รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการได้รับเมทแอมเฟตามีนต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนบีดีเอ็นเอฟในสมองของหนูทดลอง

Effects of methamphetamine on changes of BDNF protein expression in rat brain

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-นามสกุล ดร.ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะที่สังกัด สหเวชศาสตร์

รหัสโครงการ AHS01/2564

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2564

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม 2565

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการได้รับเมทแอมเฟตามีนต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนบีดีเอ็นเอฟในสมองของหนูทดลอง

Effects of methamphetamine on changes of BDNF protein expression in rat brain

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-นามสกุล ดร.ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะที่สังกัด สหเวชศาสตร์

รหัสโครงการ AHS01/2564

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2564

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม 2565

สารบัญ

หน้า

สารบัญ…… ก
สารบัญภาพ..... ข
บทคัดย่อ..... ค
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย…… 2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……. 2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย..... 2
1.5 นิยามศัพท์..... 3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..... 4
2.1 ปัญหายาเสพติดในสังคม……. 4
2.2 อุบัติการณ์การติด meth…… 4
2.3 เมทแอมเฟตามีน (methamphetamine, meth, METH) และความเป็นพิษ…… 4
2.4 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) และความสัมพันธ์ต่อการติดสารเสพติด. 5
2.5 สมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการติดสารเสพติด (Addiction-related brain area) ……... 6
2.6 โดยสรุปปัญหางานวิจัย …… 8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย…… 9
3.1 การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง…….. 9
3.2 สัตว์ทดลอง……..... 9
3.3 กลุ่มของสัตว์ทดลอง..... 9
3.4 การเตรียมตัวอย่างสไลด์ และการศึกษาการแสดงออกของ BDNF ด้วยวิธี immunohistochemistry …… 10
3.5 การถ่ายภาพ…….. 10
3.6 วิธีการประเมินผล/สังเคราะห์ข้อมูล……. 10
3.7 ระยะเวลาการวิจัย……. 11
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล…… 12
4.1 ผลการวิจัย……. 12
4.1.1 การแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน frontal cortex…… 12
4.1.2 การแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus …… 13
4.2 อภิปรายผล..... 14
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ…… 16

5.1 สรุปผลการวิจัย…..... 16
5.2 ข้อเสนอแนะ…… 16
5.3 ปัญหาและอุปสรรคของการวิจัย……. 17
บรรณานุกรม..... 18
ภาคผนวก…… 22
ภาคผนวก ก ใบรับรองจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง …… 23
ภาคผนวก ข ผลการอนุมัติให้ขยายระยะเวลาทุนวิจัย ……. 24

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 : แสดง prefrontal cortex ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งใน frontal cortex และ hippocampus ของหนูทดลอง…….. 7

ภาพที่ 2 : แสดง BDNF immunohistochemistryในสมองส่วน frontal cortex ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม…… 12

ภาพที่ 3 : แสดง BDNF immunohistochemistryในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม……. 13

หัวข้อวิจัย ผลของการได้รับเมทแอมเฟตามีนต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนบีดีเอ็นเอฟในสมองของหนูทดลอง

ชื่อผู้วิจัย ดร.ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์

หน่วยงาน คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ปีงบประมาณ 2564

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ของหนูทดลองที่ได้รับสารเสพติด meth ในรูปแบบ binge dose, escalating dose และแบบ escalating binge dose เปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม โดยเทคนิค immunohistochemistry

ผลการวิจัยพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ meth ในทุกรูปแบบ แสดงแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หนูกลุ่มที่ได้รับ meth แบบ escalating binge dose มีการแสดงออกของโปรตีน BDNF เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p=0.017$) อย่างไรก็ดี ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการแสดงออกของ BDNF protein ในสมองส่วน frontal cortex ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของ meth (regional specific effect of meth) ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ BDNF ในสมองแต่ละบริเวณ โดยมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ BDNF ในสมองส่วน hippocampus มากกว่าส่วน frontal cortex นอกจากนั้น การเพิ่มขึ้นของ BDNF ใน hippocampus ของหนูทดลองที่ได้รับ meth ยังแสดงให้ทราบถึงการเกิดความเป็นพิษของ meth ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายที่มากของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus การสร้าง BDNF ที่มากขึ้นนี้ เพื่อช่วยให้เกิดการลด meth-induced cell death factor expression ในสมอง ดังนั้น ผลงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่า การได้รับ meth โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบบ escalating binge dose ซึ่งเป็นแบบที่ได้รับในปริมาณมากที่สุด ส่งผลให้เกิดความเสียหายและการตายของเซลล์ประสาทที่มากขึ้นในสมองส่วน hippocampus ทั้งนี้ มีการเพิ่มขึ้นของ BDNF protein เป็นตัวชี้วัด

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหายาเสพติด จัดเป็นปัญหาเรื้อรังของสังคมไทยที่มีมาอย่างยาวนานตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากยังไม่มียาหรือวิธีรักษาความผิดปกติของโรคจากการติดสารเสพติดได้อย่างหายขาด อีกทั้ง การติดสารเสพติด ก่อให้เกิดผลเสียต่อบุคคลได้หลายภาคส่วน อาทิ ผลเสียในด้านปัญหาสุขภาพของผู้เสพเอง ที่มีพฤติกรรมการการติดยา ปัญหาอาการทางจิต และมีความบกพร่องต่อระบบสติปัญญา จนไม่สามารถที่จะทำงานหรือดำเนินชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การใช้สารเสพติดในบุคคลหนึ่งสามารถส่งผลเสียต่อสังคมในวงกว้าง กล่าวคือ ผู้เสพยามักมีความผิดปกติทางจิตร่วมด้วย จนมีการทำร้ายผู้อื่นที่อยู่ในครอบครัว สังคม และการก่ออาชญากรรมอย่างหลากหลายในสังคมไทย ซึ่งจัดเป็นปัญหาที่ส่งผลต่อความเป็นอยู่และความสงบเรียบร้อยในสังคม

เมทแอมเฟตามีน (methamphetamine, meth) เป็นสารเสพติด ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร amphetamine (Panenka, Procyshyn et al. 2013) ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศไทย สารเสพติด meth มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง (Courtney and Ray 2014) การได้รับ meth ในปริมาณสูงหรือเป็นเวลานาน มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะอาการทางจิต มีภาวะหลอนประสาท หลงผิด ซึ่งคล้ายคลึงกับผู้ป่วยที่เป็นจิตเภท (schizophrenia) และทำให้เกิดการทำร้ายผู้อื่นได้ (Grant, LeVan et al. 2012, Hsieh, Stein et al. 2014) นอกจากนี้ รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การได้รับสารเสพติด meth ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณประสาทในสมอง เปลี่ยนแปลงระบบสารสื่อประสาทหลายระบบ อาทิ สารสื่อประสาทกลูตาเมท (Kerdsan, Thanoi et al. 2009) กาบา (Veerasakul, Thanoi et al. 2016) โดปามีน (Yu, Zhu et al. 2015) และซีโรโทนิน (Almalki, Das et al. 2018) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในสมองหลายส่วน รวมถึงสมองส่วน frontal cortex (เกี่ยวข้องกับสติปัญญา การเรียนรู้ และความจำแบบ working memory) และ hippocampus (ส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความจำ) ก่อให้เกิดความบกพร่องในด้านพฤติกรรม การเรียนรู้และความจำในผู้เสพได้ (Sabrini, Russell et al. 2020)

Brain-derived neurotrophic factor or BDNF เป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นจากเซลล์ประสาท เป็นโปรตีนในกลุ่ม neurotrophin family ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต (neuronal growth) การคงอยู่ (maintenance) การรอดชีวิต (neuronal survival) ของเซลล์ประสาท เกี่ยวข้องกับกระบวนการเรียนรู้และความจำ (plasticity of learning and memory) การทำงานของระบบสารสื่อประสาท โดยควบคุมการส่งสัญญาณประสาทและกระบวนการ synaptic plasticity ในสมองได้อีกด้วย (Bolaños and Nestler 2004) รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ความผิดปกติของการแสดงออกของ BDNF ถูกรายงานว่าสัมพันธ์กับโรคทางระบบประสาท (neurodegenerative disorders) อาการทางจิต schizophrenia และการบกพร่องในด้าน

ความจำ (Bolaños and Nestler 2004, Autry and Monteggia 2012) อีกทั้ง การได้รับ METH ปริมาณสูง และแบบเฉียบพลัน ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสมอง โดยส่งผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีน BDNF ในสมองของหนูทดลอง (Galinato, Orio et al. 2015) นอกจากนี้ งานวิจัยที่ผ่านมาในกลุ่มผู้วิจัยเอง ยังพบว่า การได้รับ meth มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ DNA methylation และ gene expression ของ BDNF gene ด้วย (Iamjan, Thanoi et al. 2021) ดังนี้เป็นไปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว น่าจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ protein ในสมอง และสัมพันธ์ต่อความผิดปกติของการติดสารเสพติด อาการทางจิต และการบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำจากการได้รับสารเสพติด meth

อย่างไรก็ตาม ผลของ meth ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ BDNF ในสมองนั้น ขึ้นอยู่กับปริมาณ และระยะเวลาที่ได้รับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ BDNF จากการได้รับ meth แบบเฉียบพลัน เรื้อรัง หรือในแบบที่เลียนแบบการติดยาเสพติดของมนุษย์ยังไม่เคยถูกรายงาน จึงเป็นไปได้ว่าอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันได้ตามลักษณะของการได้รับยาที่แตกต่างกัน อันสอดคล้องกับการแสดงออกทางพฤติกรรมที่แตกต่างกันได้ ดังนี้จึงเป็นที่มาของการศึกษา ผลของการได้รับ meth ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ของหนูทดลอง เพื่อให้ทราบถึงกลไกที่สัมพันธ์กับการเกิดความเป็นพิษของ meth ต่อสมอง อันอาจเชื่อมโยงไปสู่ความเข้าใจการแสดงออกทางพฤติกรรมที่ผิดปกติ การมีความจำบกพร่อง และเป็นข้อมูลในการออกแบบวิธีการรักษาให้กับผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ของหนูทดลองที่ได้รับสารเสพติด meth

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาวิจัย คือ

1. เป็นการเพิ่มพูนความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และการแพทย์ ที่แสดงให้ทราบว่า การได้รับ meth ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อสมอง โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนที่สำคัญคือ BDNF และการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว อาจเป็นกลไกหนึ่งที่เชื่อมโยงไปถึงการมีพฤติกรรมที่ผิดปกติจากการติดสารเสพติด เช่นการมีอาการทางจิต และการเกิดความบกพร่องในด้านความจำได้
2. เป็นข้อมูลยืนยัน และแสดงว่า BDNF เป็นตัวชี้วัด (biomarker) ที่สำคัญต่อการนำไปพัฒนาวิธีการรักษา หรือบรรเทาความผิดปกติทางพฤติกรรมที่เกิดจากการติด meth ได้ต่อไป

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex ของหนูทดลองที่ได้รับสารเสพติด meth ในแบบ binge dose, escalating

dose และ escalating binge dose เปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม โดยเทคนิค immunohistochemistry

1.5 นิยามศัพท์

1. BDNF หมายถึง brain-derived neurotrophic factor ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในสมอง ทำหน้าที่ในการเจริญเติบโตและปกป้องเซลล์ประสาท

2. Binge dose of meth หมายถึงการให้สาร meth แบบเฉียบพลันในขนาด 6 mg/kg

3. Escalating dose of meth หมายถึงการให้สาร meth จากขนาดต่ำไปขนาดสูงตั้งแต่ 0.1-4 mg/kg ตามลำดับ

4. Escalating binge dose of meth หมายถึงการให้สาร meth จากขนาดต่ำไปขนาดสูงตั้งแต่ 0.1-4 mg/kg ตามลำดับและจากนั้นทำการเพิ่มขนาดสูง 6 mg/kg ให้อีก

บทที่ 2
วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองของหนูทดลองที่ได้รับสารเสพติด meth ซึ่งมีผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเป็นดังต่อไปนี้

2.1 ปัญหายาเสพติดในสังคม

ปัญหายาเสพติด จัดเป็นปัญหาเรื้อรังของสังคมไทยที่มีมาอย่างยาวนานตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากยังไม่มียาหรือวิธีรักษาความผิดปกติของโรคจากการติดสารเสพติดได้อย่างหายขาด อีกทั้ง การติดสารเสพติด ก่อให้เกิดผลเสียต่อบุคคลได้หลายภาคส่วน อาทิ ผลเสียในด้านปัญหาสุขภาพของผู้เสพเอง ที่มีพฤติกรรมการติดยา ปัญหาอาการทางจิต และมีความบกพร่องต่อระบบสติปัญญา จนไม่สามารถที่จะทำงานหรือดำเนินชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การใช้สารเสพติดในบุคคลหนึ่ง สามารถส่งผลเสียต่อสังคมในวงกว้าง กล่าวคือ ผู้เสพยามักมีความผิดปกติทางจิตร่วมด้วย จนมีการทำร้ายผู้อื่นที่อยู่ในครอบครัว สังคม และการก่ออาชญากรรมอย่างหลากหลายในสังคมไทย ซึ่งจัดเป็นปัญหาที่ส่งผลต่อความเป็นอยู่และความสงบเรียบร้อยในสังคม รวมถึง ยังส่งผลเสียต่อประเทศ ทำให้ประเทศต้องสูญเสียงบประมาณอย่างมากในแต่ละปี เพื่อแก้ปัญหาในการปราบปราม จับกุมผู้เสพ ปัญหาการก่ออาชญากรรม และสูญเสียงบประมาณในการจ่ายค่ารักษาพยาบาลให้กับผู้ป่วยทั้งที่เป็นผู้ป่วยรายใหม่ และผู้ป่วยรายเดิมที่ยังไม่สามารถเลิกการติดยาได้อย่างหายขาด

2.2 อุบัติการณ์การติด meth

เมทแอมเฟตามีน (methamphetamine, meth) หรือยาบ้า เป็นสารเสพติดที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย โดยในประเทศไทยนั้น พบว่ามีอุบัติการณ์ของการใช้ meth เป็นอันดับสูงที่สุดในบรรดาสารเสพติดให้โทษ ข้อมูลจากผลการปราบปรามยาเสพติดทั่วประเทศ ประจำปี 2562 ได้รายงานถึงจำนวนผู้ต้องหาที่เกี่ยวข้องกับการใช้ยาบ้า การก่อคดีอาชญากรรมและการกระทำผิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับยาเสพติด สูงถึง 230,984 คดี ในปี 2561 และ 189,841 ในปี 2562 โดยเป็นผู้กระทำผิดซ้ำ มากถึง 12,336 และ 9274 ราย ในปี 2561 และ 2562 ตามลำดับ (ข้อมูลจากระบบทะเบียนคดียาเสพติด สำนักงาน ป.ป.ส.) จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าปัญหาการติดสารเสพติดในประเทศไทย เป็นปัญหาใหญ่อย่างหนึ่งที่สามารถส่งผลกระทบต่อสภาพสังคมได้ในวงกว้าง และเป็นปัญหาที่อยู่คู่กับประเทศมาอย่างยาวนาน ยังไม่สามารถแก้ไขได้

2.3 เมทแอมเฟตามีน (methamphetamine, meth, METH) และความเป็นพิษ

Meth เป็นสารองค์ประกอบหลักของยาบ้า และเป็นอนุพันธ์ของสาร amphetamine แต่มีความรุนแรงมากกว่า เนื่องจากสามารถผ่านเข้าสู่สมองได้ง่ายกว่า และมีค่าครึ่งชีวิตในร่างกายยาวนานกว่า

amphetamine อย่างไรก็ดี meth และ amphetamine มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง การได้รับ meth ในปริมาณสูงหรือเป็นเวลานาน นอกจากจะส่งผลเสียทางกายต่อผู้เสพแล้ว ยังมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้ผู้ป่วยเกิดความผิดปกติทางพฤติกรรมและจิตใจ อาทิ มีภาวะการติดยา (dependence and abuse) ภาวะการใช้ยาเกินขนาด (intoxication) อาการถอนยา (withdrawal) มีความบกพร่องในด้านสติปัญญา (cognitive deficit) ภาวะอาการทางจิต (psychosis) ภาวะหลอนประสาท (hallucination) หลงผิด (delusion) และทำร้ายผู้อื่น ซึ่งคล้ายคลึงกับผู้ป่วยที่เป็นจิตเภท (schizophrenia) (Hsieh, Stein et al. 2014) นอกจากนี้ รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การได้รับสารเสพติด meth ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณประสาทในสมอง เปลี่ยนแปลงระบบสารสื่อประสาทหลายระบบ อาทิ ระบบสารสื่อประสาทกลูตาเมท (Kerdsan, Thanoi et al. 2012) กาบา (Veerasakul, Thanoi et al. 2016) โดปามีน (Yu, Zhu et al. 2015) และซีโรโทนิน (Almalki, Das et al. 2018) อีกทั้ง ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในสมองหลายส่วน (Yu, Zhu et al. 2015) เช่น frontal cortex และ hippocampus ซึ่งสัมพันธ์กับการก่อให้เกิดความบกพร่องในด้านพฤติกรรม การเรียนรู้และความจำในผู้เสพได้

2.4 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) และความสัมพันธ์ต่อการติดสารเสพติด

นอกจาก meth จะส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงระบบสารสื่อประสาทในสมอง อันส่งผลให้เกิดความผิดปกติตามมาแล้ว ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่เป็น neuromodulator ในสมอง อย่างโปรตีนในกลุ่ม neurotrophin ที่มีความสำคัญต่อการปกป้องเซลล์ประสาทและส่งเสริมการทำงาน/การส่งสัญญาณประสาทที่ปกติของเซลล์ประสาทได้อีกด้วย

Brain-derived neurotrophic factor หรือ BDNF เป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นจากเซลล์ประสาทและเซลล์ค้ำจุนประสาท เป็นโปรตีนในกลุ่ม neurotrophin family ที่มีการแสดงออกในสมองหลายบริเวณ เช่น ventral tegmental area (VTA), hippocampus, frontal cortex, amygdala, dorsal striatum และ nucleus accumbens (Conner, Lauterborn et al. 1997) BDNF มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต (neuronal growth) การคงอยู่ (maintenance) การรอดชีวิต (neuronal survival) ของเซลล์ประสาท เกี่ยวข้องกับกระบวนการเรียนรู้และความจำ (plasticity of learning and memory) ควบคุมการทำงานของระบบสารสื่อประสาท โดยควบคุมการส่งสัญญาณประสาทและกระบวนการ synaptic plasticity (Bolaños and Nestler 2004) ในสมองได้อีกด้วย รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ความบกพร่องของการทำงานของ BDNF สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติหรือโรคทางระบบประสาทได้หลายอย่าง เช่น Huntington's disease, Alzheimer's disease, และ addiction (การติดสารเสพติด) (Bolaños and Nestler 2004, Autry and Monteggia 2012) อีกทั้ง ระดับการแสดงออกที่ลดลงของโปรตีน BDNF ถูกรายงานว่า ส่งผลต่อกระบวนการเรียนรู้ ความจำ (Yamada and Nabeshima 2003) กลไกการเกิดโรคจิตเภท (schizophrenia) และอารมณ์สองขั้ว (bipolar disease) การได้รับ METH ปริมาณสูง และแบบเฉียบพลัน ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสมอง โดยสัมพันธ์กับการเพิ่มการแสดงออกของยีน BDNF และตัวรับ BDNF หรือ TrKB receptor ในสมองของหนูทดลอง Galinato

และคณะ เคยรายงานว่า meth มีผลต่อการตายของเซลล์ประสาท และเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่ม BDNF ในสมองส่วน ventral and dorsal hippocampus (Galinato, Orio et al. 2015) การเพิ่มขึ้นของ BDNF -TrkB receptor signaling ในสมองส่วน nucleus accumbens ซึ่งเป็น reward center ของหนู mice ได้ถูกรายงานว่าสำคัญต่อความผิดทางพฤติกรรม อาการถอนยา (meth withdraw symptom) (Ren, Ma et al. 2015) นอกจากนี้ งานวิจัยที่ผ่านมาในกลุ่มผู้วิจัยเอง พบว่า BDNF gene ซึ่งแปลรหัสให้ BDNF protein นั้น มีความสัมพันธ์อย่างมากต่อการติด meth การเกิด gene polymorphism ของ BDNF gene สัมพันธ์ต่อความไวในการติด meth และการเกิด meth psychosis ในกลุ่มประชากรเชื้อชาติไทย (Iamjan, Thanoi et al. 2015) อีกทั้ง การได้รับ meth มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ DNA methylation และ gene expression ของ BDNF gene ด้วย (Iamjan, Thanoi et al. 2021) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกทั้งในระดับกระบวนการเหนือพันธุกรรมและการแสดงออกของยีน สามารถควบคุมระดับการแสดงออกของโปรตีนได้ ดังนี้จึงอาจเป็นไปได้ว่า meth มีผลเปลี่ยนแปลง BDNF methylation และ gene expression และส่งผลต่อไปถึงการเปลี่ยนแปลงระดับของ protein ในสมองของสัตว์ทดลองด้วยเช่นกัน

2.5 สมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการติดสารเสพติด (Addiction-related brain area)

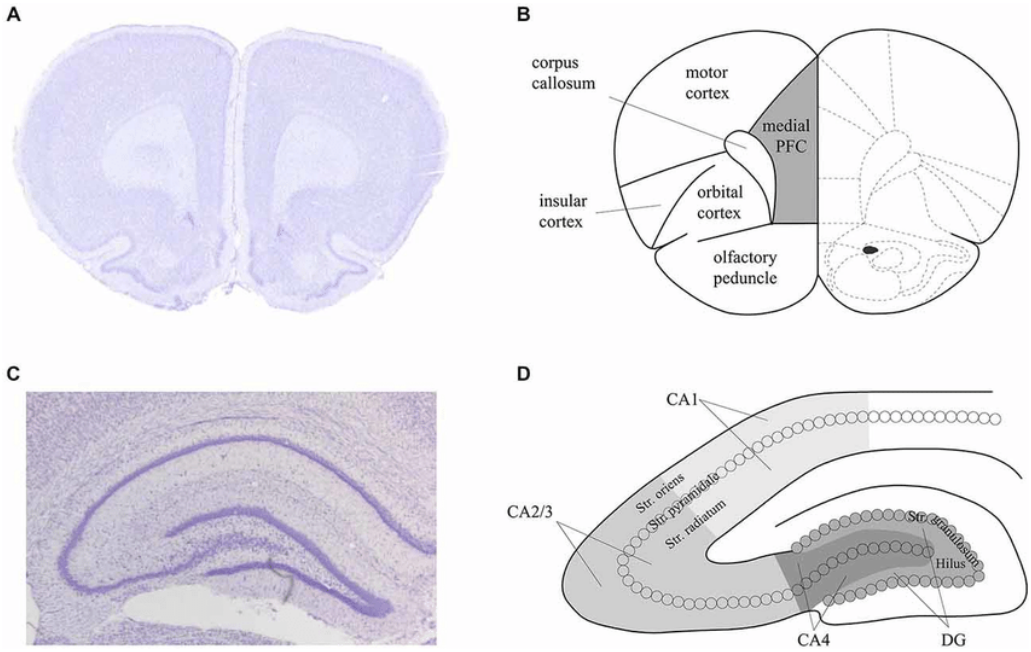
2.5.1 สมองส่วน frontal cortex (ภาพที่ 1 A, B)

สมองส่วนหน้า frontal cortex เป็นส่วนหนึ่งของ cerebral cortex ทางด้านหน้า ที่เชื่อมโยงกับสมองส่วนอื่น ๆ มากมาย โดยสมองส่วนนี้ มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสั่งการการทำงานของร่างกายเกี่ยวข้องกับการทำงานที่ซับซ้อนและขั้นสูง อาทิ การควบคุมการทำงานของอารมณ์ การพูด ระบบสติปัญญา การวางแผน การตัดสินใจ การแก้ปัญหา ความมีเหตุผล สมาธิ การคิดแบบมีหลักการความคิดรวบยอดต่าง ๆ (Smith and Jonides 1999, Allegri and Harris 2001, Witter 2003, Siddiqui, Chatterjee et al. 2008) ในงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า สมองส่วน frontal cortex ได้ถูกใช้ในการนำมาศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อทำความเข้าใจการเกิดโรคทางจิตของมนุษย์ (psychiatric) และความผิดปกติทางอารมณ์ (behavioral disorder) (Gunaydin and Kreitzer 2016) เช่น วิตกกังวล ซึมเศร้า จิตเภท รวมถึงความผิดปกติทางพฤติกรรมที่สืบเนื่องจากการติดสารเสพติด นอกจากนี้ ยังพบว่า การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานที่ผิดปกติของสมองส่วน frontal cortex เคยถูกรายงานว่ามีความสำพันธ์กับกลไกพื้นฐานของการติดสารเสพติด (drug addiction) (Volkow and Fowler 2000, Goldstein and Volkow 2002, Dom, Sabbe et al. 2005, Schoenbaum and Shaham 2008, Perry, Joseph et al. 2011) ความบกพร่องของระบบสติปัญญา (cognitive impairment) (Schoenbaum, Roesch et al. 2006) และ โรคทางจิต (psychosis) (Hsieh et al., 2014)

2.5.2 สมองส่วน hippocampus

Hippocampus (ภาพที่ 2 C, D) เป็นสมองที่อยู่ด้านในของสมองส่วน medial temporal cortex ถูกจัดเป็นส่วนหนึ่งของสมองที่เกี่ยวข้องกับอารมณ์และพฤติกรรม (limbic system) สมองส่วน hippocampus มีหน้าที่สำคัญต่อการสร้างความจำ (new memories formation) การเปลี่ยนแปลงความจำ

ระยะสั้นเป็นความจำระยะยาว (consolidation) และสัมพันธ์กับกระบวนการ plasticity of long term potential ของการเรียนรู้ (MacDonald, Jackson et al. 2006) และความจำชนิด spatial memory รายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในสมองส่วน hippocampus สัมพันธ์กับโรคความผิดปกติในระบบประสาท เช่น โรคอารมณ์สองขั้ว (Bipolar disease), โรคจิตเภท schizophrenia (Boyer, Phillips et al. 2007, Tamminga, Stan et al. 2010) รวมถึงโรคติดสารเสพติด (drug addiction) (Cooper, Moore et al. 2003, Jones and Bonci 2005, Kerdsan, Thanoi et al. 2012, Keralapurath, Briggs et al. 2017) งานวิจัยที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่า meth ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลในสมองส่วน hippocampus โดยมีผลต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ยิ่งไปกว่านั้น การศึกษาการแสดงออกของ BDNF protein ด้วยวิธี western blot ในหนูทดลอง ยังพบว่า การได้รับ meth ในขนาดที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการแสดงออกของ BDNF protein ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ การได้รับ meth ในขนาด 10 mg/kg ส่งผลให้มีการแสดงออกของ BDNF ลดลง แต่ 5mg/kg meth ทำให้การแสดงออกของ BDNF เพิ่มขึ้น และการแสดงออกของ BDNF ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อได้รับ 1mg/kg ของ meth (Shahidi, Komaki et al. 2019) จึงเห็นได้ว่า สมองส่วน hippocampus เป็นบริเวณหนึ่งที่สำคัญในการที่จะศึกษาความเป็นพิษของการได้รับ meth ที่สัมพันธ์กับการเกิดความผิดปกติของพฤติกรรมของการติดยา



ภาพที่ 1 แสดง prefrontal cortex ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งใน frontal cortex (A, B) และ hippocampus (C, D) ของหนูทดลอง (Grüter et al., 2015)

2.6 โดยสรุปปัญหางานวิจัย

ในปัจจุบัน แม้จะมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการแสดงออกของ BDNF ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับ meth มาแล้ว แต่ผลการทดลองยังมีความแตกต่างกันในแต่ละแบบจำลอง อีกทั้ง ผลของ meth ต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม และการแสดงออกของ BDNF ในสมองนั้น ขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ BDNF จากการได้รับ meth แบบเฉียบพลัน เรื้อรัง หรือในแบบที่เลียนแบบการติดยาเสพติดของมนุษย์ ยังไม่เคยถูกรายงาน จึงเป็นไปได้ว่า การได้รับ meth ในแบบที่แตกต่างกัน อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง BDNF ที่แตกต่างกันตามลักษณะของการได้รับยา และจะนำมาซึ่งความเข้าใจการแสดงออกทางพฤติกรรมที่แตกต่างกันได้ ดังนี้จึงเป็นที่มาของการศึกษา ผลของการได้รับ meth ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ของหนูทดลอง เพื่อให้ทราบถึงกลไกที่สัมพันธ์กับการเกิดความเป็นพิษของ meth ต่อสมอง อันอาจเชื่อมโยงไปสู่ความเข้าใจการแสดงออกทางพฤติกรรมที่ผิดปกติ การมีความจำบกพร่อง และเป็นข้อมูลในการออกแบบวิธีการรักษาให้กับผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองของหนูทดลอง มีวิธีดำเนินงานดังแสดงต่อไปนี้

3.1 การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการขออนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง และได้รับการรับรองให้ดำเนินงานวิจัยได้จากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตามเลขที่โครงการ NU-AE560618 (เลขที่รับรอง 56 04 0057) และมหาวิทยาลัยบูรพา ตามเลขที่ IACUC014/2564

3.2 สัตว์ทดลอง

งานวิจัยใช้ตัวอย่างสมองจาก หนูขาวพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้น้ำหนัก 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล โดยสัตว์ทดลองได้ถูกพักไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งทำการควบคุมอุณหภูมิที่ 24± 1 °C ตลอดเวลา และควบคุมแสง สว่าง:มืด 12:12 ชั่วโมงต่อวัน หนูทดลองทุกตัวถูกจัดให้ได้รับอาหารเม็ดและน้ำอย่างบริบูรณ์ตลอดการทดลอง

3.3 กลุ่มของสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ ได้ทำการใช้ตัวอย่างสมองของสัตว์ทดลองต่อจากงานวิจัยในหัวข้อ “บทบาทของระบบสารสื่อประสาทกาบาต่อการติดสารเสพติดเมทแอมเฟตามีน” ของ รศ.ดร.สุทิสา ถาน้อย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษา เป็นเนื้อเยื่อสมองของหนูทดลอง จำนวน 24 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ได้แก่

1. กลุ่มควบคุม: สัตว์ทดลองได้รับ saline 0.9% 2ml/kg 3 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 14 วัน และ 4 ครั้ง/วัน ในวันที่ 15
2. กลุ่มที่ได้รับ meth แบบเฉียบพลัน acute binge dose: หนูทดลองได้รับ saline 0.9% 2ml/kg 3 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 14 วัน และวันที่15 ได้รับ methamphetamine 6 mg/kg 4 ครั้ง
3. กลุ่มที่ได้รับ meth แบบเรื้อรัง escalating dose: หนูทดลองได้รับ methamphetamine แบบค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-4 mg/kg เป็นเวลา 14 วัน และได้รับ saline ในวันที่15
4. กลุ่มที่ได้รับ meth แบบ escalating and binge dose ร่วมกัน: หนูทดลองได้รับ meth 0.1-4 mg/kg เป็นเวลา 14 วัน 3 ครั้งต่อวัน และวันที่ 15 ได้รับ 6mg/kg meth จำนวน 4 ครั้ง

3.4 การเตรียมตัวอย่าง slide และการศึกษาการแสดงออกของ BDNF ด้วยวิธี immunohistochemistry

เนื้อเยื่อสมองของสัตว์ทดลองที่ถูกแช่ในน้ำยารักษาสภาพ (4% formaldehyde) ได้ถูกนำมาผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ (tissue processing) การฝังในพาราฟิน (tissue embedding) และการตัดเป็นสไลด์บาง ๆ ขนาด 5 micron โดยเนื้อเยื่อสมองของหนูแต่ละตัว ได้ถูกตัดเป็น 3 ชิ้นต่อเนื่องกัน ชิ้นเนื้อที่ตัดแล้ว ได้ถูกวางติดอยู่บนสไลด์ เพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีน BDNF ด้วยเทคนิค immunohisitochemistry

เนื้อเยื่อสมองของหนูทดลองบริเวณ frontal cortex และ hippocampus ในจำนวน 3 แผ่น/ตัว/สไลด์ ได้ถูกนำมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีน BDNF โดยเทคนิค immunohistochemistry ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน คือ การ deparaffinization ด้วย xylene การ rehydration ด้วยการจุ่มใน ethyl alcohol ความเข้มข้นจาก 100%, 95%, 80%, 70% และ dH2O หลังจากนั้น นำตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการ antigen retrieval ด้วยการแช่ใน 1X citrate buffer (Ph 6.0) ในความร้อน 800P เป็นเวลา 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ภายหลังจากกระบวนการ cool down ทำการล้างตัวอย่างด้วย 1XPBS buffer 3ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ลำดับต่อมากระบวนการ block endogenous enzyme ในเนื้อเยื่อ ได้ถูกทำโดยใช้ 3%H2O2 (15 นาที) ตามด้วยการ block nonspecific protein ด้วย 5% normal goat serum เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (RT) ในขั้นตอนต่อมา rabbit anti-BDNF (mature) (Ab108319, Abcam)ความเข้มข้น 1:100 ได้ถูกเติมเข้าไปจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับ BDNF protein ในเนื้อเยื่อ และทำการบ่มที่ 4 ºC overnight ภายหลังการล้างด้วย 1XPBS goat anti-rabbit IgG H&L (HRP) (Ab6721, Abcam) ความเข้มข้น 1:200 ได้ถูกบ่มเป็นเวลา 1 h, RT เพื่อเข้าจับกับ primary antibody และทำให้เกิดสีแสดงตำแหน่งของการจับของ antigen-antibody complex โดยการให้ทำปฏิกิริยากับ DAB (3 , 3’ – Diaminobenzidine tetrahydrochloride) substrate kit (Ab64238) เป็นเวลา 4 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น และเข้าสู่กระบวนการ dehydration และ clearing ด้วยการแช่ใน series alcohol ความเข้มข้นจาก 70%, 80%, 95%, 100% และ xylene ตามลำดับ

3.5 การถ่ายภาพ

ภายหลังการย้อม immunohistochemistry สไลด์ที่ได้ ถูกนำมาถ่ายภาพด้วยกล้อง Nikon upright microscope ร่วมกับ โปรแกรม NIS ภาพสมองบริเวณ hippocampus และ frontal cortex ที่กำลังขยาย 10X ได้ถูกบันทึก เพื่อนำมาวัดค่า intensity/area ด้วยโปรแกรม image J โดยเริ่มจากการปรับภาพเป็น 8 bit และ subtract background ด้วยขั้นตอน image adjust ค่า intensity ที่วัดได้ ถูกแสดงในค่า mean grey value ค่า mean intensity จาก 3 ซ้ำ/ 1 ตัวอย่าง ได้ถูกบันทึกและนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ของหนูแต่ละกลุ่มเป็นลำดับต่อไป

3.6 วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

Mean intensity/ต่อหน่วยพื้นที่ ของการย้อมติด BDNF protein ในสมองทั้งสองส่วนของหนูทดลองได้ถูกบันทึก และนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบระหว่าง 4 กลุ่ม โดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA, SPSS), LSD with Posthoc Dunnett โดยกำหนดระดับความนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p<0.05$

3.7 ระยะเวลาการวิจัย

1 ปี

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

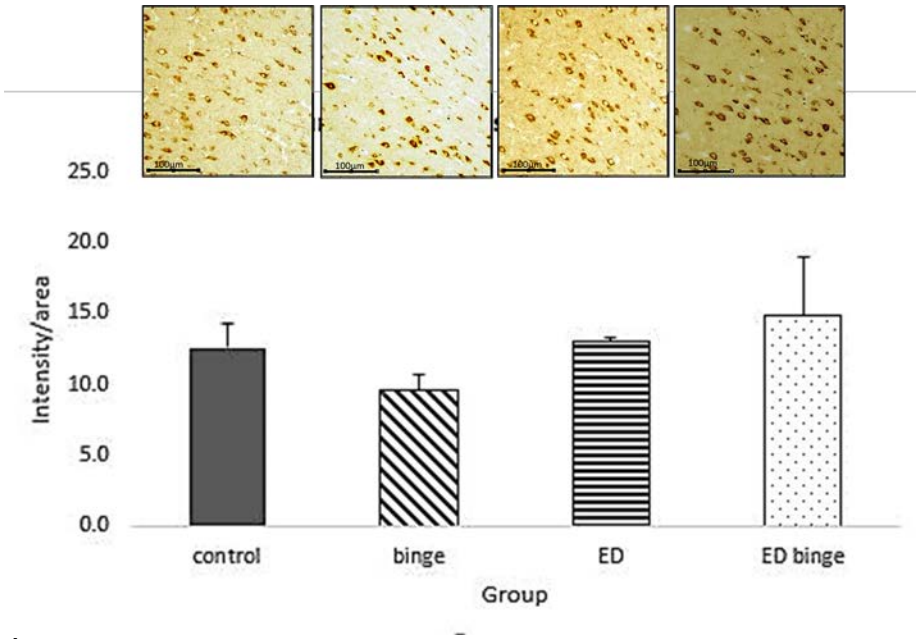
การศึกษาผลของการได้รับ meth ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองของสัตว์ทดลอง เป็นดังต่อไปนี้

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 การแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน Frontal cortex

การแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน frontal cortex ในหนูทดลองแต่ละกลุ่ม ได้ถูกแสดงดังภาพที่ 2 ผลการย้อม immunohistochemistry พบการแสดงออกของ BDNF บริเวณเซลล์ประสาทในสมองของหนูทดลอง และผลการทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองบริเวณนี้ พบว่า หนูทดลองที่ได้รับ METH ทั้งรูปแบบ binge dose, แบบ escalating dose และ escalating binge dose มีการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน frontal cortex ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบในสมองของหนูกลุ่มควบคุม

อย่างไรก็ตาม หนูทดลองที่ได้รับ meth แบบเฉียบพลัน (binge) แสดงแนวโน้มในการลดการแสดงออกของ BDNF ส่วนหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ meth แบบ ED binge dose แสดงทิศทางของการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน frontal cortex อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ไม่ถึงระดับมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value = 0.297 ในกลุ่ม binge meth, 0.895 ในกลุ่ม ED meth, และ 0.468 ในกลุ่ม ED binge meth)

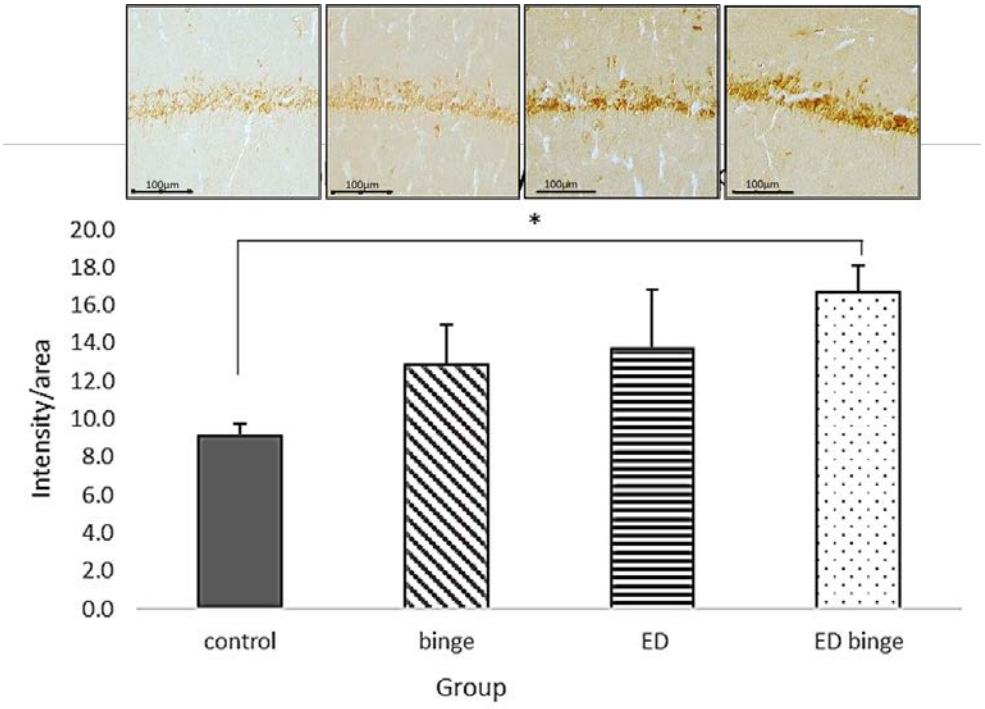


ภาพที่ 2 แสดง BDNF immunohistochemistryในสมองส่วน frontal cortex ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

One-Way ANOVA, LSD with post hoc Dunnett., *P value <0.05 is statistically significant.

4.1.2 การแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน Hippocampus

การแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus เป็นดังแสดงในภาพที่ 3 ผลการย้อม immunohistochemistry ของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus แสดงตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนในบริเวณ cytoplasm ของเซลล์ประสาทเช่นเดียวกับในบริเวณ frontal cortex นอกจากนั้น การทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในหนูทดลองแต่ละกลุ่ม พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารเสพติด meth ทุกรูปแบบมีการแสดงออกของโปรตีน BDNF เพิ่มสูงขึ้น (p=0.206 ในกลุ่ม binge; p=0.145 ในกลุ่ม ED) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หนูทดลองที่ได้รับ meth ในแบบ escalating binge dose พบการแสดงออกของโปรตีน BDNF เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.017) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 3 แสดง BDNF immunohistochemistryในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

One-Way ANOVA, LSD with post hoc Dunnett., *P value <0.05 is statistically significant.

4.2 อภิปรายผล

จากผลการทดลอง การแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองของหนูทดลองที่ได้รับ meth มีความแตกต่างกัน โดยโปรตีน BDNF มีการแสดงออกมากขึ้นในสมองส่วน hippocampus แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสมองส่วน frontal cortex ผลการทดลองชี้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของ meth ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ BDNF protein และการเกิดความเป็นพิษที่แตกต่างกันในสมองแต่ละบริเวณ (regional specific effects of meth) โดย meth แสดงผลกระทบในการเปลี่ยนแปลง BDNF ในสมองส่วน hippocampus มากกว่าส่วน frontal cortex ผลการทดลองที่เกิดขึ้น สนับสนุนงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งรายงานว่า ความเครียดเป็นปัจจัยที่ส่งผลจำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ BDNF DNA methylation ที่แตกต่างกันในสมองแต่ละบริเวณของหนูทดลองที่มีภาวะเครียด (post-traumatic stress disorder) (Roth et al., 2011) โดยการทดลองของ Roth และคณะ พบการลดลงของ BDNF methylation ใน ventral hippocampus CA1, การเพิ่มขึ้นใน dorsal hippocampal CA3 และไม่มีการเปลี่ยนแปลงในสมองส่วน medial prefrontal cortex ดังนั้น เช่นเดียวกับในการศึกษานี้ จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า meth (ซึ่งจัดเป็น stressor อย่างหนึ่งของร่างกาย) แสดง regional specific effects ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน BDNF ในสมองแต่ละบริเวณ

การได้รับ meth ในแบบ escalating binge dose ส่งผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มระดับของ BDNF protein ใน hippocampus ผลการทดลองนี้ สนับสนุนผลงานวิจัยที่ผ่านมาของผู้วิจัยเอง ซึ่งพบว่าการได้รับ meth แบบ escalating binge dose เหนี่ยวนำให้เกิดการลดลงของ BDNF DNA methylation และการเพิ่มขึ้นของ BDNF gene expression ในสมองส่วน hippocampus (Iamjan et al., 2021) กระบวนการ DNA methylation เป็นกระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetic) ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนและ protein ได้ โดย DNA methylation ที่ลดลงจะสัมพันธ์กับการเพิ่ม gene และ protein expression ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของ BDNF protein ในสมองส่วน hippocampus นี้ อาจเป็นผลของ meth ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับ DNA methylation ลงมาสู่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ gene และ protein BDNF

การพบการแสดงออกของ BDNF protein ที่มากขึ้นในสมองส่วน hippocampus นี้ ยังสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งรายงานการเพิ่มขึ้นของ BDNF expression ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองที่รับ meth แบบ meth-self administration โดยผู้วิจัยรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของ BDNF นี้ นำไปสู่การช่วยลดการแสดงออกของปัจจัยหรือโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ประสาทลง (reduced cell death factor expression) (Galinato et al., 2015) ดังนั้น ผลจากงานวิจัยปัจจุบันจึงอภิปรายได้ว่า การเพิ่มขึ้นของ BDNF ในสมองส่วน hippocampus อาจเป็นตัวชี้วัดการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วนนี้เป็นอย่างมาก จึงมีการสร้าง BDNF ที่มากขึ้น เพื่อลดการแสดงออกของ cell death factors ต่าง ๆ ในสมองได้ กระบวนการนี้ สอดคล้องกับหน้าที่ปกติของ BDNF protein ซึ่งเป็น neurotrophic protein อันมีบทบาทในการเจริญเติบโต การคงอยู่และการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท (Bolaños and Nestler 2004)

ในกรณีที่ meth ก่อให้เกิดความเสียหายหรือเกิดการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ได้มาก อาจเนื่องมาจาก เซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus มีความอ่อนไหวต่อสารพิษและเกิดการตายได้ง่าย เพราะสมองส่วนนี้ มีตัวรับสารสื่อประสาท glutamate ชนิด NMDA receptor บรรจุอยู่มาก ซึ่งตัวรับนี้ หากถูกกระตุ้นมาก จะก่อให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทที่เรียกว่า excitotoxicity ได้ (Braun et al., 2011) ซึ่ง meth เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาท glutamate มายังสมองส่วน hippocampus มาก และสามารถกระตุ้นตัวรับ NMDA ทำให้เกิด excitotoxicity หรือการตายของเซลล์ประสาทได้

อย่างไรก็ตาม ในผลการทดลองยังเห็นได้ว่า การได้รับ meth แบบ escalating binge dose ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง BDNF protein ได้มากกว่าการได้รับ meth ในรูปแบบอื่น ๆ ทั้งนี้ อาจเนื่องจาก การได้รับ meth ในรูปแบบ escalating binge dose เป็นการได้รับ meth ในปริมาณที่มากกว่ารูปแบบอื่น คือได้ทั้งแบบต่อเนื่อง (escalating) และได้รับ dose สูงเฉียบพลัน 6 mg/kg ดังนั้น หนูทดลองที่ได้รับ meth ในรูปแบบนี้ จึงแสดงความเป็นพิษที่มากกว่ารูปแบบอื่น ๆ ได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการได้รับ meth เป็นเวลานานและในปริมาณมาก มีผลต่อการตายของเซลล์ประสาทในสมอง โดยเฉพาะสมองส่วน hippocampus อันอาจส่งผลกระทบที่สัมพันธ์กับการแสดงพฤติกรรมที่ผิดปกติในด้านการติดสารเสพติดและความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองของสัตว์ทดลอง โดยเนื้อเยื่อสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ของหนูทดลองกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้ได้รับ meth ในหลายรูปแบบ คือ แบบเฉียบพลัน (binge dose) แบบต่อเนื่อง (escalating dose) และทั้งต่อเนื่องและเฉียบพลัน (escalating binge dose) ได้ถูกเก็บและนำมาศึกษาการแสดงออกของ BDNF protein ด้วยเทคนิค immunohistochemistry ซึ่งบทสรุปของผลการทดลองเป็นดังนี้

5.1 สรุปผลการวิจัย

การได้รับ meth แบบ escalating binge dose ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่แสดงถึงความเสียหายและการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วนดังกล่าว อย่างไรก็ดี ผลของ meth ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ BDNF มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสมองแต่ละบริเวณ และขึ้นอยู่กับขนาดและรูปแบบของการได้รับ โดยการได้รับในแบบ escalating binge dose ที่ได้รับในปริมาณมากที่สุด และเป็นรูปแบบการรับยาที่เลียนแบบการติดยาในมนุษย์นั้น แสดงความเป็นพิษและก่อให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus มากกว่าการรับ meth ในขนาดสูงครั้งเดียว หรือได้รับแบบต่อเนื่องตั้งแต่ขนาดต่ำไปสูงเพียงอย่างเดียว

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ศึกษาและรายงานเพียงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมอง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ชี้แสดงถึงความเป็นพิษของ meth ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของสมองและอาจเป็นปัจจัยที่สัมพันธ์กับการแสดงออกทางพฤติกรรมที่ผิดปกติตามมา ดังนี้ นักวิจัยเห็นว่า การศึกษาการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus เพิ่มเติม และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของ BDNF และการแสดงออกของพฤติกรรม เช่น พฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ (novel object recognition) พฤติกรรมการติดสารเสพติด อาทิ hyperlocomotion และ stereotypy จึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาในลำดับต่อไป ทั้งนี้ เพื่อความเข้าใจและยืนยันผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงของ BDNF ในสมองต่อการชี้วัดการตายของเซลล์ประสาทและการแสดงพฤติกรรมที่ผิดปกติ

นอกจากนั้น เมื่อพบการเปลี่ยนแปลงของ BDNF ในสมองแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงของตัวรับ BDNF คือ Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) และโมเลกุลอื่น ๆ ใน BDNF -TrkB transduction signaling cascade ร่วมด้วย ดังนั้น เพื่อให้เห็นถึงกลไกของ meth ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของสมองผ่านการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับ BDNF การศึกษาโมเลกุลที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ ใน pathway เดียวกันจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติม

5.3 ปัญหาและอุปสรรคของการวิจัย

งานวิจัย มีปัญหาและอุปสรรคในด้านการเงินสำหรับการดำเนินงานวิจัย ซึ่งได้รับล่าช้ากว่าปกติ ทำให้ผู้วิจัยซึ่งไม่มีสารหรืออุปกรณ์อยู่ก่อนแล้วในห้องปฏิบัติการ ไม่สามารถดำเนินงานวิจัยล่วงหน้าก่อนได้รับเงิน ดังนี้ จึงทำให้ผู้วิจัยเริ่มการดำเนินงานวิจัยภายหลังระยะเวลาที่ระบุในสัญญาล่าช้าไป อีกทั้ง ในงานวิจัยนี้ มีกระบวนการถ่ายรูปผลการทดลอง เพื่อนำมาวัด intensity ด้วย แต่กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้อยู่ทำงานผิดปกติ จำเป็นต้องรอการซ่อมแซมหรือรอเครื่องที่จัดซื้อใหม่ ผู้วิจัยจึงดำเนินงานล่าช้าในกระบวนการถ่ายภาพร่วมด้วย จากสาเหตุที่กล่าวข้างต้น ทำให้งานวิจัยนี้ ไม่เสร็จสิ้นตามกำหนดระยะเวลาในสัญญาและจำเป็นต้องมีการขยายระยะเวลารับทุนเพิ่มเติม

บรรณานุกรม

สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม. ผลการปราบปรามยาเสพติดทั่วประเทศ ประจำปี 2562 https://www.oncb.go.th/doclib/forms/allitems.aspx

Allegri, R. F. and P. Harris (2001). [Prefrontal cortex in memory and attention processes]. **Rev Neurol** 32(5): 449-453.

Almalki, A. H., S. C. Das, F. S. Alshehri, Y. S. Althobaiti and Y. Sari (2018). Effects of sequential ethanol exposure and repeated high-dose methamphetamine on striatal and hippocampal dopamine, serotonin and glutamate tissue content in Wistar rats. **Neurosci Lett.** 665. 61-66.

Autry, A. E. and L. M. Monteggia (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacol Rev.** 64(2). 238-258.

Bolaños, C. A. and E. J. Nestler (2004). Neurotrophic mechanisms in drug addiction. Neuromolecular Med. 5(1). 69-83.

Boyer, P., J. L. Phillips, F. L. Rousseau and S. Ilivitsky (2007). Hippocampal abnormalities and memory deficits: new evidence of a strong pathophysiological link in schizophrenia. **Brain Res Rev.** 54(1). 92-112.

Braun, A.A., Herring, N.R., Schaefer, T.L., Hemmerle, A.M., Dickerson, J.W., Seroogy, K.B., Vorhees, C.V., and Williams, M.T. (2011). Neurotoxic (+)- methamphetamine treatment in rats increases brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin receptor kinase B expression in multiple brain regions. **Neuroscience.** 184. 164-171

Conner, J. M., J. C. Lauterborn, Q. Yan, C. M. Gall and S. Varon (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. **J Neurosci.** 17(7). 2295-2313.

Cooper, D. C., S. J. Moore, N. P. Staff and N. Spruston (2003). Psychostimulant-induced plasticity of intrinsic neuronal excitability in ventral subiculum. **J Neurosci.** 23(30). 9937-9946.

Courtney, K. E. and L. A. Ray (2014). Methamphetamine: an update on epidemiology, pharmacology, clinical phenomenology, and treatment literature. **Drug Alcohol Depend.** 143. 11-21.

Dom, G., B. Sabbe, W. Hulstijn and W. van den Brink (2005). Substance use disorders and the orbitofrontal cortex: systematic review of behavioural decision-making and neuroimaging studies. **Br J Psychiatry**. 187. 209-220.

Galinato, M. H., L. Orio and C. D. Mandyam (2015). Methamphetamine differentially affects BDNF and cell death factors in anatomically defined regions of the hippocampus. **Neuroscience.** 286. 97-108.

Goldstein, R. Z. and N. D. Volkow (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **Am J Psychiatry.** 159(10). 1642-1652.

Grant, K. M., T. D. LeVan, S. M. Wells, M. Li, S. F. Stoltenberg, H. E. Gendelman, G. Carlo and R. A. Bevins (2012). Methamphetamine-associated psychosis. **J Neuroimmune Pharmacol.** 7(1). 113-139.

Grüter, T., Wieschollеck, V., Dubovyk, V., Aliane, V., & Manahan-Vaughan, D. (2015). Altered neuronal excitability underlies impaired hippocampal function in an animal model of psychosis. **Frontiers in behavioral neuroscience**. 9. 117.

Gunaydin, L. A. and A. C. Kreitzer (2016). Cortico-Basal Ganglia Circuit Function in Psychiatric Disease. **Annu Rev Physiol.** 78. 327-350.

Hsieh, J. H., D. J. Stein and F. M. Howells (2014). The neurobiology of methamphetamine induced psychosis. **Frontiers in human neuroscience.** 8. 537-537.

Iamjan, S. A., S. Thanoi, P. Watiktinkorn, H. Fachim, C. F. Dalton, S. Nudmamud-Thanoi and G. P. Reynolds (2021). Changes of BDNF exon IV DNA methylation are associated with methamphetamine dependence. **Epigenomics.** 13(12). 953-965.

Iamjan, S. A., S. Thanoi, P. Watiktinkorn, S. Nudmamud-Thanoi and G. P. Reynolds (2015). BDNF (Val66Met) genetic polymorphism is associated with vulnerability for methamphetamine dependence. **Pharmacogenomics.** 16(14). 1541-1545.

Jones, S. and A. Bonci (2005). Synaptic plasticity and drug addiction. **Curr Opin Pharmacol.** 5(1). 20-25.

Keralapurath, M. M., S. B. Briggs and J. J. Wagner (2017). Cocaine self-administration induces changes in synaptic transmission and plasticity in ventral hippocampus. **Addict Biol.** 22(2). 446-456.

Kerdsan, W., S. Thanoi and S. Nudmamud-Thanoi (2009). Changes in glutamate/NMDA receptor subunit 1 expression in rat brain after acute and subacute exposure to methamphetamine. **J Biomed Biotechnol.** 2009. 329631.

Kerdsan, W., S. Thanoi and S. Nudmamud-Thanoi (2012). Changes in the neuronal glutamate transporter EAAT3 in rat brain after exposure to methamphetamine. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 111(4). 275-278.

MacDonald, J. F., M. F. Jackson and M. A. Beazely (2006). Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. **Crit Rev Neurobiol.** 18(1-2). 71-84.

Panenka, W. J., R. M. Procyshyn, T. Lecomte, G. W. MacEwan, S. W. Flynn, W. G. Honer and A. M. Barr (2013). Methamphetamine use: a comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. **Drug Alcohol Depend.** 129(3). 167-179.

Perry, J. L., J. E. Joseph, Y. Jiang, R. S. Zimmerman, T. H. Kelly, M. Darna, P. Huettl, L. P. Dwoskin and M. T. Bardo (2011). Prefrontal cortex and drug abuse vulnerability: translation to prevention and treatment interventions. **Brain Res Rev.** 65(2). 124-149.

Ren, Q., M. Ma, C. Yang, J. C. Zhang, W. Yao and K. Hashimoto (2015). BDNF-TrkB signaling in the nucleus accumbens shell of mice has key role in methamphetamine withdrawal symptoms. **Translational psychiatry.** 5(10). e666-e666.

Roth, T.L., Zoladz, P.R., Sweatt, J.D., Daimone, D.M., (2011). Epigenetic modification of hippocampal BDNF DNA in adult rat in an animal model of post-traumatic stress disorder. **Journal of psychiatric research.** 45(7). 919-926.

Sabrini, S., B. Russell, G. Wang, J. Lin, I. Kirk and L. Curley (2020). Methamphetamine induces neuronal death: Evidence from rodent studies. **NeuroToxicology.** 77. 20-28.

Schoenbaum, G., M. R. Roesch and T. A. Stalnaker (2006). Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. **Trends Neurosci.** 29(2). 116-124.

Schoenbaum, G. and Y. Shaham (2008). The role of orbitofrontal cortex in drug addiction: a review of preclinical studies. **Biol Psychiatry.** 63(3). 256-262.

Shahidi, S., A. Komaki, R. Sadeghian and S. S. Asl (2019). Different doses of methamphetamine alter long-term potentiation, level of BDNF and neuronal apoptosis in the hippocampus of reinstated rats. **The Journal of Physiological Sciences**. 69(2). 409-419.

Siddiqui, S. V., U. Chatterjee, D. Kumar, A. Siddiqui and N. Goyal (2008). Neuropsychology of prefrontal cortex. **Indian J Psychiatry.** 50(3). 202-208.

Smith, E. E. and J. Jonides (1999). Storage and executive processes in the frontal lobes. **Science.** 283(5408). 1657-1661.

Tamminga, C. A., A. D. Stan and A. D. Wagner (2010). The hippocampal formation in schizophrenia. **Am J Psychiatry**. 167(10). 1178-1193.

Veerasakul, S., S. Thanoi, G. P. Reynolds and S. Nudmamud-Thanoi (2016). Effect of Methamphetamine Exposure on Expression of Calcium Binding Proteins in Rat Frontal Cortex and Hippocampus. **Neurotox Res.** 30(3). 427-433.

Volkow, N. D. and J. S. Fowler (2000). Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. **Cereb Cortex.** 10(3). 318-325.

Witter, M. P. (2003). Organization of cortico-hippocampal networks in rats related to learning and memory. **International Congress Series.** 1250. 131-145.

Yamada, K. and T. Nabeshima (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. **J Pharmacol Sci**. 91(4). 267-270.

Yu, S., L. Zhu, Q. Shen, X. Bai and X. Di (2015). Recent advances in methamphetamine neurotoxicity mechanisms and its molecular pathophysiology. **Behav Neurol.** 2015. 103969.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

เอกสารรับรองจริยธรรมงานวิจัยในสัตว์ทดลอง

ที่ 14/2564

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์

คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาโครงการวิจัย

รหัสโครงการ IACUC 014/2564

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

ภาษาไทย ผลของการได้รับเมทแอมเฟตามีนต่อการแสดงออกของโปรตีนบีดีเอ็นเอฟและการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในสมองของหนูทดลอง

หัวหน้าโครงการวิจัย	ดร.ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์
หน่วยงานที่สังกัด	คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยบูรพา

ข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับข้อกำหนดการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ ตามข้อเสนอการวิจัยนี้ได้

วันที่รับรอง : วันที่ 17 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2564
วันที่หมดอายุ : วันที่ 17 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2565

ลงนาม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรัชญา แก้วแก่น)
ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา