รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความสัมพันธ์ของการเกิดยีนโพลีมอร์ฟิซึมของยีน BDNF และ GRIA3 ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย

Association of BDNF and GRIA3 gene polymorphisms with vulnerability for major depressive disorder in the Thai population

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
ชื่อ-นามสกุล ดร.ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์
สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์
คณะที่สังกัด สหเวชศาสตร์

รหัสโครงการ AHS9/2562

ผู้ร่วมวิจัย
ดร.เบญจมาศ สุขใจ สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2562
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
สิงหาคม 2563

หัวข้อวิจัย ความสัมพันธ์ของการเกิดยีนโพลีมอร์ฟิซึมของยีน BDNF และ GRIA3 ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย

ชื่อผู้วิจัย ดร.ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์ และ ดร.เบญจมาศ สุขใจ (ผู้วิจัยร่วม)

หน่วยงาน คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ปีงบประมาณ 2562

บทคัดย่อ

โรคซึมเศร้า (Major depressive disorder) เป็นโรคความผิดปกติทางอารมณ์ ที่สัมพันธ์กับการลดลงของสารสื่อประสาท serotonin และการส่งสัญญาณประสาทที่ผิดปกติในสมอง Brain-derived neurotrophic factor หรือ BDNF (สร้างจาก BDNF gene) เป็นโปรตีนที่สำคัญในการปกป้องเซลล์ประสาท ช่วยส่งเสริมและปรับสมดุลการส่งสัญญาณประสาท (synaptic plasticity) ในระบบสารสื่อประสาทต่าง ๆ รวมถึงระบบสารสื่อประสาท serotonin นอกจากนี้ โปรตีนตัวรับสารสื่อประสาทกลูตาเมทชนิด AMPA (สร้างจาก GRIA gene) มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของระบบประสาทและการส่งสัญญาณประสาท งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ระดับของ BDNF และ ตัวรับสารสื่อประสาทกลูตาเมทชนิด AMPA มีการลดลงในสมองของผู้ป่วยโรคซึมเศร้า ดังนี้ การเกิด gene polymorphism ของ BDNF และ GRIA genes ซึ่งเป็นกระบวนการทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่สัมพันธ์กับกลไกการก่อโรคซึมเศร้าได้ การศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของยีน BDNF (rs6265) และ GRIA3 (rs502434) ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย การศึกษา SNP genotyping ของยีน BDNF รหัส rs6265 และ GRIA3 รหัส rs502434 ได้ถูกดำเนินการในตัวอย่าง DNA ของอาสาสมัครชาวไทยกลุ่มควบคุมจำนวน 100 คน และอาสาสมัครกลุ่มผู้ป่วยซึมเศร้า จำนวน 100 คน โดย TaqMan SNP genotyping assay ผลการทดลอง ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่ของ genotype และ allele ของทั้ง ยีน BDNF-rs6265 และ GRIA3-rs502434 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วย แสดงให้เห็นว่า การเกิด gene polymorphism ของยีน BDNF และ GRIA3 ในรหัสนี้ ไม่สัมพันธ์ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้า ปัจจัยความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนที่ศึกษานี้ อาจยังไม่ใช่ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมที่ส่งผลโดยตรงต่อกลไกการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย

Research title Association of BDNF and GRIA3 gene polymorphisms with vulnerability for major depressive disorder in the Thai population

Investigators Dr. Sri-arun Iamjan and Dr. Benjamard Thaweethee Sukjai

หน่วยงาน Faculty of Allied Health Science, Burapha University

ปีงบประมาณ 2562

Abstract

Major depressive disorder (MDD) is one of mood disorder that related to the reduction of serotonin neurotransmitter. The decrease of serotonin can contribute dysfunction of neurotransmission in the brain. The dysfunction of neurotransmitter system has been reported in neurobiology of MDD. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a member of neurotrophin family, plays role in neuronal growth, survival and maintenance. AMPA glutamate receptor subunit 3 (encoded by GRIA3 gene) is an ionotropic glutamate receptor which plays role in initial excitatory neurotransmission. Both BDNF and AMPA3 are implicated in the neurotransmitter systems and neuronal synaptic plasticity. Previous studies have reported the implication of BDNF and AMPA in psychiatric disorder, including MDD. Reductions of BDNF and AMPA glutamate receptor has been observed in postmortem brain of MDD patients. Moreover, single nucleotide polymorphism (SNP) is one of genetic mechanism related to control gene and protein levels. It is possible that the polymorphisms of BDNF and GRIA genes may also involve in the pathology of MDD. Therefore, the objective of this study is to evaluate the associations of BDNF rs6265 and GRIA3 rs502434 polymorphism with vulnerability for MDD in the Thai population. The rs6265 and rs502434 SNPs genotyping were performed in 100 controls and 100 MDD patients using TaqMan SNPs genotyping assays. The results showed that the frequencies of both alleles and genotypes of the BDNF rs6265 and GRIA3 rs502434 were not significantly different when compared between control and MDD groups. These results suggest that the polymorphism of BDNF rs6265 and GRIA3 rs502434 are not associated with susceptibility for MDD. These genetic variants might be not directly genetic risk factors for the mechanism underlying MDD in the Thai population.

คำนำ

งานวิจัยนี้ ได้จัดทำขึ้น เนื่องจากปัญหาของสังคมในปัจจุบัน ที่เต็มไปด้วยความเร่งรีบ การแข่งขันสูง ซึ่งกลายเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ทำให้บุคคลเกิดความเครียดได้ง่ายขึ้น อีกทั้ง เห็นได้ว่า บุคคลแต่ละคนจะมีความทนทานหรือความอ่อนไหวต่อสภาวะเครียดได้แตกต่างกัน ความแตกต่างในด้านความทนทานหรือความอ่อนไหวในการเกิดโรคซึมเศร้าของแต่ละบุคคลนี้ ถูกเชื่อว่าเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคล เช่น การเกิด gene polymorphism ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีนเพียงเบสเดียวบนตำแหน่งเดียวกัน ทำให้แต่ละบุคคลเกิดลักษณะที่แสดงออกภายนอกที่แตกต่างกันได้

ดังนี้ ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญในการศึกษาบทบาทของการเกิด gene polymorphism ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในตัวอย่างประชากรไทย เพื่อเป็นข้อมูลรายงานให้ทราบและเข้าใจถึง บทบาทของการเกิด gene polymorphism ต่อความไวในการเกิดโรค กลไกที่เป็นไปได้ของการเกิดโรคซึมเศร้า เพื่อประโยชน์ที่จะนำไปสู่การต่อยอด ในการออกแบบการรักษาอย่างจำเพาะเจาะจงกับผู้ป่วย โดยอาศัยความแตกต่างทางพันธุกรรมของผู้ป่วยเฉพาะราย

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการทั้งการศึกษาและทางการแพทย์ รวมถึงผู้ป่วยโรคซึมเศร้า ทำให้ได้องค์ความรู้ที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคลต่อการโรคซึมเศร้าในกลุ่มประชากรชาวไทยได้

คณะผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ของการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมของยีน BDNF และ GRIA3 ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย (Association of BDNF and GRIA3 gene polymorphisms with vulnerability for major depressive disorder in the Thai population) สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้สนับสนุนทุนในการทำวิจัย ประเภทเงินรายได้ประจำปี 2562 ตามสัญญาทุนเลขที่ AHS9/2562 รวมถึง สนับสนุนพื้นที่และเครื่องมือในการทำวิจัย ส่งผลให้การดำเนินการวิจัยเสร็จสิ้นได้ตามเป้าหมาย

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ รองศาสตราจารย์ ดร.สุทิสา ถาน้อย อาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้ยินยอมให้ใช้ตัวอย่างในการวิจัย พร้อมทั้งคอยให้ข้อแนะนำ เป็นที่ปรึกษาในการดำเนินการวิจัย และเป็นแรงบันดาลใจให้ดำเนินงานวิจัยนี้ขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงศิริจิต สุทธจิตต์ สังกัดภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และผู้ร่วมวิจัย ดร.เบญจมาศ สุขใจ อาจารย์ประจำสำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ผู้ดำเนินการคัดกรองอาสาสมัคร การดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษานี้

ขอบพระคุณอาสาสมัครในโครงการทุกท่านที่เข้าร่วมในงานวิจัย ทำให้เกิดงานที่สร้างองค์ความรู้ใหม่ๆเพิ่มขึ้น สำหรับใช้ในการต่อยอดทางการแพทย์ได้ต่อไป

ขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติ The neuroscience and reproductive biology research group ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับกำลังใจ การความช่วย ในการดำเนินเอกสาร และการจัดหาตัวอย่าง

ที่สำคัญในท้ายที่สุดนี้ ขอขอบพระคุณครอบครัว ครูอาจารย์ทุกท่าน ที่คอยสนับสนุน และเป็นส่วนหนึ่งในการให้ความรู้มากมาย สั่งสมมาจนสามารถดำเนินงานในสาขาวิชาชีพและงานวิจัยต่อยอดได้

ดร.ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์
หัวหน้าทีมวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข

คำนำ..... ค

กิตติกรรมประกาศ..... ง

สารบัญ..... จ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ช

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

1.4 ขอบเขตของการวิจัย..... 3

1.5 นิยามศัพท์..... 4

บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 โรคซึมเศร้าและปัญหา..... 5

2.2 อุบัติการณ์การเกิดโรคซึมเศร้า..... 5

2.3 โรคซึมเศร้าและการเปลี่ยนแปลงในสมอง..... 5

2.4 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)..... 6

2.5 Alpha-amino-3 hydroxy-5-methyl-4-isosasole propionic acid (AMPA) glutamate receptor (AMPA glutamate receptor)..... 7

2.6 Gene polymorphism..... 8

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 10

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง..... 10

3.2 การคัดเข้าของอาสาสมัคร..... 10

3.3 การสกัด DNA จากกระดาษกรอง FTA card..... 11

3.4 ศึกษา SNP genotyping ของ BDNF และ GRIA3 genes และการเก็บรวบรวมข้อมูล..... 11

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล…… ….. 12
3.6 ระยะเวลาการวิจัย..... 12
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล…….. 13
4.1 ผลการวิจัย ความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของ BDNF and GRIA3 gene polymorphisms in major depressive disorder and controls…….. 13
4.1.1 Hardy-Weinberg equilibrium test…… 13
4.1.2 ความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของยีน BDNF rs6265 และ GRIA3 rs502434ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้า…….. 13
4.2 อภิปรายผลการทดลอง..... 16
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ…… 20
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 20
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 20
5.3 ปัญหาและอุปสรรคของการวิจัย…… 20
บรรณานุกรม..... 22
ภาคผนวก…… 28
ภาคผนวก ก ผลรับรองจริยธรรมงานวิจัยงานวิจัยในมนุษย์
ภาคผนวก ข ตารางการใช้งบประมาณ
ภาคผนวก ค เอกสารรายงานความก้าวหน้าของงานวิจัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงความถี่ของ genotype ในยีน BDNF rs6265 และ ยีน GRIA3 rs502434..... 14

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงการจัดกลุ่ม genotype ของ BDNF rs6265 และ GRIA3 rs502434
โดย TaqMan genotyping assay..... 14
ภาพที่ 2 กราฟแสดง genotype frequency ของ BDNF gene polymorphism
ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม..... 15
ภาพที่ 3 กราฟแสดง genotype frequency ของ GRIA3 gene polymorphism
ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม..... 15

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคซึมเศร้า (major depressive disorder) เป็นโรคของความผิดปกติทางอารมณ์และความคิด ที่ส่งผลต่อสุขภาพจิต การดำเนินชีวิตในสังคม และร้ายแรงไปถึงการทำร้ายตัวเอง ผู้อื่น และการฆ่าตัวตาย สาเหตุของการเกิดโรคซึมเศร้านั้น ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานวิจัยพบว่า โรคซึมเศร้ามีสาเหตุสัมพันธ์กับการลดลงของสารสื่อประสาทซีโรโทนิน (serotonin) (Dean and Keshavan 2017) แล้วส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณที่ผิดปกติในสมอง อันเป็นปัจจัยหนึ่งที่นำไปสู่การเกิดโรคซึมเศร้าได้

การออกแบบการรักษาโรคซึมเศร้าในปัจจุบันนั้น ได้กระทำโดยการให้ยาต้านซึมเศร้า ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการเก็บกลับของสารสื่อประสาท serotonin เพื่อเพิ่มจำนวนสารสื่อประสาทในช่องว่างระหว่างเซลล์ (synaptic cleft) ให้กลับมาอยู่ในระดับที่ปกติ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการรักษาโดยการให้ยาต้านซึมเศร้านี้ เป็นเพียงการบรรเทาความรุนแรงและชะลอการพัฒนาของโรค ไม่สามารถรักษาให้หายขาด อีกทั้ง ผู้ป่วยบางรายมีการตอบสนองต่อยาได้ไม่ดี ปัญหาดังกล่าว สะท้อนให้เห็นว่า สาเหตุของการเกิดโรคซึมเศร้า อาจไม่ได้มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงในระบบสารสื่อประสาท serotonin เพียงอย่างเดียว อาจมีความผิดปกติในสมองอย่างอื่นร่วมด้วย อาทิ ความผิดปกติของระบบสารสื่อประสาทกลูตาเมท (Glutamate) และกาบา (GABA), ความผิดปกติของโปรตีนในกลุ่ม neurotrophin family อย่าง brain derived neurotrophic factor (BDNF)) รวมถึงปัจจัยด้านความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคลด้วย

