

เนื้อเรื่อง (Main body)

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Method)

1. การขออนุมัติทำวิจัยในมนุษย์

เสนอรายละเอียดโครงการวิจัย ผ่านคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตันสังกัด เพื่อขออนุมัติการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยบรรณการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และได้ผ่านการรับรองจากที่ประชุมคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เมื่อวันที่ 22 ตุลาคม 2551

2. กลุ่มตัวอย่าง

แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มตัวอย่าง และกลุ่มควบคุม

กลุ่มตัวอย่าง คือกลุ่มผู้ป่วยโรคซึมเศร้า (major depressive disorder) ที่เข้ารับการรักษที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 22 คน อายุประมาณ 18-65 ปี เนื่องจากตามระบาวินิจฉัยของผู้ป่วยโรคซึมเศร้า มีอายุเฉลี่ยประมาณ 40 ปี (มาโนช และ ปราโมท, 2548) การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจะได้รับการวินิจฉัยจากจิตแพทย์ ตาม Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) โดยจิตแพทย์จะทำการวินิจฉัยแยกกลุ่มตามอาการ และความรุนแรงของโรคซึมเศร้า

และกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่ไม่มีภาวะซึมเศร้า ไม่มีภาวะวิตกกังวล หรือภาวะเครียดอย่างเรื้อรัง รวมทั้งไม่มีประวัติ หรืออาการแสดงของโรคจิตเภท (schizophrenia) และโรคอารมณ์แปรปรวน (mood disorders) และไม่มีประวัติการเสพยาเสพติด เช่น บุหรี่ แอลกอฮอล์ เมทแอมเฟตามีน ฯลฯ การคัดเลือกกลุ่มควบคุม อาสาสมัครจะต้องทำแบบทดสอบเพื่อประเมินภาวะสุขภาพจิต ตามแบบทดสอบของกรมสุขภาพจิต (ดัชนีชี้วัดสุขภาพจิตคนไทยฉบับสมบูรณ์ 54 ข้อ: ใหม่ ปี 2547(Thai Mental Health Indicator(new 2004) : TMHI-54) อาสาสมัครมีอายุเฉลี่ย ใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอย่าง และเพศเดียวกัน

ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มจะได้รับข้อมูลและคำแนะนำสำหรับผู้ป่วยหรืออาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย แสดงความยินยอมในหนังสือแสดงความยินยอม (informed consent form) ในการเข้าร่วมโครงการวิจัย อาสาสมัครสามารถบอกยกเลิกการเข้าร่วมได้ตลอดเวลา การเก็บข้อมูลอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์ และหากอาสาสมัครมีภาวะผิดปกติทางสุขภาพจิตสามารถเข้ารับคำปรึกษาจากจิตแพทย์ที่ร่วมโครงการได้

3. Blood Samples and mRNA preparation

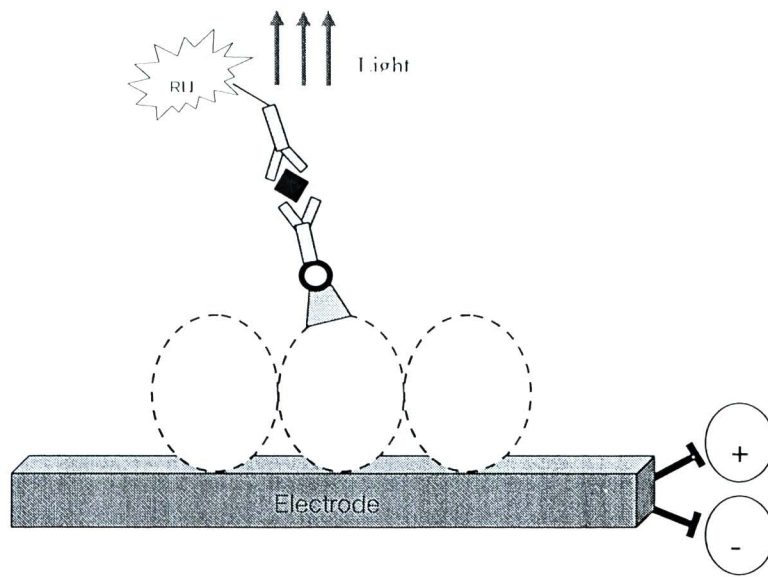
การเก็บตัวอย่างเลือดจากกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมนั้นโดยการหยดเลือดจากปลายนิ้ว ประมาณ 300 ไมโครลิตร หรือประมาณ 6 หยด ตัวอย่างเลือดจะนำมาใช้ในการสกัด mRNA โดยมี ขั้นตอนคือ ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ด้วย red blood cell lyses solution และแยกเม็ดเลือดขาวโดยใช้ การปั่นตก จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีน ด้วย protein precipitation ในขั้นตอนนี้ mRNA จะอยู่ในของเหลว จะแยกเอาของเหลวออกมาตกตะกอน mRNA ด้วย isopropanol

4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification

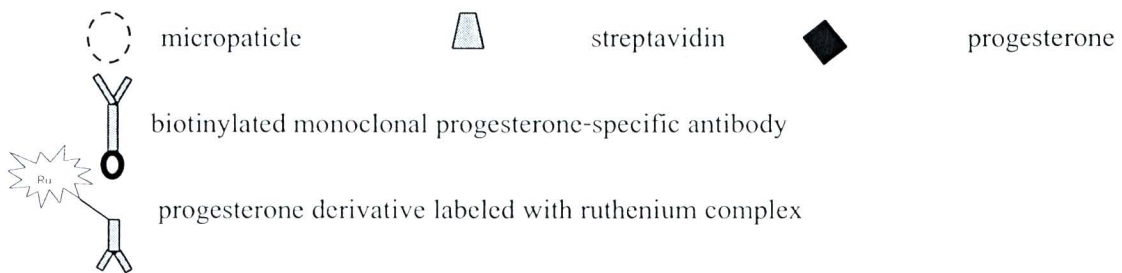
หลังจากเตรียม mRNA แล้ว จะเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA ด้วย enzyme reverse transcriptase และเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน PBR โดยใช้เทคนิค PCR มีส่วนผสมในการทำดังนี้ 1x Taq polymerase buffer, primer ของ PBR dATP, dCTP, dGTP, dTTP, biotin-dUTP, Taq DNA polymerase โดย primer ของ PBR คือ Forward: AGG GTC TCC GCT GGT AGG CC, Reverse: TGG GGC AAC CTC TGA AGC TC และ primer ของ actin คือ Forward: CCC AGA GCA AGA GAG GCA TC , Reverse: CTC AGG AGG AGC AAT GAT CT สำหรับยีน actin นั้นเป็น house keeping gene เพื่อนำมา normalize กับการแสดงออกของ PBR ยีน PCR product ที่ได้ จะนำมาทำ DNA Gel electrophoresis จากนั้น DNA บน agarose gel จะถูกนำวิเคราะห์ โดยการวัดระดับของการแสดงออกของ PBR นั้นจะใช้ programme ที่ติดตั้งร่วมกับ Gel doc ในการถ่ายภาพ cDNA product ที่ย้อมด้วย ethidium bromide และวัดค่า band intensity ที่สัมพันธ์กับค่า absorbance จากนั้น นำค่า band intensity ที่ได้มาหารอัตราส่วนต่อการแสดงออกของ beta actin ซึ่งเป็น house keeping gene ค่าอัตราส่วนที่ได้จะนำไปใช้วิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

5. Electrochemiluminescence immuno assay (ECLIA)

ระดับของ โปรเจสเตอโรน ใน serum จะถูกวัดด้วยเทคนิค ECLIA โดยใช้ Progesterone II kit (cobas, USA) โดยจะติดฉลากโปรเจสเตอโรนด้วย ruthenium ซึ่งมีวิธีการดังนี้ serum จะถูก incubate ด้วย biotinylated monoclonal progesterone-specific antibody และ progesterone derivative labeled with ruthenium complex หลังจากนั้น serum จะถูก incubate ต่อด้วย streptavidin-coated microparticles สุดท้าย โปรเจสเตอโรนที่มีการติดฉลากแล้วจะเข้าจับกับบริเวณผิวหน้าของ electrode สำหรับ serum ส่วนที่ไม่มีการจับกับ electrode จะถูกล้างออกด้วย Procell (cobas, USA) จากนั้น photomultiplier จะวัดระดับการปลดปล่อยแสงของ ruthenium เพื่อแปลผลเป็นปริมาณของ โปรเจสเตอโรน



ภาพที่ 1 Basic principle of the electrochemiluminescence technology



6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติโดย ANOVA ด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS