกศึกษาผลกระทบบของยีน *flaA* และยีน *fliD* ของเชื้อ *H. pylori* เนื่องมาจากยีน *flaA* ทำหน้าที่เป็นยีนควบคุมการสร้างโปรตีน FlaA ซึ่งเป็นแฟลเจลลินหลักของสายแฟลเจลลาในเชื้อ *H. pylori* (32) จากการศึกษาของ Wenjing และ คณะ ในปี ค.ศ. 2013 พบว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหารที่ตรวจพบการติดเชื้อ *H. pylori* มีการตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีน FlaA มากถึง 74.1% (88) นอกจากนี้ การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน FlaA จาก Mansoor และคณะ ในปี ค.ศ. 2017 พบว่า FlaA เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น Antigenic และ Immunogenic โดยสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีชนิด IgG1, IgG2a และ IgA นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์หลั่ง cytokines ทั้ง IFN- γ และ IL-5 (143) และจากการศึกษาของ Christine และคณะในปี ค.ศ. 1995 พบว่า เมื่อเชื้อ *Helicobacter mustelae* ถูกรบกวนการแสดงออกของยีน *flaA* ทำให้เชื้อ *H. mustelae* เกิดความบกพร่องในการเคลื่อนที่ และมีแฟลเจลลาที่มีรูปร่างสั้นลง มีปลายตัด และไม่พบ Terminal bulbs ที่ส่วนปลาย (80) โดยพบว่าโปรตีน FlaA ของ *H. mustelae* มีความคล้ายกับ โปรตีน FlaA ของ *H. pylori* ถึง 73% (79) ต่อมาการศึกษาของ Eaton และคณะในปี ค.ศ. 1996 พบว่า เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีประสิทธิภาพการ Colonize ใน Gnotobiotic piglets ลดลง โดยสามารถ Colonize ได้เพียง 2-4 วัน ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ปกติ N6 ที่สามารถ Colonize ได้นานถึง 10 วัน (81) ในขณะที่ยีน *fliD* ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน FliD ซึ่งเป็น Capping protein ของสายแฟลเจลลา เป็นโปรตีนส่วนสำคัญ

ในกระบวนการ Assembly ของสายแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ (32, 60) การศึกษาของ Jang และคณะ ในปี ค.ศ. 1999 พบว่าเมื่อทำให้เชื้อ *H. pylori* เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ด้วยวิธี PCR mutagenesis พบว่า แฟลเจลลาของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าว ไม่ปรากฏลักษณะของ terminal bulbs ที่ส่วนปลายของแฟลเจลลา และมีลักษณะแฟลเจลลาเป็นท่อนปลายตัด (34) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อการแสดงออกของ *fljD* ถูกรบกวน ยังมีการส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *flaA* โดยพบว่ายีน *flaA* แสดงออกได้ลดลง 7% ยีน *fljD* ยังเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* พบว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ไม่พบการเคลื่อนที่ออกจากจุดศูนย์กลาง ในการทดสอบการเคลื่อนที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว และ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fljD* ยังสูญเสียความสามารถในการ colonize ในหนูทดลอง หลังจากผ่านไปเป็นเวลา 10 วัน (34)

การศึกษานี้เลือกใช้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 เป็นสายพันธุ์ควบคุม เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของปัจจัยความรุนแรงทั้ง CagA และ VacA ซึ่งคล้ายกับ *H. pylori* สายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่พบการระบาดในประเทศไทย (127) อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการศึกษาผลกระทบของยีน *flaA* และยีน *fljD* ของเชื้อ *H. pylori* จึงได้มีการเลือกใช้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และยีน *fljD* ด้วยเทคนิค PCR mutagenesis จากการศึกษาที่ผ่านมา (117) นำมาร่วมในการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังได้ทำการสร้างสายพันธุ์ที่ได้รับยีน *flaA* และยีน *fljD* ทดแทนโดยใช้จากพลาสมิดที่สร้างจาก pGem T-easy[®] เชื่อมกับยีน *flaA* และยีน *fljD* และคัดเลือกสายพันธุ์ที่รับยีนผ่าน Natural transformation เนื่องจากเชื้อ *H. pylori* มีคุณสมบัติเป็น Natural competent cells จากการศึกษาของ Wang และคณะในปี ค.ศ. 1993 ซึ่งพบว่า เชื้อ *H. pylori* มีความสามารถในการรับพลาสมิดตามธรรมชาติ และสามารถแสดงออกคุณสมบัติของยีนใน พลาสมิด เช่น ยีนที่ทำให้ดื้อต่อยา rifampicin เป็นต้น (119) นอกจากนี้การศึกษาจาก Haas และคณะ ในปี ค.ศ. 1993 สามารถสร้าง *H. pylori* สายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออกของแฟลเจลลาได้สำเร็จ ด้วยการใช้ natural transformation ของพลาสมิดที่มีองค์ประกอบของยีน *flaA* ที่กลายพันธุ์ (144)

อย่างไรก็ตามกระบวนการรับยีนผ่าน Natural transformation ในการศึกษาครั้งนี้ มีอัตราการสำเร็จค่อนข้างต่ำ จึงส่งผลให้ไม่สามารถสร้างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ได้รับยีน *flaA* และยีน *fljD* ทดแทนได้สำเร็จ จากการทบทวนวรรณกรรมของการศึกษาก่อนหน้าที่ผ่านมา พบว่ามีงานวิจัยเพียงไม่กี่งานที่ประสบความสำเร็จในการทำให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ได้รับยีน

ทดแทนได้สำเร็จ แม้มีการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ตามธรรมชาติของ *H. pylori* สามารถรับพลาสมิดได้ โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนที่ถูกควบคุมโดยยีนในโลคัส *comB* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ Type IV secretory systems (T4SS) (120, 145, 146) จากการศึกษาของ Nedenskov และคณะในปี ค.ศ. 1990 พบว่าเชื้อ *H. pylori* มี transformation frequencies สำหรับการรับพลาสมิดเท่ากับ 5×10^{-4} CFU/ μ g (147) และในการศึกษาของ Wang และคณะ ในปี ค.ศ. 1993 พบว่าเมื่อเชื้อ *H. pylori* รับพลาสมิดจากแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ จะส่งผลกระทบต่อค่า Transformation frequencies โดยพบว่า Transformation frequencies เหลือเพียงน้อยกว่า 1×10^{-7} CFU/ μ g (119) จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น เห็นได้ว่าปัจจัยสำคัญหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จในการเกิด natural transformation คือ ชนิดของพลาสมิดที่นำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนที่ต้องการศึกษา ซึ่งในงานการศึกษาครั้งนี้ใช้พลาสมิดที่ไม่ได้มาจากเชื้อ *H. pylori* จึงอาจส่งผลให้โอกาสประสบความสำเร็จในการพบสายพันธุ์ที่รับพลาสมิดมีน้อยลง ประกอบกับพลาสมิดที่สร้างขึ้นไม่มียีนที่ทำหน้าที่เป็น Marker ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่รับพลาสมิด เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้การคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *H. pylori* ภายหลังจากทำ Natural transformation ต้องเลือกใช้โคโลนีนำมาทดสอบเป็นปริมาณมาก โดยอาจต้องทำการทดสอบมากถึง 1×10^7 โคโลนี จึงจะมีโอกาสพบเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการรับยีนทดแทน ด้วยปัจจัยที่กล่าวมาทั้งหมดจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การศึกษานี้ยังไม่ประสบความสำเร็จในการสร้างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ได้รับยีนทดแทน การศึกษาบางส่วนที่ผ่านมามีพลาสมิดตัวพาซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Shuttle vector ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีคุณสมบัติในการแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ เช่น pHel3 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่แสดงออกได้ทั้งในเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *H. pylori* และมีการออกแบบให้มีความเสถียรในการผลิตโปรตีนออกมาทดแทน กล่าวคือ ไม่อาศัยการเกิด Natural transformation หลังจากเกิดการรับพลาสมิด แต่อาศัยการแสดงออกของโปรตีนผ่านพลาสมิดที่นำใส่เข้าไปแทน ทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์และได้รับการแสดงออกของยีนทดแทนกลับมา (118) ซึ่งวิธีดังกล่าวมีโอกาสประสบความสำเร็จสูงกว่าการใช้วิธีการรับยีนโดยอาศัย Natural transformation แต่มีขั้นตอนการสร้างพลาสมิดที่มีความซับซ้อน ซึ่งไม่เหมาะสมกับระยะเวลาของการศึกษาในครั้งนี้ แม้กระนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกหรือผลกระทบของยีนต่าง ๆ ในเชื้อ *H. pylori* จากงานวิจัยส่วนใหญ่ ได้อาศัยเพียงเชื้อสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่สนใจศึกษา เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ (79, 81, 117)

การทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ถูกทดสอบ เนื่องจากเชื้อที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR mutagenesis อาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการแบ่งตัว หรือกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการแสดงออกด้านอื่น ทำให้ผลการทดสอบไม่สามารถสะท้อนถึงผลกระทบที่แท้จริงจากการขาดการแสดงออกของยีน *flaA* และ *fliD* ได้ การทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อถูกทดสอบด้วย 2 เทคนิค ได้แก่ การทดสอบการเจริญด้วยวิธีการนับโคโลนี ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการเจริญ และการแบ่งตัว และการทดสอบการเจริญด้วยเทคนิค MTT ซึ่งเป็นการทดสอบกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อที่สามารถในการรีดิวซ์ Tetrazolium salt ให้กลายเป็น Formazan ที่ไม่ละลายน้ำ แสดงถึงประสิทธิภาพของเซลล์แบคทีเรียในการตอบสนองกับสิ่งแวดล้อมภายนอก (148) แต่เดิมเทคนิค MTT เป็นที่นิยมในการวัดระดับการมีชีวิตของเซลล์ยูคาริโอต แต่ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิค MTT สำหรับศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ แบคทีเรีย จากการศึกษาของ Mshana และคณะ ในปี ค.ศ. 1998 ได้มีการประยุกต์เอาเทคนิค MTT มาใช้ในการวัดอัตราการมีชีวิตของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา rifampicin ซึ่งให้ผลทดสอบการมีชีวิตของเชื้อ *M. tuberculosis* เพื่อแปลผลความไวต่อยา rifampicin ได้รวดเร็วขึ้น (149) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2007 Li และ Song ได้นำเอาเทคนิค MTT มาประยุกต์ใช้กับการทดสอบหาอัตราการมีชีวิตของ cyanobacteria ซึ่งได้ผลการทดสอบที่สะท้อนอัตราการมีชีวิตได้ไม่แตกต่างจากวิธี Fluorescent diacetate, Evan's blue และ autofluorescence ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่นิยมสำหรับ cyanobacteria (150) จากผลการทดสอบในการศึกษาค้นคว้า พบว่าการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน ในการทดสอบทั้ง 2 วิธี กล่าวคือ เชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญ และแบ่งตัวได้ไม่แตกต่างกัน รวมทั้งมีกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นหากนำเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ไปทำการทดสอบคุณสมบัติหรือการแสดงออกด้านอื่นที่ และพบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์มาตรฐาน และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* หรือ *fliD* จึงอาจเป็นไปได้ว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้น น่าจะเป็นผลกระทบที่มาจากยีน *flaA* และ *fliD* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์

เนื่องจากยีน *flaA* ควบคุมการสร้างโปรตีนแฟลเจลลินหลัก ในขณะที่ยีน *fliD* ควบคุมการสร้าง Capping protein ในส่วนปลายของสายแฟลเจลลาโดยตรง และเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นปฏิกิริยาโพลีเมอเรชันของการสร้างสาย Filament ที่สมบูรณ์จากส่วนปลายของแฟลเจลลา นอกจากนี้ยังเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ Terminal bulbs ในสายแฟลเจลลาของ *H. pylori* ซึ่งทำหน้าที่หุ้มส่วนปลายสายของแฟลเจลลาทำให้มีความคงทนในสภาพแวดล้อมมากขึ้น (32, 60, 79, 80) ดังนั้นหากเชื่อมีการกลายพันธุ์ของยีนใดยีนหนึ่ง อาจส่งผลให้การสร้างหรือลักษณะรูปร่างของสายแฟลเจลลาไม่สมบูรณ์ เมื่อทดสอบย้อมแฟลเจลลาด้วยเทคนิค Leifson-tannic fuchsin stain (123) เพื่อศึกษาแฟลเจลลาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 สามารถมองเห็นเส้นของแฟลเจลลายื่นออกมาจากปลายด้านหนึ่งของเซลล์ โดยไม่พบลักษณะดังกล่าวในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* อย่างไรก็ตามภาพที่ได้จากเทคนิค Leifson-tannic fuchsin stain ไม่สามารถแสดงรายละเอียดของรูปร่างแฟลเจลลาได้อย่างชัดเจน จึงได้มีการบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถแสดงรายละเอียดของแฟลเจลลาที่ชัดเจนมากขึ้น โดยพบลักษณะของแฟลเจลลาที่มี terminal bulbs พองออกเล็กน้อย บริเวณส่วนปลายของแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนหุ้มบริเวณปลายสุดของสายแฟลเจลลาที่พัฒนาโดยสมบูรณ์ ช่วยให้สายแฟลเจลลามีความคงทนในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (32, 60) แต่ไม่สามารถพบลักษณะของ terminal bulbs ดังกล่าวได้ในเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และ *fliD* ทั้งนี้เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* ยังสามารถมองเห็นเส้นแฟลเจลลาได้ แสดงให้เห็นว่าแม้ยีน *flaA* ที่มีหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนแฟลเจลลินหลักจะถูกทำให้กลายพันธุ์ แต่เชื้อ *H. pylori* ยังคงความสามารถในสร้างแฟลเจลลาได้ตามปกติ แต่มีลักษณะของแฟลเจลลาที่ไม่สมบูรณ์ในส่วนของบริเวณ terminal bulbs ลักษณะที่พบดังกล่าวสามารถพบได้ในเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ที่ควบคุมการแสดงออกของ Capping protein ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของ Terminal bulbs การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของแฟลเจลลาที่เกิดขึ้นในเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และยีน *fliD* แสดงให้เห็นว่าทั้งยีน *flaA* และยีน *fliD* มีความสำคัญในการสร้างสายแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า ของ Christine และคณะในปี ค.ศ. 1995 ที่พบลักษณะเช่นเดียวกับแฟลเจลลาของเชื้อ *H. mustelae* ที่มียีน *flaA* บกพร่อง และ (80) การศึกษาของ Jang และคณะ ใน

ปี ค.ศ. 1999 ที่พบแฟลเจลลาลักษณะปลายตัด ไม่มี Terminal bulbs เช่นกันในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ยีน *flID* ถูกรบกวนการแสดงออก (34) ผลของการรบกวนการแสดงออกของยีน *flaA* ที่ทำให้เชื้อไม่สามารถสร้างโปรตีน FlaA ที่สมบูรณ์ได้ ส่งผลให้สายแฟลเจลลาที่ถูกสร้างขาดแฟลเจลลินหลัก โดย Christine และคณะ ได้รายงานลักษณะแฟลเจลลาที่พบเพียง Flagellar sheath โดยไม่มีแฟลเจลลาสมบูรณ์ด้านใน (80) และจากการศึกษาก่อนหน้าที่เกี่ยวกับการรบกวนการแสดงออกของยีน *flID* ซึ่งส่งผลต่อการลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสายแฟลเจลลา โดยเฉพาะยีน *flaA* ไปด้วย (34) ดังนั้นจึงอาจพบลักษณะแฟลเจลลาที่ไม่มี Terminal bulbs คล้ายกันในเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และยีน *flID* ซึ่งเป็นผลกระทบจากการขาดแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ด้านใน Flagellar sheath ทำให้ลักษณะของ Terminal bulbs ไม่สามารถมองเห็นได้ แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ในการศึกษาครั้งนี้

หน้าที่หลักที่สำคัญของแฟลเจลลา คือ ช่วยในการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย (32, 60) การเคลื่อนที่แบบคางสวานของแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ส่งผลให้เชื้อสามารถเคลื่อนที่ผ่านชั้น Gastric mucosa ที่มีสภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นกรดสูง ไปยังส่วน Basal layer ที่มีความเป็นด่างมากกว่า หรือมี pH ใกล้เคียงกับ 7.0 (31, 151) การศึกษาของ Kao และคณะพบว่า ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่สูง มีแนวโน้มที่พบความหนาแน่นของแบคทีเรียมากกว่าและเกิดการอักเสบมากกว่าในบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ (152) ภายหลังจากทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และยีน *flID* ภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของยีน *flaA* ที่ส่งผลทั้งรูปร่างของแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ และความสามารถในการทำงานของแฟลเจลลาในการเคลื่อนที่ลดลง ในขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flID* ซึ่งมีลักษณะของแฟลเจลลาที่ไม่สมบูรณ์ในส่วนของบริเวณ terminal bulbs มีความสามารถในการเคลื่อนที่ที่ลดลงเพียงเล็กน้อยและไม่มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* การขาดแฟลเจลลินหลักส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori* ซึ่งผลของการศึกษาในยีน *flaA* สอดคล้อง

กับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ขาดการแสดงออกของยีน *flaA* มีความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลงเช่นกัน (79) เนื่องจากการขาดโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแฟลเจลลินหลักไป แต่ยังมีการทำงานของโปรตีน FlaB ที่ทำหน้าที่เป็นแฟลเจลลินรองอยู่ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลง แต่ไม่ถึงระดับที่เชื้อสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่ ดังจะเห็นได้จากการที่เชื้อ *H. mustelae* ถูกรบกวนการแสดงออกของยีน *flaA* และ *flaB* ทำให้สูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่ไปโดยสมบูรณ์ แต่เชื้อ *H. mustelae* ที่ถูกรบกวนการแสดงออกของ ยีน *flaA* หรือ *flaB* เพียงยีนใดยีนหนึ่ง ส่งผลกระทบให้เชื้อมีความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลง แต่ไม่ถึงกับสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่ไป (80) อย่างไรก็ตามผลการศึกษายของยีน *fliD* ในครั้งนี้ให้ผลขัดแย้งกับการศึกษาก่อนหน้า โดย Jang และคณะ ในปี ค.ศ. 1999 ซึ่งพบว่าเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* จะสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่โดยสมบูรณ์ เนื่องมาจากการขาดยีน *fliD* ได้ส่งผลรบกวนการแสดงออกของโปรตีน FlaA และ FlaB ด้วย ทำให้เส้นแฟลเจลลา ไม่มีแฟลเจลลัสสมบูรณ์ภายใน Flagellar sheath ทำให้ให้สูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่ (34) แต่จากงานวิจัยดังกล่าว วัดผลของ Motility assay โดยแปลผลจากลักษณะการเคลื่อนที่กระจายของเชื้อภายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น โดยไม่ได้ใช้การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ จึงอาจส่งผลให้การแปลผลของผลการทดสอบมีความแตกต่างกันในทางค่าสถิติ นอกจากนี้การทดสอบ Motility assay ในเชื้อ *H. pylori* ไม่ได้มีเพียงการทดสอบรูปแบบเดียวเท่านั้น แต่สามารถทดสอบคุณสมบัติได้ 3 คุณสมบัติ ได้แก่ 1. Swimming motility ซึ่งเป็นการทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการคำนวณความเร็วของการเคลื่อนที่ผ่านชั้น Gastric mucosa ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase Contrast (153) 2. การทดสอบ Spreading motility ซึ่งทำโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่ภายในอาหารชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว และเป็นวิธีการทดสอบที่ถูกเลือกใช้ในการศึกษานี้ (31, 154, 155) และ 3. การทดสอบ Swarming motility โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเคลื่อนที่ บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยเป็นการทดสอบรูปแบบ Quantitative inoculation (156, 157) การศึกษาในเชื้อ *P. aeruginosa* ของ Shiwani และคณะในปี ค.ศ. 2000 พบว่า ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน FliD สามารถให้การแสดงออกโปรตีน FliD ได้ 2 ประเภท ได้แก่ ประเภท A (PAK) และ B (PAO1) โดยเชื้อ 1 สายพันธุ์จะมีการแสดงออกแค่ 1 ประเภทเท่านั้น พบว่า FliD ทั้ง 2 ประเภทเมื่อถูกรบกวนการแสดงออก จะแสดงคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ได้ลดลง แต่ในประเภท B ยังคงพบการเคลื่อนที่มากกว่าประเภท A (158) ดังนั้นจึงมีความ

เป็นไปได้ที่เชื้อ *H. pylori* อาจมีความหลากหลายของโปรตีน *FlaD* ในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่หลังมีการสูญเสียยีนดังกล่าวไปในระดับที่แตกต่างกัน

นอกเหนือจากการทดสอบรูปร่างและคุณสมบัติหลักในการเคลื่อนที่ของแฟลเจลลา การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เป้าหมาย เป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่ถูกเลือกนำมาทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากการยึดเกาะกับเซลล์เป้าหมาย เป็นจุดเริ่มต้นในการเกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อ *H. pylori* (5) การทดสอบ Adhesion สามารถทำการทดสอบได้หลายวิธี การศึกษาจาก Sheu และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 เลือกใช้วิธีการทำ Colony count ซึ่งอาศัยหลักการทำให้เซลล์ AGS ที่มี *H. pylori* ยึดเกาะอยู่ แยกออกโดยไม่กระทบกับเชื้อ *H. pylori* และนำเอาเชื้อ *H. pylori* ที่ได้ไปเจือจางเป็นลำดับ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และนับโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (159) ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีใช้เวลานาน และผลกระทบจากการที่เชื้อ *H. pylori* มีโอกาสสัมผัสออกซิเจนเป็นเวลานานขณะปฏิบัติการทดสอบ อาจส่งผลให้เชื้อเจริญได้ไม่ดีและทำให้ผลของการทดสอบมีความแปรปรวนสูง โดยสามารถพบค่า CV ได้ตั้งแต่ 6 % -20 % (160) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค Flow cytometry ในการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *H. pylori* กับเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร AGS โดยวัดสัญญาณของ FITC ที่เปล่งออกออกมาจากเชื้อ *H. pylori* ที่ถูกย้อมก่อนนำมาทำการทดสอบ (161) การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบโดยนำเชื้อไปย้อมด้วยสียฟลูออเรสเซนซ์ FITC ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และวัดสัญญาณของฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งจากเชื้อที่ยึดเกาะกับเซลล์ AGS โดยการวัด Fluorescent intensity ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และถ่ายภาพยืนยันการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* ยึดเกาะกับเซลล์ AGS ได้น้อยกว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การยึดเกาะของ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ต่อเซลล์ AGS มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงกว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 อย่างมีนัยสำคัญ โดยให้ผลสอดคล้องกันทั้งในการทดสอบในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบผลการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ด้วยวิธีการนับโคโลนี พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* ยึดเกาะเซลล์ AGS น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญและให้ผลสอดคล้องกับการวัดด้วยวิธีการใช้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ในขณะที่เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD*

มีความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ไม่แตกต่างกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการทดสอบด้วยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ความแปรปรวนของผลทดสอบอาจเกิดจากการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ด้วย Spectrophotometer จำเป็นต้องใช้ Plate ชนิดพิเศษที่มีสีดำ เพื่อลดสัญญาณรบกวนรอบข้างจากการกระตุ้นสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบกับ Plate ปกติ จึงอาจพบผลกระทบจากสัญญาณรบกวนที่สูง อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ใช้วิธีการตัดสัญญาณรบกวน ด้วยการหักลบค่าสัญญาณรบกวนพื้นฐานจากหลุมการทดสอบที่มีเพียงเซลล์ปกติเท่านั้น และใช้การวัดสัญญาณในโหมด Area scanning ซึ่งเป็นการวัดสัญญาณจาก Metrix จำลองขนาด 5 x 5 ช่อง ภายในหลุมปฏิกิริยา 1 หลุม ทำให้ได้ค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ทั้งหมด 25 จุด และนำมาหาค่าเฉลี่ยของความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธีการนับโคโลนี อาจพบความแปรปรวนได้หลากหลายรูปแบบตามที่กล่าวไปข้างต้น จากผลการทดลองทั้ง 2 วิธี แสดงให้เห็นว่ายีน *flaA* มีผลกระทบต่อการศึกษาการยึดเกาะกับเซลล์ในหลอดทดลอง ซึ่งอาจเป็นจุดเริ่มต้นในการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* (31) การศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าโปรตีนแฟลเจลลินหลักเป็นโปรตีนที่มีส่วนช่วยในการยึดเกาะกับเซลล์ โดยพบว่าเชื้อที่มีการแสดงออกของโปรตีนแฟลเจลลิน มีการ Colonize ในสัตว์ทดลองลดลง (81) แม้ว่าผลการทดสอบของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* ในการศึกษาทำให้ผลไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า ที่มีการศึกษากับเชื้อ *H. pylori* และพบว่าเมื่อยีน *flaD* ถูกรบกวนการแสดงออก จะส่งผลให้ไม่สามารถ colonize ในสัตว์ทดลองได้ (34) ความแตกต่างของผลทดสอบอาจเนื่องมาจากการทดสอบกับตัวอย่างที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการศึกษาการทดสอบ แต่มีการศึกษาอีกจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงการสูญเสียการแสดงออกของยีน *flaD* และส่งผลต่อความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มมากขึ้น ในปี ค.ศ. 2001 Eric และ คณะ พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่สูญเสียการแสดงออกของยีน *flaD* มีความสามารถในการยึดเกาะเซลล์รังไข่ของ Chinese hamster ชนิดมี Mucin (CHO-Muc1 cells) ได้เท่ากับเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ควบคุม PAK (162) ในขณะที่ Shiwani และ คณะ ในปี ค.ศ. 1998 กลับพบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่สูญเสียการแสดงออกของยีน *flaD* จะสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะกับ Human tracheobronchial mucins ไป (163) นอกจากนี้การศึกษาของ Dingle และ คณะ ในปี ค.ศ. 2011 พบว่าเชื้อ *C. difficile* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaD* และ *flaC* เพียงยีนใดยีนหนึ่ง ทำให้เชื้อ *C. difficile* ยึดเกาะกับเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2-cells

ได้มากกว่าเชื้อ *C. difficile* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แม้เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวจะสูญเสียความสามารถในการสร้างสายแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ (164) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า ผลกระทบของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสายแฟลเจลลา อาจมีผลกระทบต่อความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ทั้งในด้านการลดคุณสมบัติการยึดเกาะและส่งเสริมการยึดเกาะ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการทดสอบการยึดเกาะในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน และทดสอบกับเซลล์ที่ต่างชนิดกัน ส่งผลให้เชื้อ *H. pylori* มีผลการทดสอบการยึดเกาะแตกต่างกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้

นอกจากนี้ปัจจัยที่อาจมีผลต่อการทดสอบอีกอย่างหนึ่ง คือผลกระทบที่เกิดขึ้นกับยีนอื่น ภายหลังรบกวนการแสดงออกของยีน *fljD* การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสายแฟลเจลลา เช่น ยีน *flaA* ได้รับผลกระทบลดการแสดงออกไปด้วย ภายยีน *fljD* ถูกรบกวนทำให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ดังกล่าวสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่ไปจากการขาดโปรตีนที่ทำหน้ากระตุ้นโพลีเมอเรสชันของการสร้างสายแฟลเจลลา (34) ทั้งนี้ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ได้ศึกษาผลกระทบของยีน *fljD* ที่มีต่อการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสายแฟลเจลลา จึงเป็นที่น่าสนใจในการทำการศึกษาเพิ่มเติมในระดับการแสดงออกของยีนต่อไป จากหลักฐานการศึกษาในเชื้อ *S. typhimurium* ที่พบการแสดงออกของยีน *fljD* ที่ทำหน้าที่เช่นเดียวกับที่พบในเชื้อ *H. pylori* โดย Yokoseki และ คณะ ได้ทำการศึกษาผลกระทบของยีน *fljD* ในเชื้อ *S. typhimurium* และพบว่าเมื่อขาดการแสดงออกของยีน *fljD* ไป กลับทำให้เกิดการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ Sigma factor ประเภท FlgM (165) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนแฟลเจลลาในกลุ่ม class 3 ส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีนแฟลเจลลินหลักโดยเฉพาะ FljC เพิ่มขึ้น (166)

การศึกษาผลกระทบของเชื้อ *H. pylori* ต่อการตายของเซลล์เป็นคุณสมบัติที่เลือกนำมาทดสอบเป็นตัวแทนการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ AGS ที่ถูกทำให้ติดเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลอง การศึกษาของ Lin และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ ATCC 43504 ร่วมกับเซลล์ AGS เป็นเวลา 18, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลกระทบการตายของเซลล์ AGS แบบอะพอโทซิส ที่เกิดจาก *H. pylori* ภายใต้อาหารที่มีสาร Di(2-ethylhexyl) phthalate โดยเซลล์มีอัตราการมีชีวิตรอดลดลงอย่างชัดเจนในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงร่วม และสามารถตรวจวัดการถูกกระตุ้นของ caspase -3 ได้ตั้งแต่ 18 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงร่วม (125) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบการตายของเซลล์ AGS ที่เกิดขึ้นภายใต้ 2 ช่วงเวลา คือเวลาการเพาะเลี้ยงร่วมเป็น 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาการเพาะเลี้ยงร่วม เซลล์ถูกนำไป

ตรวจสอบพยาธิสภาพเบื้องต้นที่เกิด ก่อนนำไปวัดอัตราการตายของเซลล์ โดยตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เกิดชัดเจนมากขึ้น และเริ่มมีเซลล์หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลักษณะเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงอาจเกิดจากการหดตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม และอีกหนึ่งลักษณะที่พบคือเซลล์มีการยืดยาวออก ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้าถึงการพบการยืดยาวออกของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ว่าเป็นผลกระทบจากจากแสดงออกของยีน *CagA* ที่จับกับ Src-homology protein tyrosine phosphatase (SHP) 2 และกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ รบกวน cell polarity ผ่านการยับยั้ง focal adhesion kinase (FAK) ส่งผลให้เซลล์มีรูปร่างยืดยาวออก โดยเรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า Hummingbird phenotype (167) การพบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ AGS เป็นจำนวนมากกว่า 60% ของประชากรเซลล์ทั้งหมดที่เวลาการเพาะเลี้ยงร่วม 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เป็นหนึ่งในปัจจัยสนับสนุนให้เลือกทำการทดสอบวัดอัตราการตายในช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงร่วมดังกล่าว

การทดสอบการตายของเซลล์ AGS ถูกทดสอบโดยใช้การย้อมด้วย Annexin V-FITC และ PI และวัดสัญญาณด้วยการใช้เทคนิค Flow cytometry โดยเป็นเทคนิคที่วัดปริมาณเซลล์ที่เกิดการตายจากการใช้ความสามารถของ Annexin V ที่จับอย่างจำเพาะกับ Phosphatidylserine (PS) ซึ่งในเซลล์ปกติ PS จะพบอยู่บริเวณ Lipid bilayer ด้านในของเซลล์ ในเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส PS จะเกิดการพลิกออกมาอยู่บริเวณ Lipid bilayer ด้านนอกของเซลล์แทน ทำให้สามารถจับกับ Annexin V ได้ (168) ในขณะที่ PI มีคุณสมบัติแทรกซึมเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่มีการสูญเสียความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์มักพบได้ในการตายแบบเนโครซิส และเข้าจับกับ DNA ภายในเซลล์ (169) ดังนั้นจึงใช้ PI ในการแยกเซลล์ที่ตายแบบเนโครซิสออกจากเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิส เมื่อวัดสัญญาณด้วยเทคนิค Flow cytometry สามารถจำแนกกลุ่มเซลล์ออกเป็นกลุ่มเซลล์มีชีวิต กลุ่มเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส และกลุ่มเซลล์ที่เกิดการตายแบบเนโครซิส ผลการทดสอบพบว่า ในช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของอัตราการตายเซลล์ AGS ที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีอัตราการตายของเซลล์ต่ำกว่าเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์

อื่น ๆ อย่างไรก็ตามในเซลล์ AGS ที่มีการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flhD* ไม่พบว่ามียีนอัตราการตายของเซลล์ที่แตกต่างจากเซลล์ AGS ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ายีน *flaA* อาจมีผลกระทบต่ออัตราการตายของเซลล์ ในขณะที่ยีน *flhD* อาจไม่มีผลกระทบดังกล่าว ทั้งนี้ควรศึกษาวิถีกลไกการตายที่เจาะจงเฉพาะแบบอะพอพอโทซิส และเนโครซิสเพิ่มเติม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลไกการตายแบบอะพอพอโทซิส เนื่องจากมีหลักฐานการศึกษาว่า เซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพอโทซิสได้ (5, 115) รวมไปถึงเพิ่มกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ได้รับยีน *flaA* และ *flhD* ทดแทนเพื่อสนับสนุนผลกระทบดังกล่าวของยีนทั้งสองชนิด จากผลการทดสอบดังกล่าวจะเห็นว่า แม้ทั้ง 2 ยีน จะเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างสายแฟลเจลลาเหมือนกัน แต่ให้ผลการทดสอบการตายของเซลล์ AGS ที่มีความแตกต่างกัน การขาดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกเกี่ยวกับการสร้างแฟลเจลลา สามารถก่อให้เกิดผลกระทบได้หลากหลายทางต่อเซลล์ที่ติดเชื้อ *H. pylori* จากการทบทวนวรรณพบว่าการศึกษาความสัมพันธ์ของแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* กับการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ถือเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่อธิบายถึงความเป็นไปได้ของแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ที่อาจเป็นหนึ่งในปัจจัยก่อโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร ผ่านการที่กระตุ้นเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารให้เกิดการตายได้ ทั้งนี้พบการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของแฟลเจลลากับการตายของเซลล์ในเชื้อแบคทีเรียประเภทอื่นๆ โดย Kenichi และคณะได้ทำการกระตุ้นให้ยีน *flhD* และ *flhR* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสายแฟลเจลลาของเชื้อ *Serratia marcescens* กลายพันธุ์และนำไปทดสอบผลกระทบต่ออัตราการตายแบบอะพอพอโทซิสของเซลล์แมโครฟาจของหนู พบว่าเชื้อ *S. marcescens* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว ทำให้เซลล์แมโครฟาจของหนู ตายแบบอะพอพอโทซิสได้ลดลง (110) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบโดยใช้โปรตีนแฟลเจลลิน (FlhC) ของเชื้อ *S. typhimurium* สายพันธุ์ SL3201 กระตุ้นเซลล์เยื่อบุลำไส้ของหนู ผลการทดสอบพบว่า โปรตีนแฟลเจลลินสามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอพอโทซิสใน extrinsic pathway ด้วยกลไก TLR5-dependant (108)

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีผลต่อรูปร่างของแฟลเจลลาที่ไม่สมบูรณ์ ความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลง ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ที่ลดลง และความสามารถในการทำให้เซลล์ AGS ตายลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่ายีน *flaA* ของเชื้อ *H. pylori* อาจมีผลกระทบต่อการศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยเฉพาะการยึดเกาะกับเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการเริ่มต้นในการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (5, 32) ในขณะเดียวกันเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ส่งผลกระทบต่อรูปร่างของแฟลเจลลา แต่ไม่มีผลกระทบอย่างชัดเจนต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ และแม้จะพบความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 แต่ไม่พบความแตกต่างในการทำให้เซลล์ AGS ที่ติดเชื้อตาย เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อยืนยันการตายว่าเป็นการตายด้วยกลไกใด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตายแบบอะพอพโทซิส เช่น การวัดปริมาณ caspase-3 ที่ถูกกระตุ้น การทดสอบกลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง การแสดงออกของยีนและโปรตีน bcl-2 และ bax ที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า โปรตีนทั้ง Bax จะถูกกระตุ้นให้เพิ่มปริมาณขึ้น และ Bcl-2 จะถูกยับยั้งการแสดงออก เมื่อเซลล์ AGS เกิดการติดเชื้อ *H. pylori* ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษประเภท VacA (140)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

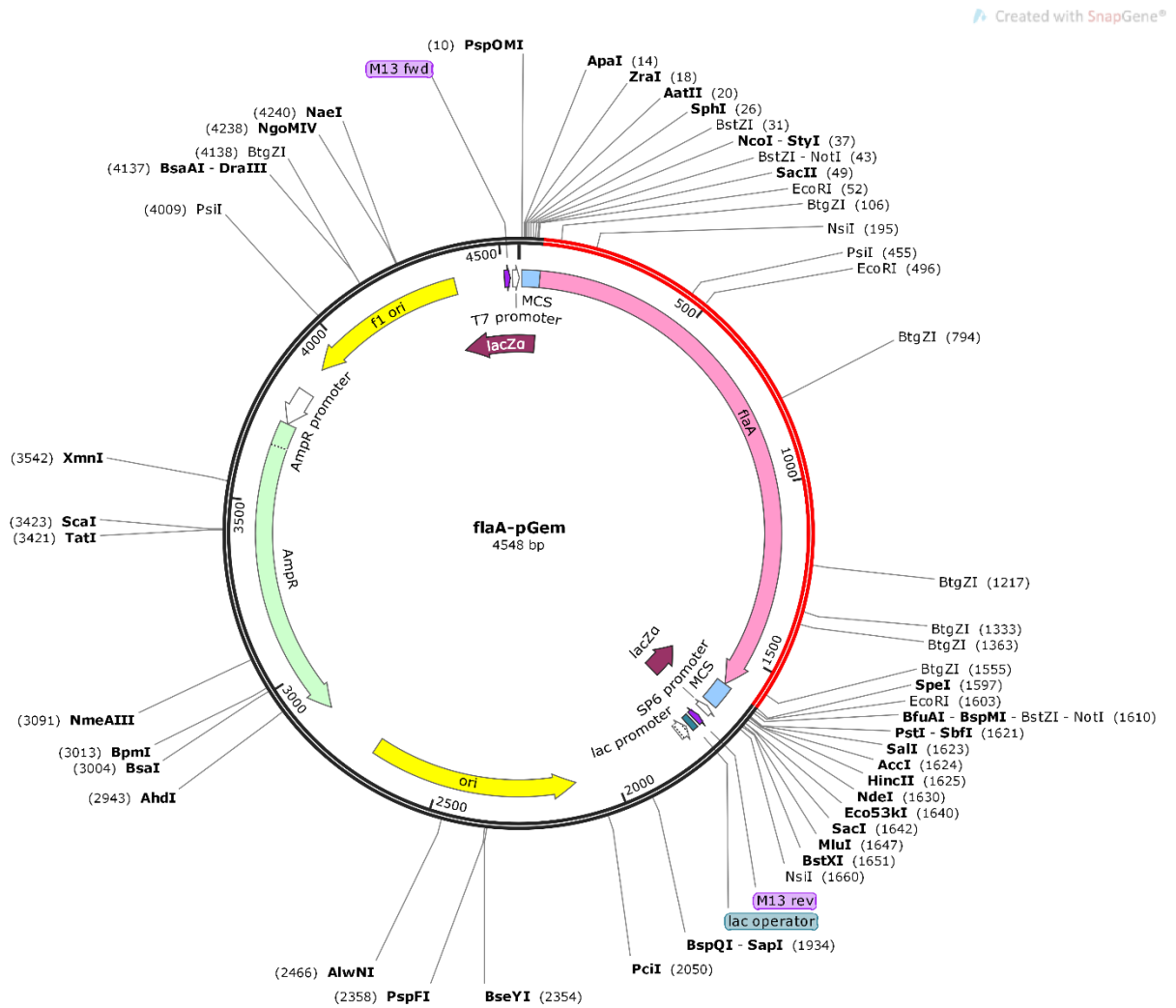
การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลกระทบของยีน *flaA* และยีน *fliD* ที่มีต่อแฟลเจลลาและหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ได้แก่ ผลกระทบต่อรูปร่างแฟลเจลลา ความสามารถในการเคลื่อนที่ ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS และความสามารถในการกระตุ้นให้เซลล์ AGS ตาย การถูกทำให้กลายพันธุ์ของยีน *flaA* และยีน *fliD* ด้วยวิธี PCR mutagenesis ไม่สร้างผลกระทบต่อความสามารถในการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ส่งผลให้เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และยีน *fliD* สามารถเจริญได้ตามปกติเทียบเท่ากับกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ยีน *flaA* ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน FlaA ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแฟลเจลลินหลักในองค์ประกอบสายแฟลเจลลาของเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่ยีน *fliD* ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน Flid ที่ทำหน้าที่เป็น capping protein ในส่วนปลายของสายแฟลเจลลาของเชื้อและเป็นโปรตีนกระตุ้นการเกิดโพลีเมอไรเซชันของสายแฟลเจลลาที่สมบูรณ์ แม้ว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* และยีน *fliD* เชื้อ *H. pylori* ยังสามารถสร้างสายแฟลเจลลาได้ แต่มีองค์ประกอบที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากไม่พบโครงสร้างในส่วนของ Terminal bulbs บริเวณปลายสายแฟลเจลลา เมื่อทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว พบว่า เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* มีความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ เชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* มีความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ AGS ที่เป็นเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารเปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flaA* สามารถยึดเกาะกับเซลล์ AGS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ตรงกันข้ามกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *fliD* ที่สามารถยึดเกาะกับเซลล์ AGS สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในการทดสอบที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาผลกระทบต่อตายของเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ต่าง ๆ ร่วมกับเซลล์ AGS ที่เวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของการทำให้เซลล์ตายระหว่างเชื้อแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลาย

พันธุ์ของยีน *flaA* ทำให้เซลล์ตายได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่ายีน *flaA* มีส่วนสำคัญต่อการทำให้เซลล์เกิดพยาธิสภาพดังกล่าว

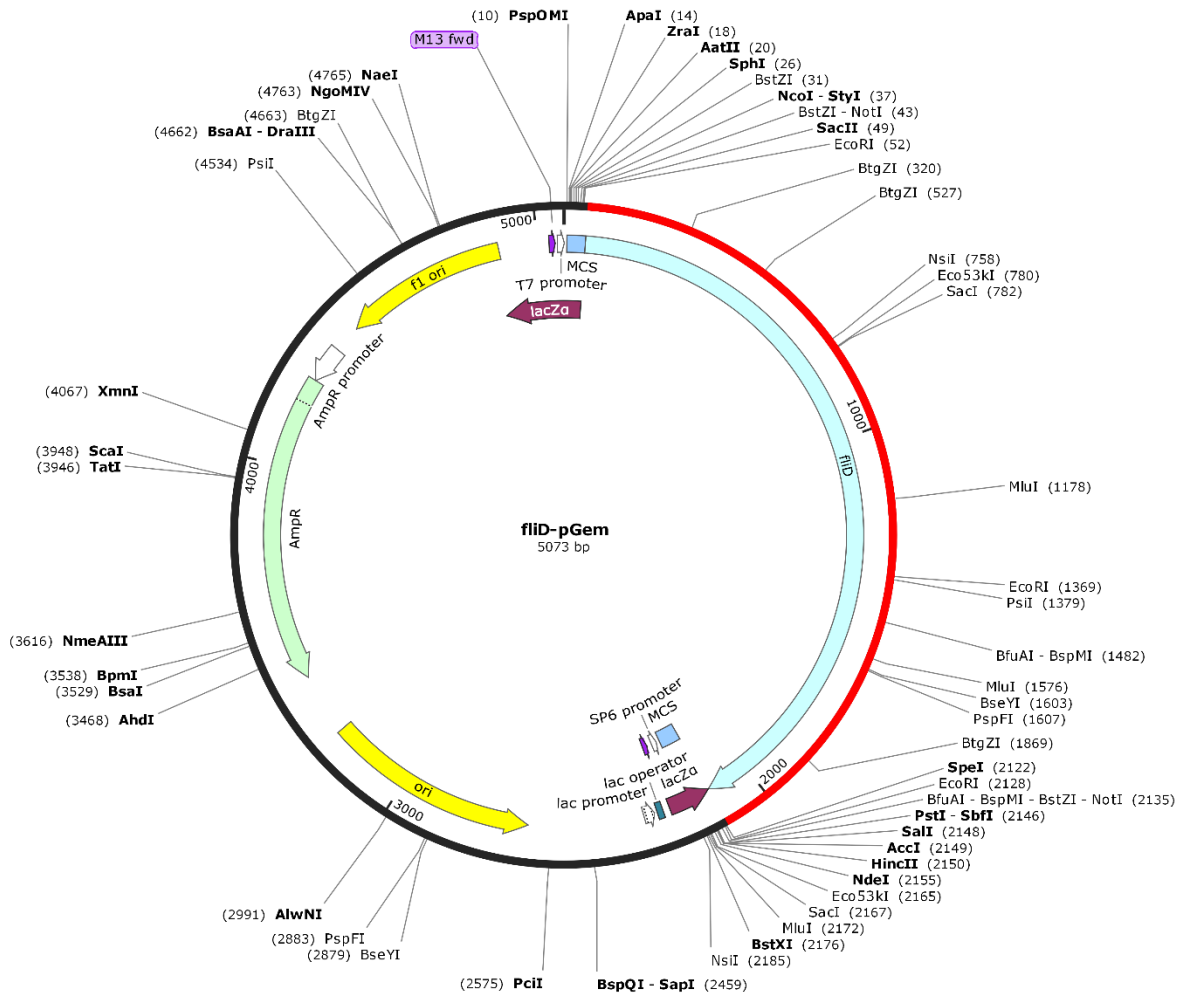
ข้อมูลจากการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่ายีน *flaA* มีอาจมีผลกระทบต่อความสมบูรณ์ของรูปร่างของแฟลเจลลา รวมไปถึงการมีส่วนในการสนับสนุนปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *H. pylori* ทั้งการเคลื่อนที่ การยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิว และการทำให้เซลล์เยื่อบุผิวตาย ในขณะที่ยีน *flid* มีผลกระทบต่อความสมบูรณ์ของรูปร่างของแฟลเจลลา และพบว่าเมื่อถูกรบกวนการแสดงออกของยีนกลับส่งผลให้ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวมีเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามเพื่อความสมบูรณ์ครบถ้วนของข้อมูลที่จะอธิบายผลกระทบของยีน *flaA* และยีน *flid* ต่อการตายของเซลล์ AGS จึงควรมีการทดสอบเพิ่มเติมด้วยเชื้อสายพันธุ์ที่มีการทดแทนด้วยยีนดังกล่าวทั้งสอง รวมไปถึงการทดสอบเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลกระทบต่อยีนหรือวิถีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตายของเซลล์ และการศึกษาในสัตว์ทดลองซึ่งมีความซับซ้อนและใกล้เคียงกับกลไกที่เกิดขึ้นจริงในธรรมชาติ

บทที่ 7
ภาคผนวก

7.1 แผนที่ยีนของพลาสมิดที่ใช้ในการสร้าง *H. pylori* สายพันธุ์ที่ได้รับยีน *flaA* และ *flid* ทดแทน



รูปที่ 23 แสดงโครงสร้างของ complementary พลาสมิด pGEM®T-Easy vector ที่มีชิ้นส่วนของยีน *flaA* ที่ใช้ในการสร้างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ได้รับยีน *flaA* ทดแทน



รูปที่ 24 แสดงโครงสร้างของ complementary พลาสมิด pGEM® T-Easy vector ที่มีชิ้นส่วนของยีน *flid* ที่ใช้ในการสร้างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ได้รับยีน *flid* ทดแทน

7.2 ข้อมูลการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ 10 % FBS

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ 10 % FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จำนวนเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ		เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504	เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>flaA</i>	เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fljD</i>
การทดสอบครั้งที่ 1	หลุมที่ 1	5.4×10^6 CFU	5.8×10^6 CFU	5.6×10^6 CFU
	หลุมที่ 2	5.6×10^6 CFU	5.1×10^6 CFU	5.2×10^6 CFU
การทดสอบครั้งที่ 2	หลุมที่ 1	5.8×10^6 CFU	5.6×10^6 CFU	5.5×10^6 CFU
	หลุมที่ 2	6.2×10^6 CFU	5.9×10^6 CFU	6.1×10^6 CFU

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนผสมของ 10 % FBS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จำนวนเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ		เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504	เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>flaA</i>	เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>fljD</i>
การทดสอบครั้งที่ 1	หลุมที่ 1	6.1×10^6 CFU	5.8×10^6 CFU	6.2×10^6 CFU
	หลุมที่ 2	6.4×10^6 CFU	6.5×10^6 CFU	5.9×10^6 CFU
การทดสอบครั้งที่ 2	หลุมที่ 1	6.6×10^6 CFU	6.7×10^6 CFU	6.8×10^6 CFU
	หลุมที่ 2	5.8×10^6 CFU	6.1×10^6 CFU	6.3×10^6 CFU

7.3 ผลการทดสอบ Adhesion assay ด้วยวิธีการวัดความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ และการนับจำนวนโคโลนี ของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากการทดสอบ Adhesion ที่เวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบ	เซลล์ AGS (RFU)	AGS + <i>H. pylori</i> ATCC 43504 (RFU)	AGS + <i>flaA</i> mutated <i>H. pylori</i> (RFU)	AGS + <i>fliD</i> mutated <i>H. pylori</i> (RFU)
ครั้งที่ 1	347	5,261	4,255	5,842
	369	5,294	4,279	5,703
ครั้งที่ 2	358	4,903	4,149	5,322
	346	4,460	3,911	5,222
ครั้งที่ 3	325	4,424	4,076	4,862
	347	4,671	4,089	4,890
ครั้งที่ 4	358	4,479	3,591	5,120
	312	4,612	3,668	5,056

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากการทดสอบ Adhesion ที่เวลา 48 ชั่วโมง

การทดสอบ	เซลล์ AGS (RFU)	AGS + <i>H. pylori</i> ATCC 43504 (RFU)	AGS + <i>flaA</i> mutated <i>H. pylori</i> (RFU)	AGS + <i>fliD</i> mutated <i>H. pylori</i> (RFU)
ครั้งที่ 1	375	5,753	4,564	6,100
	361	5,355	4,246	6,279
ครั้งที่ 2	324	5,789	4,364	6,364
	378	5,729	4,643	6,454
ครั้งที่ 3	359	5,751	4,752	6,376
	324	5,762	4,549	6,290
ครั้งที่ 4	374	5,754	4,315	6,171
	389	5,536	4,570	6,353

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นับได้จากการทดสอบ Adhesion ที่เวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบ	AGS + <i>H. pylori</i> ATCC 43504 ($\times 10^5$ CFU)	AGS + <i>flaA</i> mutated <i>H. pylori</i> ($\times 10^5$ CFU)	AGS + <i>fliD</i> mutated <i>H. pylori</i> ($\times 10^5$ CFU)
ครั้งที่ 1	5.5	4.1	6.2
	5.3	4.4	5.9
ครั้งที่ 2	6.7	4.8	6.9
	6.1	4.5	7.4

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นับได้จากการทดสอบ Adhesion ที่เวลา 48 ชั่วโมง

การทดสอบ	AGS + <i>H. pylori</i> ATCC 43504 ($\times 10^5$ CFU)	AGS + <i>flaA</i> mutated <i>H. pylori</i> ($\times 10^5$ CFU)	AGS + <i>fliD</i> mutated <i>H. pylori</i> ($\times 10^5$ CFU)
ครั้งที่ 1	5.8	4.7	6.8
	5.6	4.9	6.2
ครั้งที่ 2	6.5	4.4	7.1
	6.9	4.8	7.3

7.4 ผลการทดสอบการตายของเซลล์ AGS ที่ติดเชื้อ *H. pylori* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยการย้อมสี AnnexinV/PI และวัดสัญญาณด้วย flow cytometry

ตารางที่ 10 แสดงร้อยละของประชากรเซลล์แยกตามจตุภาคจากการทดสอบการตายของเซลล์ AGS ด้วย flow cytometry ที่เวลาเพาะเลี้ยงรวม 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างทดสอบ	จตุภาค 1 (UL,Q1)	จตุภาค 2 (UR,Q2)	จตุภาค 3 (LL,Q3)	จตุภาค 4 (LR,Q4)
เซลล์ AGS	2.76	1.43	95.27	0.54
	2.95	1.48	95.00	0.57
	2.31	1.52	95.53	0.64
	2.45	1.32	95.69	0.54
	2.54	1.44	95.38	0.64
	2.34	1.56	95.68	0.42
AGS + 200 $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2$	11.41	8.20	55.96	24.43
	11.61	8.11	53.06	27.22
	10.48	7.04	65.28	17.20
	10.64	6.88	65.96	16.52
	10.11	6.31	64.62	18.96
	10.02	6.71	66.08	17.19

ตัวอย่างทดสอบ	จุดภาค 1 (UL,Q1)	จุดภาค 2 (UR,Q2)	จุดภาค 3 (LL,Q3)	จุดภาค 4 (LR,Q4)
AGS + <i>H. pylori</i> ATCC 43504	8.42	1.39	88.22	1.97
	8.21	1.43	88.48	1.88
	7.54	1.24	89.95	1.27
	7.71	1.23	89.67	1.39
	6.87	1.14	90.51	1.48
	7.02	1.11	90.43	1.44
AGS + <i>flaA</i> mutated <i>H.</i> <i>pylori</i>	8.04	1.37	88.60	1.99
	9.14	1.41	87.52	1.93
	6.47	0.54	91.70	1.29
	6.98	0.58	91.13	1.31
	6.55	0.88	91.15	1.42
	7.29	0.72	90.53	1.46
AGS + <i>fliD</i> mutated <i>H.</i> <i>pylori</i>	9.11	1.64	87.37	1.88
	9.03	1.56	87.36	2.05
	8.11	1.47	89.00	1.42
	8.22	1.62	88.58	1.58
	7.51	1.11	90.23	1.15
	7.66	1.19	90.08	1.07

ตารางที่ 11 แสดงร้อยละของประชากรเซลล์แยกตามจุดภาคจากการทดสอบการตายของเซลล์ AGS ด้วย flow cytometry ที่เวลาเพาะเลี้ยงรวม 48 ชั่วโมง

ตัวอย่างทดสอบ	จุดภาค 1 (UL,Q1)	จุดภาค 2 (UR,Q2)	จุดภาค 3 (LL,Q3)	จุดภาค 4 (LR,Q4)
เซลล์ AGS	3.62	1.97	93.74	0.67
	3.34	1.82	94.09	0.75
	2.87	1.11	95.77	0.25
	2.74	1.38	95.57	0.31
	3.11	1.68	94.92	0.29
	2.97	1.32	95.44	0.27
AGS + 200 $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2$	13.72	6.59	53.15	26.54
	13.64	5.78	56.40	24.18
	11.14	5.27	61.28	22.31
	12.65	5.42	61.98	19.95
	11.28	6.87	61.98	19.87
	10.24	5.49	64.26	20.01
AGS + <i>H. pylori</i> ATCC 43504	27.98	5.01	65.25	1.76
	29.41	5.37	63.54	1.68
	28.54	6.47	63.82	1.17

ตัวอย่างทดสอบ	จุดภาค 1 (UL,Q1)	จุดภาค 2 (UR,Q2)	จุดภาค 3 (LL,Q3)	จุดภาค 4 (LR,Q4)
AGS + <i>H. pylori</i> ATCC 43504	25.65	6.19	66.89	1.27
	22.39	5.41	70.87	1.33
	27.78	5.22	65.59	1.41
AGS + <i>flaA</i> mutated <i>H.</i> <i>pylori</i>	15.47	3.08	79.31	2.14
	16.51	3.27	77.70	2.52
	19.64	2.47	76.13	1.76
	18.29	2.22	77.54	1.95
	13.07	2.01	83.20	1.72
	14.41	2.19	81.75	1.65
AGS + <i>fljD</i> mutated <i>H.</i> <i>pylori</i>	28.14	6.84	63.68	1.31
	32.55	6.94	58.84	1.67
	24.84	5.88	57.81	1.47
	28.34	5.72	64.33	1.61
	25.67	5.44	67.58	1.31
	29.31	5.38	64.12	1.19

บรรณานุกรม

1. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med. 2002;347(15):1175-86.
2. Kuipers E, Thijs J, Festen H. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. Aliment Pharmacol Ther. 1995;9:59-69.
3. Fock KM, Ang TL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. J Clin Gastroenterol Hepatol. 2010;25(3):479-86.
4. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. Am J Surg Pathol. 1995;19:S37-43.
5. Kusters JG, Van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19(3):449-90.
6. Goodwin CS, Mendall MM, Northfield TC. *Helicobacter pylori* infection. Lancet Microbe. 1997;349(9047):265-9.
7. Hahm K, Lee K, Kim J, Cho S, Chung M. *Helicobacter pylori* infection, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. Dig Dis Sci. 1998;43(9 Suppl):72S-7S.
8. McColl KE, El-Omar E, Gillen D. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. Gastroenterol Clin North Am. 2000;29(3):687-703.
9. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995;267(5203):1456-62.
10. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Essential cell biology: Garland Science; 2013.
11. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. 2008;134(1):306-23.
12. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770.

13. Salamone GV, Petracca Y, Bass JIF, Rumbo M, Nahmod KA, Gabelloni ML, et al. Flagellin delays spontaneous human neutrophil apoptosis. *Lab. Invest.* 2010;90(7):1049.
14. Sipponen P, Hyvärinen H. Role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol.* 1993;28(sup196):3-6.
15. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet Microbe.* 1983;321(8336):1273-5.
16. Steer H. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol.* 1975;28(8):639-46.
17. Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest.* 2001;107(7):767.
18. Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice E-Book: Elsevier Health Sciences; 2011.*
19. Ryan KJ, Ray CG. *Medical microbiology. McGraw Hill.* 2004;4:370.
20. Mobley H, Hu L-T, Foxall P. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. *Scand J Gastroenterol.* 1991;26(sup187):39-46.
21. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou P-H, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med.* 1991;325(16):1132-6.
22. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet Microbe.* 1991;338(8776):1175-6.
23. Kuipers E, Peña A, Festen H, Meuwissen S, Uytterlinde A, Roosendaal R, et al. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet Microbe.* 1995;345(8964):1525-8.
24. Zhang Z-W, Farthing MJ. Molecular mechanisms of *H. pylori* associated gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5(5):369.

25. Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect.* 2000;2(1):55-60.
26. Müller A, Solnick JV. Inflammation, immunity, and vaccine development for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2011;16(s1):26-32.
27. Goh KL, Chan WK, Shiota S, Yamaoka Y. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter.* 2011;16(s1):1-9.
28. Momtaz H, Souod N, Dabiri H, Sarshar M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World J Gastroenterol.* 2012;18(17):2105.
29. Hulten K, Han S, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, et al. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology.* 1996;110(4):1031-5.
30. Park S, Mackay W, Reid D. *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Res.* 2001;35(6):1624-6.
31. Ottemann KM, Lowenthal AC. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun.* 2002;70(4):1984-90.
32. Gu H. Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Curr Microbiol.* 2017;74(7):863-9.
33. Rust M, Schweinitzer T, Josenhans C. *Helicobacter* flagella, motility and chemotaxis. *Helicobacter pylori* Molecular Genetics and Cellular Biology. 2008:61-86.
34. Kim JS, Chang JH, Chung SI, Yum JS. Molecular Cloning and Characterization of the *Helicobacter pylori* *fljD* Gene, an Essential Factor in Flagellar Structure and Motility. *J Bacteriol.* 1999;181(22):6969-76.
35. McGEE DJ, Coker C, Testerman TL, Harro JM, Gibson SV, Mobley HL. The *Helicobacter pylori* *flbA* flagellar biosynthesis and regulatory gene is required for motility and virulence and modulates urease of *H. pylori* and *Proteus mirabilis*. *J Med Microbiol.* 2002;51(11):958-70.

36. Suerbaum S. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. Trends Microbiol. 1995;3(5):168-70.
37. Odenbreit S, Swoboda K, Barwig I, Ruhl S, Borén T, Koletzko S, et al. Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. Infect Immun. 2009;77(9):3782-90.
38. Evans DJ, Evans DG. *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. Helicobacter. 2000;5(4):183-95.
39. Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science. 2000;287(5457):1497-500.
40. Eskandari-Nasab E, Sepanjnia A, Moghadampour M, Hadadi-Fishani M, Rezaeifar A, Asadi-Saghandi A, et al. Circulating levels of interleukin (IL)-12 and IL-13 in *Helicobacter pylori*-infected patients, and their associations with bacterial CagA and VacA virulence factors. Scand J Infect Dis. 2013;45(5):342-9.
41. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat Rev Microbiol. 2005;3(4):320-32.
42. Asaka M, Kato M, Sakamoto N. Roadmap to eliminate gastric cancer with *Helicobacter pylori* eradication and consecutive surveillance in Japan. J Gastroenterol. 2014;49(1):1-8.
43. Safaei HG, Rahimi E, Zandi A, Rashidipour A. *Helicobacter pylori* as a zoonotic infection: the detection of *H. pylori* antigens in the milk and faeces of cows. J Res Med Sci. 2011;16(2):184.
44. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis. 2006;6(11):699-709.

45. Cancer IAfRo. IARC monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon; 1994.
46. SESSION D. International programme on chemical safety. 2009.
47. Vilaichone R-K, Mahachai V, Graham DY. *Helicobacter pylori* diagnosis and management. Gastroenterol Clin. 2006;35(2):229-47.
48. Fock KM, Talley N, Moayyedi P, Hunt R, Azuma T, Sugano K, et al. Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention. J Gastroenterol Hepatol. 2008;23(3):351-65.
49. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. N Engl J Med. 1995;333(1):32-41.
50. Mahachai V, Vilaichone R. Current status of *Helicobacter pylori* infection in Thailand. *Helicobacter Res*. 2011;15:38-44.
51. Ming SC. Gastric carcinoma: a pathobiological classification. Cancer. 1977;39(6):2475-85.
52. Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* infection: a clinical overview. Dig Liver Dis. 2008;40(8):619-26.
53. De Vries A, Kuipers E. *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther. 2007;26:25-35.
54. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut. 2007;56(6):772-81.
55. Fock KM, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, Talley NJ, et al. Second Asia-Pacific consensus guidelines for *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24(10):1587-600.
56. Chey WD, Wong BC, Gastroenterology PPCotACo. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol. 2007;102(8):1808-25.

57. Gisbert J, Calvet X. Review article: non-bismuth quadruple (concomitant) therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. 2011;604-17.
58. MOLINA-INFANTE J, Perez-Gallardo B, Fernandez-Bermejo M, Hernandez-Alonso M, Vinagre G, Dueñas C, et al. Clinical trial: clarithromycin vs. levofloxacin in first-line triple and sequential regimens for *Helicobacter pylori* eradication. Aliment Pharmacol Ther. 2010;31(10):1077-84.
59. Chang W-L, Yeh Y-C, Sheu B-S. The impacts of *H. pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. J Biomed Sci. 2018;25(1):1-9.
60. Spohn G, Scarlato V. Motility, chemotaxis, and flagella. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics: ASM Press; 2001.
61. Morimoto YV, Minamino T. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. Biomolecules. 2014;4(1):217-34.
62. Tsang J, Hoover TR. Basal body structures differentially affect transcription of RpoN-and FliA-dependent flagellar genes in *Helicobacter pylori*. J Bacteriol. 2015;197(11):1921-30.
63. Macnab RM, Ornston MK. Normal-to-curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling. Stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. J Mol Biol. 1977;112(1):1-30.
64. Ueno T, Oosawa K, Aizawa S-I. M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. J Mol Biol. 1992;227(3):672-7.
65. Suzuki H, Yonekura K, Namba K. Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. J Mol Biol. 2004;337(1):105-13.
66. Khan IH, Reese TS, Khan S. The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(13):5956-60.

67. Francis NR, Sosinsky GE, Thomas D, DeRosier DJ. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol.* 1994;235(4):1261-70.
68. Yamaguchi S, Aizawa S-I, Kihara M, Isomura M, Jones C, Macnab R. Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol.* 1986;168(3):1172-9.
69. Wilson ML, Macnab RM. Co-overproduction and localization of the *Escherichia coli* motility proteins motA and motB. *J Bacteriol.* 1990;172(7):3932-9.
70. Blair DF, Berg HC. Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science.* 1988;242(4886):1678-81.
71. Block SM, Berg HC. Successive incorporation of force-generating units in the bacterial rotary motor. *Nature.* 1984;309(5967):470-2.
72. Zhou J, Lloyd SA, Blair DF. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(11):6436-41.
73. Berg HC. Torque generation by the flagellar rotary motor. *Biophys J.* 1995;68(4 Suppl):163S.
74. Minamino T, Macnab RM. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol.* 1999;181(5):1388-94.
75. Schmitz A, Josenhans C, Suerbaum S. Cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *flbA* gene, which codes for a membrane protein involved in coordinated expression of flagellar genes. *J Bacteriol.* 1997;179(4):987-97.
76. Foyne S, Dorrell N, Ward SJ, Zhang ZW, McColm AA, Farthing MJ, et al. Functional analysis of the roles of FliQ and FlhB in flagellar expression in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol.* 1999;174(1):33-9.

77. Ryan KA, Karim N, Worku M, Penn CW, O'Toole PW. *Helicobacter pylori* flagellar hook-filament transition is controlled by a Flk functional homolog encoded by the gene HP0906. *J Bacteriol.* 2005;187(16):5742-50.
78. Ohnishi K, Ohto Y, Aizawa S, Macnab RM, Iino T. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1994;176(8):2272-81.
79. Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol.* 1993;175(11):3278-88.
80. Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol.* 1995;177(11):3010-20.
81. Eaton K, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun.* 1996;64(7):2445-8.
82. Spohn G, Scarlato V. Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J Bacteriol.* 1999;181(2):593-9.
83. Niehus E, Gressmann H, Ye F, Schlapbach R, Dehio M, Dehio C, et al. Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 2004;52(4):947-61.
84. Brahmachary P, Dashti MG, Olson JW, Hoover TR. *Helicobacter pylori* FlgR is an enhancer-independent activator of σ^{54} -RNA polymerase holoenzyme. *J Bacteriol.* 2004;186(14):4535-42.

85. Tomb J-F, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1997;388(6642):539-47.
86. Yokoseki T, Kutsukake K, Ohnishi K. Functional analysis of the flagellar genes in the *fliD* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*. 1995;141(7):1715-22.
87. Tang R-X, Luo D-J, Sun A-H, Yan J. Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies. *World J Gastroenterol*. 2008;14(30):4816.
88. Tian W, Jia Y, Yuan K, Huang L, Nadolny C, Dong X, et al. Serum Antibody Against *Helicobacter pylori* FlaA and Risk of Gastric Cancer. *Helicobacter*. 2014;19(1):9-16.
89. Li H, Zhang B, Hu X, Dong Y, Fan Q, Guo F, et al. Serum *Helicobacter pylori* Flid antibody and the risk of gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7(16):22397.
90. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1415-30.
91. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet*. 1993;341(8855):1251-4.
92. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
93. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol*. 2005;84(10):627-39.
94. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(3):325-31.
95. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997;88(3):355-65.
96. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;1309-12.
97. Kam P, Ferch N. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*. 2000;55(11):1081-93.
98. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 2004;73.
99. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326(1):1-16.

100. Ryoo HD, Bergmann A. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(8):a008797.
101. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.* 2003;7(3):249-57.
102. Lee JM, Bernstein A. Apoptosis, cancer and the *p53* tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev.* 1995;14(2):149-61.
103. Debatin K-M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53(3):153-9.
104. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 2001;411(6835):342.
105. Xia HH-X, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(1):16-26.
106. Canman CE, Kastan MB. Role of *p53* in apoptosis. *Adv Pharmacol.* 1997;41:429-60.
107. Triantafyllidis J, Cheracakis P. Gastric Cancer: recent developments in its etiology and pathogenesis. *Ann Gastroenterol.* 2003;16:12-9.
108. Zeng H, Wu H, Sloane V, Jones R, Yu Y, Lin P, et al. Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290(1):G96-G108.
109. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001;410(6832):1099.
110. Ishii K, Adachi T, Imamura K, Takano S, Usui K, Suzuki K, et al. *Serratia marcescens* induces apoptotic cell death in host immune cells via a lipopolysaccharide-and flagella-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2012;287(43):36582-92.

111. Vijay-Kumar M, Wu H, Jones R, Grant G, Babbin B, King TP, et al. Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am J Pathol*. 2006;169(5):1686-700.
112. Xu Y, Wu D, Fan Y, Li P, Du H, Shi J, et al. Novel recombinant protein FlaA N/C increases tumor radiosensitivity via NF- κ B signaling in murine breast cancer cells. *Oncol Lett*. 2016;12(4):2632-40.
113. Hunt RH, Tytgat G. *Helicobacter pylori: Basic Mechanisms to Clinical Cure* 1998: SSBM; 2012.
114. Peek Jr RM, Moss SF, Wang S, Holt PR, Tham KT, Blaser MJ, et al. *Helicobacter pylori cagA+* strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(12):863-8.
115. Moss S, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt P. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut*. 1996;38(4):498-501.
116. Zhao Q, Yin W, Zhao R, Wang Y, Song C, Wang H, et al. Outer inflammatory protein of *Helicobacter pylori* impacts IL-8 expression, adherence, cell apoptosis and cell cycle of gastric cells independent of its copy number. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(5):621-30.
117. Ratthawongjirakul P, Thongkerd V, Chaicumpa W. The impacts of a *fljD* mutation on the biofilm formation of *Helicobacter pylori*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2016;6(12):1008-14.
118. Heuermann D, Haas R. A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol Gen Genet*. 1998;257(5):519-28.
119. Wang Y, Roos KP, Taylor DE. Transformation of *Helicobacter pylori* by chromosomal metronidazole resistance and by a plasmid with a selectable chloramphenicol resistance marker. *Microbiology*. 1993;139(10):2485-93.

120. Hofreuter D, Odenbreit S, Henke G, Haas R. Natural competence for DNA transformation in *Helicobacter pylori*: identification and genetic characterization of the *comB* locus. *Mol Microbiol.* 1998;28(5):1027-38.
121. Smeets LC, Kusters JG. Natural transformation in *Helicobacter pylori*: DNA transport in an unexpected way. *Trends Microbiol.* 2002;10(4):159-62.
122. Forbes L. Rapid flagella stain. *J Clin Microbiol.* 1981;13(4):807.
123. Piccolomini R, Di Bonaventura G, Neri M, Di Girolamo A, Catamo G, Pizzigallo E. Usefulness of Leifson staining method in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Microbiol.* 1999;37(1):199-201.
124. Han L, Xia X, Xiang X, Huang F, Zhang Z. Protective effects of canolol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in AGS cells. *RSC Adv.* 2017;7(68):42826-32.
125. Lin C-H, Wu C-Y, Kou H-S, Chen C-Y, Huang M-C, Hu H-M, et al. Effect of Di (2-ethylhexyl) phthalate on *Helicobacter pylori*-Induced Apoptosis in AGS Cells. *Gastroenterol Res Prac.* 2013;2013.
126. Polk DB, Peek RM. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nature Rev Cancer.* 2010;10(6):403-14.
127. Uchida T, Miftahussurur M, Pittayanon R, Vilaichone R-k, Wisedopas N, Ratanachuek T, et al. *Helicobacter pylori* infection in Thailand: a nationwide study of the CagA phenotype. *PloS One.* 2015;10(9):e0136775.
128. Liu Z, Xu X, Chen L, Li W, Sun Y, Zeng J, et al. *Helicobacter pylori* CagA inhibits the expression of Runx3 via Src/MEK/ERK and p38 MAPK pathways in gastric epithelial cell. *J Cell Biochem.* 2012;113(3):1080-6.
129. Xu X, Liu Z, Fang M, Yu H, Liang X, Li X, et al. *Helicobacter pylori* CagA induces ornithine decarboxylase upregulation via Src/MEK/ERK/c-Myc pathway: implication for progression of gastric diseases. *Exp Biol Med.* 2012;237(4):435-41.

130. Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(26):9300-5.
131. Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U, Fox JG, Rogers AB, et al. Activation of β -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(30):10646-51.
132. Song X, Xin N, Wang W, Zhao C. Wnt/ β -catenin, an oncogenic pathway targeted by *H. pylori* in gastric carcinogenesis. Oncotarget. 2015;6(34):35579.
133. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Sci. 2005;96(12):835-43.
134. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nature Rev Cancer. 2004;4(9):688-94.
135. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:92.
136. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Mégraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DMDM, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 1999;116(4):823-30.
137. Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, et al. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. EMBO J. 2000;19(23):6361-70.
138. Willhite DC, Cover TL, Blanke SR. Cellular vacuolation and mitochondrial cytochrome c release are independent outcomes of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin activity that are each dependent on membrane channel formation. J Biol Chem. 2003;278(48):48204-9.
139. Yamasaki E, Wada A, Kumatori A, Nakagawa I, Funao J, Nakayama M, et al. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins

Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation. *J Biol Chem.* 2006;281(16):11250-9.

140. Lan CH, Sheng JQ, Fang DC, Meng QZ, Fan LL, Huang ZR. Involvement of VDAC1 and Bcl-2 family of proteins in VacA-induced cytochrome c release and apoptosis of gastric epithelial carcinoma cells. *J Dig Dis.* 2010;11(1):43-9.

141. Lindholm C, Quiding-Järbrink M, Lönroth H, Hamlet A, Svennerholm A-M. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun.* 1998;66(12):5964-71.

142. Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth H-P, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001;107(5):611-20.

143. Zarei M, Mosayebi G, Khansarinejad B, Abtahi H. Antigenic and immunogenic evaluation of *Helicobacter pylori* FlaA epitopes. *Iran J Basic Med Sci.* 2017;20(8):920.

144. Haas R, Meyer TF, van Putten JP. Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol.* 1993;8(4):753-60.

145. Israel DA, Lou AS, Blaser MJ. Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;186(2):275-80.

146. Hofreuter D, Karnholz A, Haas R. Topology and membrane interaction of *Helicobacter pylori* ComB proteins involved in natural transformation competence. *Int J Med Microbiol.* 2003;293(2-3):153-65.

147. Nedenskov-Sørensen P, Bukholm G, Bøvre K. Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis.* 1990;161(2):365-6.

148. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta histochem.* 2018;120(4):303-11.

149. Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miörner H. Use of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1998;36(5):1214-9.
150. Li J, Song L. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycologia*. 2007;46(5):593-9.
151. Kao C-Y, Sheu B-S, Wu J-J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J*. 2016;39(1):14-23.
152. Kao CY, Sheu BS, Sheu SM, Yang HB, Chang WL, Cheng HC, et al. Higher motility enhances bacterial density and inflammatory response in dyspeptic patients infected with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2012;17(6):411-6.
153. Bansil R, Celli J, Hardcastle J, Turner B. The influence of mucus microstructure and rheology in *Helicobacter pylori* infection. *Front Immunol*. 2013;4:310.
154. McGee DJ, Langford ML, Watson EL, Carter JE, Chen Y-T, Ottemann KM. Colonization and inflammation deficiencies in Mongolian gerbils infected by *Helicobacter pylori* chemotaxis mutants. *Infect Immun*. 2005;73(3):1820-7.
155. Osaki T, Hanawa T, Manzoku T, Fukuda M, Kawakami H, Suzuki H, et al. Mutation of *luxS* affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. *J Med Microbiol*. 2006;55(11):1477-85.
156. Mishra J, Panigrahi S. A study of changes in stomach wall at sites other than the ulcer in chronic duodenal ulcer patients. *Indian J Surg*. 2011;73(4):262-3.
157. Nakajima K, Inatsu S, Mizote T, Nagata Y, Aoyama K, Fukuda Y, et al. Possible involvement of *putA* gene in *Helicobacter pylori* colonization in the stomach and motility. *Biomed Res*. 2008;29(1):9-18.

158. Arora SK, Dasgupta N, Lory S, Ramphal R. Identification of two distinct types of flagellar cap proteins, FliD, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 2000;68(3):1474-9.
159. Sheu S-M, Cheng H, Kao C-Y, Yang Y-J, Wu J-J, Sheu B-S. Higher glucose level can enhance the *H. pylori* adhesion and virulence related with type IV secretion system in AGS cells. *J Biomed Sci*. 2014;21(1):96.
160. Skindersoe ME, Rasmussen L, Andersen LP, Krogfelt KA. A Novel Assay for Easy and Rapid Quantification of *Helicobacter pylori* Adhesion. *Helicobacter*. 2015;20(3):199-205.
161. Niehues M, Hensel A. In-vitro interaction of l-dopa with bacterial adhesins of *Helicobacter pylori*: an explanation for clinical differences in bioavailability? *J Pharm Pharmacol*. 2009;61(10):1303-7.
162. Lillehoj EP, Kim BT, Kim KC. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol*. 2002;282(4):L751-L6.
163. Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect Immun*. 1998;66(3):1000-7.
164. Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. *Infect Immun*. 2011;79(10):4061-7.
165. Yokoseki T, Iino T, Kutsukake K. Negative regulation by *fliD*, *fliS*, and *fliT* of the export of the flagellum-specific anti-sigma factor, FlgM, in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. 1996;178(3):899-901.
166. Kutsukake K, Ohya Y, Iino T. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. 1990;172(2):741-7.

167. Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, Rittig MG, Hardie KR, Atherton JC. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *J Med Microbiol.* 2008;57(2):145-50.
168. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184(1):39-51.
169. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(11):pdb. prot087288.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ณัฐวุฒิ วิเวโก
วัน เดือน ปี เกิด	23 มีนาคม 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	49 ซอยบางแวก 2 แขวงบางแวก เขต ภาษีเจริญ กรุงเทพฯ 10160