Brain-derived neurotrophic factor หรือ BDNF (สร้างจาก BDNF gene) เป็นโปรตีนที่สำคัญในการปกป้องเซลล์ประสาท มีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญเติบโต การคงอยู่และการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมและปรับสมดุลการส่งสัญญาณประสาท (synaptic plasticity) ในระบบสารสื่อประสาทต่าง ๆ (Bolaños and Nestler 2004) รวมถึงระบบสารสื่อประสาทซีโรโทนิน เช่นเดียวกับโปรตีนตัวรับสารสื่อประสาทกลูตาเมทชนิด AMPA ที่สร้างจาก GRIA gene มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการทำงานในระบบประสาท และการส่งสัญญาณประสาท เกี่ยวข้องกับกระบวนการเรียนรู้และความจำ งานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ระดับของ BDNF และ ตัวรับสารสื่อประสาทกลูตาเมทชนิด AMPA ที่ลดลงในสมอง มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของการเกิดโรคซึมเศร้า ดังนี้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า การเกิด gene polymorphism ของ BDNF และ GRIA genes น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่

สำคัญในกลไกการก่อโรคซึมเศร้าได้ เนื่องจากการเกิด gene polymorphism สามารถเป็นหนึ่งในกระบวนการทางพันธุกรรมที่ส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน

ปัจจัยทางพันธุกรรมของการเกิด gene polymorphism หรือการเกิด single nucleotide polymorphism (SNP) (อ่านว่าสนิปส์) ของยีน เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน ณ ตำแหน่งใด ๆ เพียงหนึ่งตำแหน่ง แล้วอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของยีนหรือโปรตีน นำไปสู่การเกิดความผิดปกติของร่างกายได้ เป็นที่ทราบกันดีว่า ปัจจัยความแตกต่างทางพันธุกรรม การเกิด gene polymorphism สามารถทำให้บุคคลมีความทนทาน ความไว หรือความเสี่ยงในการเกิดโรค ความรุนแรงของโรค รวมถึงการตอบสนองต่อยารักษาโรคได้แตกต่างกันในแต่ละบุคคลหรือเชื้อชาติ (Sripichai & Fucharoen, 2007) การเกิด gene polymorphism ของยีน BDNF (gene ที่ถอดและแปลรหัสให้ BDNF protein) โดยเฉพาะในตำแหน่ง rs6265 (val66met) ก็ได้ถูกรายงานว่า มีความสัมพันธ์ต่อความไวต่อการเกิดโรคความผิดปกติทางอารมณ์หลายประเภท อาทิ substance-relating disorders (โรคจากการใช้สารเสพติด), eating disorders (โรคจากพฤติกรรมการกิน), schizophrenia (จิตเภท) (Gratacòs et al., 2007), mood disorder (ความผิดปกติทางอารมณ์) (Autry & Monteggia, 2012) และ major depressive disorder (โรคซึมเศร้า) เช่นเดียวกับการเกิด gene polymorphism ของ GRIAs gene (ยีนตัวรับสารสื่อประสาทกลูตาเมทชนิด AMPA) ที่ถูกรายงานถึงความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคจิตเภท schizophrenia (Kang et al., 2012; Magri et al., 2006; Magri et al., 2008) โรคปวดหัวชนิด migraine (Fang et al., 2016) อารมณ์สองขั้ว bipolar disease (Kerner et al., 2009; Gécz et al., 1999) การติดสารมอร์ฟีน (morphine dependence) (Billa, et al., 2010) ติดสุรา (alcoholism) (Karpyak et al., 2012) รวมถึงการตอบสนองต่อยาในการรักษาผู้ป่วยซึมเศร้า (Black, 2005) ความสัมพันธ์ดังกล่าว อาจเนื่องมาจาก การเกิด gene polymorphisms ของ BDNF และ GRIA genes มีผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน อันสามารถนำไปสู่การพัฒนาของโรคซึมเศร้าภายหลังจากการได้รับสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดความเครียดได้

จากที่กล่าวมาข้างต้น มีความเป็นไปได้ว่า ปัจจัยทางพันธุกรรม การเกิด gene polymorphism น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อความอ่อนไหวในการเป็นโรคซึมเศร้าได้ จึงเห็นถึงความสำคัญในการศึกษาความสัมพันธ์ของความแตกต่างทางพันธุกรรมการเกิด gene polymorphism ของ gene BDNF และ GRIA3 ต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย ทั้งนี้ เพื่อประโยชน์ทำให้ทราบถึง ยีนที่จำเพาะเจาะจงกับการเกิดโรค กลไกที่เป็นไปได้ของการเกิดโรค การทำนายความทนทาน/ความไวในการเกิดโรค ประสิทธิภาพของการรักษา การตอบสนองต่อยาของแต่ละบุคคล และอาจต่อยอดไปสู่การพัฒนาวิธีการวินิจฉัย ประเมินความเสี่ยง/ความรุนแรงของโรค วิธีการรักษา ประเมินผลการรักษา และการตอบสนอง

ต่อยาของผู้ป่วยโรคซึมเศร้าแต่ละบุคคลได้อย่างจำเพาะเจาะจงและให้ประสิทธิผลมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกลุ่มประชากรไทย

1.2 **วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

วัตถุประสงค์หลัก : เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้า

วัตถุประสงค์เฉพาะ :

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ในยีน BDNF รหัส rs6265 ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ในยีน GRIA3 รหัส rs502434 ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย

1.3 **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาวิจัย คือ

1. เป็นการเพิ่มพูนความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และการแพทย์ ที่แสดงให้ทราบว่า การเกิด gene polymorphism ของยีน BDNF และ GRIA3 มีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดโรคซึมเศร้า โดยอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมที่ส่งผลต่อการเป็นโรคซึมเศร้าในประชากรไทย
2. เป็นการแสดงตัวชี้วัดที่เป็นไปได้ (possible biomarker) ในการนำมาพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยคัดกรองเบื้องต้นให้กับผู้ป่วยโรคซึมเศร้า และนำไปสู่การรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้น ก่อนที่จะมีอาการแสดงออกของการเป็นโรคซึมเศร้าเกิดขึ้น อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดเพื่อประเมินความเสี่ยงและความรุนแรงของการเป็นโรคซึมเศร้าให้กับทั้งบุคคลปกติและผู้ป่วยได้อย่างจำเพาะมากขึ้น ตามข้อมูลทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคล
3. เป็นการเพิ่มองค์ความรู้ ความเข้าใจและทราบถึงกลไกที่เป็นไปได้ของการเกิดโรคซึมเศร้าว่าเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระบบสารสื่อประสาทกลูตาเมท รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของ neurotrophic factors ในสมอง (เช่น BDNF) อันจะนำมาซึ่งการพัฒนายา หรือการรักษาต่อยอด ที่มุ่งไปที่การเยียวยาการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ซึ่งอาจนำไปสู่วิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพและประสิทธิผลมากยิ่งขึ้น

1.4 **ขอบเขตของการวิจัย**

งานวิจัยนี้ ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของการเกิด gene polymorphism ของยีนที่สำคัญ ซึ่งเคยถูกรายงานว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดภาวะความผิดปกติทางจิต (อาทิ ยีน BDNF

และ GRIA3) ในตัวอย่างหยดเลือดจากปลายนิ้วผู้ป่วยโรคซึมเศร้าจำนวน 100 คน เปรียบเทียบกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุม 100 คน โดยใช้เทคนิค SNP (สนิปส์) genotyping

1.5 นิยามศัพท์

1. ความถี่ของ genotype หรือ allele

หมายถึง ลักษณะการกระจายตัวของ genotype หรือ allele ในยีนที่ศึกษา ว่ามีการกระจายตัวอยู่ที่ genotype หรือ allele ใด เป็นจำนวนเท่าใด ในจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด

2. Allele

หมายถึง ยีนที่อยู่แบบเดี่ยว ๆ เช่น allele A, allele C, allele G, allele T เป็นต้น

3. Genotype

หมายถึง ชนิดของยีนที่มาจับคู่กัน (การจับคู่กันของ allele) เช่น genotype GG, Ga หรือ aa เป็นต้น genotype สามารถกำหนดลักษณะที่จะแสดงออกของบุคคลที่ทำให้เรามองเห็นได้ เช่น สีผิว สีผม (เรียกลักษณะที่แสดงออกมาภายนอก นี้ว่า phenotype ซึ่งกำหนดโดยการเข้าคู่กันของยีน genotype นั่นเอง)

4. Gene polymorphism หรือ single nucleotide polymorphism หรือ SNP

หมายถึง ความหลากหลายทางพันธุกรรมรูปแบบหนึ่ง ที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบส (A G T C) ตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียว บนตำแหน่งเดียวกันของ Chromosome เรียกการเปลี่ยนแปลงหรือความแตกต่างตรงนี้ว่า single nucleotide polymorphism หรือ SNP ทั้งนี้ การเปลี่ยนแปลงนี้ สามารถส่งผลให้เกิดความแตกต่างของแต่ละบุคคลได้ เช่น ทำให้บุคคลมีสีผิว สีตา ความไวในการเกิดโรคที่ต่างกัน เป็นต้น หรือในทางตรงกันข้าม การเกิด gene polymorphism อาจไม่รุนแรง และไม่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างบุคคล ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ polymorphism

5. Neurotransmission

หมายถึง การส่งสัญญาณประสาทกันระหว่างเซลล์ประสาท เพื่อติดต่อสื่อสาร หรือสั่งการให้เกิดการทำงานต่าง ๆ ในสมอง โดยใช้สารเคมีในสมองเป็นสื่อในการติดต่อกัน เรียกสารเคมีนั้นว่า เรียกว่า neurotransmitter

6. Rs (ตัวเลข)

หมายถึง รหัสของ SNP ที่เป็นการระบุตำแหน่งของการเกิด SNP ของยีนนั้น ๆ บนสายของ chromosome

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคซึมเศร้าและปัญหา

โรคซึมเศร้า (major depressive disorder) เป็นโรคของความผิดปกติทางอารมณ์ ในทางการแพทย์สามารถวินิจฉัยบ่งชี้ ได้จากการเกิดความผิดปกติอย่างน้อย 5 อาการ ที่เกิดขึ้นเกือบทั้งวันและทุกวันติดต่อกันอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ได้แก่ การมีอารมณ์เศร้า หรือเบื่อหน่ายไม่มีความสุขกับกิจกรรมที่เคยทำ ร่วมกับความผิดปกติอื่น ในด้านการกินอาหาร (เบื่ออาหารหรืออยากอาหารมากกว่าปกติ จนมีน้ำหนักลดหรือเพิ่มแบบผิดปกติ) การนอนหลับ (นอนไม่หลับ หรือนอนหลับมากเกินไป) เคลื่อนไหวช้า อ่อนเพลียไร้เรี่ยวแรง รู้สึกไร้ค่า สมาธิสั้น ความคิดอ่านลดลง และ มีภาวะอยากฆ่าตัวตาย (DSM-IV American psychiatric association, 1994; (Shelton 2007) ปัญหาโรคซึมเศร้านี้มีความร้ายแรง นอกจากจะส่งผลกระทบเป็นอย่างมากต่อผู้ป่วยด้านสุขภาพ ความคิด อารมณ์ และการใช้ชีวิตแต่ละวันแล้ว ยังส่งผลต่อการมีปฏิสัมพันธ์อันดีต่อผู้อื่น การฆ่าตัวตาย ทำร้ายตนเองหรือผู้อื่นด้วย (Sriruenthong et al., 2011) นอกจากนี้ ยังส่งผลต่อการสูญเสียประสิทธิภาพในการทำงาน และทำให้ประเทศสูญเสียแรงงานในการทำงานเพื่อพัฒนาประเทศต่อปีเป็นจำนวนมาก

2.2 อุบัติการณ์การเกิดโรคซึมเศร้า

ในปัจจุบัน ทั่วโลกและประเทศไทย มีอุบัติการณ์ของการเกิดโรคซึมเศร้าเพิ่มสูงขึ้น มีอัตราการฆ่าตัวตายสูงถึง 5.3 หมื่นคนต่อปี ซึ่งเฉลี่ยเป็น 6 ชั่วโมงต่อ 1 คน (ข้อมูลจากกรมสุขภาพจิต เผยแพร่เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2562) โดยการมีภาวะโรคซึมเศร้าเป็นปัจจัยหลักของการฆ่าตัวตายนี้ด้วย กรณีช่วงอายุของผู้ป่วยซึมเศร้านั้น ถูกพบได้ในประชากรหลายกลุ่ม ตั้งแต่ช่วงวัยเรียน วัยทำงาน และผู้สูงอายุ (Kongsuk et al. 2008; Nuntatikul et al. 2008) และสามารถถูกเหนี่ยวนำได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยทางความเครียด (stress event) (Charney and Manji 2004) ปัจจัยทางสังคม สิ่งแวดล้อม การใช้ชีวิต (Paykel 2006; Swaab, Bao, and Lucassen 2005) การเกิดโรคหรือความผิดปกติของระบบประสาท การตายของเซลล์ประสาท (neurodegeneration) (Swaab, Bao, and Lucassen 2005) รวมถึง ความแตกต่าง/ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic variation) (Caspi et al. 2003; Jans et al. 2007)

2.3 โรคซึมเศร้าและการเปลี่ยนแปลงในสมอง

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา เป็นที่ทราบกันดีว่า ความผิดปกติของการส่งสัญญาณในระบบสารสื่อประสาทเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้าได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารสื่อประสาทในกลุ่ม

monoamine (serotonin, epinephrine) ที่ถูกรายงานว่า การลดลงของสารสื่อประสาท serotonin ถูกพบในสมองของผู้ป่วยซึมเศร้า (Dean & Keshavan, 2017) ดังนี้ จึงเป็นเหตุให้การรักษาโรคซึมเศร้าในปัจจุบัน เป็นการรักษาโดยยาต้านซึมเศร้า (antidepressant) ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม SSRI (selective serotonin reuptake inhibitors) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำลายและการเก็บกลับของสารสื่อประสาท serotonin ที่อยู่ในช่องว่าง synaptic cleft เพื่อส่งผลให้มีสารสื่อประสาท serotonin เพิ่มขึ้น พร้อมสำหรับการทำงานหรือการส่งสัญญาณในระดับที่เพียงพอต่อการทำงานที่ปกติของสมอง

อย่างไรก็ตาม การรักษาโดยการให้ยาต้านซึมเศร้ากลุ่ม SSRI ไม่สามารถใช้รักษาผู้ป่วยให้หายขาดได้ เป็นเพียงการเยียวยาความรุนแรงและลดการพัฒนาของโรคให้แก่ผู้ป่วย อีกทั้ง ผู้ป่วยแต่ละคนยังมีการตอบสนองต่อยารักษาที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยของการเกิดโรคซึมเศร้า อาจไม่ได้มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงในระบบสารสื่อประสาท serotonin เพียงอย่างเดียว อาจมีความผิดปกติในสมองอย่างอื่น อาทิ ความผิดปกติของระบบสารสื่อประสาทกลูตาเมท (Glutamate) และกาบา (GABA) หรือความผิดปกติของโปรตีนในกลุ่ม neurotrophin ในสมอง ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบประสาทให้เกิดความผิดปกติ อันสามารถเชื่อมโยงไปสู่กลไกการเกิดโรคซึมเศร้าได้

2.4 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) เป็นโปรตีนในกลุ่ม neurotrophin family ที่มีการแสดงออกในสมองหลายบริเวณ เช่น ventral tegmental area (VTA), hippocampus, frontal cortex, amygdala, dorsal striatum และ nucleus accumbens (Conner et al., 1997) BDNF มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต การรอดชีวิต การคงอยู่ของเซลล์ประสาท และทำงานเกี่ยวข้องในกระบวนการ synaptic plasticity (ความยืดหยุ่นหรือการเปลี่ยนแปลงของสมอง) ในสมอง (Bolaños and Nestler, 2004) รายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ความบกพร่องของการทำงานของ BDNF สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติหรือโรคทางระบบประสาทหลายอย่าง เช่น Huntington's disease, Alzheimer's disease และ addiction (การติดสารเสพติด) (Autry & Monteggia, 2012; Bolaños & Nestler, 2004; Lu et al., 2014) ระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ที่ลดลง ยังส่งผลต่อกระบวนการเรียนรู้ ความจำ (Yamada and Nabeshima, 2003) การเกิดโรคจิตเภท (schizophrenia) และอารมณ์สองขั้ว (bipolar disease) ได้

กรณีความสัมพันธ์ของโปรตีน BDNF ต่อการเกิดโรคซึมเศร้า (major depressive disorder) นั้น Martinowich และคณะ (2007) ได้รายงานว่า BDNF เปรียบเสมือนสารตั้งต้นของความเครียดซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้า (Charney & Manji, 2004) กล่าวคือ ระดับการแสดงออกของ BDNF มีการลดลงในภาวะเครียด (Martinowich et al., 2007) และภาวะซึมเศร้า

(Castrén et al., 2007) แต่กลับมามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นภายหลังจากได้รับยา antidepressants (Castrén & Rantamäki, 2010) แสดงให้เห็นว่า ระดับการแสดงออกของ BDNF ในสมองมีความสัมพันธ์กับกลไกการเกิดโรคซึมเศร้าในผู้ป่วย ดังนี้ จึงมีความน่าสนใจในการใช้ BDNF เป็นตัวชี้วัด (biomarker) การเกิดโรค และเป็นเป้าหมายของการรักษาผู้ป่วยซึมเศร้าได้ต่อไป

นอกจาก BDNF จะมีบทบาทโดยตรง ในการปกป้องเซลล์ประสาทและระบบประสาทแล้ว งานวิจัยที่ผ่านมายังรายงานว่า BDNF สามารถควบคุมการส่งสัญญาณของระบบสารสื่อประสาทต่าง ๆ ในสมองได้ โดยควบคุมปริมาณการแสดงออกของตัวรับสารสื่อประสาท เช่น ตัวรับสารสื่อประสาทกลูตาเมทชนิด AMPA (Alpha-amino-3 hydroxy-5-methyl-4-isosasole propionic acid (AMPA) glutamate receptor) ที่อยู่บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ประสาทและเซลล์ค้ำจุนในสมอง ผ่านกระบวนการ MAPK/ERK partway ของ BDNF–TrkB receptor transduction signaling cascade (Li & Wolf, 2011) แล้วส่งผลต่อการทำงานของสมองด้วยเช่นกัน

2.5 Alpha-amino-3 hydroxy-5-methyl-4-isosasole propionic acid (AMPA) glutamate receptor (AMPA glutamate receptor)

AMPA glutamate receptor (GluR) เป็นโปรตีนตัวรับสารสื่อประสาทกลูตาเมทชนิด ionotropic glutamate receptor ที่พบได้ทั่วไปในสมอง อาทิ hippocampus, nucleus accumbens, dorsal striatum และ prefrontal cortex (Reimers, Milovanovic, and Wolf 2011) มีบทบาทสำคัญในการเป็นจุดเริ่มต้นการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของระบบประสาท (initial excitation, fast excitatory neurotransmission) สำคัญต่อกระบวนการเรียนรู้และสร้างความจำ รวมถึงกลไก synaptic plasticity ในสมองอีกด้วย AMPA glutamate receptor ถูกสร้างจาก GRIA gene และการเกิด gene polymorphism ของ GRIA genes ถูกรายงานว่ามีความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคจิตเภท schizophrenia (Kang et al. 2012; Magri et al. 2006; Magri et al. 2008) โรคปวดหัวชนิด migraine (Fang et al. 2015) อารมณ์สองขั้ว bipolar disease (Kerner et al. 2009; Gécz et al. 1999) การติดสารมอร์ฟีน (morphine dependence) (Billa, Xia, and Morón 2010) ติดสุรา (alcoholism) (Karpyak et al. 2012) รวมถึงการตอบสนองต่อยาในการรักษาผู้ป่วยซึมเศร้า (Black 2005) อีกด้วย

งานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่า AMPA glutamate receptor มีความเกี่ยวข้องกับโรคซึมเศร้า การแสดงออกของ AMPA glutamate receptor มีการลดลง ในสมองของผู้ป่วยที่เป็นโรคซึมเศร้า นอกจากนี้งานวิจัยในกลุ่มของผู้วิจัยเอง (Iamjan et al. 2018) ได้พบว่า รูปแบบ genotype G/0 ของ GRIA3 gene polymorphism ที่รหัส rs502434 มีความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการพัฒนาให้เกิดอาการทางจิตจากการใช้สารเสพติดเมทแอมเฟตามีนในประชากรชายไทย ผลการวิจัยมีความน่าสนใจเพิ่มมากขึ้น เมื่อ

ทดสอบความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างการเกิด gene polymorphism ของ GRIA3 และ BDNF genes ในภาวะการติดสารเสพติด โดยพบว่า การมี G/0 genotype ของ GRIA3 rs502434 gene polymorphism ร่วมกับการมี risk genotype (GG) ของ BDNF gene polymorphism แสดงถึงการมีความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นต่อการติดสารเสพติดเมทแอมเฟตามีนในประชากรชายไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) ดังนี้ จึงเป็นไปได้ว่า การเกิด gene polymorphism ของ gene BDNF และ GRIA3 น่าจะสัมพันธ์กับการเกิดภาวะซึมเศร้าเช่นเดียวกับการเกิดความผิดปกติทางจิตจากการเหนี่ยวนำโดยการใช้สารเสพติด

2.6 Gene polymorphism

ปัจจัยความแตกต่างทางพันธุกรรมการเกิด gene polymorphism หรือ single nucleotide polymorphism หรือ SNP (อ่านว่าสนิปส์) เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีนเพียงหนึ่งตำแหน่งบนสายของ DNA ในตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งการเกิด gene polymorphism ในบางตำแหน่งบน chromosome สามารถส่งผลให้เกิดความแตกต่างทางลักษณะ phenotype ของแต่ละบุคคล เช่น สีผม สีผิว ความทนทาน ความไว ความเสี่ยงในการเกิดโรค รวมถึงประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อยาต่าง ๆ ได้แตกต่างกันในแต่ละบุคคลหรือเชื้อชาติ (Sripichai & Fucharoen, 2007) บาง SNP ส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีน หรือ โปรตีนที่แตกต่างกัน จึงก่อให้เกิดโรคและความผิดปกติได้ต่างกันในแต่ละบุคคล

การเกิด gene polymorphism ของ BDNF โดยเฉพาะในตำแหน่ง rs6265 (val66met) ได้ถูกรายงานว่า มีความสัมพันธ์ต่อความไวในการติดสารเสพติดเมทแอมเฟตามีน (ยาบ้า) ความไวในการเกิดความผิดปกติทางจิตจากการติดสารเสพติดเมทแอมเฟตามีนในประชากรไทย (Iamjan et al., 2015) และความไวต่อการเกิดความผิดปกติต่าง ๆ อาทิ substance-relating disorders (โรคจากการใช้สารเสพติด), eating disorders (โรคจากพฤติกรรมการกิน), schizophrenia (จิตเภท) (Gratacòs et al., 2007), และ mood disorder (ความผิดปกติทางอารมณ์) (Autry & Monteggia, 2012) รวมถึง major depressive disorder (โรคซึมเศร้า) ซึ่งถูกรายงานในประชากรเชื้อชาติ Han Chinese (Liang et al., 2018), Russia (Bondarenko et al., 2016) และ European population (Li et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้น ยังไม่เคยถูกรายงานในประชากรไทย ดังนี้ จึงเห็นความสำคัญของการศึกษา ความสัมพันธ์ของการเกิด BDNF gene polymorphism (rs6265) ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย

เช่นเดียวกับการเกิด gene polymorphism ของ GRIAs gene (ยีนตัวรับสารสื่อประสาทกลูตาเมทชนิด AMPA) ที่ถูกรายงานถึงความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคจิตเภท schizophrenia (Kang

et al., 2012; Magri et al., 2006; Magri et al., 2008) โรคปวดหัวชนิด migraine (Fang et al., 2016) อารมณ์สองขั้ว bipolar disease (Kerner et al., 2009; Gécz et al., 1999) การติดสารมอร์ฟีน (morphine dependence) (Billa, et al., 2010) ติดสุรา (alcoholism) (Karpyak et al., 2012) รวมถึงการตอบสนองต่อยาในการรักษาผู้ป่วยซึมเศร้า (Black, 2005) ความสัมพันธ์ดังกล่าว อาจเนื่องมาจาก การเกิด gene polymorphism ของ BDNF และ GRIA genes มีผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน อันสามารถนำไปสู่การพัฒนาของโรคซึมเศร้าภายหลังจากการได้รับสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดความเครียดได้

จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้น สามารถสันนิษฐานได้ว่า ปัจจัยความแตกต่างทางพันธุกรรมของการเกิด gene polymorphism ของ ทั้ง BDNF rs6265 และ GRIA3 gene rs502434 อาจมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคซึมเศร้าในกลุ่มประชากรไทย จึงเห็นความสำคัญของการศึกษา ความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของ BDNF และ GRIA3 genes นี้ ต่อความเสี่ยงของการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย เพื่อให้ทราบถึงกลไกที่เป็นไปได้ของการเกิดโรคซึมเศร้า อันจะสามารถนำข้อมูลการวิจัยนี้ มาปรับใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจประเมินความเสี่ยง/ความเปราะบางของการเกิดโรค ทำนายความรุนแรง และพัฒนาวิธีการรักษา รวมถึงทำนายประสิทธิภาพในการรักษา การตอบสนองต่อยารักษาโรคซึมเศร้าสำหรับผู้ป่วยในแต่ละราย และแต่ละเชื้อชาติได้อย่างจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิผลมากยิ่งขึ้น

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของ BDNF และ GRIA3 gene ต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในอาสาสมัคร ซึ่งเป็นตัวแทนของประชากรไทย ได้ถูกดำเนินการโดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาในอาสาสมัคร 200 คน แบ่งเป็น อาสาสมัครกลุ่มควบคุมคนไทย เพศชายและหญิง อายุ 18-65 ปี ซึ่งไม่มีความผิดปกติทางจิต และไม่มีภาวะซึมเศร้า จำนวน 100 คน และอาสาสมัครกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า (major depressive disorder) ชาย-หญิง อายุระหว่าง 18-65 ปี ที่ป่วยเป็นโรคซึมเศร้า จำนวน 100 คน ผู้เข้ารับการตรวจวินิจฉัย หรือรักษาในแผนกผู้ป่วยนอกจิตเวช โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ โดยผู้ป่วยไม่มีความผิดปกติทางจิตแบบอื่นร่วม

3.2 การคัดเข้าของอาสาสมัคร

ในกรณีการคัดเข้าผู้ป่วยโรคซึมเศร้านั้น เกณฑ์ตาม Diagnosis and statistical manual of mental disorder (DSM)-IV ได้ถูกใช้ เพื่อเป็นเกณฑ์ในการวินิจฉัยและคัดเข้าผู้ป่วยโรคซึมเศร้า ซึ่งกระทำโดย รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศิริจิต สุทธจิตต์ สังกัดภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตัวอย่างเลือดจากปลายนิ้วมือของอาสาสมัคร ได้ถูกเก็บและหยดลงบนกระดาษกรอง FTA card โดย ดร. เบญจมาศ สุขใจ การเก็บตัวอย่างดังกล่าว ได้ถูกรับรองว่าเป็นไปตามหลักจริยธรรมตามมาตรฐานสากล (Declaration of Helsinki, The Betmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP) โดยคณะกรรมการจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

3.3 การสกัด DNA จากกระดาษกรอง FTA card

การศึกษานี้ ใช้ตัวอย่างหยดเลือดจากปลายนิ้วของอาสาสมัครที่ถูกเก็บไว้บนกระดาษกรอง FTA card ซึ่งเป็นตัวอย่างเดิมที่คงเหลือจากงานวิจัยก่อนหน้าของโครงการ “การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนตัวรับกลูตาเมทและโพลิมอร์ฟิซึมในโรคซึมเศร้า”

ในโครงการวิจัยนี้ DNA จากหยดเลือดของอาสาสมัครจำนวน 200 ตัวอย่าง ที่หยดบนกระดาษกรอง FTA card (Whatman, Inc., Folrham Park, NJ, USA) ได้ถูกสกัด โดยวิธี Chelex-100® method เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการศึกษาหารูปแบบ genotype ของยีนที่สนใจ ซึ่งกระบวนการสกัด DNA ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. 1.2mm disc จำนวน 2 discs/ตัวอย่าง ของหยดเลือดบนกระดาษกรอง FTA card ถูกเจาะและใส่ลงใน 1000µl of sterile deionized water ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหรือจนกว่า disc จาง

2. ตัวอย่าง disc ของ DNA sample ที่บ่มแล้ว ได้ถูกย้ายมา incubate ใน 5% chelex-100® (iminodiacetic acid, freshly prepared) ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 นาที และทำการหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 8 นาที

4. นำสารละลายที่ได้ มาปั่นตก (centrifuge) ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และสารละลาย DNA ได้ถูกเก็บ ใน -20 °C เพื่อนำมาทดลองหา รูปแบบ genotype ของยีน BDNF ต่อ ด้วยเทคนิค SNP genotyping เป็นลำดับต่อไป

3.4 ศึกษา SNP genotyping ของ BDNF และ GRIA3 genes และการเก็บรวบรวมข้อมูล

การศึกษารูปแบบของ genotype ของ BDNF และ GRIA3 gene polymorphism ได้ถูกทำโดยใช้ TaqMan probe based real-time PCR system

Real-time PCR reaction สำหรับ BDNF gene ได้ถูกเตรียมในปริมาตรสุดท้าย 10 µl ซึ่งประกอบด้วย 10 ng/µl ของ genomic DNA template, 5 µl ของ TaqMan® genotyping master mix (Applied biosystem) และ 0.25 µl ของ TaqMan® genotyping assay (SNP ID: rs6265: C_11592758_10 สำหรับ BDNF และ SNP ID: rs502434: C_881576_1_ สำหรับยีน GRIA3)

การเพิ่มจำนวน PCR product ได้ถูกทำใน Quantstudio 5 real-time PCR machine รูปแบบ genotype ของแต่ละยีน ได้ถูกตรวจสอบ โดย VIC หรือ FAM-labelled probes genotype ในแต่ละแบบได้ถูกจัดกลุ่มโดยโปรแกรม ข้อมูลผลการทดลองได้ถูกบันทึก และนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่ของ genotype และ allele เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและผู้ป่วยซึมเศร้าต่อไป

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการทดลองที่บันทึกไว้ ความถี่หรือการกระจายตัวของ genotype ของ ยีน BDNF และยีน GRIA3 ได้ถูกทดสอบการกระจายตัวในสมดุลของ Hardy –Weinberg equilibrium (HWE) โดย SHEsis program เพื่อประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีการทดลอง และ ประเมินความพอเพียงของกลุ่มตัวอย่างต่อการใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มประชากรชาวไทย หลังจากนั้น ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่ของ genotype และ allele ของ gene BDNF และ GRIA3 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยซึมเศร้าและกลุ่มควบคุม ได้ถูกวิเคราะห์โดย Fisher's exact test กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ p value น้อยกว่า 0.05

3.6 ระยะเวลาการวิจัย

1 ปี

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิจัย ความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของ BDNF and GRIA3 gene polymorphisms in major depressive disorder and controls

4.1.1 Hardy-Weinberg equilibrium test

การกระจายตัวของ genotype ของ BDNF และ GRIA3 genes ในอาสาสมัครกลุ่มควบคุมและผู้ป่วย แสดงใน ตารางที่ 1

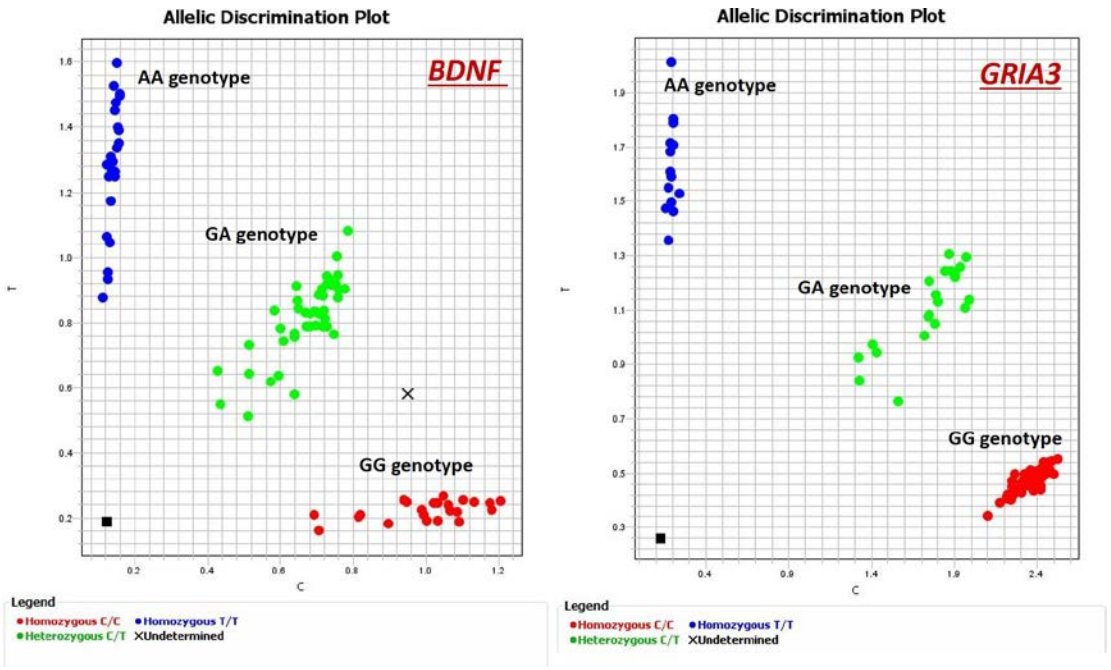
ในการทดสอบการกระจายตัวของ genotype อยู่ในสมดุลของ Hardy-Weinberg equilibrium นั้น ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า การกระจายตัวของ genotype ของยีน BDNF ทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า เป็นไปตามสมดุลของ Hardy-Weinberg (กลุ่มควบคุม chi2=1.406353, df=1, p= 0.236, กลุ่มผู้ป่วย chi2=0.361273, df=1, p=0.548) อย่างไรก็ตาม การกระจายตัวของ genotype ในยีน GRIA3 ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วย ไม่อยู่ในสมดุลของ Hardy-Weinberg equilibrium (กลุ่มควบคุม chi2=6.250000, df=1, p= 0.012, กลุ่มผู้ป่วย chi2=8.300316, df=1, p=0.004)

4.1.2 ความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของยีน BDNF rs6265 และ GRIA3 rs502434ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้า

ผลการตรวจหารูปแบบและการจัดกลุ่มของ genotype ของยีน BDNF และ ยีน GRIA3 โดย TaqMan SNP genotyping assay ถูกแสดงในภาพที่ 1

ความถี่ของ genotype และ allele ในยีน BDNF และ GRIA3 ในอาสาสมัครกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า แสดงในตารางที่ 1, ภาพที่ 2 (BDNF gene) และ ภาพที่ 3 (GRIA3 gene) ตามลำดับ

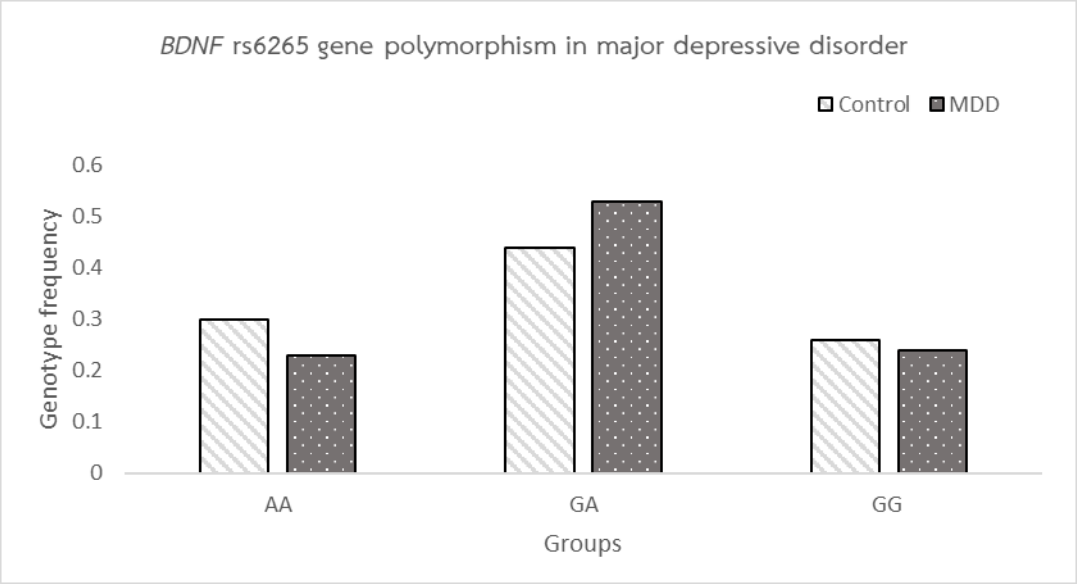
ผลการทดสอบทางสถิติโดยใช้ Fisher's exact test วิเคราะห์ความแตกต่างของความถี่ของ genotype และ allele ในยีน BDNF และ GRIA3 ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วย พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่ของ genotype และความถี่ของ allele เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาสาสมัครกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า



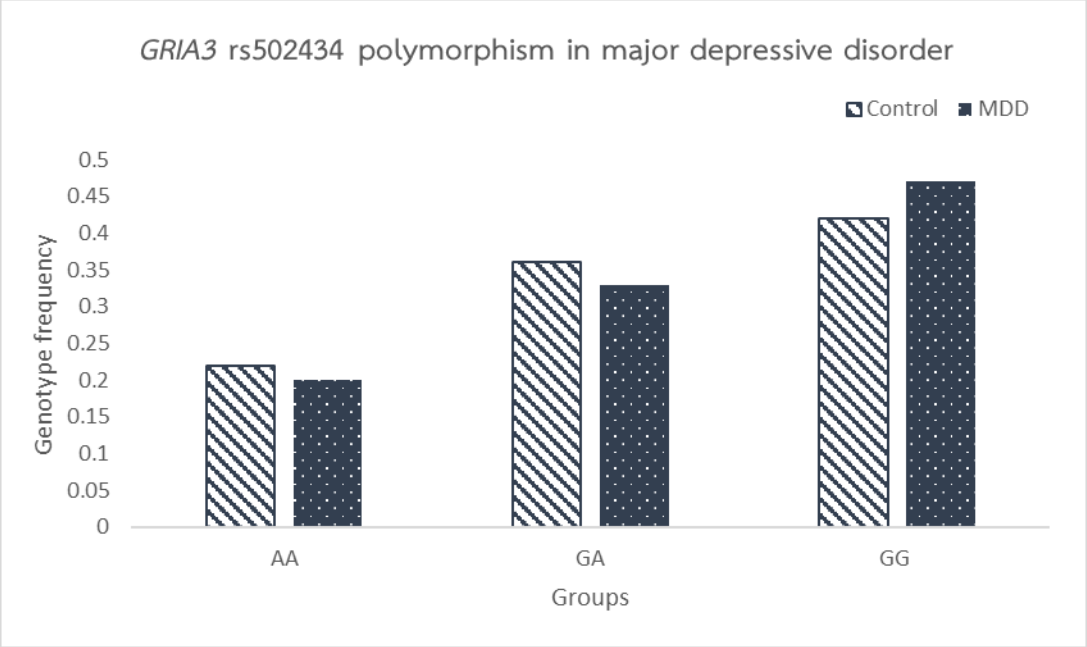
ภาพที่ 1 แสดงการจัดกลุ่ม genotype ของ BDNF rs6265 และ GRIA3 rs502434 โดย TaqMan genotyping assay

ตารางที่ 1 แสดงความถี่ของ genotype ในยีน BDNF rs6265 และ ยีน GRIA3 rs502434

SNP gene	genotype/allele	Control (n= 100) number (frequency)	MDD (n=100) number (frequency)	*p*
rs6265 BDNF				
	AA	30(0.300)	23(0.230)	
Genotype	AG	44(0.440)	53(0.530)	
	GG	26(0.260)	24(0.240)	*0.399*
Allele	A	104(0.520)	99(0.495)	
	G	96(0.480)	101(0.505)	*0.617*
rs502434 GRIA3				
	AA	22(0.220)	20(0.200)	
Genotype	AG	36(0.360)	33(0.330)	*0.776*
	GG	42(0.420)	47(0.470)	
Allele	A	80(0.400)	73(0.365)	
	G	120(0.600)	127(0.635)	*0.471*



ภาพที่ 2 กราฟแสดง genotype frequency ของ BDNF gene polymorphism ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 3 กราฟแสดง genotype frequency ของ GRIA3 gene polymorphism ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้าเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2 อภิปรายผลการทดลอง

การกระจายตัวของ genotype ในยีน BDNF rs6265 เป็นไปตามสมดุลของ Hardy-Weinberg equilibrium แสดงให้เห็นว่า การจัดกลุ่มของ genotype ในเทคนิค genotyping assay มีความถูกต้องและสอดคล้องกับลักษณะการกระจายตัวของ genotype ในกลุ่มประชากรไทยที่นำมาศึกษา อย่างไรก็ตาม ในกรณีของ GRIA3 gene นั้น การทดลองพบการกระจายตัวของ genotype ไม่อยู่ในสมดุลของ Hardy-Weinberg equilibrium ดังนี้ อาจเนื่องมาจากการเกิด gene polymorphism ใน GRIA3 gene rs502434 เกิดขึ้นใน gene ที่อยู่บน chromosome X ซึ่งในเพศชาย มี chromosome X เพียงตัวเดียว จะทำให้ ไม่พบ heterozygous genotype (GA) ในกลุ่มอาสาสมัครเพศชาย และจากการศึกษาทดลองนี้ เป็นการศึกษาในอาสาสมัครทั้งเพศชายและหญิง การกระจายตัวของ genotype ของ GRIA3 gene จึงไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับสมดุลของ Hardy-Weinberg equilibrium ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งพบการกระจายตัวของ genotype ในยีน GRIA3 rs502434 ไม่เป็นไปตามสมดุลของ Hardy-Weinberg equilibrium ในกลุ่มตัวอย่างประชากรชายไทย (Iamjan, Thanoi et al. 2018)

ผลการทดลองไม่พบความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของ GRIA3 gene ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้า แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยความแตกต่างทางพันธุกรรมของการเกิด GRIA3 gene polymorphism รหัส rs502434 นี้ ไม่ใช่ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมโดยตรง ที่ทำให้บุคคลมีความอ่อนไหว (sensitivity) ต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในเชื้อชาติไทย

GRIA3 gene เป็น gene ที่ถอดรหัสให้ได้โปรตีน AMPA glutamate receptor subunit 3 (GluR3) ซึ่งมีบทบาทสำคัญเป็นจุดเริ่มต้นในกระบวนการกระตุ้นการทำงานของสมอง การลดลงของ GluR3 ซึ่งถอดรหัสโดย GRIA3 ถูกพบในสมองส่วน hippocampus ของผู้ป่วยโรคซึมเศร้าที่เสียชีวิตแล้ว (Duric, Banasr et al. 2013) แม้ว่าในปัจจุบัน กลไกของการเกิด GRIA3 rs502434 polymorphism ที่ส่งผลต่อการเกิดความผิดปกติทางจิตหรืออารมณ์ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการศึกษาที่ผ่านมา GRIA3 gene ถูกรายงานว่า มีบทบาทสำคัญต่อการเริ่มหรือก่อให้เกิดภาวะฆ่าตัวตาย (suicidal ideation) ในคนไข้ที่ได้รับยารักษาโรคซึมเศร้า (de Sousa, Loch et al. 2017) นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การเกิด GRIA3 rs502434 gene polymorphism มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดอาการทางจิตในผู้ป่วยที่ติดสารเสพติด (Iamjan, Thanoi et al. 2018) ในกรณีของโรคซึมเศร้านั้น มีรายงานว่า การเกิด linkage disequilibrium หรือการปรากฏร่วมกันของ GRIA3 gene รหัส rs502434 ร่วมกับรหัส rs3761555 มีความสัมพันธ์ต่อการเริ่มมีความผิดปกติของการเกิดโรคซึมเศร้า (early onset) จากการได้รับการกระตุ้นของความเครียด (Pu, Zhang et al. 2013) อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเกิด gene polymorphism ของ GRIA3 rs502434 เพียงลำพังไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากร Han Chinese population จำนวน 281 คน (Pu, Zhang et al.

2013) ดังนี้ จากการทดลองในปัจจุบัน อาจเป็นไปได้ว่า การเกิด GRIA3 rs502434 polymorphism เพียงลำพัง ไม่ส่งผลโดยตรงต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย แต่การมี GRIA3 รหัส rs502434 ปรากฏร่วมกับ GRIA3 polymorphism ในรหัสอื่น ในลักษณะของ linkage disequilibrium ของ GRIA3 gene อาจมีผลสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทยได้ เช่นเดียวกับผลการศึกษาที่ผ่านมาในกลุ่มประชากรชาวจีน

ในกรณีของ BDNF gene ผลการทดลองเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่ของ genotype ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความถี่ของ genotype ในยีน BDNF รหัส rs6265 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า แสดงให้เห็นว่า การเกิด gene polymorphism ของ BDNF rs6265 ไม่สัมพันธ์ หรือมีบทบาทโดยตรงต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในตัวอย่างประชากรไทย ผลการศึกษานี้ สนับสนุนงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งรายงานว่า การเกิด gene polymorphism ของ BDNF ในรหัส rs6265 ไม่สัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคซึมเศร้า และการเริ่มอาการซึมเศร้า (age of onset) รวมถึงประวัติการมีภาวะฆ่าตัวตาย (suicide history) จากการเป็นโรคซึมเศร้าในคนไข้ประชากรจีน (Chinese population) BDNF rs6265 อาจไม่เป็นปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม (risk genetic factor) ที่ทำให้บุคคลมีความไวหรืออ่อนไหวต่อการเกิดความผิดปกติทางอารมณ์ได้ (Hong, Huo et al. 2003) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tsai และคณะ (2003) ซึ่งได้รายงานว่า การเกิด gene polymorphism ของ BDNF rs6265 ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคซึมเศร้า จึงไม่ใช่ปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีบทบาทสำคัญในกลไกการก่อโรคซึมเศร้า (Tsai, Cheng et al. 2003) อีกทั้งรายงานของ Kishi และคณะในปี 2018 ระบุว่า BDNF rs6265 ไม่สัมพันธ์กับการเกิดโรคซึมเศร้า แต่เป็นปัจจัยทางพันธุกรรมที่สำพันธ์ต่อการติดตามระยะของโรคซึมเศร้าและการตอบสนองต่อยาที่ใช้ในการรักษาโรคซึมเศร้า (Kishi, Yoshimura et al. 2018) มากกว่าการเป็นปัจจัยในการเกิดโรคซึมเศร้าของบุคคล

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษา ยังมีความแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมา ที่รายงานว่า การเกิด gene polymorphism ของ functional BDNF rs6265 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากร Mexican-American จำนวน 331 คน เปรียบเทียบกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุมจำนวน 284 คน (Ribeiro, Busnello et al. 2007) นอกจากนี้ A allele ของ BDNF rs6265 gene polymorphism และระดับ BDNF ที่ลดลงในสมองของผู้ป่วยส่วน anterior cingulate cortex และ caudal brainstem ได้ถูกรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยที่มีภาวะโรคซึมเศร้า (Youssef, Underwood et al. 2018) จากที่กล่าวมาข้างต้น เป็นไปได้ว่า ความแตกต่างในด้านขนาดของจำนวนประชากรที่ศึกษา และเชื้อชาติ มีผลกระทบต่อผลการทดสอบความสัมพันธ์ของ BDNF rs6265 polymorphism ต่อความไวในการเกิด

โรคซึมเศร้าได้ งานวิจัยนี้ ได้สนับสนุนผลการศึกษาในอดีต ที่พบการเกิด BDNF gene polymorphism สัมพันธ์กับการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรกลุ่มเชื้อชาติยุโรป (Caucasian population) และไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในประชากรเชื้อชาติญี่ปุ่น จีน (Hong, Huo et al. 2003) และประชากรไทย อีกทั้งในการศึกษา BDNF gene polymorphism ต่อการติดสารเสพติด ก็ได้พบว่า การเกิด gene polymorphism ของ BDNF rs6265 สัมพันธ์กับการติดสารเสพติดและการเกิดอาการทางจิตในประชากรชายไทย (Iamjan, Thanoi et al. 2015) และ ประชากร Malaysian Chinese (Sim, Mohamed et al. 2010) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว เมื่อศึกษาในประชากร Caucasians (Bousman, Glatt et al. 2010) ผลการศึกษา ยืนยันให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของยีน BDNF ขึ้นอยู่กับความแตกต่างในด้านเชื้อชาติของประชากรที่ศึกษา

BDNF เป็นโมเลกุลที่สำพันธ์กับการเจริญเติบโต การคงอยู่และการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท รวมถึงเกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับสมดุลของการส่งสัญญาณในระบบประสาท (synaptic plasticity) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการเรียนรู้และความจำ (synaptic plasticity of learning and memory) การเปลี่ยนแปลงในระดับ BDNF gene และ protein ถูกรายงานว่ามีการลดลงในพยาธิสภาพของโรคหรือความผิดปกติทางอารมณ์ เช่น โรคจิตเภท schizophrenia, อารมณ์สองขั้ว (Bipolar disorder) และโรคซึมเศร้า (major depressive disorder) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก การเกิดโรคซึมเศร้า มีสาเหตุที่สำคัญจากการลดการหลั่งสารสื่อประสาท serotonin จากเซลล์ประสาทในสมอง ปัจจัยในด้านความเครียดสามารถส่งผลต่อความเสียหายและการตายของเซลล์ประสาทได้ และการลดลงของ BDNF ทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลายได้ง่าย เซลล์ประสาทไม่ได้รับการปกป้องในภาวะที่มีความผิดปกติของสมอง ดังนี้ เซลล์ประสาทจึงอาจมีจำนวนลดลง และมีการหลั่งสารสื่อประสาท serotonin ลดลง นำไปสู่พยาธิสภาพของการเกิดโรคซึมเศร้าได้ ดังนี้ แม้ผลการทดลอง จะพบว่า BDNF gene polymorphism rs6265 ไม่ใช่ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของการเกิดโรคซึมเศร้า แต่จากที่กล่าวมาข้างต้น เห็นได้ว่า ระดับการแสดงออกของ BDNF gene หรือ protein ยังเป็นโมเลกุลที่สำคัญในกลไกการเกิดโรคซึมเศร้า

ปัจจัยการเกิด gene polymorphism ของ BDNF ในรหัส rs6265 นี้ เคยถูกรายงานว่า มีความเกี่ยวข้องต่อการควบคุมระดับการแสดงออกของ BDNF gene หรือ protein เนื่องจาก G genotype ของ BDNF rs6265 สำพันธ์กับระดับการแสดงออกของ BDNF ที่สูง แต่ BDNF – A allele สำพันธ์กับการแสดงออกของ BDNF ที่ลดลง จึงเป็นเหตุผลของการเลือก BDNF rs6265 มาทำการศึกษา แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้ ไม่ได้เป็นตัวแทนผลการทดลองในทุก BDNF polymorphisms เนื่องจาก มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมระดับการแสดงออกของยีน หรือโปรตีน BDNF ได้ เช่น การเกิด gene polymorphism ในรหัส Rs อื่น, กระบวนการเหนือพันธุกรรม (epigenetic DNA methylation) หรือ

ปัจจัยทางสิ่งแวดลอม เป็นต้น ผลการทดลองที่พบ จึงเป็นการชี้แสดงให้เห็นว่า BDNF gene polymorphism ในรหัส rs6265 ไม่จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงโดยตรงในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย ทั้งนี้ ไม่ได้หมายรวมถึง การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน BDNF ต่อการเกิดโรคซึมเศร้านั่นเอง

จากที่กล่าวมาข้างต้น ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การเกิด gene polymorphism ของ BDNF gene rs6265 และ GRIA3 rs502434 เพียงลำพัง ไม่สัมพันธ์โดยตรงต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphisms ของ BDNF rs6265 และ GRIA3 rs502434 ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทยกลุ่มควบคุม จำนวน 100 คน และกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้าจำนวน 100 คน โดยเทคนิค TaqMan® SNP genotyping assay

ความแตกต่างของความถี่ของ allele และ genotype ของทั้งสอง SNP ถูกทดสอบโดย Fisher' exact test กำหนด $P<0.05$ ในการแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์ผลความแตกต่างของความของถี่ของ genotype และ allele ของทั้งสอง polymorphisms พบว่า ความถี่ของ genotype และ allele ใน BDNF และ GRIA3 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มผู้ป่วย แสดงให้เห็นว่า การเกิด gene polymorphism ของ BDNF รหัส rs6265 และ GRIA3 rs502434 เพียงลำพัง ไม่มีความสัมพันธ์ต่อความไวหรือความอ่อนไหวต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรเชื้อชาติไทย

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ มีข้อจำกัดในด้านจำนวนของอาสาสมัครในการทดลอง เป็นกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก การศึกษาในจำนวนตัวอย่างอาสาสมัครที่เพิ่มขึ้น อาจแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ของ BDNF rs6265 และ GRIA3 rs502434 ต่อการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทยได้

นอกจากนี้ ตัวอย่างที่ศึกษา มีเพียงหยดเลือดบนกระดาษกรอง FTA card ซึ่งทำให้ไม่เพียงพอในการนำมาสกัด RNA หรือ Protein เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน BDNF และ GRIA3 ได้ ซึ่งการศึกษาในอนาคต หากทำการศึกษา polymorphism ควบคู่ไปกับการศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนด้วย จะทำให้ทราบถึงกลไกการเกิดโรคซึมเศร้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ BDNF และตัวรับสารสื่อประสาทกลูตาเมท (GRIA) ได้ดียิ่งขึ้น

5.3 ปัญหาและอุปสรรคของการวิจัย

งานวิจัย มีปัญหาและอุปสรรคในด้านระยะเวลาพิจารณารับรองจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์ ที่มีการพิจารณาที่ยาวนาน ส่งผลให้การเริ่มดำเนินการวิจัยในช่วงแรกเป็นไปด้วยความล่าช้า อย่างไรก็ตาม

ภายหลังจากผ่านการรับรองจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์แล้ว ผู้วิจัยสามารถดำเนินการวิจัยได้เสร็จสิ้นภายในกำหนดระยะเวลาของการรับทุน

บรรณานุกรม

สำนักพิมพ์ข่าวสด., 2562 พฤษภาคม. คนไทยฆ่าตัวตาย ปีละ 5.3 หมื่นคน เฉลี่ย 6 คน/ชม. แนะแนวทางการป้องกัน (ออนไลน์). Available URL: https://www.dmh.go.th/news-dmh/view.asp?id=29720

American Psychiatric Association. (1994). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders** (4th ed.). American Psychiatric Publishing, Inc: Arlington, VA, US.

Autry, A. E., and Monteggia, L. M. (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacological Reviews**. 64. 238-58.

Billa, S. K., Xia, Y. and Morón, J. A. (2010). Disruption of morphine-conditioned place preference by a delta2-opioid receptor antagonist: study of mu-opioid and delta-opioid receptor expression at the synapse. **The European journal of neuroscience**. 32. 625-31.

Black, M. D. (2005). Therapeutic potential of positive AMPA modulators and their relationship to AMPA receptor subunits. A review of preclinical data. **Psychopharmacology (Berl)**. 179. 154-63.

Bolaños, C. A. and Nestler, E. J. (2004a). Neurotrophic mechanisms in drug addiction. **NeuroMolecular Medicine**. 5. 69-83.

Bondarenko, E. A., Shadrina, M. I., Grishkina, M. N., Druzhkova, T. A., Akzhigitov, R. G., Gulyaeva, N. V., Guekht, A. B., and Slominsky, P. A. (2016). Genetic Analysis of BDNF, GNB3, MTHFR, ACE and APOE Variants in Major and Recurrent Depressive Disorders in Russia. **International Journal of Medical Sciences**. 13. 977-83.

Bousman, C. A., Stephen J. G., Mariana C., Hampton Atkinson, J., Grant, I., Tsuang, M. T, Everall, I.P., and HNRC Group. (2010). Preliminary evidence of ethnic divergence in associations of putative genetic variants for methamphetamine dependence. **Psychiatry research**. 178. 295-98.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A. and Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science**. 301. 386-9.

Castrén, E., and Rantamäki, T. (2010). The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. **Developmental Neurobiology**. 70. 289-97.

Castrén, E., Võikar, V. and Rantamäki, T. (2007). Role of neurotrophic factors in depression. **Current Opinion in Pharmacology**. 7: 18-21.

Charney, D. S. and Manji, H. K. (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. **Sciences STKE (Signal Transduct Knowl Environ)**. re5.

Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C., Varon, M. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. **Journal of Neuroscience**. 17. 2295-313.

de Sousa, R. T., Alexandre A. L., André F. C., André R. B., Marie R.H., Ioline D. H., Carlos A. Z., and Rodrigo M. (2017). Genetic Studies on the Tripartite Glutamate Synapse in the Pathophysiology and Therapeutics of Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**. 42. 787-800.

Dean, J., and Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian Journal of Psychiatry**. 27. 101-11.

Duric, V., Banasr, M., Stockmeier, C. A., Simen, A. A., Newton, S. S., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Dieter L. and Duman ,R.S. (2013). Altered expression of synapse and glutamate related genes in post-mortem hippocampus of depressed subjects. **The international journal of neuropsychopharmacology**. 16. 69-82.

Fang, J., An, X., Chen, S., Yu, Z., Ma, Q. and Qu, H. (2015). Case-control study of GRIA1 and GRIA3 gene variants in migraine. **The journal of headache and pain**. 17. 2.

Gécz, J., Barnett, S., Liu, J., Hollway, G., Donnelly, A., Eyre, H., Eshkevari, H. S., Baltazar, R., Grunn, A., Nagaraja, R., Gilliam, C., Peltonen, L., Sutherland, G.R., Baron, M. and Mulley, J. C. (1999). Characterization of the human glutamate receptor subunit 3 gene (GRIA3), a candidate for bipolar disorder and nonspecific X-linked mental retardation. **Genomics**. 62. 356-68.

Gratacòs, M., González, J. R., Mercader, J. M., de Cid, R., Urretavizcaya, M. and Estivill, X. (2007). Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. **Biological Psychiatry**. 61. 911-22.

Hong, C. J., Huo, S. J., Yen, F. C., Tung, C. L., Pan, G. M. and Tsai, S.J. (2003). Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and mood disorders, age of onset and suicidal behavior. **Neuropsychobiology**. 48. 186-9.

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. 1541-5.

Iamjan, S. A., Thanoi, S., Watiktinkorn, P., Reynolds, G. P., and Nudmamud-Thanoi, S. (2018). Genetic variation of GRIA3 gene is associated with vulnerability to methamphetamine dependence and its associated psychosis. **Journal of Psychopharmacology**. 32. 309-15.

Jans, L. A., Riedel, W. J., Markus, C. R. and Blokland, A. (2007). Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. **Molecular Psychiatry**. 12. 522-43.

Kang, W.S., Park, J. K., Kim, S. K., Park, H. J., Lee, S. M., Song, J. Y., Chung, J. H. and Kim, J. W. (2012). Genetic variants of GRIA1 are associated with susceptibility to schizophrenia in Korean population. **Molecular Biology Reports**. 39. 10697-703.

Karpyak, V.M., Geske, J.R., Colby, C.L., Mrazek, D.A. and Biernacka, J.M. (2012). Genetic variability in the NMDA-dependent AMPA trafficking cascade is associated with alcohol dependence. **Addiction Biology**. 17. 798-806.

Kerner, B., Jasinska, A.J., DeYoung, J., Almonte, M., Choi, O.W. and Freimer, N.B. (2009). Polymorphisms in the GRIA1 gene region in psychotic bipolar disorder. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**. 150b. 24-32.

Kongsuk, T., Kittirattanapaiboon, P., Kenbubpha, K., Sukawaha, S., Leejongpermpoon, J. (2008). The Prevalence of Major Depressive Disorders in Thailand: Results from the Epidemiology of Mental Disorders National Survey

Kishi, T., Reiji Y., Toshikazu I. and Nakao I. (2018). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Major Depressive Disorder: Evidence from Meta-Analyses. **Frontiers in psychiatry.** 8. 308-08.

Li, M., Chang, H. and Xiao, X. (2016). BDNF Val66Met polymorphism and bipolar disorder in European populations: A risk association in case-control, family-based and GWAS studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews.** 68. 218-33.

Li, X., and Wolf, M.E. (2011). Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases AMPA receptor surface expression in rat nucleus accumbens. **European Journal of Neuroscience.** 34. 190-8.

Liang, J., Yue, Y., Jiang, H., Geng, D., Wang, J., Lu, J., Li, S., Zhang, K., Wu, A. and Yuan, Y. (2018). Genetic variations in the p11/tPA/BDNF pathway are associated with post stroke depression. **Journal of Affective Disorders.** 226. 313-25.

Lu, B., Nagappan, G. and Lu Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. **Handbook of Experimental Pharmacology.** 220. 223-50.

Magri, C., Gardella, R., Barlati, S.D., Podavini, D., Iatropoulos, P., Bonomi, S., Valsecchi, P., Sacchetti, E. and Barlati, S. (2006). Glutamate AMPA receptor subunit 1 gene (GRIA1) and DSM-IV-TR schizophrenia: a pilot case-control association study in an Italian sample. **American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics.** 141b. 287-93.

Magri, C., Gardella, R., Valsecchi, P., Barlati, S.D., Guizzetti, L., Imperadori, L., Bonvicini, C., Tura, G. B., Gennarelli, M., Sacchetti, E. and Barlati, S. (2008). Study on GRIA2, GRIA3 and GRIA4 genes highlights a positive association between schizophrenia and GRIA3 in female patients. **American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics.** 147b. 745-53.

Martinowich, K., Manji, H. and Lu, B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. **Nature Neuroscience.** 10. 1089-93.

Nuntatikul, P., Hongsranagon, P., Havanond, P. (2010). Prevalence of and factors associated with depression in Thai adult general OPD patients at Phanomphrai hospital., Roi-ed province, Thailand. **Health Research.** 24(suppl2). 133- 136.

Paykel, E.S. (2006). Depression: major problem for public health. **Epidemiology and Psychiatric Sciences** . 15. 4-10.

Pu, M., Zhang, Z., Xu, Z., Shi, Y., Geng, L., Yuan, Y., Zhang, X. and Reynolds, G. P.. (2013). Influence of genetic polymorphisms in the glutamatergic and GABAergic systems and their interactions with environmental stressors on antidepressant response. **Pharmacogenomics.** 14. 277-88.

Reimers, J. M., Milovanovic, M. and Wolf, M.E. (2011). Quantitative analysis of AMPA receptor subunit composition in addiction-related brain regions. **Brain Research.** 1367. 223-33.

Ribeiro, L., João, V.B, Rita, M. Cantor, F. W., Pamela W., Panos D., Ma-Li W. and Julio L. (2007). The brain-derived neurotrophic factor rs6265 (Val66Met) polymorphism and depression in Mexican-Americans. **Neuroreport.** 18. 1291-93.

Shelton, R.C. (2007). The molecular neurobiology of depression. **Psychiatric Clinics of North America.** 30. 1-11.

Sim, M. S., Mohamed, Z., Hatim, A., Rajagopal, V. L. and Habil, M. H. (2010). Association of brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) genetic polymorphism with methamphetamine dependence in a Malaysian population. **Brain Research.** 1357. 91-6.

Sripichai, O. and Fucharoen, S.. (2007). Genetic polymorphisms and implications for human diseases. **Journal of the Medical Association of Thailand.** 394-8.

Sriruenthong, W., Kongsuk, T., Pengchuntr, W., Kittirattanapaiboon, P., Kenbubpha, K., YingYeun, R. (2011). The suicidality in Thai population: a national survey. **Journal of the Psychiatric Association of Thailand.** 56. 4. 413–424.

Swaab, D.F., Bao, A.M., and Lucassen, P.J. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Researcg Reviews.** 4. 141-94.

Tsai, S. J., Cheng, C.Y., Yu Y.W., Chen, T. J. and Hong, C.J. (2003). Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and major depressive disorders, symptomatology, and antidepressant response. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics.** 123b. 19-22.

Yamada, K. and Nabeshima, T. (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. **Journal of Pharmacological Sciences.** 91. 267-70.

Youssef, Mariam M., Underwood Mark D., Huang, Y., Hsiung, S., Liu, Y., Norman R.S., Mihran J.B., Gorazd B.R., Andrew J.D., Victoria A. and John Mann, J. (2018). Association of BDNF Val66Met Polymorphism and Brain BDNF Levels with Major Depression and Suicide. **The international journal of neuropsychopharmacology**. 21. 528-38.

ภาคผนวก

ที่ ๒๑๓/๒๕๖๒

เอกสารรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาโครงการวิจัย

รหัสโครงการวิจัย : Sci 075/2562
โครงการวิจัยเรื่อง : ความสัมพันธ์ของการเกิดยีนโพลิมอร์ฟิซึมของยีน BDNF และ GRIA3 ต่อการเกิดภาวะซึมเศร้าในประชากรไทย
หัวหน้าโครงการวิจัย : ดร.ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์
หน่วยงานที่สังกัด : คณะสหเวชศาสตร์

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาแล้วเห็นว่า โครงการวิจัยดังกล่าวเป็นไปตามหลักการของจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โดยที่ผู้วิจัยเคารพสิทธิและศักดิ์ศรีในความเป็นมนุษย์ ไม่มีการล่วงละเมิดสิทธิสวัสดิภาพ และไม่ก่อให้เกิดภยันตรายแก่ตัวอย่างการวิจัยและผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยในขอบข่ายของโครงการวิจัยที่เสนอได้ (ดูตามเอกสารตรวจสอบ)

๑. แบบเสนอเพื่อขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์	ฉบับที่ ๒ วันที่ ๒๘ เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๒
๒. เอกสารโครงการวิจัยฉบับภาษาไทย	ฉบับที่ ๒ วันที่ ๒๘ เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๒
๓. เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย	ฉบับที่ - วันที่ - เดือน - พ.ศ. -
๔. เอกสารแสดงความยินยอมของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย	ฉบับที่ - วันที่ - เดือน - พ.ศ. -
๕. เอกสารแสดงรายละเอียดเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยซึ่งผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว หรือชุดที่ใช้เก็บข้อมูลจริงจากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย	ฉบับที่ ๒ วันที่ ๒๘ เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๒
๖. เอกสารอื่น ๆ (ถ้ามี)	ฉบับที่ - วันที่ - เดือน - พ.ศ. -

วันที่รับรอง : วันที่ ๑๐ เดือน มกราคม พ.ศ. ๒๕๖๓
วันที่หมดอายุ : วันที่ ๙ เดือน มกราคม พ.ศ. ๒๕๖๔

ลงนาม
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ้งเอี่ยม)
ประธานคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ชุดที่ ๑ (กลุ่มคลินิก/ วิทยาศาสตร์สุขภาพ/ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)

ตารางแสดงงบประมาณสรุปการเงิน

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง
1. ค่าตอบแทนและค่าจ้าง	-	-
2. ค่าวัสดุ - ค่าอุปกรณ์ใช้สิ้นเปลืองในการทำการทดลอง เช่น ถุงมือ, tip, microcentrifuge tube, tip boxes, sample boxes, dry ice - ค่าสารเคมีสำหรับการสกัด DNA, และ การทำ SNP genotyping	120,000	135,000
3. ค่าใช้สอย - ค่าใช้จ่ายในการเดินทางไปรับตัวอย่าง และส่งคืนตัวอย่าง - ค่าใช้จ่ายในการเตรียมเอกสาร การจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์ -ค่าใช้จ่ายในการจัดประชุม อภิปรายผลการทดลองเพื่อการตีพิมพ์ และการค่าใช้จ่ายในการไปนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ (ตามแผน)	30,000	15,000
4. ค่าครุภัณฑ์และค่าใช้จ่ายอื่น ๆ	-	-
รวม	**150,000**	**150,000**

หมายเหตุ จากสถานการณ์โควิด 19 ทำให้งานประชุมวิชาการต่าง ๆ มีการยกเลิก ทำให้ค่าใช้สอยที่วางแผนไว้สำหรับเดินทาง จัดประชุมเพื่ออภิปรายผลงานวิจัยกับผู้ร่วมวิจัย และค่าใช้จ่ายในการไปนำเสนอผลงาน ณ ที่ประชุมวิชาการ ยังไม่ถูกใช้ ดังนี้ ผู้วิจัยจึงใช้งบประมาณดังกล่าวในค่าสารเคมีและวัสดุ ที่มีค่าใช้จ่ายเกินกว่าที่วางแผนไว้แทน

ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์

กองบริหารการวิจัยและนวัตกรรม
รับที่ 02181
วันที่ 27 พ.ค. 2563
เวลา 12.08 น.

บันทึกข้อความ

ส่วนงาน คณะสหเวชศาสตร์ สำนักงานคณบดี มหาวิทยาลัยบูรพา โทร. ๒๖๑๔, ๓๑๘๖
ที่ อว ๘๑๒๐/ ๐๓๓๕ **วันที่** ๒๕ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๓
เรื่อง ขอส่งรายงานความก้าวหน้าทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ส่วนงาน คณะสหเวชศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

เรียน รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

คณะสหเวชศาสตร์ ขอจัดส่งรายงานความก้าวหน้าทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ส่วนงาน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒ จำนวน ๑ โครงการ

๑. ชื่อโครงการ “ความสัมพันธ์ของการเกิดยีนโพลีมอร์ฟิซึมของยีน BDNF และ GRIA3 ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย”
หัวหน้าโครงการ นางสาวศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์

ทั้งนี้คณะกรรมการพิจารณารายงานความก้าวหน้าของส่วนงานได้พิจารณาเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบและพิจารณาลำดับต่อไป

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร)
คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

เรียน รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

๑. เพื่อโปรดทราบ รายงานความก้าวหน้าโครงการประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๒
๒. เพื่อโปรดพิจารณา ลงนามในแบบประเมินฯ รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย
๓. เพื่ออนุมัติ รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ส่วนงาน
๔. เห็นควรแจ้งผู้ช่วยอธิการบดีฝ่ายพัฒนามาตรฐานการวิจัย เพื่อโปรดทราบ
๕. เห็นควรมอบคุณจินตนา เปล่งปลั่ง ดำเนินการต่อไป

๒๘ พ.ค. ๒๕๖๓

อนุมัติ ตามเสนอ
ดำเนินการตามเสนอ
๒๘ พ.ค. ๒๕๖๓
(รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช)
รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

แบบรายงานความก้าวหน้าแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) ความสัมพันธ์ของการเกิดยีนโพลีมอร์ฟิซึมของยีน BDNF และ GRIA3 ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในประชากรไทย

(ภาษาอังกฤษ) Association of BDNF and GRIA3 gene polymorphisms with vulnerability for major depressive disorder in the Thai population

ชื่อผู้วิจัย (นาย นางสาว นาง ยศ) นางสาว ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์

คณะ สหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

หมายเลขโทรศัพท์ 0802242619 โทรสาร - e-mail sriarun.ia@go.buu.ac.th

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ประเภททุน ส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่

งบประมาณที่ได้รับ 150,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน ปี) กันยายน 2562 ถึง (เดือน ปี) กันยายน 2563

2. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย (โดยสรุป)

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิด gene polymorphism ในยีน BDNF และ GRIA3 ต่อความไวในการเกิดโรคซึมเศร้าในตัวอย่างกลุ่มประชากรไทย

2.2 แสดงตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง ในรูปของแผนการดำเนินงานตลอดแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย ว่ามีกิจกรรม / ขั้นตอนปฏิบัติตามลำดับอย่างไร

แผนการดำเนินงานที่เสนอไว้		งานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง	
กิจกรรมที่วางแผน	**เวลาที่วางแผนไว้**	**ความก้าวหน้า**	**เดือน**
1. การเตรียมเอกสารเพื่อขอจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์	สิงหาคม – ตุลาคม 2562	ดำเนินการส่งเอกสารเพื่อขอรับรองจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์ ในเดือน สิงหาคม 2562 และได้รับคำสั่งให้ดำเนินปรับแก้ตามคำแนะนำของคณะกรรมการในเดือน พฤศจิกายน 2562 และได้รับใบรับรองการผ่านจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์ เดือน มกราคม 2563	ผ่านการรับรองในวันที่ 10 มกราคม 2563
2. ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง	ตุลาคม – พฤศจิกายน 2562		
2.1 การสกัด DNA จากหยดเลือดบนกระดาษกรอง FTA card	พฤศจิกายน – ธันวาคม 2562	ดำเนินการสกัด DNA ในกลุ่มตัวอย่างที่จะใช้ เป็นที่เรียบร้อย จำนวนทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง	มีนาคม 2563
3. การทดลอง SNP genotyping ของยีน BDNF และ GRIA3	มกราคม – พฤษภาคม 2563	ดำเนินการสั่งซื้อสารเคมีและอุปกรณ์การทำสำหรับ BDNF gene เรียบร้อย กำลังจะดำเนินการ optimize protocol เพื่อจะให้ได้วิธีการที่เหมาะสมก่อนทำการทดลองในกลุ่มตัวอย่างจริง กรณี GRIA3 ยังไม่ได้ดำเนินการสั่งซื้อสารเคมี	คาดว่าจะได้ดำเนินการกับตัวอย่างจริงและแล้วเสร็จในเดือน เมษายน - พฤษภาคม 2563 (กรณี BDNF gene) คาดว่าจะดำเนินการและแล้วเสร็จในเดือน มิถุนายน -สิงหาคม 2563 (กรณี GRIA3)
4. การวิเคราะห์ผลและสรุปผล	พฤษภาคม – กรกฎาคม 2563	ยังไม่ได้ดำเนินการ	คาดว่าจะได้ช่วงเดือน สิงหาคม – กันยายน 2563

5. เขียนรายงานผลการทดลองเพื่อปิดโครงการและการตีพิมพ์	กรกฎาคม – กันยายน 2563	ยังไม่ได้ดำเนินการ	คาดว่าจะได้ดำเนินการเดือนสิงหาคม - กันยายน 2563

2.3 แสดงรายละเอียดของผลการดำเนินงาน พร้อมสรุปและวิเคราะห์ผลที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

การดำเนินงานที่ได้จัดทำภายหลังได้รับทุนวิจัยงวดที่ 1 ผู้วิจัยได้เริ่มส่งเอกสารเพื่อขอรับรองจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์พร้อมกันกับช่วงเวลาที่ส่งเอกสารขอรับทุนวิจัย คือช่วงเดือน สิงหาคม 2562 หลังจากนั้น ทำการปรับแก้เอกสารตามคำแนะนำของคณะกรรมการในเดือนพฤศจิกายน 2562 และได้รับผลการรับรองจากคณะกรรมการของมหาวิทยาลัยบูรพาให้ดำเนินการวิจัยได้ในเดือนมกราคม 2563 (เอกสารการรับรองเป็นดังเอกสารแนบ)

ภายหลังจากการรับรองจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์ ผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการติดต่อ และรับตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษกรอง FTA card จาก รศ.ดร.สุทิสา ถาน้อย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อันได้แก่ ตัวอย่างจากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 100 คน และตัวอย่างจากอาสาสมัครกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้าจำนวน 100 คน เพื่อนำมาทำวิจัยที่คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตัวอย่างจำนวน 200 ตัวอย่าง ได้ถูกนำมาสกัด DNA ซึ่งจะใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการศึกษาหารูปแบบ genotype ของยีนที่สนใจ ด้วยวิธีสกัดที่ชื่อว่า Chelex-100® method ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนและหลักการคือ

1. การเจาะตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรอง FTA card ในขนาด 1.2mm disc จำนวน 2 discs/ตัวอย่าง ใส่ลงใน 1000 ul of sterile deionized water
2. ทำการ incubate ตัวอย่างในข้อ 1 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือจนกว่า disc ของตัวอย่างจาง เพื่อเป็นการแตกเซลล์
3. ตัวอย่าง disc ของ DNA sample ได้ถูกย้ายมา incubate ใน 5% chelex-100 (imminodiacetic acid) (freshly prepared) ที่อุณหภูมิ 56 C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ Chelex เกิดการทำปฏิกิริยาไปจับกับ Mg2+ และ Ca2+ ซึ่งเป็น co-factor ของ enzymes ต่างๆที่สามารถทำลาย DNA ได้
4. ทำการหยุดปฏิกิริยาที่ขั้นตอนการ incubate สารละลาย ที่อุณหภูมิ 100 C เป็นเวลา 8 นาที พร้อมกับใช้ความร้อนนี้ ทำลาย protease enzyme และโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน อันเป็นการแยกส่วนของ protein ออกจาก DNA ไปพร้อมกัน
5. สารละลายในข้อ 4 ได้ถูกนำมาปั่นตก (centrifuge) ต่อที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำการเก็บเฉพาะสารละลาย DNA ด้านบนไว้ เตรียมสำหรับนำมาทดลองหา รูปแบบ genotype ของยีน BDNF ต่อ ด้วยเทคนิค SNP genotyping เป็นลำดับต่อไป

ดังที่กล่าวข้างต้น ผลการดำเนินงานในปัจจุบัน ทำให้ผู้วิจัยมีตัวอย่าง DNA ที่พร้อมสำหรับทำวิจัยในขั้นตอนต่อไปแล้ว และจากการจัดสรรทุนวิจัยที่ได้รับในงวดที่ 1 ทำให้ผู้วิจัยมีอุปกรณ์/สารเคมีสำหรับทำ SNP genotyping ของยีนตัวที่ 1 (BDNF) เป็นที่เรียบร้อย ขณะนี้ได้ดำเนินการติดต่อให้ทาง specialist ผู้ดูแลเครื่องมือมาตั้งค่าความพร้อมของเครื่อง Quantstudio 5 real time PCR machine ให้ สำหรับเริ่ม optimize protocol ของการทำ SNP genotyping ของยีน BDNF ต่อไป ในการนี้ ผู้วิจัยคาดการณ์ว่า ระยะเวลาการ

ดำเนินการทดลองน่าจะเสร็จสิ้นในช่วงเดือนเมษายน - พฤษภาคม 2563 นี้ และเพื่อให้การดำเนินการวิจัยมีความต่อเนื่องและเพื่อพยายามให้การดำเนินงานวิจัยเสร็จสิ้นภายกำหนดเวลาของสัญญาการรับทุน ผู้วิจัยจึงขอส่งรายงานความก้าวหน้าของการวิจัยที่ได้ดำเนินไป ในการขอเบิกเงินทุนวิจัยงวดที่ 2 เพื่อในระหว่างดำเนินการวิจัยในยีน BDNF ผู้วิจัยจะได้เริ่มสั่งซื้ออุปกรณ์/สารเคมีสำหรับการทำวิจัยในยีน GRIA3 ซึ่งเป็นยีนที่เหลืออีก 1 ตัว เป็นการช่วยลดปัญหาการรอสารเคมีที่สั่งซื้อเป็นเวลานาน (อย่างน้อย 1-2 เดือน) อีกทั้ง ผู้วิจัยคาดว่า หากได้รับการจัดสรรงบวิจัยในงวดที่ 2 ภายหลังการรายงานความก้าวหน้านี้ การสั่งซื้อและการได้รับสารเคมีชุดใหม่น่าจะเรียบร้อยในช่วงเวลาเดียวกันหรือใกล้เคียงกันกับเวลาที่ผู้วิจัยดำเนินการวิจัยในส่วนของ BDNF gene เสร็จสิ้น เป็นผลดีช่วยให้การดำเนินการวิจัยมีความต่อเนื่องและทันตามกำหนดเวลาที่วางแผน

2.4 ผลลัพธ์จากงานวิจัย เช่น บทความตีพิมพ์เผยแพร่ การจดสิทธิบัตร การพัฒนาต้นแบบ หรือการนำไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบอื่น พร้อมแนบหลักฐานประกอบ (ถ้ามี)

ผลลัพธ์จากงานวิจัย คือ ได้ตัวอย่าง DNA ที่พร้อมสำหรับทำวิจัยในเทคนิค SNP genotyping ของยีน BDNF ครบตามจำนวนที่วางแผนดำเนินการไว้ แต่ยังไม่ได้ผลการทดลองสำหรับการวิเคราะห์ เนื่องจากอยู่ในช่วงติดต่อให้ทาง specialist ผู้ดูแลเครื่องมือมาตั้งค่าความพร้อมของเครื่อง Quantstudio 5 real time PCR machine ให้ สำหรับเริ่ม optimize protocol ของการทำ SNP genotyping ของยีน BDNF ให้ได้ condition ที่เหมาะสมในการลงทำการทดลองกับกลุ่มตัวอย่างจริง

2.5 ระบุรายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน (ถ้ามี) -

2.6 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยเป็นเงินทั้งสิ้น 78,617.08 **บาท**

หมายเหตุ นักวิจัยเก็บหลักฐานการใช้งบประมาณสามารถตรวจสอบได้

2.7 งานตามแผนงานวิจัย / โครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ทำการ optimize protocol สำหรับการทดลอง เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการทำ SNP genotyping ในยีน BDNF ในตัวอย่างจริง และขณะทำการทดลองในยีน BDNF นี้ ผู้วิจัยวางแผนที่จะดำเนินการสั่งซื้อสารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยของยีน GRIA3 ควบคู่ไปด้วย และเมื่อได้อุปกรณ์ครบ (น่าจะเป็นช่วงที่ทำการทดลองในยีนแรกเรียบร้อย) จะดำเนินการทำการทดลองต่อในยีน GRIA3

ภายหลังจากการทดลองในห้องปฏิบัติการเสร็จสิ้น ผู้วิจัยจะนำข้อมูลผลการทดลองที่ได้ทั้งหมด (ทั้ง BDNF และ GRIA3) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคซึมเศร้าในตัวอย่างประชากรไทย พร้อมรายงานและสรุปผลการทดลอง เพื่อการตีพิมพ์เป็นลำดับต่อไป

หมายเหตุ แสดงแผนเปรียบเทียบการดำเนินงานตามแผนเดิม และแผนใหม่

กิจกรรมที่ต้องดำเนินการ	เวลาที่วางแผน (เดิม)	เวลาที่วางแผน (ใหม่)
1. การทดลอง SNP genotyping 1.1 ยีน BDNF 1.2 ยีน GRIA3 : สั่งซื้อสารเคมีสำหรับการศึกษา และทำการทดลอง snp genotyping	มกราคม – พฤษภาคม 2563	 เมษายน - พฤษภาคม 2563 (กรณี BDNF gene) มิถุนายน - สิงหาคม 2563 (กรณี GRIA3)
2. การวิเคราะห์ผลและสรุปผล	พฤษภาคม – กรกฎาคม 2563	สิงหาคม – กันยายน 2563
3. เขียนรายงานผลการทดลองเพื่อปิดโครงการและเตรียมสำหรับการตีพิมพ์	กรกฎาคม – กันยายน 2563	สิงหาคม – กันยายน 2563

2.8 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา/อุปสรรค และวิธีการแก้ไข (ถ้ามี)

สาเหตุของงานวิจัยล่าช้า อาจเป็นไปได้ว่า เนื่องจากระยะเวลาของการได้รับพิจารณารับรองจริยธรรมงานวิจัยในมนุษย์ มีระยะเวลาที่นานเกินกว่าแผนที่วางไว้มาก การดำเนินงานจึงเริ่มขึ้นไม่ได้ จนกว่าจะได้รับการรับรองจากคณะกรรมการ ดังนี้ จึงต้องทำการปรับแผนและระยะเวลาการดำเนินงานใหม่ดังที่แสดงในตารางแผนการดำเนินงานที่จะทำต่อไป นอกจากนี้ ก่อนการดำเนินการทดลองกับตัวอย่างจริง จะต้องมีการ optimize protocol ให้ดีก่อนเสมอ เพื่อให้เกิดความเสียหายต่อตัวอย่างจริงที่มีอยู่น้อยที่สุด จึงจำเป็นต้องให้ความสำคัญในขั้นตอนนี้ เพื่อรักษาตัวอย่างที่มีด้วย จึงยังไม่ได้ทำการทดลองในส่วน snp genotyping ของยีน BDNF ในตัวอย่างจริง อย่างไรก็ดี ผู้วิจัยจะพยายามเร่งดำเนินการวิจัยให้ได้ตามแผนที่มีการปรับเปลี่ยน เพื่อให้ได้มาซึ่งผลการทดลองเพื่อการรายงานและตีพิมพ์เผยแพร่เป็นลำดับต่อไป

(ลงชื่อ) ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์

(นางสาวศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 31 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2563

<u>หมายเหตุ</u> : แนบเอกสารอื่นๆประกอบถ้ามี และจัดส่งพร้อมกับบันทึกข้อความขอจัดส่งรายงานความก้าวหน้า

ที่ ๒๑๓/๒๕๖๒

เอกสารรับรองผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
มหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาโครงการวิจัย

รหัสโครงการวิจัย : Sci 075/2562
โครงการวิจัยเรื่อง : ความสัมพันธ์ของการเกิดยีนโพลิมอร์ฟิซึมของยีน BDNF และ GRIA3 ต่อการเกิดภาวะซึมเศร้าในประชากรไทย
หัวหน้าโครงการวิจัย : ดร.ศรีอรุณ เอี่ยมจันทร์
หน่วยงานที่สังกัด : คณะสหเวชศาสตร์

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาแล้วเห็นว่า โครงการวิจัยดังกล่าวเป็นไปตามหลักการของจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โดยที่ผู้วิจัยเคารพสิทธิและศักดิ์ศรีในความเป็นมนุษย์ ไม่มีการล่วงละเมิดสิทธิ สวัสดิภาพ และไม่ก่อให้เกิดภยันตรายแก่ตัวอย่างการวิจัยและผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยในขอบข่ายของโครงการวิจัยที่เสนอได้ (ดูตามเอกสารตรวจสอบ)

๑. แบบเสนอเพื่อขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์	ฉบับที่ ๒ วันที่ ๒๘ เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๒
๒. เอกสารโครงการวิจัยฉบับภาษาไทย	ฉบับที่ ๒ วันที่ ๒๘ เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๒
๓. เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย	ฉบับที่ - วันที่ - เดือน - พ.ศ. -
๔. เอกสารแสดงความยินยอมของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย	ฉบับที่ - วันที่ - เดือน - พ.ศ. -
๕. เอกสารแสดงรายละเอียดเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยซึ่งผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว หรือชุดที่ใช้เก็บข้อมูลจริงจากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย	ฉบับที่ ๒ วันที่ ๒๘ เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๒
๖. เอกสารอื่น ๆ (ถ้ามี)	ฉบับที่ - วันที่ - เดือน - พ.ศ. -

วันที่รับรอง : วันที่ ๑๐ เดือน มกราคม พ.ศ. ๒๕๖๓
วันที่หมดอายุ : วันที่ ๙ เดือน มกราคม พ.ศ. ๒๕๖๔

ลงนาม
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ้งเอี่ยม)
ประธานคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ชุดที่ ๑ (กลุ่มคลินิก/ วิทยาศาสตร์สุขภาพ/ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)

ผลการประเมินรายงานความก้าวหน้าของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย โดยหัวหน้าส่วนงาน

สรุปความเห็นของการประเมิน

☑ สนับสนุนให้ดำเนินการต่อไป

☐ ไม่สนับสนุนให้ดำเนินการต่อไป ระบุเหตุผล .....

.....

.....

(ลายเซ็น).....หัวหน้าหน่วยงาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช)

(.....)

รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

วันที่ ..... เดือน ๒๘ พ.ค. ๒๕๖๓ พ.ศ. .....

หมายเหตุ : แบบฟอร์มนี้ใช้สำหรับรายงานความก้าวหน้างานวิจัยทั้งแผนงานวิจัยและโครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ส่วนงาน/กองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา