



การศึกษาเปรียบเทียบไมโครไบโอมในน้ำลายจากผู้ป่วยสูงอายุคนไทยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ ผู้ป่วยที่มีการรู้คิดบกพร่องบกพร่องเล็กน้อยและกลุ่มคนสุขภาพดี
 ณรงค์ฤทธิ์ ศรีธนะ วท.ด., อติทยา พึ่งพิณิจ วท.บ.

งานห้องปฏิบัติการวิจัยระดับโมเลกุลและจีโนม ฝ่ายห้องปฏิบัติการและเครื่องมือกลาง
 เพื่อสนับสนุนการวิจัย ศูนย์การเรียนรู้และวิจัยเฉลิมพระเกียรติ 60 ปี เจ้าฟ้าจุฬาภรณ
 ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ แขวงทุ่งสองห้อง เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ 10210

**The Study of Salivary Microbiome from Thai Elderly Patients with
 Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Healthy Control**

Narongrit Sritana, Ph.D., Atitaya Phungpinij, B.Sc.

Molecular and Genomics Research Laboratory, Centre of Learning and
 Research in Celebration of HRH Princess Chulabhorn's 60th Birthday
 Anniversary, Chulabhorn Royal Academy, Thung Song Hong, Lak Si,
 Bangkok, 10210, Thailand

Corresponding Author: Narongrit Sritana (E-mail: narongrit.sri@cra.ac.th)

(Received: 30 July, 2024; Revised: 2 October, 2024; Accepted: 21 January, 2025)

Abstract

Background: Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease that mainly affects the elderly population. The variation of microbiome in mouth may have an impact on the brain. However, the relationship between the oral microbiome and neurodegenerative diseases such as AD, remain unclear.

Objectives: This study interested to compare the differences in microbiome from saliva of elderly people diagnosed with AD, mild cognitive impairment (MCI) and healthy controls. **Methods:** Saliva samples and clinical data from 10 AD patients, 46 MCI patients, and 44 healthy elderly subjects, were collected and analyzed using long-read next generation sequencing (NGS). In addition, bioinformatic analysis including, QIIME version qiime2, Linear discriminant analysis (LDA) and LDA effect size were performed in this study.

Results: AD patients had Clinical Dementia Rating, Montreal Cognitive Assessment and Mini-mental Status Examination were lower than the MCI group. In addition, the AD patient group had a higher microbial diversity than the MCI and control groups. Moreover, AD patients had number of microorganisms including, Fusobacteriaceae and Fusobacterium, that increased significantly ($p < .05$) compared to samples from the control group (4.53 ± 3.2 and 2.60 ± 1.8 for AD and control, respectively). Interestingly, it was found that samples from AD patients had significantly lower number of Prevotella histicola than samples from the control group ($p < .05$) (1.10 ± 1.4 and 5.36 ± 5.4 for AD and control, respectively). **Conclusions:** The long-read NGS analysis to study oral microbial biomarkers in the elderly may be useful in indicating risk of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, Mild cognitive impairment, Elderly people, Microbiome, Next-generation sequencing

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: โรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) เป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมของระบบประสาทซึ่งส่วนใหญ่ส่งผลกระทบต่อประชากรสูงอายุ การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ (ไมโครไบโอม) ในช่องปากและอาจมีผลกระทบต่อสมองได้ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างไมโครไบโอมในช่องปากและโรคเกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาท เช่น AD

ยังมีการศึกษาวิจัยที่ไม่มากนัก **วัตถุประสงค์:** เพื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์หรือไมโครไบโอมจากตัวอย่างน้ำลายของผู้สูงอายุที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค AD ผู้ที่มีความบกพร่องทางสติปัญญาเล็กน้อย (mild cognitive impairment; MCI) และกลุ่มควบคุมที่สุขภาพดี (control) **วิธีการ:** ทำการเก็บตัวอย่างน้ำลายจากผู้ป่วย AD 10 ราย ผู้ป่วย MCI 46 ราย และผู้สูงอายุที่มีสุขภาพดี 44 ราย นำมาตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบผลทางคลินิก และความแตกต่างของไมโครไบโอมด้วยเทคนิค long-read next generation sequencing (NGS) และวิเคราะห์ทาง bioinformatics ด้วยโปรแกรมและกระบวนการต่าง ๆ เช่น QIIME version qiime2, linear discriminant analysis (LDA) และ LDA effect size เป็นต้น **ผล:** ผู้ป่วย AD มีคะแนน Clinical Dementia Rating, Montreal Cognitive Assessment และ Mini-mental Status Examination ต่ำกว่ากลุ่ม MCI และนอกจากนั้นกลุ่มผู้ป่วย AD ความหลากหลายของจุลินทรีย์มากกว่า MCI และกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ผู้ป่วย AD มีจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ ในระดับแฟมิลีคือ Fusobacteriaceae และจีนัส Fusobacterium ที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างจากกลุ่มควบคุม (4.53 ± 3.2 และ 2.60 ± 1.8 สำหรับ AD และ กลุ่มควบคุม คนปกติ ตามลำดับ) และที่น่าสนใจคือพบว่าตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์มีจำนวน *Prevotella histicola* น้อยกว่าตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$) (1.10 ± 1.4 และ 5.36 ± 5.4 สำหรับ AD และ กลุ่มควบคุม คนปกติ ตามลำดับ) **สรุป:** การใช้เทคนิค long-read NGS เพื่อวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในช่องปากในผู้สูงอายุ อาจมีประโยชน์ในการบอกถึงความเสี่ยงต่อการเป็นโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ได้

คำสำคัญ: โรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์, ภาวะการรู้คิดบกพร่องบกพร่องเล็กน้อย, ผู้สูงอายุ, ไมโครไบโอม, เทคโนโลยีการหาลำดับเบสที่พัฒนาขึ้นใหม่

บทนำ

โรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทที่ซับซ้อน โดยมีลักษณะพิเศษคือความบกพร่องทางสติปัญญาและความจำบกพร่อง โรคสมองเสื่อม อัลไซเมอร์ยังก่อให้เกิดข้อกังวลด้านสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทย แนวโน้มจำนวนผู้ป่วยที่เพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดความท้าทายต่อระบบการดูแลสุขภาพและสังคม โดยในประเทศไทยมีการ

คาดการณ์ว่ามีผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ประมาณ 7 ล้านคน และส่วนใหญ่ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี แสดงอาการของโรคในระยะเริ่มแรก นอกจากผลกระทบที่มีการลดลงของความจำอย่างต่อเนื่อง ทักษะทางด้านความคิด ภาษา และความสามารถในการเรียนรู้ที่เกิดกับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์เอง แต่ยังมีผลกระทบต่อครอบครัวและผู้ดูแลผู้ป่วยในวงกว้างอีกด้วย จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการจัดการกับภาวะที่เป็นอันตรายนี้¹ มีรายงานในประเทศไทยที่ศึกษาวิจัยในการพัฒนาความเข้าใจเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ เช่น การระบุการกลายพันธุ์ใหม่ในยีน APP ในคนไทยที่มีอาการสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ในระยะเริ่มแรก เผยให้เห็นถึงสาเหตุทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์² นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาวินิจฉัยหาความชุกของโรคไม่ติดต่อกันในประเทศไทย ได้แสดงผลเน้นย้ำถึงการมุ่งเน้นไปที่โรคเรื้อรังเช่นโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ โดยเน้นถึงความจำเป็นในกลยุทธ์ด้านสาธารณสุขที่ครอบคลุม เพื่อจัดการกับภาวะที่เพิ่มขึ้นของความผิดปกติทางระบบประสาทในประเทศ³ มีรายงานความพยายามในการวิจัย และนวัตกรรมเพื่อต่อสู้กับผลกระทบที่เพิ่มขึ้นของโรคอัลไซเมอร์ต่อประชากรประเทศไทย เช่น การออกแบบระบบช่วยเหลือผู้ดูแลที่ปรับให้เหมาะสมกับความต้องการของผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ เพื่อเป็นการยกระดับคุณภาพการดูแลและการสนับสนุนที่มีให้กับแต่ละบุคคล ด้วยการใช้ประโยชน์จากข้อมูลเชิงลึกจากการศึกษาทางพันธุกรรม โครงการต่าง ๆ ด้านสาธารณสุขและความก้าวหน้าในการให้บริการดูแล เพื่อให้สามารถพัฒนามาตรการแก้ไขที่ตรงเป้าหมายเพื่อปรับปรุงผลลัพธ์สำหรับผู้ป่วยที่มีชีวิตอยู่ในภาวะที่ท้าทายนี้¹

เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการผลการวิจัยที่มุ่งเน้นบทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ หรือเรียกรวม ๆ ว่าไมโครไบโอม (microbiome) มากขึ้นในการเกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ โดยตระหนักถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากชุมชนจุลินทรีย์ต่อการลุกลามของโรค⁴ จากความสัมพันธ์ของระบบประสาทส่วนกลางและระบบทางเดินอาหาร ที่เชื่อว่าการสื่อสารแบบสองทิศทางระหว่างกันโดยถือเป็นแนวทางสำคัญในการตรวจสอบอิทธิพลของชุมชนจุลินทรีย์ ที่มีต่อสภาวะทางระบบประสาท ที่อาจจะเกี่ยวข้องกับโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์⁵ นอกจากนี้ไมโครไบโอมในระบบทางเดินอาหารแล้ว ยังมีไมโครไบโอมในช่องปากที่เกี่ยวกับโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ เนื่องจากมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอมในช่องปากอาจส่งผลกระทบต่อ การเกิดและการลุกลามของโรค การวิจัยได้เน้นย้ำถึงบทบาทที่เป็นไปได้ของจุลินทรีย์ในช่องปากที่มีอิทธิพลต่อการเกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์⁶ ไมโครไบโอมในช่องปาก

ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียมากกว่า 600 สายพันธุ์ นั้นมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับสุขภาพช่องปากและสุขภาพของร่างกาย โดยชุมชนจุลินทรีย์บางส่วนมีอิทธิพลต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ได้⁷ ยังมีการศึกษาระบบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะสุขภาพช่องปาก ภาวะสมองเสื่อม และการเกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ โดยผลการศึกษชี้ให้เห็นว่าไมโครไบโอมในช่องปากอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนในการพัฒนาการดำเนินโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์⁸ ผลการศึกษาวิจัยยังชี้ให้เห็นถึงความเชื่อมโยงระหว่างโรคปริทันต์ กับการเปลี่ยนแปลงของไมโครไบโอมในช่องปาก ที่น่าจะมีผลให้เกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์⁹ องค์ประกอบของไมโครไบโอมในลำไส้และในช่องปากอาจได้รับอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญจากการเปลี่ยนแปลงการบริโภคอาหาร การวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงอาหารสามารถนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในความหลากหลายไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มหรือลดความหลากหลายขององค์ประกอบ และความคงตัวของจุลินทรีย์ในลำไส้ ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนแปลงการบริโภคอาหารที่สำคัญ เช่น การบริโภคคาร์โบไฮเดรตแปรรูปที่เพิ่มขึ้น มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญในความหลากหลาย (diversity) และองค์ประกอบของไมโครไบโอมในช่องปาก มากกว่านั้นพบว่า การปรับเปลี่ยนด้านอาหารสามารถส่งผลกระทบต่อไมโครไบโอมในลำไส้ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไมโครไบโอมในลำไส้ ซึ่งอธิบายได้จากความแปรปรวนในสารเมตาบอไลต์ในซีรัมที่มีผลมาจากอาหารนั่นเอง¹⁰

ความก้าวหน้าของ long-read next-generation sequencing ได้ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อการศึกษาเกี่ยวกับไมโครไบโอม โดยให้ข้อมูลเชิงลึกที่มีคุณค่าเกี่ยวกับความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างไมโครไบโอมในช่องปากและโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (AD) การวิจัยล่าสุด ที่รายงานถึงการใช้เทคโนโลยีการหาลำดับพันธุกรรมขั้นสูงเพื่อสำรวจชุมชนจุลินทรีย์ที่ซับซ้อนที่มีอยู่ในช่องปาก และผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อการเกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ มีการศึกษาที่ระบุว่าแบคทีเรียในช่องปากที่เฉพาะเจาะจง เช่น *Porphyromonas gingivalis* ในสมองของผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์¹¹ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความเชื่อมโยงที่อาจเกิดขึ้นระหว่างจุลินทรีย์ในช่องปากและการเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ การประยุกต์ใช้เทคนิค long-read next-generation sequencing ช่วยให้นักวิจัยสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของไมโครไบโอมในช่องปากในกลุ่มประชากรที่มีความหลากหลายได้ และทำให้เกิดความรู้

เกี่ยวกับบทบาทของจุลินทรีย์ในช่องปากในกลุ่มโรคที่มีผลกระทบหลาย ๆ ระบบร่างกายอย่างโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ได้¹²

ในประเทศไทยนั้น การทำความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างไมโครไบโอมในลำไส้และโรคอัลไซเมอร์ยังมีไม่มากนัก ทั้งลักษณะสังคม อาหารและสิ่งแวดล้อมแตกต่างจากประเทศอื่น ๆ ทำให้คาดว่าจะมีความแตกต่างของไมโครไบโอมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของคนไทยกับประชากรของประเทศอื่น ๆ โดยเฉพาะโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ ดังนั้นหากมีการศึกษาดังกล่าวนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในการเข้าใจถึงความสัมพันธ์ของไมโครไบโอมและกลไกการเกิดโรค รวมถึงแนวทางการดูแลสุขภาพผู้ป่วยโรคดังกล่าว และถือเป็นการส่งเสริมการเรียนรู้และพัฒนาคุณภาพประชากรในวัยสูงอายุของประเทศไทยให้ดียิ่งขึ้นในอนาคต

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ (รทส EC No.043/2560) ทำการเก็บตัวอย่างน้ำลายจากผู้เข้าร่วมไทยสูงอายุจำนวน 100 คนที่ร่วมโครงการ ณ โรงพยาบาลจุฬาภรณ์ โดยเป็นผู้ที่ไม่ได้มีปัญหาเกี่ยวกับโรคในช่องปาก เช่น มีโรคเหงือก หรือปวดฟัน เป็นต้น ก่อนการเก็บตัวอย่าง โดยใช้ชุดเก็บตัวอย่างน้ำลายยี่ห้อ OMNIgene® ORAL (DNA Genotek, ประเทศแคนาดา) ตามคำคู่มือของผู้ผลิต ก่อนการเก็บตัวอย่างจะให้ผู้เข้าร่วมโครงการทำการบ้วนน้ำสะอาดจำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงทำการบ้วนน้ำลายลงในภาชนะบรรจุจนถึงขีดเครื่องหมายที่กำหนดของชุดเก็บน้ำลาย (ปริมาตร 1 มล.) หลังจากนั้นตัวอย่างถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งทำการสกัดดีเอ็นเอ สำหรับผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ และผู้ป่วยที่มีการรู้คิดบกพร่องเล็กน้อย ทำโดยนักประสาทวิทยาหรือแพทย์ผู้เชี่ยวชาญตามเกณฑ์ของ National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

2. การสกัดดีเอ็นเอ

เพื่อเป็นการเตรียมตัวอย่างสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ จะใช้จุลินทรีย์มาตรฐาน (ยี่ห้อ ZymoBIOMICS™ Spike-in control II, Zymo Research, สหรัฐอเมริกา) โดยละลายจุลินทรีย์มาตรฐานทั้งหมดบนน้ำแข็งและผสมให้เข้ากันโดยใช้กระแสน้ำวน โดยเติมเป็นสัดส่วน ใช้ปริมาตร 40 ไมโครลิตรของจุลินทรีย์มาตรฐานต่อตัวอย่างน้ำลาย 500 ไมโครลิตร

และบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นจึงสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้น้ำยา Zymo-BIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research, สหรัฐอเมริกา) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือการตรวจวิเคราะห์จากผู้ผลิตโดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะถูกตรวจสอบคุณภาพด้วยเครื่อง Nanodrop One (Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา) และ Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา) เฉพาะตัวอย่างที่ผ่านมาตรฐานคุณภาพจึงจะนำไปทำการตรวจวิเคราะห์ในลำดับต่อไป

3. การตรวจวิเคราะห์

ในการตรวจสอบความหลากหลายของชุมชนแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำลาย จะใช้เทคโนโลยีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเฉพาะ SMRT PacBio ซึ่งเป็นเทคนิค next-generation sequencing ที่หาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสายยาวได้ ขั้นแรกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิด 16S ไรโบโซมอล DNA (rDNA) โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อส่วนของแบคทีเรียทั่วไปหนึ่งคู่ร่วมกับไพรเมอร์สำหรับ 16S rRNA อีกหนึ่งคู่ โดยใช้ไพรเมอร์เหล่านี้ถูกเลือกเนื่องจากความสามารถในการกำหนดเป้าหมายแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ กระบวนการขยายเสียงดำเนินการตามคำแนะนำของผู้ผลิตสำหรับ ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค long-read Next-generation sequencing ที่ประกอบด้วยขั้นตอนและน้ำยาต่าง ๆ ตามคู่มือและคำแนะนำของน้ำยาที่ใช้ เช่น SMRTbell® Prep Kit 3.0 (Pacific Biosciences of California, CA, USA) ตรวจสอบคุณภาพของผลผลิตด้วยเครื่อง Qubit 2.0 โดยใช้น้ำยา Qubit dsDNA HA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) และท้ายที่สุดดำเนินการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง PacBio Sequel® I ตามคำแนะนำของผู้ผลิต จากนั้นนำผลของการวิเคราะห์มาดำเนินการทางกระบวนการ bioinformatics กระบวนการวิเคราะห์ทาง bioinformatics เริ่มจากการตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลลำดับเบส (sequencing data) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง PacBio Sequel® I system โดยใช้โปรแกรม FastQC เมื่อผ่านมาตรฐานที่กำหนดแล้ว จึงนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม QIIME version qiime2 (เวอร์ชัน 2022.2 เว็บไซต์ <https://qiime2.org>, เข้าใช้งานล่าสุดเมื่อ 1 กรกฎาคม 2567) จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ quality-filtered และ dereplicated ด้วยอัลกอริทึม DADA2 ตามไปป์ไลน์ dada2 denoise-ccs จากนั้นลำดับซีควนส์ (sequences) ทั้งหมดจะถูกนำไปสู่กระบวนการ alignment กับ representative sequencing ด้วยกระบวนการ multiple

alignment โดยใช้ MAFFT algorithm และสร้าง phylogeny tree ด้วยโปรแกรม FastTree จากนั้นจะตรวจหา identical read และ amplicon sequence variant ที่จำเพาะและมีความสำคัญ โดยวิเคราะห์ข้อมูล SILVA เวอร์ชัน 138 และจะสามารถสร้าง alpha and beta diversity metrics และกราฟออกมาได้ ในส่วนของ operational taxonomic unit (OTU) นั้นถูกสร้างจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมหรือกระบวนการ linear discriminant analysis (LDA) และ LDA effect size

ผล

1. สรุปข้อมูลทั่วไปของผู้เข้าร่วมและลักษณะทางคลินิก

ผู้เข้าร่วมงานวิจัยทั้งหมดจำนวน 100 คน แบ่งเป็นผู้ป่วย AD จำนวน 10 คน ผู้ป่วย MCI จำนวน 46 คน และกลุ่มควบคุมที่เป็นกลุ่มผู้สูงอายุที่มีสุขภาพดีจำนวน 44 คน โดยตารางที่ 1 แสดงภูมิหลังและคะแนนการรับรู้ของแต่ละกลุ่ม โดยในแต่ละกลุ่มมีสัดส่วนของผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยโรค AD ผู้ป่วย MCI และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีคือ 66.90 ปี 68.50 ปี และ 64.73 ปี ตามลำดับ ซึ่งแต่ละกลุ่มมีอายุไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่ม AD คะแนนเฉลี่ยภาวะสมองเสื่อมทางคลินิก (CDR) การประเมินความรู้ความเข้าใจมอนทรีออล (MoCA) และการตรวจสอบสถานะทางจิตขนาดเล็ก (MMSE) อยู่ที่ 1.45, 13.9 และ 16.7 ตามลำดับ กลุ่ม MCI มีค่าเท่ากับ 0.41, 22.36 และ 25.89 ตามลำดับ

2. ความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำลายของผู้เข้าร่วมโครงการ

หลังจากการกรองคุณภาพของข้อมูลได้ค่า unique tags ของกลุ่ม AD, MCI และกลุ่มควบคุมได้ค่าคือ 32,425, 27,309 และ 26,583 ตามลำดับ ส่วนจำนวน OTU ใกล้เคียงกับ unique tags ของแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 2) unique tags และจำนวน OTU ในกลุ่ม AD สูงกว่าในกลุ่ม MCI และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .0001$) ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในน้ำลายโดยรวมในกลุ่ม AD มีแนวโน้มที่จะสูงกว่าในกลุ่ม MCI และกลุ่มควบคุม

3. แฟมิลี จินัสและสปีชีส์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจที่พบจากตัวอย่างน้ำลายของผู้เข้าร่วมงานวิจัยเนื่องจากพบกว่ากลุ่มทดลองมีสัดส่วนของเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปัจจัยเรื่องเพศกับ parameters อื่น ๆ แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงได้ดำเนินการเปรียบเทียบผล

รวมตามประเภทของกลุ่มตัวอย่างของการศึกษานี้ ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ (% relative abundance) ในระดับแฟมิลีที่ตรวจพบได้ในตัวอย่างจาก น้ำลายของผู้เข้าร่วมงานวิจัยในแต่ละกลุ่ม โดยพบว่าแฟมิลี Prevotellaceae มีปริมาณมากที่สุด รองลงไปอีก 5 ลำดับ คือ Pasteurellaceae, Streptococcaceae, Neisseriaceae, Enterobacteriaceae และ Veillonellaceae นอกจากนี้ แสดงผลการวิเคราะห์จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ (% relative abundance) ในระดับจีนัส ที่ตรวจพบได้ในตัวอย่างจาก น้ำลายของผู้เข้าร่วมงานวิจัยในแต่ละกลุ่ม โดยพบว่าจีนัส Prevotella มีปริมาณมากที่สุด รองลงไปอีก 5 ลำดับคือ Streptococcus, Veillonella, Neisseria, Haemophilus และ Klebsiella อย่างไรก็ตามเมื่อทำการคำนวณทางสถิติ

พบว่าจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ (% relative abundance) ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระดับแฟมิลีและจีนัส คือ Fusobacteriaceae และ Fusobacterium ($p < .05$) (ภาพที่ 1A และ 1B) โดยพบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างตัวอย่างจากกลุ่มของผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ กับ กลุ่มควบคุมที่เป็นคนสุขภาพดี (4.53 ± 3.2 และ 2.60 ± 1.8 สำหรับ AD และ กลุ่มควบคุมคนปกติ ตามลำดับ) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ (% relative abundance) ในระดับสปีชีส์ พบว่าตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วย สมองเสื่อมอัลไซเมอร์มีจำนวน Prevotella histicola น้อยกว่า ตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมที่เป็นคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$) (1.10 ± 1.4 และ 5.36 ± 5.4 สำหรับ AD และกลุ่ม ควบคุมคนปกติ ตามลำดับ) (ภาพที่ 1C)

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (AD) กลุ่มผู้ป่วยที่มีการรู้คิดบกพร่องบกพร่อง เล็กน้อย (MCI) และกลุ่มควบคุมที่เป็นคนปกติสุขภาพดี

รายการข้อมูล	กลุ่ม AD	กลุ่ม MCI	กลุ่มควบคุม
1. จำนวนตัวอย่าง	10	46	44
2. สัดส่วนชาย: หญิง (ร้อยละ)	40 : 60	30.4 : 69.6	27.3 : 72.7
3. อายุเฉลี่ย (ปี)	66.90 ± 7.06	68.50 ± 6.35	64.73 ± 4.78
4. BMI เฉลี่ย	24.51 ± 4.3	23.37 ± 3.32	23.58 ± 3.67
5. CDR score (Min.-Max.)	1.45 ± 0.16 (0.5–2)	0.41 ± 0.22 (0–1)	n/a
6. MoCA score (Min.-Max.)	13.90 ± 4.51 (5–19)	22.36 ± 2.13 (16–27)	26.91 ± 1.84 (20–30)
7. MMSE score (Min.-Max.)	16.70 ± 3.13 (12–21)	25.89 ± 2.23 (20–29)	28.14 ± 1.41 (24–30)

ค่าเฉลี่ยของการทดสอบด้านสมองและความจำได้แก่ CDR: Clinical Dementia Rating คะแนนเฉลี่ยภาวะสมองเสื่อม ทางคลินิก, MoCA: Montreal Cognitive Assessment การประเมินความรู้ความเข้าใจมอนทรีออล, MMSE: Mini-mental Status Examination การตรวจสอบสถานะทางจิตขนาดเล็ก

ตารางที่ 2 แสดง unique tags, ปริมาณของ operational taxonomic units (OTUs) และดัชนีความหลากหลายของ ไมโครไบโอมจากตัวอย่างน้ำลายของกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ (AD) กลุ่มผู้ป่วยที่มีการรู้คิดบกพร่องบกพร่อง เล็กน้อย (MCI) และกลุ่มควบคุมที่เป็นคนปกติสุขภาพดี

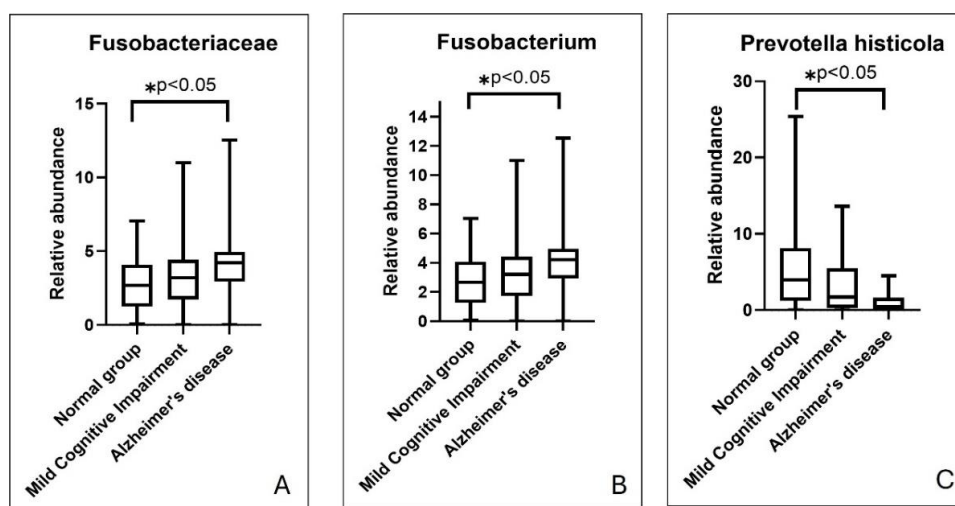
รายการข้อมูล	AD	MCI	กลุ่มควบคุม
Unique tags	$32,425 \pm 17,819^*$	$27,309 \pm 11,052$	$26,583 \pm 6,887$
No. of OTUs	$31,105 \pm 17,441^*$	$25,641 \pm 10,610$	$25,156.7 \pm 7,182$
Richness index	60.8 ± 22.56	50.67 ± 14.77	50.0 ± 11.75
Diversity index (Shannon)	7.04 ± 1.42	6.48 ± 1.22	6.54 ± 1.09

* $p < .0001$ One sample t-test เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม AD และ MCI หรือกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 3 แสดงค่าร้อยละของ relative abundance รายการเชื้อในระดับแฟมิลีและจีนัสที่พบในตัวอย่างแต่ละกลุ่มทดลอง

ชื่อแฟมิลี	AD	MCI	กลุ่มควบคุม	ชื่อจีนัส	AD	MCI	กลุ่มควบคุม
Prevotellaceae	17.87	20.2	20.49	Prevotella	14.47	17.42	18.29
Pasteurellaceae	11.33	7.64	8.14	Streptococcus	10.91	11.3	12.97
Streptococcaceae	10.92	11.3	12.97	Veillonella	6.91	8.02	9.76
Neisseriaceae	9.2	12.2	8.68	Neisseria	9.07	11.98	8.46
Enterobacteriaceae	9.1	9.53	8.96	Haemophilus	10.43	6.93	7.71
Veillonellaceae	7.78	8.94	10.85	Klebsiella	0.42	5.29	3.64
Fusobacteriaceae	4.52	3.25	2.6	Rothia	2.52	2.94	3.07
Porphyromonadaceae	4.39	4.23	2.84	Porphyromonas	4.39	4.23	2.84
Lachnospiraceae	2.76	1.93	1.98	Pseudomonas	0.03	1.19	2.79
Micrococcaceae	2.52	2.94	3.08	Fusobacterium	4.52	3.25	2.6
Campylobacteraceae	2.44	1.8	2.09	Alloprevotella	3.33	2.71	2.19
Leptotrichiaceae	2.17	1.12	1.09	Campylobacter	2.44	1.8	2.09
Other	5.77	5.81	7.32	Others	8.99	7.63	5.5

AD = Alzheimer's Disease, MCI = Mild Cognitive Impairment



ภาพที่ 1 กราฟแสดงของร้อยละ relative abundance ของเชื้อในแฟมิลี Fusobacteriaceae (ภาพ A) และในจีนัส Fusobacterium (ภาพ B) ที่ตรวจพบในตัวอย่างจากผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกราฟแสดงร้อยละ relative abundance ของเชื้อ Prevotella histicola ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในตัวอย่างจากผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์เมื่อเทียบกับตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพปกติ (ภาพ C)

วิจารณ์

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าตัวอย่างจากน้ำลายของกลุ่มผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ พบมีดัชนีความหลากหลาย (diversity) ของไมโครไบโอมเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่ม MCI และกลุ่มควบคุมที่เป็นคนสุขภาพดี ซึ่งผลการวิจัยนี้ไม่เป็นไปในทางเดียวกับบางรายงานก่อนหน้านี้ ที่พบว่าตัวอย่างจากผู้ป่วย AD จะมีความหลากหลายของไมโครไบโอมลดลง อย่างไรก็ตาม

มีรายงานก่อนหน้านี้เมื่อไม่นานมานี้ของกลุ่มวิจัยในประเทศแคนาดาได้รายงานว่าในกลุ่มผู้ป่วย AD ก็มีความหลากหลายของไมโครไบโอมเพิ่มขึ้นในหลาย ๆ ระดับของอนุกรมวิธาน (taxonomy) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นคนปกติเช่นเดียวกัน¹³ นอกจากนั้นการเพิ่มหรือลดความหลากหลายของไมโครไบโอมก็ถือเป็นภาวะความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ (dysbiosis) เช่นเดียวกัน มีรายงานการศึกษาวิจัยพบว่าภาวะความไม่สมดุลของจุลินทรีย์สามารถมีผลต่อการดูดซึมของลำไส้ ขัดขวางการทำงานของเยื่อแนวกั้นระหว่างเลือดกับสมอง (blood-brain barrier) และกระตุ้นการเกิดพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรค AD ผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณรีดอกซ์การทำงานของระบบประสาท การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ¹⁴ ภาวะความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (gut microbiota) ยังมีรายงานที่ระบุว่าเกี่ยวข้องกับการที่สัมพันธ์กับความชราที่กระทบต่อระบบประสาทส่วนกลาง ในกลุ่มผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ด้วย¹⁵ นอกจากนั้นยังมีการศึกษาที่ระบุถึงความเชื่อมโยงระหว่างภาวะความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในช่องปากกับภาวะ amyloid β ในสมองที่เพิ่มขึ้นที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในช่องปากและการพัฒนาของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ภาวะความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์แล้ว ยังมีโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทอื่น ๆ ที่มีรายงานการวิจัยว่ามีความเกี่ยวข้องด้วยเช่นกัน ได้แก่ โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) และโรคฮันติงตัน (Huntington's disease)¹⁶ การวิจัยล่าสุดแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไมโครไบโอมในช่องปากในบุคคลที่เป็นโรค AD ไมโครไบโอมในช่องปากได้รับการเสนอให้มีบทบาทในพยาธิสรีรวิทยาของความผิดปกติเกี่ยวกับระบบประสาทต่าง ๆ รวมถึงโรค AD โดยทั่วไปแล้วหลากหลายของจุลินทรีย์พบได้มากที่สุดตามด้วยในช่องปาก¹⁷ ภาวะ dysbiosis ของจุลินทรีย์ในช่องปากได้รับการยอมรับมากขึ้นเรื่อย ๆ ว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดโรคและการลุกลามของโรคต่าง ๆ รวมถึงโรคไขมันพอกดับที่ไม่มีแอลกอฮอล์ โรคลิ้นหัวใจ การอักเสบทั่วร่างกาย ปฏิกริยาภูมิคุ้มกัน ความเครียดจากปฏิกริยาออกซิเดชัน และการเกิดลิ้นเลือด¹⁸

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบเชื้อในแฟมิลี Prevotellaceae ในตัวอย่างน้ำลายที่ศึกษามากที่สุด และพบอีก 5 อันดับรองลงไปได้แก่ Pasteurellaceae, Streptococcaceae, Neisseriaceae, Enterobacteriaceae และ Veillonellaceae เป็นต้น ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานแสดงว่า ภาวะไม่สมดุลของ

จุลินทรีย์ที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของเชื้อแฟมิลี Pasteurellaceae เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อที่สัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ และเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย และก็มีรายงานวิจัยที่แสดงผลที่คล้ายคลึงกันว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อในกลุ่มแฟมิลี Neisseriaceae, Streptococcaceae, Enterobacteriaceae และ Veillonellaceae นั้น อาจส่งผลให้เกิดการอักเสบของระบบประสาท และมีผลให้เกิดภาวะความจำเสื่อมที่เป็นการแสดงออกหลักของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์¹⁹ นอกจากในระดับแฟมิลีแล้ว งานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าในตัวอย่างน้ำลายที่นำมาตรวจวิเคราะห์ พบจีโนส Prevotella มีปริมาณมากที่สุด รองลงไปอีก 5 ลำดับคือ Streptococcus, Veillonella, Neisseria, Haemophilus และ Klebsiella เป็นต้น เช่นเดียวกับในระดับแฟมิลี เชื้อในจีโนส Prevotella ก็มีรายงานวิจัยที่เชื่อมโยงว่ามีผลต่อกระบวนการอักเสบของเซลล์ประสาทที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ และเชื้อในจีโนส Streptococcus, Veillonella, Neisseria, Haemophilus, รวมถึง Klebsiella ซึ่งปกติพบเป็นเชื้อพื้นถิ่นของในช่องปากและระบบทางเดินอาหารของคน ก็มีรายงานว่าหากเกิดสภาวะที่ไม่สมดุลของเชื้อดังกล่าวก็จะทำให้เกิดการตอบสนองของกระบวนการอักเสบ ที่อาจจะพัฒนาการเกิดพยาธิสภาพของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ได้²⁰

นอกจากนั้นยังผลการตรวจวิเคราะห์ที่พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จากตัวอย่างน้ำลายของผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ระดับแฟมิลี Fusobacteriaceae และจีโนส Fusobacterium มีปริมาณมากกว่ากลุ่มคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าเชื้อในกลุ่มนี้อาจมีความสำคัญหรือความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ ซึ่งก่อนหน้านี้ก็มีรายงานว่าพบเชื้อในแฟมิลี Fusobacteriaceae และจีโนส Fusobacterium มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบในหลาย ๆ สถานการณ์ และมีความเชื่อมโยงถึงการอักเสบของเซลล์ประสาท ที่อาจเป็นสาเหตุของโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ได้²¹ โดยเชื่อว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับการกลไกของการกระตุ้นผ่านทางระบบภูมิคุ้มกัน การตอบสนองของการอักเสบ และอาจจะขัดขวางการทำงานของเยื่อแนวกั้นระหว่างเลือดกับสมองได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานวิจัยเพิ่มเติมที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของเชื้อในแฟมิลี Fusobacteriaceae ที่เกี่ยวข้องกับการภาวะความจำเสื่อม (cognitive impairment) โดยแสดงให้เห็นว่าเกี่ยวข้องกับการพัฒนาโรคในช่องปาก (periodontal diseases) และยังมีผลถึงภาวะความจำที่ลดลงรวมถึงความผิดปกติของเซลล์ประสาทด้วย²²

ผลการตรวจวิเคราะห์ที่น่าสนใจพบว่าตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ มีจำนวน *Prevotella histicola* น้อยกว่าตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมที่เป็นคนสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$) ซึ่งเชื้อ *Prevotella histicola* เป็นแบคทีเรียในลำไส้ของมนุษย์ ที่มีผลการศึกษาวินิจฉัยพบว่ามีเกี่ยวข้องกับกับบริบทของโรคทางระบบประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะต่าง ๆ เช่น โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (multiple sclerosis) และภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือด (vascular dementia) และผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่า *Prevotella histicola* สามารถระงับกลไกการอักเสบของระบบประสาทส่วนกลางและโรค demyelinating diseases ได้ ผ่านการปรับเปลี่ยนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ด้วยความสามารถของ *Prevotella histicola* ที่ควบคุมโปรตีนบางตัวเกี่ยวกับระบบประสาท ควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกการอักเสบ กระตุ้นการทำงานของ regulatory T cells และลดการทำงานของ autoimmune responses เป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการรักษาสภาวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เชื้อ *Prevotella histicola* ยังมีรายงานว่ามีความเชื่อมโยงกับการลดความบกพร่องทางระบบประสาท และช่วยในกระบวนการแก้ไขความบกพร่องทางสติปัญญาในสัตว์ทดลองที่มีภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือดได้²³ การศึกษาวินิจฉัยยังมีข้อจำกัดบางประการที่สามารถปรับปรุงได้ในการศึกษาในอนาคต อันดับแรกแพลตฟอร์ม PacBio ที่ใช้นี้ยังต้นทุนที่สูงกว่าการทดสอบอื่น ๆ การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

ในจำนวนที่มากขึ้นอาจจะสามารถลดต้นทุนได้ และทำให้การทดสอบนี้เข้าถึงได้มากขึ้น ประการที่สอง ไมโครไบโอมในลำไส้ของผู้เข้าร่วมงานวิจัยไม่ได้รับการตรวจวิเคราะห์เพื่อนำมาประกอบรวมกับการศึกษาวิจัยครั้งนี้ แม้ว่าอาจเกี่ยวข้องกับการเริ่มมีอาการก็ตามของผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ ดังนั้น หากมีการเปรียบเทียบองค์ประกอบของลำไส้และจุลินทรีย์ในช่องปากอาจปรับปรุงความเป็นไปได้การประยุกต์ใช้ทางคลินิกของการศึกษาวินิจฉัยในอนาคต และท้ายที่สุด หากมีการศึกษาในอนาคตที่มีขนาดตัวอย่างขนาดใหญ่และการติดตามผลที่นานขึ้น อาจจะช่วยในการติดตามผลลัพธ์ของไมโครไบโอมกับการเกิดโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ได้ชัดเจนและเที่ยงตรงมากยิ่งขึ้น

สรุป

การใช้แพลตฟอร์มการหาลำดับพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค long-read next-generation sequencing (NGS) เพื่อวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในช่องปากในผู้สูงอายุอาจมีประโยชน์ในการบอกถึงความเสี่ยงต่อการเป็นโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม FRB650039/0240 รหัสโครงการ 165416 และราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Kongjit C, Tuntisak P. Analysis and design of prototype application of caregivers' supportive system phase 1 Alzheimer's based on a design thinking process. Int J Online Biomed 2021;17(13):81-98.
2. Van Giau V, Senanarong V, Bagyinszky E, Limwongse C, An SSA, Kim S. Identification of a novel mutation in APP gene in a Thai subject with early-onset Alzheimer's disease. Neuropsychiatr Dis Treat 2018;14:3015-23.
3. Kaufman ND, Chasombat S, Tanomsingh S, Rajataramya B, Potempa K. Public health in Thailand: emerging focus on non-communicable diseases. Int J Health Plann Manage 2011;26(3):e197-212.
4. Ferreira AL, Choi J, Ryou J, Newcomer EP, Thompson R, Bollinger RM, et al. Gut microbiome composition may be an indicator of preclinical Alzheimer's disease. Sci Transl Med 2023;15(700):eabo2984.
5. Askarova S, Umbayev B, Masoud AR, Kaiyrykzy A, Safarova Y, Tsoy A, et al. The links between the gut microbiome, aging, modern lifestyle and Alzheimer's disease. Front Cell Infect Mi 2020;10:104.
6. Na H, Jung N, Choi S, Kim S, Kim HJ, Lee JY, et al. Analysis of oral microbiome in chronic periodontitis with Alzheimer's disease: pilot study. Research Square 2020;1-20.

เอกสารอ้างอิง (References)

7. Burcham ZM, Garneau NL, Comstock SS, Tucker RM, Knight R, Metcalf JL, et al. Patterns of oral microbiota diversity in adults and children: a crowdsourced population study. *Sci Rep* 2020;10(1):2133.
8. Lin JW, Chang CH, Caffrey JL. Examining the association between oral health status and dementia: A nationwide nested case-controlled study. *Exp Biol Med* 2020;245(3):231-44.
9. Issilbayeva A, Kaiyrlkyzy A, Vinogradova E, Jarmukhanov Z, Kozhakhmetov S, Kassenova A, et al. Oral microbiome stamp in Alzheimer's disease. *Pathogens* 2024;13(3):195.
10. Cato LE, McKay AKA, L'Heureux JE, Vanhatalo A, Jones AM, Askew CD, et al. Low carbohydrate, high fat diet alters the oral microbiome without negating the nitrite response to beetroot juice supplementation. *Nutrients* 2023;15(24):5123.
11. Willis JR, Gabaldón T. The Human oral microbiome in health and Disease: from sequences to ecosystems. *Microorganisms* 2020;8(2):308.
12. Guo H, Li J, Yao H, Liu Y, Ji Y, Zhang J, et al. The dynamic communities of oral microbiome in neonates. *Front Microbiol* 2022;13:1052525.
13. Cirstea MS, Kliger D, MacLellan AD, Yu AC, Langlois J, Fan M, et al. The oral and fecal, microbiota in a canadian cohort of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2022;87(1):247-58.
14. Das TK, Ganesh BP. Interlink between the gut microbiota and inflammation in the context of oxidative stress in Alzheimer's disease progression. *Gut Microbes* 2023;15(1):2206504.
15. Schächtle MA, Rosshart SP. The microbiota-gut-brain axis in health and disease and its implications for translational research. *Front Cell Neurosci* 2021;15:698172.
16. Yussof A, Yoon P, Krkljes C, Schweinberg S, Cottrell J, Chu TC, et al. A meta-analysis of the effect of binge drinking on the oral microbiome and its relation to Alzheimer's disease. *Sci Rep-Uk*. 2020;10(1):19872.
17. Chen CK, Wu YT, Chang YC. Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study. *Alzheimers Res Ther* 2017;9(1):56.
18. Li Y, Zhu M, Liu Y, Luo B, Cui J, Huang L, et al. The oral microbiota and cardiometabolic health: A comprehensive review and emerging insights. *Front Immunol* 2022;13:1010368.
19. Zhao C, Kuraji R, Ye C, Gao L, Radaic A, Kamarajan P, et al. Nisin a probiotic bacteriocin mitigates brain microbiome dysbiosis and Alzheimer's disease-like neuroinflammation triggered by periodontal disease. *J Neuroinflammation* 2023;20(1):228.
20. Licastro F. Special Issue Editorial: "Infections, inflammation and neurodegeneration in Alzheimer disease" infections, neuronal senescence, and dementia. *Int J Mol Sci* 2022;23(11): 5865.
21. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 2009;9:259.
22. Harris S, Croft J, O'Flynn C, Deusch O, Colyer A, Allsopp J, et al. A pyrosequencing investigation of differences in the feline subgingival microbiota in health, gingivitis and mild periodontitis. *PLoS One* 2015;10(11):e0136986.
23. Duan R, Hou JK, Wang XX, Huang ZH, Cao HM, Hu JY, et al. Transplantation ameliorates cognitive impairment and decreases oxidative stress in vascular dementia rats. *Brain Sci* 2023;13(8):1136.