

การศึกษาผลของยาอิมาทินิบต่อการเปลี่ยนแปลงความดันหลอดเลือดแดงปอดในหนูแรทที่อยู่ในสภาวะ
ขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effect of Imatinib on Pulmonary Vasculature in Chronic Intermittent Hypoxic rat model

Mr. Nophol Leelayuwatanakul



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาผลของยาอิมานิทินต่อการเปลี่ยนแปลงความดัน
หลอดเลือดแดงปอดในหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาด
ออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง

โดย

นายพนพล ลีลาวัฒน์กุล

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ญัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ประวิตร อัศวานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ญัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. แพทย์หญิง ชนิดา วินะยานุวัตติคุณ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วัฒนชัย โชตินัยวัตรกุล)

นพพล ลีลาญวัฒน์กุล : การศึกษาผลของยาอิมาทินิบต่อการเปลี่ยนแปลงความดันหลอดเลือดแดงปอดในหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง (Effect of Imatinib on Pulmonary Vasculature in Chronic Intermittent Hypoxic rat model) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. ญัฐพงษ์ เจียมจรรย์ธรรม, 65 หน้า.

บทนำ พยาธิกำเนิดของการเกิดความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงที่เกิดจากภาวะหยุดหายใจขณะนอนหลับ ยังไม่มีการศึกษาถึงความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่าน platelet-derive growth factor receptor จึงนำมาสู่การศึกษาโดยใช้ยา imatinib เพื่อออกฤทธิ์ยับยั้งกลไกดังกล่าว และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอด ในสภาวะการขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง

วิธีการศึกษา หนู Sprague Dawley จำนวน 25 ตัว ถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม และใช้ยา imatinib ป้อนทางปาก ในกลุ่มหนูที่อยู่ในแบบจำลองสภาวะดังกล่าวเป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน และทำการศึกษาการเปลี่ยนทางระบบไหลเวียนโลหิต และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา เปรียบเทียบกับกลุ่มยาหลอก

ผลการศึกษา พบว่าแบบจำลองดังกล่าว สามารถทำให้หนูทดลองเกิดสภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงได้ และยา imatinib สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอดในส่วนของ ความดันหลอดเลือดแดงปอด และ การหนาตัวของหลอดเลือดแดงปอดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยาหลอก

สรุปผลการศึกษา การเกิดภาวะหลอดเลือดแดงปอดสูงในสภาวะการขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง อาจมีความเกี่ยวข้องผ่านกลไกการส่งสัญญาณผ่าน platelet-derive growth factor receptor และอาจมีกลไกอื่นที่ยังต้องมีการศึกษาต่อไป

ภาควิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

5874038230 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: PULMONARY HYPERTENSION / OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA / IMATINIB / TYROSINE KINASE INHIBITOR

NOPHOL LEELAYUWATANAKUL: Effect of Imatinib on Pulmonary Vasculature in Chronic Intermittent Hypoxic rat model. ADVISOR: ASSOC. PROF. NATTAPONG JAIMCHARIYATAM, M.D., 65 pp.

Background This is the proof-of-concept study to examine the effects of imatinib mesylate, PDGF receptor inhibitor, on overall aspects of pulmonary vasculature in an chronic intermittent hypoxia(CIH)-associated PH rat model.

Methods Twenty-five Sprague Dawley rats were randomly divided into five groups, including two normoxia-groups, two CIH-groups and one control group. Imatinib was given to one CIH-group and one normoxia-group for 28 days. At the end of study, hemodynamics and histopathological studies were performed.

Results Hemodynamic studies revealed significant reduction in mPAP in imatinib- treated CIH- group than untreated CIH- group. Histopathological studies revealed significant lower in percent wall thickness of pulmonary arteriole in imatinib-treated CIH-group than untreated CIH-group. Moreover, upregulation of PDGFR- β and its phosphorylated form were observed in untreated CIH-group and slightly attenuated in imatinib-treated CIH-group.

Conclusions CIH model induces increased mPAP, pulmonary vascular remodeling. Imatinib was proved to be beneficial in CIH model on pulmonary vasculature in terms of hemodynamics and pulmonary vascular remodeling. PDGF pathway might be associated with the development of OSA/CIH-associated PH.

Department: Medicine

Student's Signature

Field of Study: Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุกท่าน ที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยครั้งนี้ และทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ได้แก่

หน่วยโรคระบบทางเดินหายใจและภาวะวิกฤตทางการหายใจ ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประกอบไปด้วย รศ. นพ. ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ พญ. นิวัน กลิ่นงาม ที่ช่วยเหลือการฝึกฝนและการควบคุมการทำหัตถการกับสัตว์ทดลอง

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ รศ. นพ. สมพล สงวนรังศิริกุล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ และช่วยดูแลและให้คำแนะนำเรื่องแบบจำลองสัตว์ทดลองเป็นอย่างดี

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ รศ.นพ. ปุณชวิษฐ์ จันทรานูวัฒน์ ผู้ที่เสียสละเวลาอ่านผลทางพยาธิวิทยาเป็นอย่างดี

หน่วย Chulalongkorn University System Biology (CUSB) ประกอบไปด้วย อ. นพ. ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล ผู้ที่เสียสละเวลาให้คำแนะนำการตรวจทางโมเลกุลวิทยาและให้คำแนะนำเป็นอย่างดี รวมทั้ง คุณ นัฐธิญา กาลพงษ์นุกุล นักวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยเสียสละเวลาให้คำแนะนำและดูแลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างใกล้ชิดทุกขั้นตอน

สาขาวิชาประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ได้แก่ ผศ.นพ.วิวัฒน์ชัย โชตินัยวัตรกุล ที่ให้ข้อเสนอแนะและความคิดเห็นในงานวิจัย

หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้การสนับสนุนยาในการทำงานวิจัยนี้ และศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิทยานิพนธ์ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่มอบทุนรัชดาภิเษกสมโภชเพื่อในการทำวิจัยชิ้นนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญแผนภูมิ.....	1
สารบัญตาราง.....	2
สารบัญรูปภาพ.....	3
บทที่ 1	5
บทนำ.....	5
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)	5
1.2 คำถามของการวิจัย (Research questions).....	7
1.2.1 คำถามหลัก (primary research question).....	7
1.2.2 คำถามรอง (Secondary research questions).....	7
1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	8
1.4 สมมติฐาน	9
1.5 กรอบแนวคิด (Conceptual framework).....	10
1.6 ขอบเขตงานวิจัย	11
1.7 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	12
1.8 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในงานวิจัย (Operational definition)	13
1.9 รูปแบบการวิจัย	13
1.10 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	13
1.11 ข้อจำกัดในงานวิจัย.....	14

1.12 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการแก้ไข	15
1.13 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	15
บทที่ 2	18
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	18
2.1. แนวคิดและทฤษฎี.....	18
2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
บทที่ 3	22
วิธีดำเนินงานวิจัย	22
3.1. รูปแบบการวิจัย	22
3.2. ระเบียบการวิจัย.....	22
3.3. การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	23
3.4. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	23
3.5. การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	25
3.6. การวิเคราะห์ข้อมูล	29
บทที่ 4	39
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	39
4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา	39
4.2 ผลการวิเคราะห์	39
4.2.1 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต.....	40
4.2.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจ	41
4.2.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการเกิด PDGFR Beta phosphorylation ของเนื้อเยื่อปอด	42
4.2.4 ผลการศึกษาระดับก๊าซในเลือดแดง	42

4.3 ผลการเปรียบเทียบ	43
4.3.1 ค่าความดันหลอดเลือดแดงปอด (right ventricular systolic pressure).....	43
4.3.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเปลี่ยนแปลงของการหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือด แดงปอด.....	43
4.3.3 ค่าการเปลี่ยนแปลงของการหนาตัวของผนังห้องห้องหัวใจล่างขวา (right ventricular hypertrophy)	43
4.3.4 ค่าการเปลี่ยนแปลงของการเกิด PDGFR-Beta phosphorylation ของเนื้อเยื่อ ปอด	44
บทที่ 5	55
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ	55
5.1 สรุปผลการวิจัย	55
5.2 อภิปรายผล	56
5.3 ข้อเสนอแนะ	58
รายการอ้างอิง	60
ภาคผนวก.....	63
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	65

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 แสดงพยาธิกำเนิดของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงปอดสูงจากภาวะหยุดหายใจ ขณะนอนหลับ ³	6
แผนภูมิที่ 2 แสดงวิธีการวัดความหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอดในการศึกษา ทางพยาธิวิทยา.....	28
แผนภูมิที่ 3 แสดงแผนภูมิการดำเนินการวิจัยและการแบ่งกลุ่มหนูแรท (consort diagram).....	31
แผนภูมิที่ 4 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของหนูแรทจำแนกตามกลุ่ม ณ จุดเวลาหนึ่งๆ....	47
แผนภูมิที่ 5 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยความดันหลอดเลือดแดงปอดวัดโดย right ventricular systolic pressure (RVSP) จากการศึกษาาระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic studies)	49
แผนภูมิที่ 6 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยความดันหลอดเลือดแดง (mean arterial pressure) จากการศึกษาาระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic studies)	49
แผนภูมิที่ 7 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) จากการศึกษา ระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic studies)	50
แผนภูมิที่ 8 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด (medial wall thickness of pulmonary artery, diameter 50-100 micron).....	52
แผนภูมิที่ 9 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยความหนาของผนังกล้ามเนื้อของหัวใจห้องขวาข้าง (ratio of mean weight of right ventricle weight to left ventricle plus septum weight)	52

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของหนูแรทกลุ่มตัวอย่างอายุ 8 สัปดาห์	45
ตารางที่ 2 ตารางแสดงข้อมูลน้ำหนักตัวของหนูแรทจำแนกตามกลุ่ม ณ จุดเวลาต่างๆ	46
ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิตจำแนกตามกลุ่มหนูแรท (hemodynamic studies).....	48
ตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาจำแนกตามกลุ่มหนูแรท (histopathological studies).....	51
ตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษาการเกิด phosphorylation ของ PDGFR-Beta เทียบกับจำนวน PDGFR-Beta ทั้งหมดจำแนกตามกลุ่มหนูแรท.....	53

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 แสดงสถานที่ในการใช้เลี้ยงหนูแรทตลอด 28 วัน.....	31
ภาพที่ 2 แสดงเครื่องการตัดจ่ายก๊าซเพื่อจำลองสภาวะ chronic intermittent hypoxia และอุปกรณ์ที่ใช้ในแบบจำลองทั้งหนูแรทที่อยู่ในกลุ่ม chronic intermittent hypoxia และ normoxia.....	32
ภาพที่ 3 แสดงเครื่องการอัดจ่ายก๊าซให้กับแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia	32
ภาพที่ 4 แสดงเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิตซึ่งต่อกับ TSD 104A blood pressure transducer and Biopac System	33
ภาพที่ 5 แสดงการเตรียมเครื่องมือเพื่อต่อกับ TSD 104A blood pressure transducer and Biopac System.....	33
ภาพที่ 6 แสดงการเตรียมเครื่องมือก่อนการศึกษาทางระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic studies).....	34
ภาพที่ 7 แสดงการตัดขนบริเวณขาหนีบของหนูแรทเพื่อทำการสอดสายสวนเข้าหลอดเลือดแดง	34
ภาพที่ 8 แสดงการสอดสายเข้าหลอดเลือดแดงที่บริเวณขาหนีบของหนูแรทเพื่อวัดความดันโลหิตระหว่างการศึกษาในระบบไหลเวียนโลหิต	35
ภาพที่ 9 แสดงการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิตเพื่อวัดค่าความดันหลอดเลือดแดงปอด โดยใช้วิธี subxiphoid approach	36
ภาพที่ 10 แสดงการทำการ усыชาตโดยใช้ยา pentobarbital จนกระทั่งไม่มีสัญญาณชีพจากสายสวนหลอดเลือดแดง	36
ภาพที่ 11 แสดงการปั่นเนื้อเยื่อปอดเพื่อเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการศึกษา western blot	37
ภาพที่ 12 แสดงการศึกษา western blot จากชิ้นเนื้อตัวอย่างจากเนื้อเยื่อปอดหนูแรท.....	37
ภาพที่ 13 แสดงการตรวจทางพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ของหลอดเลือดแดงปอดขนาด 50-100 ไมครอน.....	38
ภาพที่ 14 แสดงการตรวจทาง western blot เพื่อศึกษาการเกิด phosphorylation ของ PDGFR-Beta	53

ภาพที่ 15 แสดงผลการศึกษาค่าก๊าซในหลอดเลือดแดงจำแนกตามกลุ่มหนูแรท..... 54



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

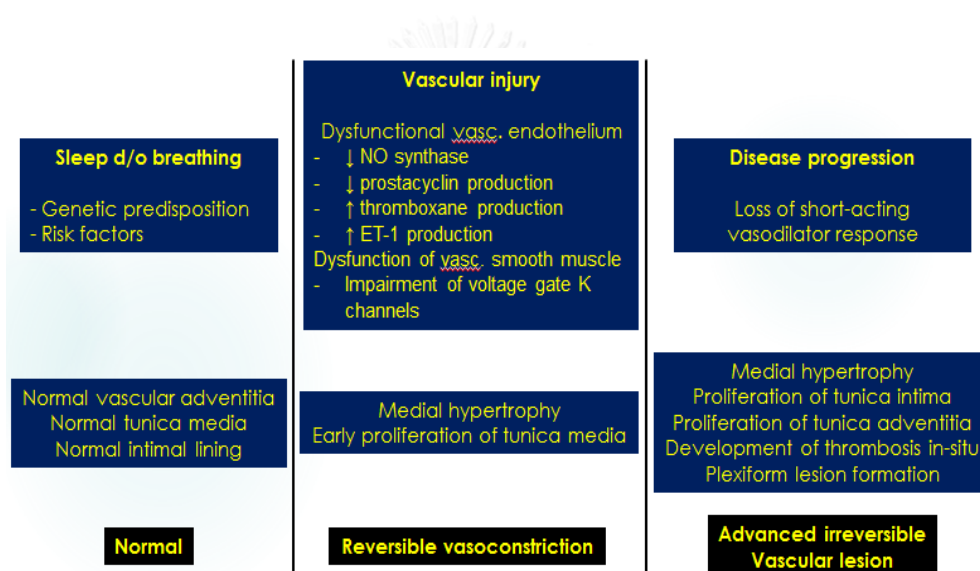
ภาวะหยุดหายใจขณะนอนหลับ (Obstructive Sleep Apnea, OSA) เป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยขณะนอนหลับ ซึ่งเกิดจากการหย่อนตัวของกล้ามเนื้อทางเดินหายใจส่วนต้นขณะนอนหลับ ผลของภาวะดังกล่าว เช่น การนอนหลับที่ไม่ต่อเนื่องในเวลากลางคืน (sleep fragmentation) ภาวะก๊าซออกซิเจนในเลือดต่ำ (hypoxemia) ภาวะการคั่งของก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (hypercapnia) และอาการแสดง ได้แก่ นอนกรน (snoring), อาการหยุดหายใจขณะนอนหลับ อาการง่วงนอนมากผิดปกติในช่วงกลางวัน (excessive daytime sleepiness, EDS) ¹ อาการเหนื่อยหุดหืดได้ง่าย สมาธิ ความจำ สมรรถภาพการทำงานถดถอย นอกจากนี้ในระหว่างการหยุดหายใจจะมีผลต่อความดันหลอดเลือดแดงปอดให้สูงขึ้นด้วย จนในท้ายที่สุดเกิดภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงอย่างถาวร (pulmonary hypertension)

ภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงจากภาวะหยุดหายใจขณะนอนหลับ ได้รับการจำแนกอยู่ในกลุ่มที่ 3.4 คือ ภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงที่เกี่ยวข้องกับภาวะความผิดปกติจากการนอนหลับ ² ซึ่งพยาธิกำเนิดของภาวะนี้เกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ ภาวะซิมพาเทติกที่สูงขึ้นจากการหยุดหายใจขณะนอนหลับ (sympathetic activation) ภาวะการอักเสบและการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอด การเกิดภาวะเลือดแข็งตัวผิดปกติ (hypercoagulability) และความผิดปกติทางเมตาโบลิสมจากภาวะอ้วน ภาวะต่อต่อเลปตินและอินซูลิน (dysregulated metabolism) ³ ซึ่งเมื่อการเกิดภาวะขาดก๊าซออกซิเจนเป็นๆหายๆตลอดช่วงการนอนหลับทำให้ผนังหลอดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงโดยการสร้างและการหนาตัวของเยื่อบุผนังหลอดเลือด (pulmonary hypoxic vasoconstriction and endothelial remodeling) และทำให้เกิดภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงในช่วงกลางวัน (daytime pulmonary hypertension) ⁴ ในท้ายที่สุด โดยจากการศึกษา พบความชุกของการเกิดภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูง ร้อยละ 12-34 ของผู้ป่วย OSA ⁵⁻⁷ ความสำคัญของการวินิจฉัยภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงจึงมีความสำคัญเนื่องจากมีอัตราการเสียชีวิตที่มากขึ้นกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดังกล่าว ⁸

การรักษาภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงเน้นไปที่การรักษาตามพยาธิสภาพของหลอดเลือดที่เปลี่ยนแปลง และรักษาที่สาเหตุการก่อโรค โดยเฉพาะในผู้ป่วย OSA ที่การรักษามุ่งเน้นที่การ

รักษาโดยวิธีไม่ผ่าตัด (non-surgical treatment) ได้แก่ การลดน้ำหนัก การหลีกเลี่ยงยาหรือ เครื่องดื่มที่อาจมีฤทธิ์กดประสาทส่วนกลาง การปรับเปลี่ยนท่าทางการนอนหลับ การใช้เครื่องอัด อากาศแรงดันบวกชนิดต่อเนื่อง (continuous positive airway pressure, CPAP)

อย่างไรก็ตามในผู้ป่วย pulmonary arterial hypertension (PAH) การรักษาหลักคือการใช้ ยาลดความดันหลอดเลือดแดงปอด โดยมีการนำยากลุ่มใหม่ที่ออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจง (targeted therapy) ได้แก่ ยาอิมาทินิบ (imatinib) ซึ่งเป็นยากลุ่ม Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) ที่ออก ฤทธิ์ผ่าน platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) เพื่อยับยั้งการสร้างเยื่อผนังหลอดเลือด และทำให้เกิดการสลายตัวของ PSMCs (anti-apoptosis of PSMCs)^{9,10}



แผนภูมิที่ 1 แสดงพยาธิกำเนิดของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงปอดสูงจากภาวะหยุดหายใจขณะนอนหลับ³

ในผู้ป่วย PH มีการศึกษาจากการติดตามผู้ป่วย idiopathic PAH และ PAH associated connective tissue disease จำนวน 15 ราย พบว่ายา targeted therapy ซึ่งได้แก่ ยา imatinib ซึ่งใช้เป็นยาเพิ่มเติมจากยาหลัก (add-on therapy) สามารถเพิ่มความสามารถในการทำกิจกรรมต่างๆ (functional class) และคุณภาพชีวิตได้¹¹ นอกจากนั้นแล้วการศึกษาไปข้างหน้าด้วยวิธีสุ่ม ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของยา imatinib เป็นยาเสริมเพิ่มเติมจากยาหลัก (add-on therapy) ในผู้ป่วย PAH พบว่าสามารถเพิ่มความสามารถในการออกกำลังกาย (exercising capacity) จากการเพิ่มขึ้นของ 6MWD เป็นระยะทาง 32 เมตร เปรียบเทียบระหว่างเริ่มการศึกษาจนถึงจบการศึกษาที่ 24 สัปดาห์ (95%CI, 12–52; P=0.002) และลดค่าแรงต้านของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary

vascular resistance, PVR) 379 dyne/s/cm-5 (95%CI, -502 to -255; $P < 0.001$)^{12,13} โดยในการศึกษาก่อนหน้ามีเพียงการศึกษาที่พิจารณาประสิทธิภาพของยาในผู้ป่วย PH กลุ่มที่ 1 เท่านั้น แต่การศึกษาในผู้ป่วย PH กลุ่มที่ 3 โดยเฉพาะในกลุ่มที่เกิดจากความผิดปกติจากการนอนหลับยังคงค่อนข้างจำกัดจึงนำมาสู่คำถามของงานวิจัยนี้

1.2 คำถามของการวิจัย (Research questions)

1.2.1 คำถามหลัก (primary research question)

ยา imatinib 50 mg/kg body weight โดยการให้ทางปาก (oral gavage) วันละ 1 ครั้ง สามารถลดการเปลี่ยนแปลงความดันหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary arterial pressure, PAP) ของแบบจำลองหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรังด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน (chronic intermittent hypoxia, CIH) ได้หรือไม่

1.2.2 คำถามรอง (Secondary research questions)

1. ยา imatinib 50 mg/kg body weight โดยการให้ทางปาก (oral gavage) วันละ 1 ครั้ง ของแบบจำลองหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรังด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) ได้หรือไม่ โดยใช้การวัดความหนาของชั้นกล้ามเนื้อผนังหลอดเลือดแดงปอดทางพยาธิวิทยาหลังการุณยฆาต
2. ยา imatinib 50 mg/kg body weight โดยการให้ทางปาก (oral gavage) วันละ 1 ครั้ง ของแบบจำลองหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรังด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน จะมีผลต่อการหนาตัวของหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) ได้หรือไม่ โดยใช้การวัดอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกันระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสองห้อง (ratio of right ventricle weight and left ventricle weight + septal weight)

3. ยา imatinib 50 mg/kg body โดยการให้ทางปาก (oral gavage) วันละ 1 ครั้ง ของแบบจำลองหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรังด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน จะสามารถเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ platelet derived growth factor receptor (PDGFR phosphorylation) ได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อประเมินผลของยา imatinib กับกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะ chronic intermittent hypoxia โดยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน ต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลงของความดันหลอดเลือดแดงปอดโดยวัดเป็นค่าความดันของการบีบตัวของหัวใจฝั่งขวา (RVSP) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก
2. เพื่อประเมินผลของยา imatinib กับกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะ chronic intermittent hypoxia โดยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) โดยใช้การวัดความหนาของชั้นกล้ามเนื้อผนังหลอดเลือดแดงปอดทางพยาธิวิทยาหลังการุณยฆาต หน่วยวัดเป็น มิลลิเมตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก
3. เพื่อประเมินผลของยา Imatinib กับกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะ chronic intermittent hypoxia โดยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน ต่อการหนาตัวของหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) โดยใช้การวัดอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกล้ามเนื้อระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสอง

ห้อง (ratio of right ventricle weight and left ventricle weight + septal weight)

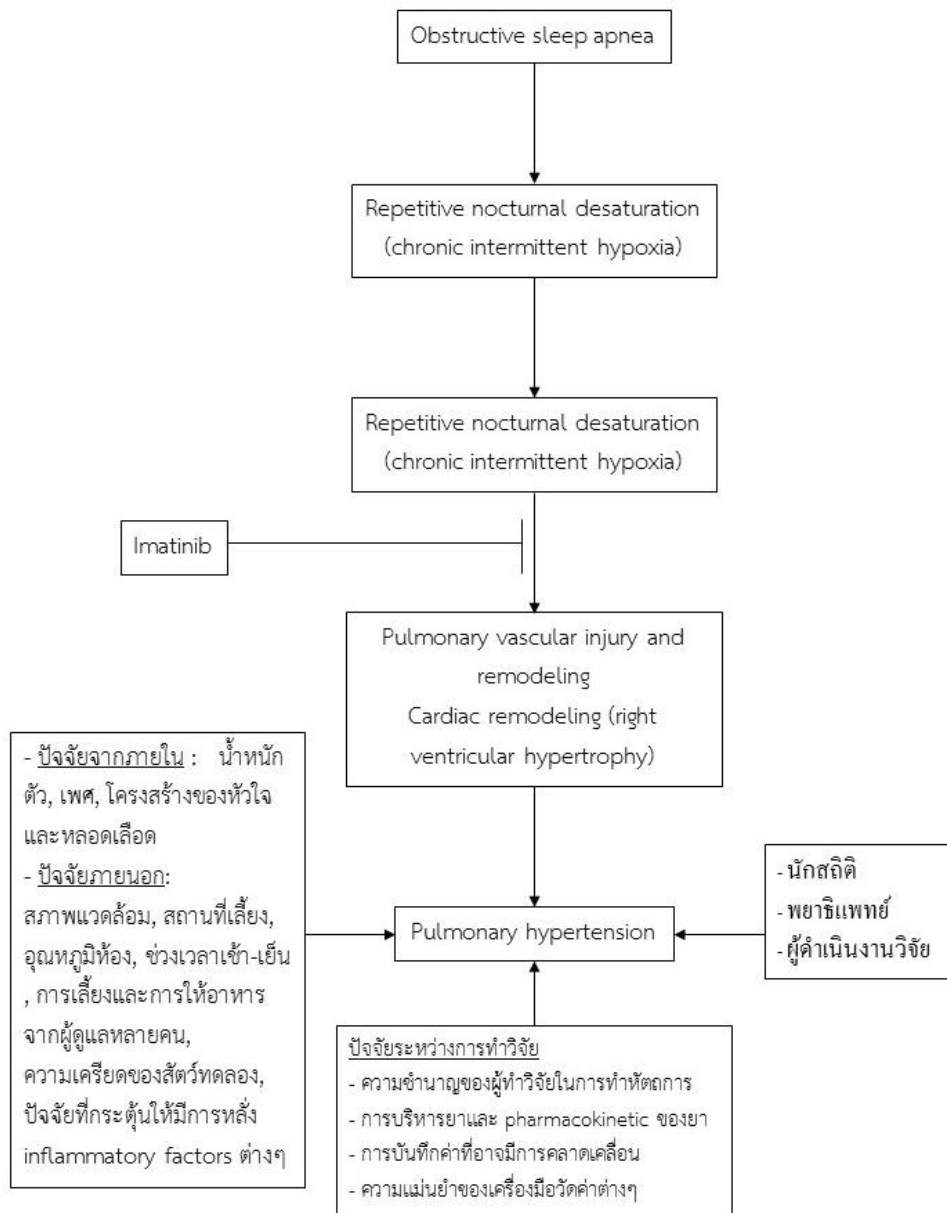
เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก

4. เพื่อประเมินผลของยา imatinib กับกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะ chronic intermittent hypoxia โดยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลาต่อเนื่อง 28 วัน ต่อการลดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ platelet derived growth factor receptor (PDGFR phosphorylation) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก

1.4 สมมติฐาน

ยา imatinib 50 mg/kg body weight โดยการให้ทางปาก (oral gavage) วันละ 1 ครั้ง สามารถลดการเปลี่ยนแปลงความดันหลอดเลือดแดงปอดได้อย่างน้อย 8 มิลลิเมตรปรอท, ลดการปรับเปลี่ยนพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling), ลดการหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy), ลดการเกิด phosphorylation ของ PDGFR ของแบบจำลองหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรังด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิด ที่กำหนดระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกันนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องนาน 28 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก

1.5 กรอบแนวคิด (Conceptual framework)



1.6 ขอบเขตงานวิจัย

1. **Study population** คือ หนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ ที่มีน้ำหนักตัวระหว่าง 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. **Sample population** คือ กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ ที่มีน้ำหนักตัวระหว่าง 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดลถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มตามการสุ่มตามจำนวนตัวอย่างที่คำนวณ
3. **ตัวแปรอิสระ** คือ สภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง และการให้ยา imatinib
4. **ตัวแปรตาม** คือ การเปลี่ยนแปลงของความดันหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary arterial pressure) การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular remodeling) การหนาตัวของผนังห้องหัวใจฝั่งขวา (right ventricular hypertrophy) และการเปลี่ยนแปลงของการเกิด phosphorylation ของ PDGFR (PDGFR phosphorylation) การเปลี่ยนแปลงของค่าก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas; ABG)
5. **ตัวแปรควบคุม** คือ การเลี้ยงดู การให้อาหารและสภาพแวดล้อมของหนูแรท วิธีการป้อนยา imatinib และน้ำหนักตัวที่ลดลง
6. **เครื่องมือในการวัดผล** ได้แก่ เครื่องมือในการวัดความดันหลอดเลือดแดงปอด และความดันโลหิต เครื่องมือในการตรวจทางพยาธิวิทยาของพยาธิแพทย์ เครื่องมือในการชั่งน้ำหนักเนื้อเยื่อหัวใจ เครื่องมือในการตรวจทางห้องปฏิบัติการในการทำ western blot จากเนื้อเยื่อปอด
7. **การทดสอบ reliability** ของเครื่องมือที่ใช้วัดระดับความดันหลอดเลือดแดงปอด มีการวัดเปรียบเทียบเพื่อให้ค่าเป็นมาตรฐานกับเครื่องวัดความดันโลหิตอย่างน้อย 2 เครื่อง และวัดเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลสองชุดในหนูแรทตัวเดียวกัน ส่วนการเปลี่ยนทางพยาธิวิทยาใช้เป็น intra-observer reliability ในการแปลผลโดยทำ repeatability test ใน

ชิ้นเนื้อเดียวกัน แต่ต่างเวลากันโดยพยาธิแพทย์ที่มีความชำนาญการเพียงคนเดียว ส่วนการตรวจ western blot ใช้การแปลผลเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อตัวอย่างกับชิ้นเนื้อที่มีผลการทดสอบเป็น positive control และ negative control

8. การศึกษาเป็น double blinded โดยใช้รหัส (code) แทนหนูตัวอย่างในการวิจัยแต่ละตัว การเก็บข้อมูลความดันโลหิตเลือดแดงปอดและการตรวจทางพยาธิวิทยาทั้งหมด ผู้วิจัยและผู้วิเคราะห์ข้อมูลและแปลผลจะไม่ทราบว่า หนูแรทอยู่ในกลุ่มใด (blinded) แต่ในการให้ยา ผู้วิจัยจะทราบว่าหนูแรทแต่ละตัวอยู่ในกลุ่มใด (unblinded) เพื่อจะสามารถสังเกตอาการข้างเคียงจากยา เพื่อประโยชน์ในการบันทึกและสามารถหยุดการทดลองในหนูแรทที่มีพฤติกรรมผิดปกติและภาวะแทรกซ้อนจากยาระหว่างการศึกษาได้

1.7 ข้อตกลงเบื้องต้น

1. กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เบื้องต้นไม่มีความแตกต่างในแง่เพศ อายุ น้ำหนักตัว ความดันโลหิตเลือดแดงปอด ความดันโลหิต โครงสร้างของหัวใจที่ไม่มีการตีตันของการไหลเวียนโลหิตของห้องหัวใจฝั่งขวา (right ventricular outflow tract obstruction) การบีบตัวของหัวใจและอัตราการเต้นของหัวใจ พยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด และ ความหนาของผนังห้องหัวใจฝั่งขวา ซึ่งจะทำให้การสู่มหนูแรทเพศผู้จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ 6 ตัว มาเพื่อทำการศึกษาค้นคว้าที่กล่าวมาเบื้องต้น เพื่อทดสอบว่าหนูแรทไม่มีความผิดปกติก่อนเริ่มทำการศึกษา
2. กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ใช้ในการทดลองมาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และระหว่างทำการศึกษา การเลี้ยงดู การให้อาหารถูกกระทำโดยผู้วิจัยคนเดียวกันและสภาพแวดล้อมเดียวกัน

1.8 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในงานวิจัย (Operational definition)

1. Chronic intermittent hypoxic rat model คือการกำหนดสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรังให้กับหนูแรท โดยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์ทุกๆ 30 วินาที ในระบบปิด นาน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องนาน 28 วัน ในช่วงเวลากลางวัน
2. Right ventricular systolic pressure (RVSP) ได้แก่ ค่าความดันห้องหัวใจฝั่งขวาล่างขณะบีบตัว วัดเป็นหน่วย มิลลิเมตรปรอท (mmHg) ซึ่งจะเท่ากับ ความดันหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary artery pressure, PAP) ในกรณีที่ไม่มี การตีบตันของระบบไหลเวียนโลหิตออกจากห้องหัวใจฝั่งขวา (right ventricular outflow tract obstruction)
3. การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular remodeling) ที่เกิดจากภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงต่อเนื่องเป็นเวลานาน โดยการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของความดันห้องหัวใจฝั่งขวาล่างขณะบีบตัว (RVSP) และการประเมินการเปลี่ยนทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด และการเปลี่ยนแปลงของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.9 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในสัตว์ทดลอง (Experimental study in animal model, randomized placebo-controlled trial)

1.10 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทราบถึงความสัมพันธ์และกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของผู้ป่วยความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงจาก OSA ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอดผ่านกลไกใดบ้าง และเหมือนกับกลไกการเกิดโรคในกลุ่มโรคความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงจากสาเหตุอื่นหรือไม่

2. ทราบถึงกลไกออกฤทธิ์ของยา imatinib ในการป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular remodeling) ว่าสามารถออกฤทธิ์ผ่านทางกลไกการส่งสัญญาณผ่าน PDGFR หรือไม่
3. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อในมนุษย์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอดในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัย OSA

1.11 ข้อจำกัดในงานวิจัย

1. การบริหารการจัดการยาในสัตว์ทดลองเป็นสิ่งที่ผู้วิจัยไม่เคยทำมาก่อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการฝึกฝนเพื่อให้เกิดความชำนาญก่อนเริ่มการศึกษาดังนั้น
2. ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นข้อมูล ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (cross sectional study) ดังนั้นแล้วอาจมีผลการศึกษาไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่าปัจจัยใดเกิดขึ้นก่อนหรือหลัง
3. การทำการทดลองในสัตว์ทดลอง โดยการให้ยาและวัดความเปลี่ยนแปลงของห้องหัวใจฝิ่งขวา ดังนั้นแล้วผลการศึกษาจึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในมนุษย์ได้โดยตรง เป็นเพียงแนวทางในการนำไปศึกษาต่อและทำการทดลองในมนุษย์ต่อไป
4. การสร้าง chronic intermittent hypoxic model ซึ่งใช้ในการทดลองนี้ไม่ได้จำลองการเกิดภาวะหยุดหายใจขณะนอนหลับได้ทั้งหมดเนื่องจากไม่มีการตรวจติดตามค่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และไม่สามารถจำลองการหยุดหายใจในสัตว์ทดลองได้ แต่เป็นแบบจำลองที่เป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างกว้างขวาง รวมทั้งไม่สามารถจำลองพยาธิสภาพที่เกิดในคนไข้ OSA ได้ทั้งหมด
5. การทำการทดลองในหนูแรท ไม่สามารถวัดค่าความเปลี่ยนแปลงของ hemodynamic study ในหนูแรทตัวเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบก่อนและหลังให้ยาได้ เนื่องจากจะเป็นการทำการุณกรรมสัตว์ การทดลองจึงออกแบบให้หนูแรทกลุ่มที่อยู่ในสภาพแวดล้อมปกติเป็นกลุ่มควบคุม (control) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นก่อนการให้ยา (baseline hemodynamic study)

1.12 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการแก้ไข

1. เนื่องจากการศึกษาในสัตว์ทดลองเป็นสิ่งที่ผู้วิจัยไม่เคยทำมาก่อน อาจมีข้อผิดพลาดในการบริหารยา การทำหัตถการกับสัตว์ทดลอง ซึ่งวิธีการแก้ไข คือการฝึกฝนให้มีความชำนาญก่อนการปฏิบัติจริง ภายใต้คำดูแลและคำแนะนำจากผู้เชี่ยวชาญในการทำวิจัยสัตว์ทดลอง
2. ระหว่างทำการศึกษาอาจมีปัญหาเรื่องสภาพแวดล้อมและการดูแลสัตว์ทดลองซึ่งอาจทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิต หรือ การไม่สามารถควบคุมสภาวะขาดออกซิเจนจากระบบการจ่ายก๊าซมีปัญหาได้ วิธีการแก้ปัญหาคือ การหมั่นดูแลสัตว์ทดลองและให้อาหารอย่างถูกวิธีและตรวจสอบแบบจำลองและอุปกรณ์การควบคุมการจ่ายก๊าซอย่างสม่ำเสมอ

1.13 วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ติดต่อประสานงานศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อจัดเตรียมหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ใช้ในการศึกษาเพื่อให้ได้เพศ อายุ และน้ำหนักที่ต้องการ
2. ติดต่อประสานงานกับศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อจัดเตรียมสถานที่และการให้อาหารสำหรับการเลี้ยงหนูแรทที่จะนำมาศึกษาทดลอง และประสานงานกับบริษัทเอกชนในการจัดส่งก๊าซที่จะนำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองหนูแรท chronic intermittent hypoxia
3. ติดต่อประสานงานกับอาจารย์ในภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกี่ยวกับการเก็บข้อมูลและการเตรียมอุปกรณ์ในการสร้างแบบจำลองหนูทดลอง chronic intermittent hypoxia และการฝึกการวัดค่าความดันหลอดเลือดแดงปอด (RVSP) และการวัดความดันหลอดเลือดแดง
4. ติดต่อประสานงานกับ ฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เพื่อจัดซื้อยา imatinib เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง
5. ติดต่อประสานงานกับเจ้าหน้าที่และอาจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา เกี่ยวกับการเก็บข้อมูลทางพยาธิวิทยาของสัตว์ทดลองหลังจากการรุกรณขนาด เพื่อการจัดเตรียมวิธีการเก็บชิ้นเนื้อ

, การย้อมพิเศษเพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและการ
หน้าตัวของหัวใจ

6. ประชุมชี้แจงรายละเอียดของการศึกษาทดลองและวัตถุประสงค์และวิธีการทำการ
ทดลองให้แก่ผู้ร่วมงานและผู้ประสานงานแต่ละภาควิชา และสรุปอภิปรายการศึกษา
ร่วมกันหลังเสร็จสิ้นการทดลอง
7. ติดต่อประสานงานกับเจ้าหน้าที่ ศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อขอเข้า
รับการอบรมการใช้สัตว์เพื่อการวิจัย ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ก่อนทำการศึกษาทดลองจริง
8. ทดลองในห้องปฏิบัติการการสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia โดย
เจ้าหน้าที่ ศูนย์สัตว์ทดลอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจะเป็นผู้นำหนูแรทเข้าสู่กรงระบบ
ปิด ที่มีการกำหนดสภาวะของออกซิเจน ให้มีระดับ 10 เปอร์เซ็นต์สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์
ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกันนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลาทั้งหมด 28 วัน ในช่วง
เวลากลางวัน และให้ยา imatinib หรือ ยาหลอก คือ normal saline solution (NSS)
ผ่านทางปาก (oral gavage) ด้วยตนเอง ตามกลุ่มการทดลอง
9. หลังจากหนูแรทได้ถูกการจัดแบ่งกลุ่มโดยวิธีการสุ่มและเข้าสู่สภาวะการขาดออกซิเจน
แบบต่อเนื่องเรื้อรังจนครบ 28 วันแล้ว ผู้ทำวิจัยจะทำการชั่งน้ำหนัก สังเกตพฤติกรรม
ของหนูแรท
10. ทำการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ ภายหลังจากให้ยาสลบหนูแรทที่ต้องการจะศึกษา
ผู้วิจัยจะทำการสอดสายสวนหลอดเลือดทาง femoral artery เพื่อวัดความดันโลหิต
ขณะทำการศึกษา และใช้เข็มฉีดยาขนาด 24 นิ้ว ด้วยวิธี subxiphoid approach แล้ว
ต่อเข้ากับเครื่องวัดค่า เพื่อวัดค่าความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ ค่าความดัน
หลอดเลือดแดงปอดซึ่งวัดเป็นค่า RVSP โดยมีการฝึกฝนให้ชำนาญก่อนการศึกษา
จริง ภายใต้การดูแลแนะนำของอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญจาก ภาควิชาสรีรวิทยา จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย
11. ทำการดูดเลือดจาก femoral artery เพื่อส่งตรวจหาค่าก๊าซในหลอดเลือดแดง ก่อนทำ
การทดสอบทางระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study)

12. ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา (histopathological study) เมื่อทำการศึกษาหนูแรทที่ผ่านการใส่สายสวนหลอดเลือดและวัดค่าความดันหลอดเลือดแดงปอดเรียบร้อยแล้ว ทำการการุณยฆาตโดยการให้ยาสลบเกินขนาด และทำการเก็บชิ้นเนื้อเยื่อหัวใจและปอดแช่น้ำยาฟอร์มาลินและส่งตรวจต่อทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา เพื่อให้ผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยาศึกษาและย้อมพิเศษต่อไป
13. ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ platelet derived growth factor receptor (PDGFR phosphorylation) จากเนื้อเยื่อปอด
14. เก็บรวบรวมข้อมูลต่างๆเพื่อนำมาแปลผลการศึกษา
15. สรุปลงการศึกษาและเตรียมนำเสนอผลการศึกษาต่อไป



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1. แนวคิดและทฤษฎี

ภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูง (pulmonary hypertension) ที่เกิดจาก ภาวะหยุดหายใจขณะนอนหลับ เกิดขึ้นจากการหนาตัวของหลอดเลือดแดงปอดซึ่งเป็นผลตามมาจาก สภาวะการขาดออกซิเจนอย่างต่อเนื่องเรื้อรังที่เกิดระหว่างการหยุดหายใจแต่ละครั้งระหว่างการนอนหลับ ซึ่งสภาวะการขาดออกซิเจนนี้ทำให้มีการส่งสัญญาณผ่านกลไกระดับเซลล์มากมาย ซึ่งยังไม่มี การศึกษาใน pulmonary hypertension จากสาเหตุนี้ ดังนั้นแล้วการศึกษาผลของยา imatinib ที่ออกฤทธิ์ต่อกลไกการส่งสัญญาณผ่าน PDGFR อาจสามารถอธิบายพยาธิกำเนิดของการ เกิด pulmonary hypertension จากภาวะหยุดหายใจขณะนอนหลับได้

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง จากการศึกษาของ Kohtarō Abe และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 พบว่ายา tyrosine Kinase Inhibitors ได้แก่ อิมาทินิบ (imatinib) โซราฟินิบ (sorafenib) และ นิโลทีนิบ (nilotinib) ซึ่งศึกษาในหนูแรทที่ได้รับสาร vascular endothelial growth factor receptor blockade และอยู่ในสภาวะขาดก๊าซออกซิเจน (chronic hypoxia) เป็น เวลา 3 อาทิตย์ สามารถลดค่าความต้านทานหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular resistance, PVR) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีผลต่อความดันของห้องหัวใจฝั่งซ้ายน้อย¹⁴ และ การศึกษาของ Edward A. Pankey และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 พบว่ายา imatinib ขนาด 50 มิลลิกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal, IP) ในแบบจำลองหนูแรทที่ได้รับสาร monocrotaline (monocrotaline-induced pulmonary hypertension) สามารถลดความดันหลอดเลือดแดงปอด (Pulmonary arterial pressure, PAP) ภาวะห้องหัวใจฝั่งขวาโต (right ventricular hypertrophy, RVH) และ การเปลี่ยนของหลอดเลือดแดงปอด (small pulmonary vessel remodeling) ได้อย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ และยังได้ทำการศึกษาในหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดก๊าซออกซิเจนแบบฉับพลัน (10% O₂-90% N₂ gas mixture) พบว่ายา imatinib ฉีดเข้าหลอดเลือดยังสามารถลด PAP ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ¹⁵

จากการศึกษาในปี ค.ศ. 2015 ของ Satoshi Akagi และคณะที่ทำการศึกษาในหนูแรท monocrotaline-induced PAH โดยใช้ยา imatinib ที่ทำให้อยู่ในขนาดอนุภาคนาโน (nanoparticle) ให้อาผ่านทางหลอดเลือดของหนูแรท พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างเยื่อผนังหลอดเลือดปอดและยังมีผลต่อเนื้อเยื่อหลังจากการหยุดให้ยา imatinib และสามารถลดความดันของห้องหัวใจฝั่งขวา (right ventricular systolic pressure, RVSP) จาก 61.8 ± 6.3 มิลลิเมตรปรอท เหลือ 38.6 ± 12.5 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถป้องกันการเกิดการหนาตัวของห้องหัวใจฝั่งขวาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม¹⁰

การศึกษาทดลองส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในแบบจำลองหนูแรทที่มีภาวะ pulmonary hypertension แต่จากผลการศึกษาที่พบว่ายา Imatinib สามารถลด PAP และ PVR ได้จริง การทดสอบประสิทธิภาพของยา Imatinib เริ่มต้นจากการทดลองให้ยา Imatinib ในผู้ป่วย 61 ปี ซึ่งได้รับการวินิจฉัย idiopathic pulmonary arterial hypertension ซึ่งได้รับยาหลายชนิดเพื่อรักษาภาวะ pulmonary hypertension ได้แก่ endothelin receptor antagonist, phosphodiesterase inhibitor และ prostacycline analogues พบว่าหลังจากที่ให้ยา imatinib สามารถเพิ่มความสามารถในการออกกำลังกาย (exercise capacity) วัดจากการให้ผู้ป่วยเดินต่อเนื่องเป็นเวลา 6 นาที (6-minute walk distance, 6MWD) เพิ่มจาก 260 เมตร เป็น 383 เมตร และสามารถลดค่า PVR จาก 1538 ไคน์/วินาที/ซม⁵ เป็น 835 ไคน์/วินาที/ซม⁵ และเพิ่มค่าดัชนีการบีบตัวของห้องหัวใจฝั่งซ้าย (cardiac index) จาก 1.36 ลิตรต่อนาที เป็น 2.33 ลิตรต่อนาที¹⁶ ซึ่งจากกรณีศึกษาผู้ป่วย 1 รายที่พิสูจน์ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของยา Imatinib จึงเริ่มมีการศึกษาวิจัยในมนุษย์ (clinical trial) ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 Hossein A. Ghofrani และคณะ ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของยา Imatinib ในมนุษย์ ซึ่งเป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้าด้วยวิธีสุ่ม ในผู้ป่วย pulmonary arterial hypertension จำนวน 42 ราย เป็นเวลานาน 24 สัปดาห์ ได้รับยา imatinib 400 มิลลิกรัมต่อวัน ผลการศึกษาพบว่ายา imatinib สามารถลดค่า PVR ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับยาหลอก 300 ± 347 ไคน์/วินาที/ซม⁵ และ 78 ± 269 ไคน์/วินาที/ซม⁵ ($P < 0.01$) และเพิ่มการบีบตัวของห้องหัวใจฝั่งซ้าย (cardiac output) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับยาหลอก (10.6 ± 1.2 L/min และ 20.1 ± 0.9 L/min, $P = 0.02$)¹⁷ และในปี ค.ศ. 2013 Hoepfer และคณะ ได้ทำการศึกษาไปข้างหน้าแบบสุ่ม ซึ่งมีจำนวนประชากรที่ได้รับการวินิจฉัย pulmonary arterial hypertension ที่มีอาการ (WHO functional class II-IV) ที่เข้าร่วมการศึกษาจาก 14 ประเทศ (multicenter, double-blinded randomized control trial) ทำการศึกษาผลของยา imatinib 400 มิลลิกรัมต่อวัน เพื่อเป็นยา add-on therapy นาน 24 สัปดาห์ พบว่าทั้งผลระยะสั้นและการศึกษาติดตามผู้ป่วยไปในระยะยาว สามารถเพิ่ม 6MWD ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถเดินได้ไกลมากขึ้น 32 เมตร (95%CI 12-52, $p = 0.002$) และค่า PVR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติคิดเป็น 379 ไตน์/วินาที/ชม⁵ (95% CI 255-502, $p < 0.001$) ส่วนอัตราการเสียชีวิต (mortality rate) ระยะเวลาจนถึงจุดที่อาการแย่ลง (time to clinical worsening) และความสามารถในการทำกิจกรรม (functional class) ไม่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่ม¹² จากการศึกษาขนาดใหญ่เป็นการศึกษาที่แสดงได้ว่ายา imatinib มีประสิทธิผลในการลดความดันหลอดเลือดแดงปอดและสามารถเพิ่ม exercise capacity ในผู้ป่วย pulmonary arterial hypertension ได้

อย่างไรก็ตามการศึกษาที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในแบบจำลองหนูแรท pulmonary arterial hypertension รวมทั้งการศึกษาในมนุษย์ก็เน้นไปในกลุ่มประชากรที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น pulmonary arterial hypertension แต่การศึกษาในแบบจำลองหนูแรทของ pulmonary hypertension ที่เกิดจากกลุ่มโรคปอดและโรคที่เกิดจากการนอนหลับ ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่ผู้ทำวิจัยสนใจ ยังมีจำกัด ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ในปี ค.ศ. 2010 Gambaryan และคณะ ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการให้ยา imatinib ทางปาก ในหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดก๊าซออกซิเจนอย่างต่อเนื่อง (chronic normobaric hypoxia) เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ พบว่าสามารถลดค่า RVSP ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ยา และพบว่า c-kit+/FceR1a-/tryptase- cells ในผนังหลอดเลือดของหนูแรท chronic normobaric hypoxia ที่ได้ยา Imatinib ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ยา¹⁸

ในปี ค.ศ. 2013 Ciucan และคณะ ได้ทำการศึกษาทดลองในหนูแรท chronic normobaric hypoxia เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และการให้สาร SU-5416 เพื่อทำให้เกิดภาวะ pulmonary hypertension และศึกษาความสัมพันธ์ของการส่งสัญญาณผ่าน PDGFR (PDGFR signaling) และการแสดงออกของ tryptophan hydroxylase-1 (TPH1 expression) ผลการศึกษาพบว่า การให้ยา imatinib สามารถทำให้ค่า RVSP ลดลงไปสู่ปกติ และพบความสัมพันธ์ระหว่างการออกฤทธิ์ผ่าน PDGFR และการลดลงของ TPH1 expression (down regulation of TPH1 expression)¹⁹

จากการศึกษารวมรวมหลักฐานทางวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบว่ายา Imatinib สามารถใช้เป็นยารักษา add-on therapy ในกลุ่มคนไข้ PAH ที่ได้รับยามาหลายชนิดและอาการยังไม่ดีขึ้น ซึ่งมีหลักฐานทั้งจากการศึกษาในสัตว์ทดลองและมนุษย์ ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มอื่น โดยเฉพาะในกลุ่ม pulmonary hypertension ที่เกิดจากความผิดปกติจากการนอนหลับ ยังไม่พบการศึกษาของกลุ่มนี้ในสัตว์ทดลอง โดยเป็นที่ทราบแล้วว่าในการแบ่งกลุ่มผู้ป่วย pulmonary hypertension ออกเป็นกลุ่มต่างๆเนื่องจากมีประโยชน์การตอบสนองต่อยาและพยาธิกำเนิดที่แตกต่างกันไป ดังนั้นแล้วจึงเป็นที่มาของการศึกษา ยา imatinib ในแบบจำลองหนูแรทที่จำลองการเกิด pulmonary hypertension จากโรคที่เกี่ยวข้องกับการนอนหลับ โดยทำให้หนูทดลองเกิดสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะ

ปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง (chronic intermittent hypoxia) และศึกษาผลของยา imatinib ต่อการเปลี่ยนแปลงทางความดันของห้องหัวใจฝั่งขวา และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือด และการหนาตัวของห้องหัวใจฝั่งขวา ซึ่งผลของการศึกษาอาจมีประโยชน์ในการศึกษาพยาธีกำเนิดของโรคกลุ่มนี้ว่ากลไกการเกิด pulmonary hypertension ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณผ่านกลไก PDGFR หรือไม่ เพื่อใช้ต่อยอดการศึกษาในมนุษย์ต่อไป



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1. รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในสัตว์ทดลอง

(Experimental study in animal model, randomized placebo-controlled trial)

3.2. ระเบียบการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา

หนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดลที่ถูกสุ่มตามจำนวนขนาดตัวอย่างจากการคำนวณ

เกณฑ์ในการคัดเลือกประชากรเข้าการศึกษา

หนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา

ไม่มี

เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง

หนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Sprague Dawley อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยหนูแรททุกตัวจะถูกเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกันเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้คุ้นเคยกับสถานที่และสภาพแวดล้อม ก่อนเริ่มการศึกษา หลังจากนั้น กลุ่มหนูแรท Sprague Dawley อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 25 ตัวจะถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว โดยวิธีการสุ่มแบบ blocked randomization โดยสร้างกรงจำลองเพื่อจำลองสภาวะกลางวัน 8 ชั่วโมงและกลางคืน 16 ชั่วโมง ส่วนหนูแรทในกลุ่มปกติจะถูกเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมปกติ

3.3. การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากไม่มีการศึกษาในอดีตของยา imatinib ต่อการลดความดันของห้องหัวใจฝืดขวาของแบบจำลองหนูแรทที่มีสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง (chronic intermittent hypoxia) การคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบผลของยา Imatinib จึงอ้างอิงตามผลการศึกษาจากแบบจำลองหนูแรทที่มีสภาวะขาดออกซิเจนแบบเรื้อรัง (chronic hypoxia) คำนวณได้จาก

$$N/\text{group} = \frac{2(\sigma_1^2 + \sigma_2^2) \times \sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

จากการศึกษาของ Schermuly และคณะ²⁰ พบว่ายา Imatinib สามารถลดค่าความดันหลอดเลือดแดงปอดซึ่งวัดจากค่า RVSP ในหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเรื้อรัง โดยสามารถลด RVSP จาก 32 มิลลิเมตรปรอท เหลือ 24 มิลลิเมตรปรอท (\bar{X}_1 แทน ค่าเฉลี่ยความดันหลอดเลือดแดงปอด โดย $\bar{X}_1 = 32$, $\bar{X}_2 = 24$)

และกำหนด $\alpha = 0.05$ (two-tailed), $\beta = 0.2$ (power = 0.8)

$$\text{คำนวณ } \sigma = 5 \text{ จากสูตร } \sigma^2 = \frac{(\sigma_1^2 - 1)\sigma_1^2 + (\sigma_2^2 - 1)\sigma_2^2}{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2 - 2)}$$

ได้ผลลัพธ์เท่ากับ 5 ตัวต่อกลุ่ม

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาผลของยา imatinib ในแบบจำลอง chronic intermittent hypoxic rat model มาก่อน จึงมีการทำการศึกษานำร่อง (pilot study) โดยสุ่มหนูมาจำนวน 3 ตัวต่อกลุ่มและนำผลการศึกษามาคำนวณยืนยันขนาดของตัวอย่างอีกครั้ง

หนูแรทในกลุ่มปกติ จะนำมาศึกษาความดันหลอดเลือดแดงปอด เพื่อยืนยันว่าหนูแรทจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ไม่มีความผิดปกติของระบบโครงสร้างของหัวใจและหลอดเลือดก่อนเข้าการศึกษา

3.4. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. แบบบันทึกข้อมูลการวิจัย

2. เครื่องมือสำหรับการสร้างแบบจำลองของ chronic intermittent hypoxia ซึ่งประกอบด้วยระบบการตัดจ่ายก๊าซทุกๆ 30 วินาที และเครื่องอัดจ่ายก๊าซ (gas compressor) ถังก๊าซ (gas cylinder)
3. เครื่องวิเคราะห์ระดับก๊าซในเลือด (gas analyser)
4. เครื่องมือสำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต โดย TSD 104A blood pressure transducer and Biopac System
5. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการแสดงค่าของระบบไหลเวียนโลหิต ได้แก่ ความดันหลอดเลือดและความถี่ของการเต้นของหัวใจ โดย Biopac system, MP 100, AcqKnowledge Software version 3.4
6. เครื่องมือในการนำสลบและยาสลบ pentobarbital sodium สำหรับการใช้นำสลบและการุณยฆาต
7. อุปกรณ์ในห้องทดลองเพื่อทำหัตถการกับสัตว์ทดลองในการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิตและการเก็บส่งตรวจทางพยาธิวิทยา
8. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บส่งตรวจเพื่อเก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อปอดและหัวใจสำหรับการศึกษาในระดับโมเลกุล
9. อุปกรณ์ในห้องทดลองสำหรับการตรวจ western blot analysis ซึ่งใช้น้ำยา western blot analysis ในการตรวจ anti-phospho (Tyr 751) PDGFR β และ anti-PDGFR β . จาก Cell Signaling Technology Inc.
10. เครื่องวิเคราะห์ระดับก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas analysis)
11. เครื่องมือสำหรับการชั่งน้ำหนักหนูแรทระหว่างการศึกษาและเครื่องมือสำหรับชั่งน้ำหนักหัวใจหนูที่มีความละเอียด 4 จุดทศนิยม
12. กล้องจุลทรรศน์ในการศึกษาทางพยาธิวิทยา

3.5. การเก็บรวบรวมข้อมูล

การเก็บและบันทึกข้อมูลทำโดยผู้วิจัยทั้งหมด ซึ่งข้อมูลได้มาจากภาควิชาสรีรวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา และห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ Chulalongkorn system biology คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. เตรียมหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. ทำการสุ่มหนูแรทออกเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลองจะทำการศึกษาต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 28 วัน ส่วนหนูแรทที่อยู่ในสภาพแวดล้อมปกติ จะทำการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิตก่อนเป็นลำดับแรก ดังนี้
 - a. กลุ่มที่ 1 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในสภาพแวดล้อมปกติ (normal rat)
 - b. กลุ่มที่ 2 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลองที่มีปริมาณก๊าซออกซิเจนปกติ และได้รับน้ำเกลือทางปาก (imatinib-untreated normoxia-group; N-C group)
 - c. กลุ่มที่ 3 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลองที่มีปริมาณก๊าซออกซิเจนปกติ และได้รับยา imatinib ทางปาก (imatinib-treated normoxia-group; N-Im group)
 - d. กลุ่มที่ 4 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลองที่มีสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง และได้รับน้ำเกลือทางปาก (imatinib-untreated CIH-group; CIH-C group)
 - e. กลุ่มที่ 5 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลองที่มีสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง และได้รับยา imatinib ทางปาก (imatinib-treated CIH-group; CIH-Im group)
3. เตรียมอุปกรณ์การสร้างแบบจำลองที่มีสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง (chronic intermittent hypoxia) ซึ่งเป็นระบบปอดซึ่งถูกควบคุมให้มีการตัดจ่ายก๊าซทุกๆ 30 วินาที ซึ่งจ่ายก๊าซสลับระหว่าง ก๊าซที่มีปริมาณออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ และ ก๊าซที่มีปริมาณออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งควบคุมโดยระบบการตัดจ่าย

ก๊าซ ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ระดับก๊าซ (gas analyser) ก่อนการศึกษาจริง ซึ่งระหว่างนี้จะมีการควบคุมแสงให้มืดเพื่อจำลองภาวะการหยุดหายใจขณะนอนหลับ

4. ให้ยา imatinib ทางปาก (oral gavage) โดยใช้อุปกรณ์ในการ gavage ยาให้กับหนูแรท ขนาดยา imatinib 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ในเวลาเดียวกันทุกวันต่อเนื่องกัน 28 วัน และให้น้ำเกลือ (normal saline) ในกลุ่มควบคุมด้วยสัดส่วนปริมาณที่เท่ากัน และติดตามชั่งน้ำหนัก สังเกตอาการและพฤติกรรมทั่วไปของหนูแรทระหว่างทำการศึกษาทุกวัน

5. หลังจากทำการศึกษาครบ 28 วัน ทำการเก็บข้อมูลของหนูแรทพร้อมกัน ในวันที่ 29 ของการวิจัย ซึ่งการเก็บข้อมูลจะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือการเก็บข้อมูลระบบไหลเวียนโลหิตทั้งหมด ก่อนการการุณยฆาต และการเก็บเนื้อเยื่อหัวใจและปอดสำหรับส่งตรวจต่อไป

5.1 การเก็บข้อมูลระบบไหลเวียนโลหิตก่อนการการุณยฆาต

a. การเก็บตัวอย่างเลือดจาก femoral artery หลังการใส่สายวัดความดัน หลอดเลือดแดงตำแหน่ง femoral artery เพื่อทำการตรวจก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas)

b. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study) โดยใช้ pentobarbital sodium ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ฉีดผ่านทางช่องท้อง (intraperitoneal route) เพื่อนำสลับ และบันทึกติดตามความดันโลหิต ตลอดการศึกษาจากสายสวนที่ใส่ใน femoral artery และบันทึกความดันหลอดเลือดแดง ปอด (right ventricular systolic pressure; RVSP) โดยใช้วิธี subxiphoid approach ด้วย เข็มฉีดยาขนาด 24 นิ้ว ซึ่งทั้งสายสวนหลอดเลือด femoral artery และเข็มฉีดยา จะถูกต่อเข้ากับระบบอ่านกราฟและความดันอัตโนมัติเข้ากับคอมพิวเตอร์ โดยผู้วิจัยไม่ทราบว่าเป็นหนูแรทที่ทำการศึกษาอยู่ในกลุ่มใด (blinded)

c. หลังเสร็จสิ้นการศึกษาทางระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study) ผู้วิจัยจะทำการการุณยฆาตด้วยยา pentobarbital sodium 100 มิลลิกรัมต่อ

น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ผ่านทางสายสวนหลอดเลือด femoral artery จนหัวใจหยุดเต้น จึงทำการเก็บเนื้อเยื่อส่งตรวจต่อไป

5.2. การเก็บข้อมูลหลังการการุณยฆาต

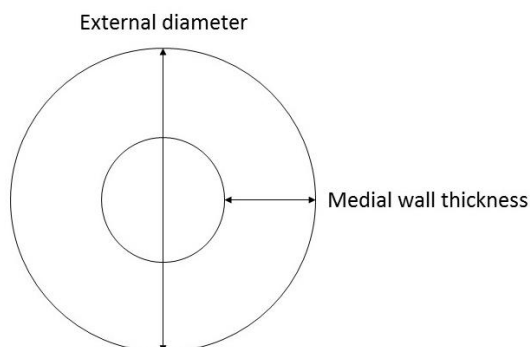
a. ผู้วิจัยจะทำการเก็บเนื้อเยื่อหัวใจและปอดเพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา (histopathological study) ต่อไป ซึ่งผู้อ่านผลจะกระทำโดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเพียงคนเดียวและไม่ทราบว่เนื้อที่ถูกส่งไปเป็นหนูแรทในกลุ่มใดของการวิจัย (blinded) ซึ่งอ่านผลทางพยาธิวิทยาตามข้อกำหนด ดังนี้

ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) โดยประเมินจากเปอร์เซ็นต์การหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอดที่มีขนาด 50-100 ไมครอน โดยอาศัยวิธีการย้อมสี hematoxylin และ eosin (percentage of medial wall thickness of pulmonary arteriole) โดยนับจำนวนเส้นเลือดอย่างน้อย 20 เส้น แล้วเข้าสู่สูตรดังนี้

$$\% \text{ of medial wall thickness of pulmonary arteriole} = \frac{2 \times \text{medial wall thickness}^*}{\text{external diameter}^{**}} \times 100$$

* Medial wall thickness คือ ความหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด

** External diameter คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดแดงปอด



แผนภูมิที่ 2 แสดงวิธีการวัดความหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอดในการศึกษาทางพยาธิวิทยา

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการหนาตัวของผนังห้องหัวใจห้องขวา (right ventricular hypertrophy) โดยคำนวณจากอัตราส่วนของน้ำหนักของห้องหัวใจห้องล่างขวาเทียบกับผลรวมของน้ำหนักของห้องหัวใจห้องล่างซ้ายรวมผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสองห้อง (ratio of right ventricle weight and left ventricle weight + septal weight)

$$\text{Cardiac remodeling index} = \frac{\text{Right ventricular free wall weight (g)*}}{\text{Left ventricular plus septal weight (g)**}}$$

* Right ventricular free wall weight คือ น้ำหนักของห้องหัวใจห้องล่างขวาที่ตัดแยกออกจากผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายและผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจทั้งสอง หน่วยเป็น กรัม

**Left ventricular plus septal weight คือ น้ำหนักของห้องหัวใจห้องล่างซ้ายรวมกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจทั้งสอง หน่วยเป็น กรัม

b. ผู้วิจัยจะทำการเก็บสุ่มเก็บเนื้อเยื่อปอดจากกลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib และ กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง เพื่อนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ PDGFR phosphorylation โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดมาทำ western blot ต่อไปโดยดำเนินการในห้องปฏิบัติการโดยผู้วิจัยเอง ซึ่งการเก็บเนื้อเยื่อปอดจะทำการล้างด้วยสาร

phosphate buffer saline ก่อนทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพของโปรตีน หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาทำ western blot ต่อไป โดยใช้ antibody สำหรับ phosphorylated-PDGFR (Tyr751) และ PDGFR-Beta (total) และนำมาหาค่าอัตราส่วนของการเกิด phosphorylation ที่ PDGFR ตำแหน่ง Tyr 751 เทียบกับปริมาณ PDGFR-Beta ทั้งหมด โดยการวัดการเรืองแสงภายใต้วิธี chemiluminescence immunoassay

6. เก็บรวบรวมข้อมูลและทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากการศึกษา
7. สรุปผลที่ได้จากการศึกษาและนำเสนอข้อมูลจากการศึกษา

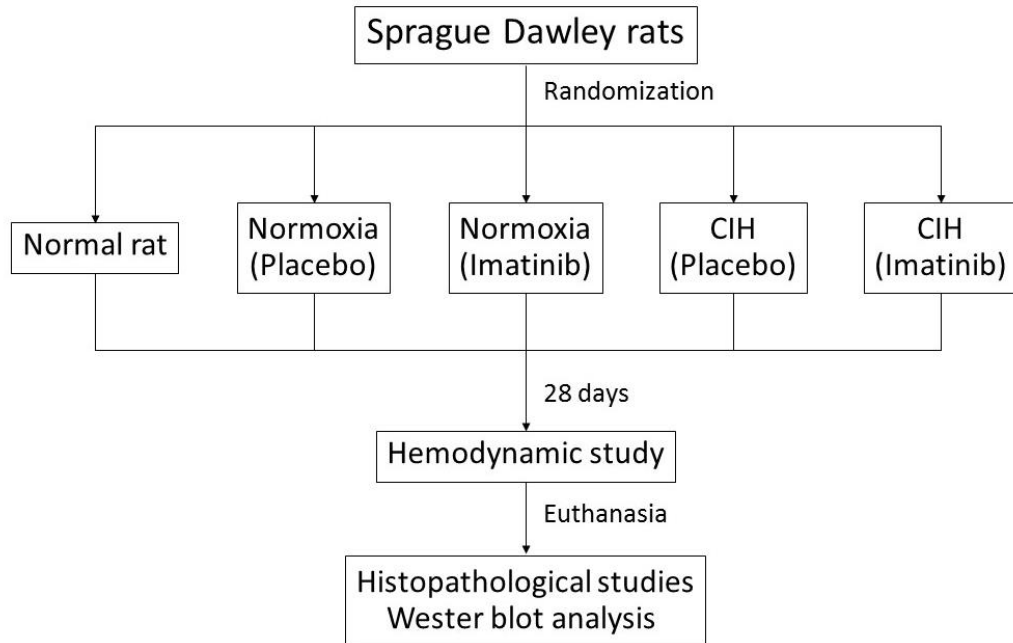
3.6. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจากการศึกษาใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 21.0 โดยใช้วิธีการทางสถิติ ดังนี้

1. สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive studies) ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ยเลขคณิตและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean \pm 2SD) เพื่อแสดงข้อมูลที่มีลักษณะของข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data) ได้แก่ ค่าน้ำหนักตัว ค่าการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต ค่าการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพหลอดเลือดแดง และการหนาตัวของผนังห้องหัวใจฝั่งขวาล่าง และผลของการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วน phosphorylated PDGFR (Tyr751) ต่อ PDGFR-Beta และผลค่าก๊าซในหลอดเลือดแดง (arterial blood gas)
2. สถิติเชิงอนุมาน (Inferential statistics) ใช้ในการพิสูจน์สมมติฐาน โดยใช้ one-way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบหาข้อมูลหลายกลุ่มที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับนัยสำคัญ p-value น้อยกว่า 0.05 และใช้สถิติโดยวิธี independent sample T-test ในการเปรียบเทียบระหว่างความแตกต่างของค่าตัวแปรค่าเดียวระหว่างกลุ่ม โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ p-value น้อยกว่า 0.05 (one-tailed)



แผนภูมิที่ 3 แสดงแผนภูมิการดำเนินการวิจัยและการแบ่งกลุ่มหนูแรท (consort diagram)



ภาพที่ 1 แสดงสถานที่ในการใช้เลี้ยงหนูแรทตลอด 28 วัน



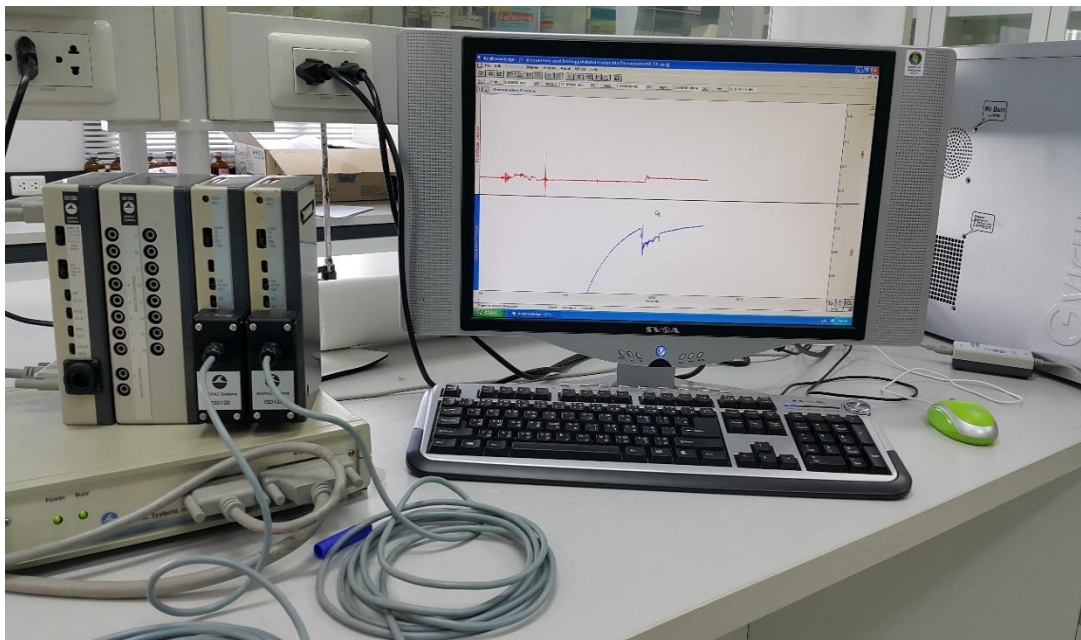
ภาพที่ 2 แสดงเครื่องการตัดจ่ายก๊าซเพื่อจำลองสภาวะ *chronic intermittent hypoxia* และ อุปกรณ์ที่ใช้ในแบบจำลองทั้งหมดที่อยู่ในกลุ่ม *chronic intermittent hypoxia* และ *normoxia*



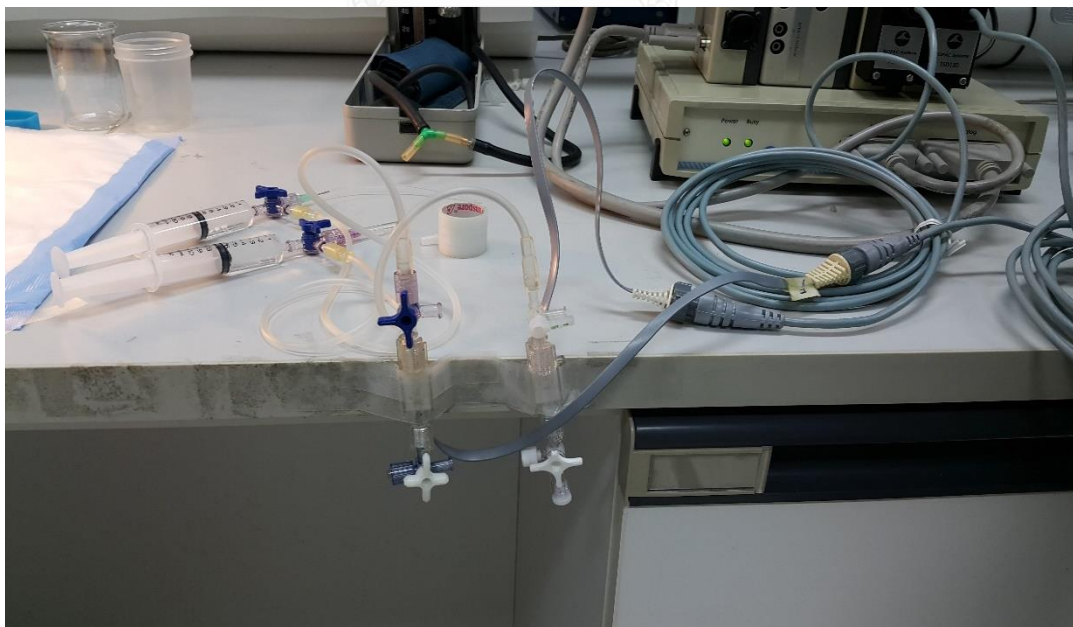
ภาพที่ 3 แสดงเครื่องการอัดจ่ายก๊าซให้กับแบบจำลอง *chronic intermittent hypoxia*



ภาพที่ 4 แสดงเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิตซึ่งต่อกับ TSD 104A blood pressure transducer and Biopac System



ภาพที่ 5 แสดงการเตรียมเครื่องมือเพื่อต่อกับ TSD 104A blood pressure transducer and Biopac System



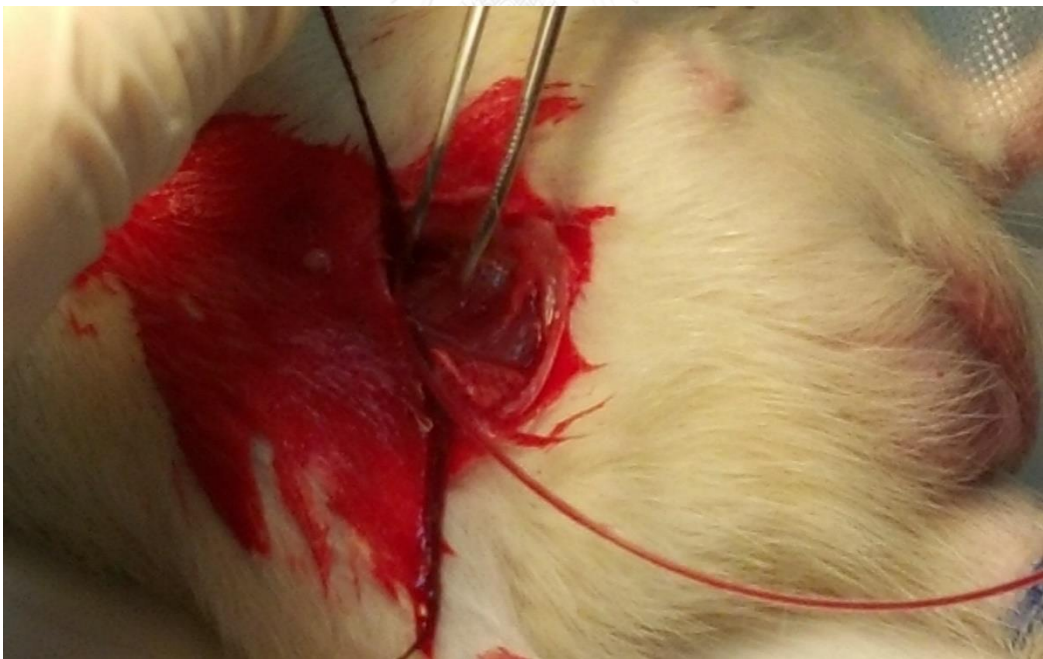
ภาพที่ 6 แสดงการเตรียมเครื่องมือก่อนการศึกษาทางระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic studies)



ภาพที่ 7 แสดงการตัดขนบริเวณขาหนีบของหนูแรทเพื่อทำการสอดสายสวนเข้าหลอดเลือดแดง



ภาพที่ 8 แสดงการสอดสายเข้าหลอดเลือดแดงที่บริเวณขาหนีบของหนูแรทเพื่อวัดความดันโลหิตระหว่างการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิต



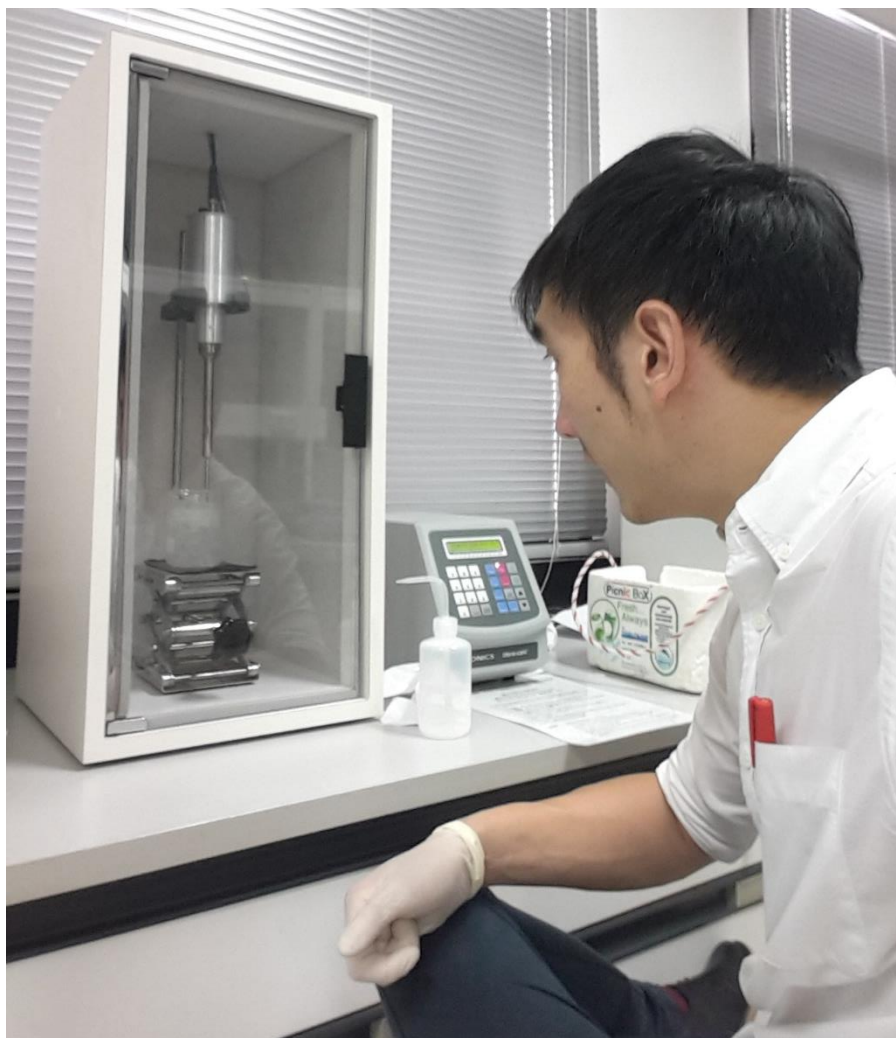
ภาพที่ 9 แสดงการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิตเพื่อวัดค่าความดันหลอดเลือดแดงปอด โดยใช้วิธี subxiphoid approach



ภาพที่ 10 แสดงการทำการุณยฆาตโดยใช้ยา pentobarbital จนกระทั่งไม่มีสัญญาณชีพจากสายสวนหลอดเลือดแดง



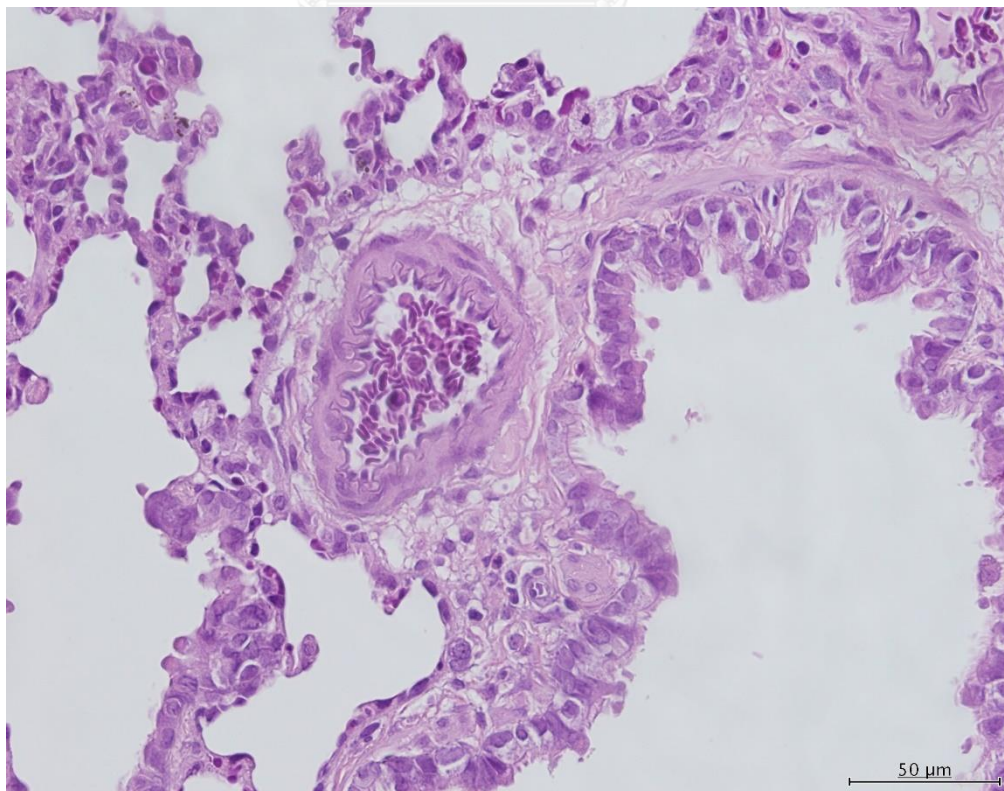
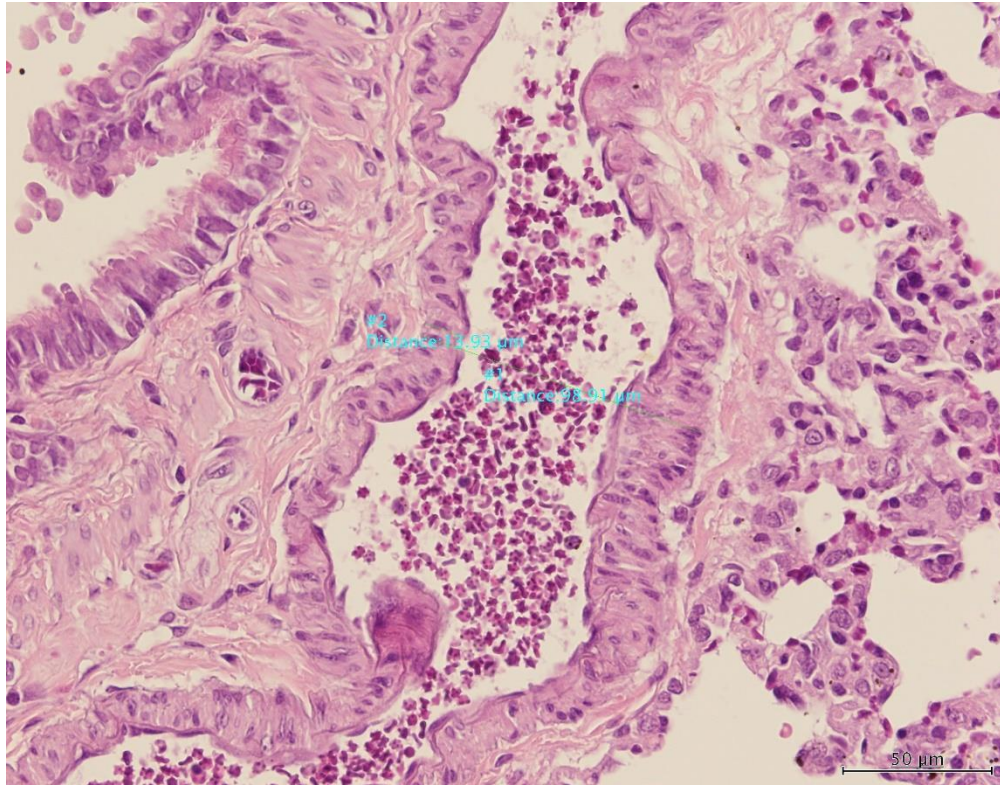
ภาพที่ 11 แสดงการปั่นเนื้อเยื่อปอดเพื่อเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการศึกษา western blot



ภาพที่ 12 แสดงการศึกษา western blot จากชิ้นเนื้อตัวอย่างจากเนื้อเยื่อปอดหนูแรท



ภาพที่ 13 แสดงการตรวจทางพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ของหลอดเลือดแดงปอดขนาด 50-100 ไมครอน



บทที่ 4

การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา

ในการศึกษานี้ ประชากรที่ใช้ศึกษาเป็นหนูแรท สายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 25 ตัว ซึ่งได้รับการเลี้ยงดูที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยผู้วิจัยได้ผ่านการอบรมการใช้สัตว์ทดลองเพื่อการศึกษาวิจัยจาก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การศึกษาวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee, CU-AUC) ตามเลขที่ใบรับรอง 007/2559

4.2 ผลการวิเคราะห์

หนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 25 ตัว ถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว โดยกลุ่มแรก (normal rat) มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย (259 ± 12.4 กรัม) ซึ่งนำมาศึกษาระบบไหลเวียนโลหิต เพื่อพิสูจน์ว่าหนูแรทที่นำมาใช้ในการศึกษา ไม่มีความผิดปกติของระบบไหลเวียนโลหิตและทางพยาธิวิทยา โดยผลการศึกษาในระบบไหลเวียนโลหิต พบว่า ค่าความดันหลอดเลือดแดงปอด โดยวัดเป็นค่าความดันห้องหัวใจฝั่งขวาล่าง (right ventricular systolic pressure; RVSP) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.6 ± 1.14 มิลลิเมตรปรอท และมีค่าความดันโลหิตเฉลี่ย เท่ากับ 101.34 ± 2.19 มิลลิเมตรปรอท ค่าเฉลี่ยของอัตราการเต้นของหัวใจเท่ากับ 398 ± 14.83 ครั้งต่อนาที

การตรวจทางพยาธิวิทยาพบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนัง หลอดเลือดแดงปอดเท่ากับ 25.6 ± 1.51 เปอร์เซ็นต์ และค่าการหนาตัวของผนังหัวใจห้องขวาล่าง มีอัตราส่วนเท่ากับ 0.19 ± 0.01

หนูแรททั้งหมด 20 ตัว สามารถอยู่จนจบการศึกษาตลอด 28 วัน โดยค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว แรกก่อนเข้าการศึกษา ในกลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib (349.4 ± 36.6 กรัม), กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา imatinib (318.2 ± 10.2 กรัม), กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib (316.8 ± 9.5 กรัม), กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib (331 ± 35.6 กรัม) ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.221) หลังจากทีหนูแรททั้ง 4 กลุ่มเริ่มการศึกษา ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูแรทในกลุ่ม normoxia ทั้งที่ ได้รับยาและไม่ได้รับยา imatinib มีแนวโน้ม เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มหนูแรท CIH ทั้งที่ ได้รับยาและไม่ได้รับยา imatinib โดยเมื่อดำเนินการศึกษานาน 14 วัน ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา imatinib, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib และ กลุ่มหนู แรท CIH ที่ได้รับยา imatinib มีค่าเท่ากับ 435 ± 41 กรัม 384.6 ± 25.8 กรัม 331 ± 22.5 กรัม และ 352 ± 21 กรัม ตามลำดับ

เมื่อดำเนินการศึกษาครบ 28 วัน หนูแรททุกกลุ่ม มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ดังนี้ กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib มีค่าเท่ากับ 471.8 ± 49.3 กรัม กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ ได้รับยา imatinib มีค่าเท่ากับ 429.4 ± 31.7 กรัม กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib มีค่า เท่ากับ 369.8 ± 40.6 กรัม กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib มีค่าเท่ากับ 392.2 ± 26.3 กรัม

4.2.1 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต

- ค่าความดันหลอดเลือดแดงปอด โดยวัดเป็น right ventricular systolic pressure พบว่า กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib และ กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา imatinib มี ค่าไม่แตกต่างกัน เท่ากับ 18.26 ± 1.97 มิลลิเมตรปรอท และ 18.67 ± 0.91 มิลลิเมตรปรอท

ตามลำดับ ส่วนกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 48.38 +/- 5.84 มิลลิเมตรปรอท และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 38.77 +/- 2.17 มิลลิเมตรปรอท

- ค่าความดันโลหิต (arterial blood pressure) พบว่า กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยความดันโลหิตสูงที่สุด เท่ากับ 110.6 +/- 11.86 มิลลิเมตรปรอท หนูแรท 3 กลุ่มที่เหลือมีค่าใกล้เคียงกัน ได้แก่ กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 94.2 +/- 3.96 มิลลิเมตรปรอท กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 97 +/- 5.38 มิลลิเมตรปรอท และ กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 94 +/- 1 มิลลิเมตรปรอท

- ค่าอัตราการเต้นของหัวใจ พบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ทั้งที่ได้รับยา imatinib และไม่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยของอัตราการเต้นของหัวใจที่สูงกว่า ได้แก่ 427 +/- 27 ครั้งต่อนาที และ 376 +/- 15 ครั้งต่อนาที ตามลำดับ ส่วนหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา imatinib และไม่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยของอัตราการเต้นของหัวใจเท่ากับ 360 +/- 26 ครั้งต่อนาที และ 356 +/- 9 ครั้งต่อนาที ตามลำดับ

4.2.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจ

- ความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular remodeling index) กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา imatinib และไม่ได้รับยา imatinib มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอดเท่ากับ 24.4 +/- 3.36 เปอร์เซ็นต์ และ 23 +/- 4.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ค่า p value เท่ากับ 0.576) ส่วนกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib และได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยที่สูงกว่ากลุ่ม normoxia ได้แก่ 32 เปอร์เซ็นต์ และ 27.6 +/- 3.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

- การเปลี่ยนแปลงของการหนาตัวของผนังห้องหัวใจข้างขวา (right ventricular hypertrophy) โดยวัดจากค่า cardiac remodeling index ตามสูตรการคำนวณอ้างอิงจากบทที่ 3 พบว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา

imatinib กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib มีค่าเท่ากับ 0.17 ± 0.03 0.17 ± 0.01 0.2 ± 0.02 0.21 ± 0.02 ตามลำดับ

4.2.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการเกิด PDGFR Beta phosphorylation ของเนื้อเยื่อปอด

- ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของการเกิด phosphorylation ที่ PDGFR Beta ตำแหน่ง Tyr 751 เทียบกับปริมาณ PDGFR-Beta ทั้งหมด ในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib มีค่าเท่ากับ 0.193 ± 0.019 และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib มีค่าเท่ากับ 0.152 ± 0.049 ซึ่งแปลผลร่วมกับ ขึ้นเนื้อตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) และขึ้นเนื้อตัวอย่างควบคุมลบ (negative control)

4.2.4 ผลการศึกษาระดับก๊าซในเลือดแดง

- ค่าเฉลี่ยระดับก๊าซออกซิเจนในเลือดแดง (PaO₂) กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib และได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยของก๊าซออกซิเจนในเลือดแดงเท่ากับ 81 ± 6.24 มิลลิเมตรปรอท และ 75.6 ± 5.32 มิลลิเมตรปรอท ตามลำดับ ส่วนหนูแรทกลุ่ม normoxia ที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 78.15 ± 5.57 มิลลิเมตรปรอทและ 74.1 ± 8.63 มิลลิเมตรปรอทตามลำดับ

- ค่าเฉลี่ยระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในเลือดแดง (PaCO₂) กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib และได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยของก๊าซออกซิเจนในเลือดแดงเท่ากับ 42.34 ± 5.80 มิลลิเมตรปรอทและ 41.1 ± 6.23 มิลลิเมตรปรอท ตามลำดับ ส่วนหนูแรทกลุ่ม normoxia ที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา imatinib มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39.5 ± 4.40 มิลลิเมตรปรอทและ 39.6 ± 2.12 มิลลิเมตรปรอท ตามลำดับ

4.3 ผลการเปรียบเทียบ

ผลการศึกษาเปรียบเทียบในหนูแรททั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา imatinib กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib จำแนกตามผลการศึกษา เป็นดังนี้

4.3.1 ค่าความดันหลอดเลือดแดงปอด (right ventricular systolic pressure)

พบว่ากลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา imatinib และไม่ได้รับยา imatinib มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.68) ส่วนกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib มีค่าความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib (ค่า p-value เท่ากับ 0.001) และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib มีค่าความดันหลอดเลือดแดงปอดต่ำกว่ากลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.009)

4.3.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ความเปลี่ยนแปลงของการหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด

พบว่ากลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib มีเปอร์เซ็นต์การหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอดมากกว่ากลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib และได้รับยา imatinib อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.001) และเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มหนูแรท CIH ทั้งสองกลุ่มพบว่า หนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา imatinib มีเปอร์เซ็นต์การหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอดน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยา imatinib อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.019) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูแรท normoxia ทั้งกลุ่มที่ได้รับยา imatinib และไม่ได้รับยา imatinib ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.576)

4.3.3 ค่าการเปลี่ยนแปลงของการหนาตัวของผนังห้องห้องหัวใจล่างขวา (right ventricular hypertrophy)

จากการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูแรททั้ง 4 กลุ่มโดยใช้วิธี one-way anova พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกันระหว่างกลุ่ม (ค่า p-value เท่ากับ 0.023) แต่หากเปรียบเทียบ

ระหว่างกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib กับกลุ่ม normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.08) และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา imatinib ไม่ได้มีความแตกต่างกันทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงของการหนาดำของผนังห้องหัวใจล่างขวา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib (ค่า p-value เท่ากับ 0.847)

4.3.4 ค่าการเปลี่ยนแปลงของการเกิด PDGFR-Beta phosphorylation ของเนื้อเยื่อปอด

การศึกษา western blot ของเนื้อเยื่อปอด พบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib มีการเกิด phosphorylation เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อตัวอย่างที่มีผลควบคุมลบ และผลการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูแรท CIH ทั้งสองกลุ่มพบว่า กลุ่มที่ได้รับยา imatinib มีแนวโน้มการเกิด PDGFR-Beta phosphorylation น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยา imatinib แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.26)

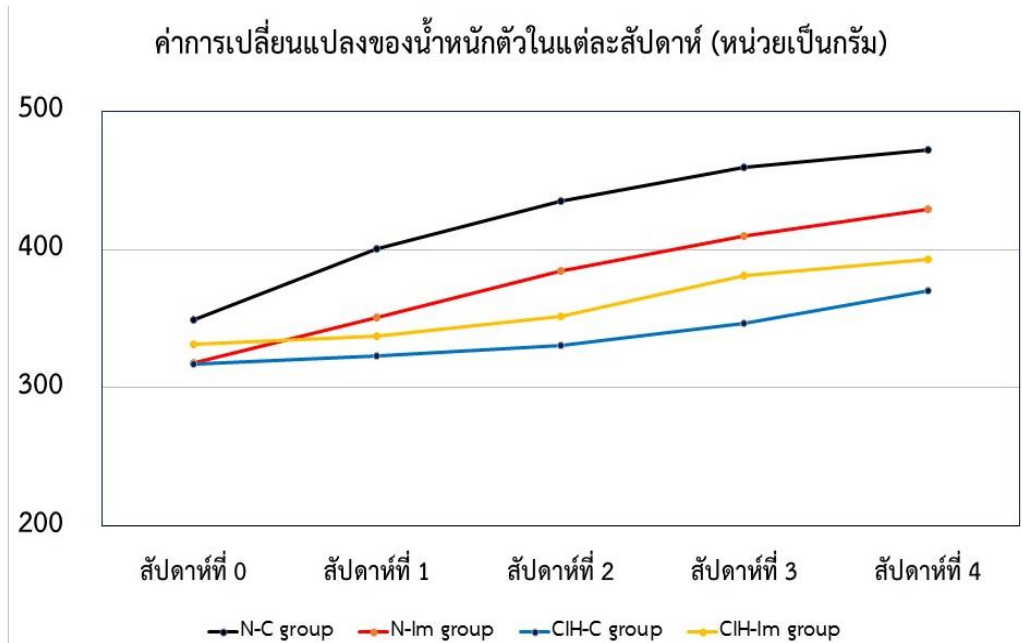
ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของหนูแรทกลุ่มตัวอย่างอายุ 8 สัปดาห์

การศึกษา	ผลการศึกษา
ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูแรท	259±12.4 กรัม
การศึกษาทางระบบไหลเวียนโลหิต <ul style="list-style-type: none"> - Right ventricular systolic pressure - Heart rate - Systemic blood pressure 	17.6±1.14 มิลลิเมตรปรอท 398±14.83 ครั้งต่อนาที 101±2.19 มิลลิเมตรปรอท
ความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในหลอดเลือดแดงปอด <ul style="list-style-type: none"> - Percentage thickness of medial hypertrophy 	25.6±1.51 %
ความหนาตัวของผนังกล้ามเนื้อในห้องหัวใจขวา <ul style="list-style-type: none"> - Ratio of RV/LV+S 	0.19±0.01

ตารางที่ 2 ตารางแสดงข้อมูลน้ำหนักตัวของหนูแรทจำแนกตามกลุ่ม ณ จุดเวลาต่างๆ

ค่าเฉลี่ย น้ำหนัก ตัว ณ จุดเวลา ต่างๆ (กรัม)	กลุ่ม normoxia ที่ ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม normoxia ที่ ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ ได้รับยา imatinib	P- value
สัปดาห์ ที่ 0	349.4±36.6	318.2±10.28	316.8±9.57	331.6±35.61	0.221
สัปดาห์ ที่ 1	400.8± 32.44	351±13.67	323±6.16	337±24.17	0.000
สัปดาห์ ที่ 2	435±41.03	384.6±25.83	331±22.56	352±21.05	0.000
สัปดาห์ ที่ 3	459.4±53.69	409.8±30.06	347±41.69	381.2±29.91	0.003
สัปดาห์ ที่ 4	471.8±49.37	429.4±31.75	369.8±40.62	392.8±26.35	0.003

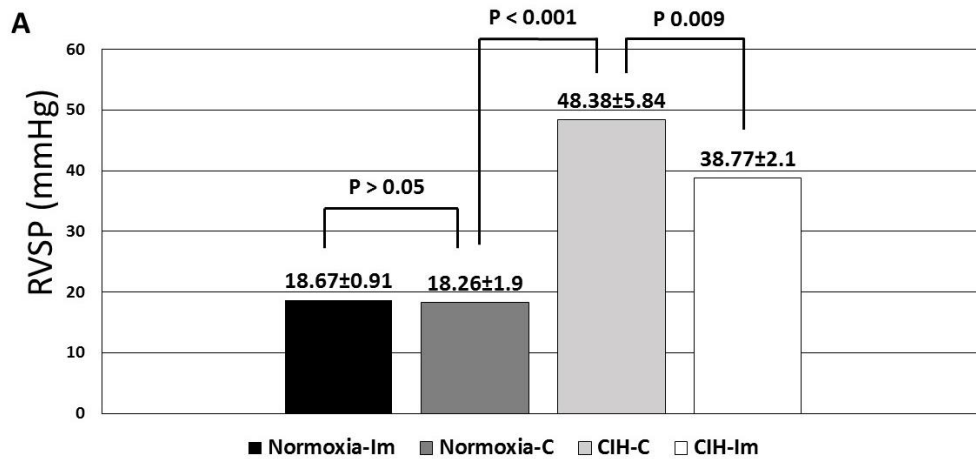
แผนภูมิที่ 4 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของหนูแรทจำแนกตามกลุ่ม ณ จุดเวลาหนึ่งๆ



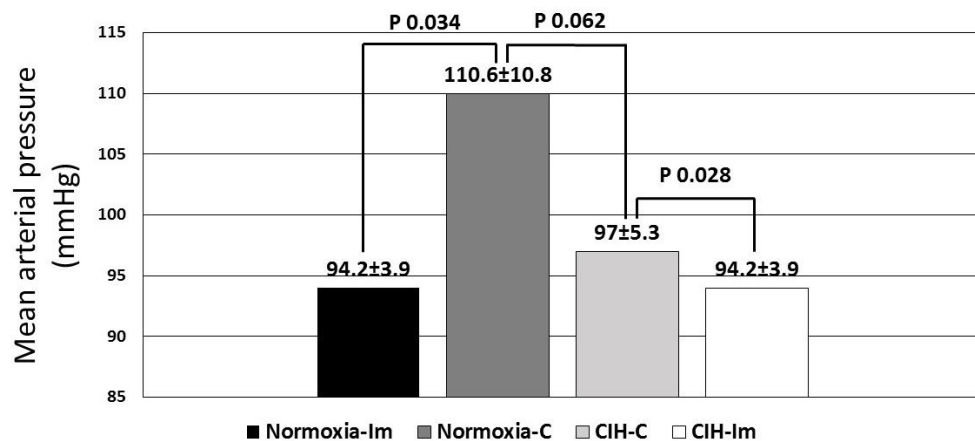
ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิตจำแนกตามกลุ่มหนูแรท (hemodynamic studies)

ค่าการศึกษา ระบบ ไหลเวียน โลหิต (mean +/- 2SD)	กลุ่ม normoxia ที่ ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม normoxia ที่ ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ ได้รับยา imatinib	P value
● ค่าเฉลี่ย ความดัน หลอดเลือด เลียดแดง (มิลลิเมตร ปรอท)	110.6±10.8	94.2±3.9	97.5.3	94.2±3.9	0.006
● ค่าเฉลี่ย อัตราการ เต้นของ หัวใจ (ครั้งต่อ นาที)	360±26.2	356±9.6	427±27	38±23	0.000
● ค่าเฉลี่ย ความดัน หลอดเลือด ปอด (มิลลิเมตร ปรอท)	18.26±1.97	18.67±0.91	48.38±5.84	38.77±2.17	0.000

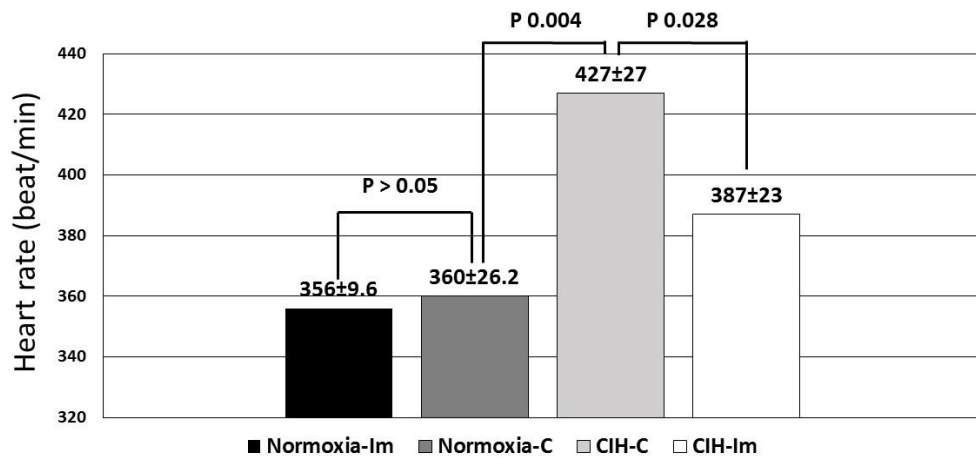
แผนภูมิที่ 5 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยความดันหลอดเลือดแดงปอดวัดโดย right ventricular systolic pressure (RVSP) จากการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic studies)



แผนภูมิที่ 6 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยความดันหลอดเลือดแดง (mean arterial pressure) จากการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic studies)



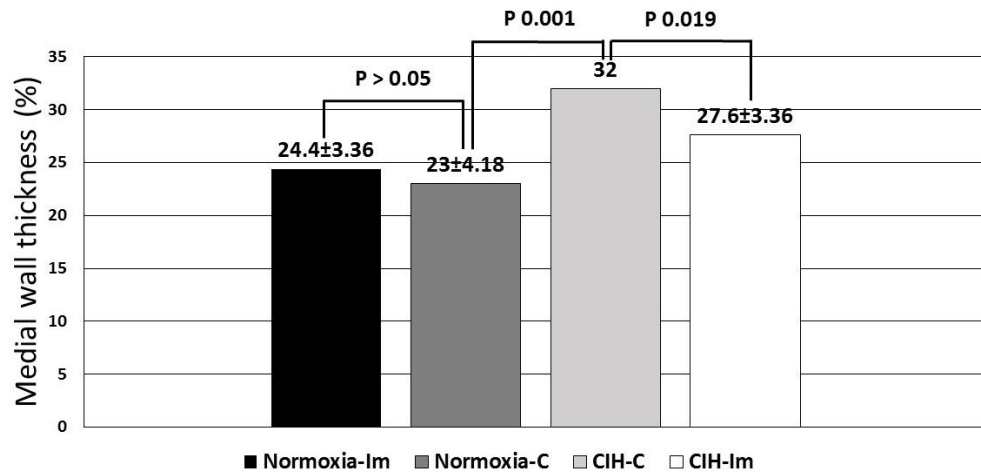
แผนภูมิที่ 7 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) จากการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic studies)



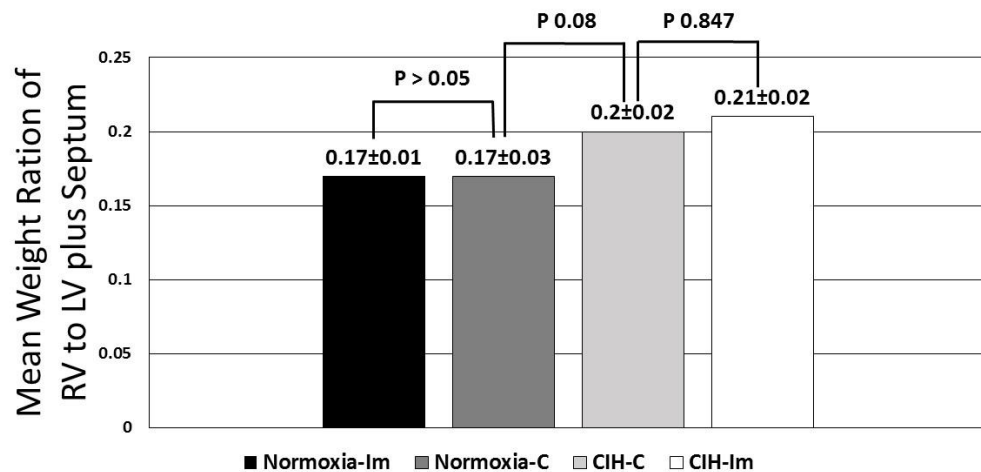
ตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาจำแนกตามกลุ่มหนูแรท (histopathological studies)

การศึกษาทางพยาธิวิทยา (mean +/- 2SD)	กลุ่ม normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม normoxia ที่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา imatinib	P value
● ค่าเฉลี่ยความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด (%)	24.4±3.36	23.4.18	32	27.6±3.36	0.002
● ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนน้ำหนักของหัวใจห้องขวา ล่างต่อน้ำหนักหัวใจห้องซ้าย ล่างรวมกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจ	0.17±0.03	0.17±0.01	0.2±0.02	0.21±0.02	0.023

แผนภูมิที่ 8 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด (medial wall thickness of pulmonary artery, diameter 50-100 micron)



แผนภูมิที่ 9 แสดงผลการศึกษาค่าเฉลี่ยความหนาของผนังกล้ามเนื้อของหัวใจห้องขวา (ratio of mean weight of right ventricle weight to left ventricle plus septum weight)



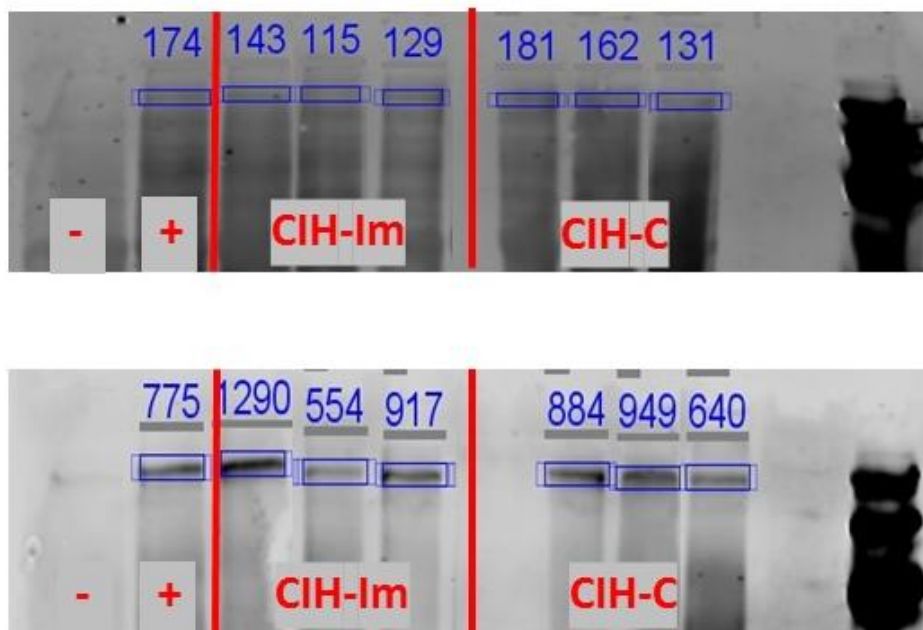
ตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษาการเกิด phosphorylation ของ PDGFR-Beta เทียบกับจำนวน PDGFR-Beta ทั้งหมดจำแนกตามกลุ่มหนูแรท

* P value เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib และกลุ่มหนูแรท CIH ที่

การศึกษาการเกิด phosphorylation ของ PDGFR-Beta (mean +/- 2SD)	กลุ่ม normoxia ที่ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา imatinib	P value*
Phospho-PDGFR-Beta/Total PDGFR-Beta	0.152±0.049	0.193±0.019	27.6±3.36	0.26

ได้รับยา imatinib

ภาพที่ 14 แสดงการตรวจทาง western blot เพื่อศึกษาการเกิด phosphorylation ของ PDGFR-Beta



ภาพที่ 15 แสดงผลการศึกษาค่าก๊าซในหลอดเลือดแดงจำแนกตามกลุ่มหนูแรท

การศึกษาค่าก๊าซในหลอดเลือดแดง (mean)	กลุ่ม normoxia ที่ ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม normoxia ที่ ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ ไม่ได้รับยา imatinib	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา imatinib
● ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด ต่าง	7.463 \pm 0.04	7.462 \pm 0.03	7.354 \pm 0.05	7.416 \pm 0.03
● ค่าเฉลี่ยก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ (มิลลิเมตรปรอท)	39.5 \pm 4.40	39.6 \pm 2.12	42.34 \pm 5.80	41.4 \pm 6.23
● ค่าเฉลี่ยก๊าซออกซิเจน (มิลลิเมตรปรอท)	78.15 \pm 5.57	74.1 \pm 8.63	81 \pm 6.24	75.6 \pm 5.32

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่า หนูแรทจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ไม่มีความผิดปกติของระบบไหลเวียนโลหิตโดยเฉพาะความดันหลอดเลือดแดงปอดรวมทั้งความผิดปกติของพยาธิสภาพของหลอดเลือดและห้องหัวใจฝั่งขวา เพื่อเป็นการยืนยันว่า ผลการศึกษาในหนูแรททั้ง 4 กลุ่มที่เหลือไม่ได้เกิดจากความผิดปกติของหนูแรทก่อนเข้าการศึกษา

แบบจำลองสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง (chronic intermittent hypoxia model, CIH) สามารถทำให้หนูแรทเกิดภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงได้ จากการเพิ่มขึ้นของความดันหลอดเลือดแดงปอดที่วัดโดย right ventricular systolic pressure อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลองที่มีก๊าซออกซิเจนปกติ (normoxia) นอกจากนั้นแล้ว การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดซึ่งมีการหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอดและการหนาตัวของกล้ามเนื้อห้องหัวใจฝั่งขวาล่างก็เป็นลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบในภาวะดังกล่าว

กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลอง CIH ที่ได้รับยา imatinib จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงขึ้นเช่นเดียวกัน แต่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลอง CIH ที่ไม่ได้รับยา imatinib อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมถึงผลทางพยาธิวิทยาที่มีความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอดที่น้อยกว่าเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าการให้ยา imatinib สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของความดันหลอดเลือดแดงปอดและสภาพทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดได้จริง ส่วนผลทางพยาธิวิทยาของห้องหัวใจฝั่งขวามีแนวโน้มที่จะเกิดการหนาตัวของผนังกล้ามเนื้อหัวใจ

ห้องล่างขวาในกลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลอง CIH แต่การหนาของผนังกล้ามเนื้อหัวใจดังกล่าวยังไม่พบความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลองที่มีก๊าซออกซิเจนปกติ (normoxia) รวมทั้งกลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลอง CIH การได้รับยา imatinib ก็พบความหนาตัวของผนังกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวาไม่แตกต่างกันในทั้งสองกลุ่ม

ผลการเปลี่ยนแปลงของการเกิด phosphorylation ของ PDGFR-Beta พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการเกิดกระบวนการดังกล่าวในกลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลอง CIH เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อตัวอย่างควบคุมลบ (negative control) และการให้ยา imatinib การเกิดกระบวนการ phosphorylation น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยา แต่ยังไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

5.2 อภิปรายผล

การศึกษาในอดีต พบความสัมพันธ์ของกลไกการส่งสัญญาณผ่านทาง PDGFR กับพยาธิกำเนิดของ pulmonary arterial hypertension และ chronic hypoxia ในสัตว์ทดลอง^{15,20} แต่เนื่องจากสมมติฐานที่ว่า พยาธิกำเนิดของภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงในแต่ละกลุ่มโรคอาจมีกลไกการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่แตกต่างกันออกไปตามพยาธิกำเนิด การศึกษานี้จึงถูกออกแบบขึ้นซึ่งเป็นการศึกษาแรกที่พิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างกลไกของการส่งสัญญาณผ่าน PDGFR กับการเกิดภาวะความดันหลอดเลือดแดงสูงจากสภาวะ chronic intermittent hypoxia โดยใช้ยา imatinib เพื่อออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งสัญญาณดังกล่าว และศึกษาว่ายาสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิตและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของระบบหัวใจและหลอดเลือดแดงปอดได้หรือไม่ ซึ่งผลการศึกษาพบว่า กลไกการส่งสัญญาณผ่าน PDGFR มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงในสภาวะ chronic intermittent hypoxia ตามผลการศึกษาที่กล่าวข้างต้น

ทั้งนี้ การศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของการเกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวา จึงอาจจะเป็นสาเหตุที่ไม่พบความแตกต่างของผลการศึกษาในกลุ่มหนูแรทที่อยู่ใน

แบบจำลอง CIH ทั้งที่ได้ยาและไม่ได้ยา imatinib เนื่องจากระยะเวลาของการศึกษาอาจไม่นานเพียงพอที่จะทำให้กล้ามเนื้อหัวใจห้องขวาล่างเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

การเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิตและทางพยาธิวิทยาจากการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ทำการดูเลือดจากหลอดเลือดแดงของหนูแรทเพื่อส่งตรวจค่าก๊าซ ซึ่งผลการศึกษาไม่พบการเพิ่มขึ้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia จึงเป็นการพิสูจน์ได้ว่า ความเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่เกิดขึ้นเกิดจากการขาดออกซิเจนของแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia และไม่ได้เกิดจากการคั่งของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (hypercapnia)

การศึกษาในแบบจำลองสัตว์ทดลองที่ใช้สาร monocrotaline เพื่อทำให้หนูเกิดภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูง (monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension) ของ Schermuly และคณะ พบว่าการให้ยา imatinib สามารถลดการเกิด phosphorylation ของ PDGFR-Beta ได้ และผลของการศึกษาในแบบจำลอง chronic hypoxia ก็เป็นไปในแนวทางเดียวกัน นอกจากนั้นแล้ว ยังมีการศึกษาของ Chen EY และคณะ²¹ ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ hypoxia และการส่งสัญญาณผ่านกลไก PDGFR ดังนั้นการศึกษานี้จึงออกแบบเพื่อตรวจการส่งสัญญาณผ่าน PDGFR ว่าผลของการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิตและพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อปอดและหัวใจ เป็นจากกลไกการยับยั้งของยา imatinib หรือไม่ และผลการศึกษพบว่ามีการเกิด phosphorylation ของ PDGFR-Beta ลดลง แต่ยังไม่พบความแตกต่างทางสถิติ คำอธิบายของผลการศึกษานี้ อาจเกิดได้เนื่องจากยา imatinib ที่นำมาศึกษาเป็น Tyrosine kinase inhibitors ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งสัญญาณได้หลากหลายกลไก ได้แก่ BCR-ABL, c-kit และ PDGFR-Beta ดังนั้นแล้ว ผลของการศึกษานี้อาจมีความเกี่ยวข้องจากการยับยั้งการส่งสัญญาณผ่านกลไกอื่น ซึ่งหมายถึง อาจยังมีกลไกการส่งสัญญาณผ่านกลไกอื่นนอกเหนือจาก PDGFR-Beta ที่มีความเกี่ยวข้องพยาธิกำเนิดของภาวะความดันหลอดเลือดแดงปอดสูงจากสภาวะที่ผู้วิจัยต้องการศึกษาด้วย

แบบจำลอง chronic intermittent hypoxia ที่ผู้วิจัยออกแบบนั้นมีการควบคุมก๊าซออกซิเจนให้มีการสลับการจ่ายตามข้อกำหนดเบื้องต้นซึ่งสามารถจำลองสภาวะการขาดออกซิเจนเป็นช่วงของผู้ป่วยโรคหยุดหายใจขณะนอนหลับได้ แต่เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต

โดยเฉพาะหลอดเลือดแดงปอดทั้งทางกายภาพและพยาธิสภาพ อาจเกิดจากสาเหตุอื่นนอกเหนือจากการขาดออกซิเจนเป็นช่วง เช่น การเปลี่ยนแปลงของความดันในช่องอก หรือ การเปลี่ยนแปลงทางระบบประสาทอัตโนมัติที่เกิดระหว่างการหยุดหายใจตอนนอนหลับ ซึ่งแบบจำลองที่ออกแบบขึ้นมาไม่สามารถจำลองภาวะการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ทั้งหมด

5.3 ข้อเสนอแนะ

- การให้ยา imatinib ในการศึกษาคือการให้ยาทางปาก (oral gavage) เนื่องจากยาที่ใช้ในการศึกษาใช้ในรูปแบบเม็ดยา (tablet) และนำมาละลายน้ำ เนื่องจากข้อจำกัดที่ไม่สามารถเตรียมยาที่สามารถให้โดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดหรือช่องท้องได้ ดังนั้นแล้ว ปริมาณยาอาจมีปริมาณที่ไม่คงที่ในแต่ละรอบของการให้ยา และการให้ยาในบางครั้งที่หนูมีพฤติกรรมต่อต้านการระหว่างการให้ยา จึงอาจเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการวัดผลการศึกษาได้ วิธีการแก้ไข คือการเตรียมยาที่เป็นสารบริสุทธิ์ที่สามารถให้ทางหลอดเลือดดำหรือทางช่องท้องและสามารถกำหนดปริมาณยาที่ให้ในแต่ละครั้งได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

- การศึกษานี้ทำการตรวจการเกิด phosphorylation ของ PDGFR-Beta ซึ่งเป็นเพียงแค่หนึ่งในกลไกที่ยา imatinib ออกฤทธิ์ยับยั้งการส่งสัญญาณ ผลของการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia ที่ได้ยา imatinib อาจเกิดจากการยับยั้งผ่านกลไกอื่นนอกเหนือจากการส่งสัญญาณผ่าน PDGFR ดังนั้นแล้ว การตรวจหาระดับโมเลกุลของกลไกอื่นๆอาจทำให้มีความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของโรคมากขึ้น

- การตรวจในระดับโมเลกุล ในตำแหน่งการเกิด phosphorylation ของ PDGFR ในการศึกษานี้ได้มาจากการศึกษาในอดีต ซึ่งใช้ tyrosine residue ตำแหน่งที่ 751 ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การตรวจการเกิด phosphorylation ตำแหน่งอื่นอาจให้ผลที่แตกต่างกันออกไป

- ผลการศึกษาทางระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study) เป็นเพียงการศึกษาที่จุดสุดท้ายของการวิจัย ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการออกแบบงานวิจัย ที่ไม่สามารถตรวจการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการศึกษาได้ ดังนั้นแล้วมีปัจจัยหลากหลายที่มีผลต่อการศึกษานี้ โดยเฉพาะระหว่าง

การทำการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิต ซึ่งระดับสารน้ำในร่างกาย ภาวะการเสียเลือด หรือ การเกิด
การขยายตัวของหลอดเลือดจากยานำสลบ อาจมีผลต่อผลการศึกษาได้ทั้งสิ้น อาจจำเป็นต้องอาศัย
การตรวจที่ช่วยประเมินการทำงานของหัวใจชนิดอื่น เช่น การตรวจหัวใจด้วยคลื่นเสียงสะท้อนความถี่
สูง (echocardiography)



รายการอ้างอิง

1. Epstein LJ, Kristo D, Strollo PJ, Jr., et al. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine*. Jun 15 2009;5(3):263-276.
2. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. Dec 24 2013;62(25 Suppl):D34-41.
3. Adegunsoye A, Ramachandran S. Etiopathogenetic mechanisms of pulmonary hypertension in sleep-related breathing disorders. *Pulmonary medicine*. 2012;2012:273591.
4. Ip MS, Lam B, Chan LY, et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *American journal of respiratory and critical care medicine*. Dec 2000;162(6):2166-2171.
5. Bady E, Achkar A, Pascal S, Orvoen-Frija E, Laaban JP. Pulmonary arterial hypertension in patients with sleep apnoea syndrome. *Thorax*. Nov 2000;55(11):934-939.
6. Chaouat A, Weitzenblum E, Krieger J, Oswald M, Kessler R. Pulmonary hemodynamics in the obstructive sleep apnea syndrome. Results in 220 consecutive patients. *Chest*. Feb 1996;109(2):380-386.
7. Alchanatis M, Tourkohoriti G, Kakouros S, Kosmas E, Podaras S, Jordanoglou JB. Daytime pulmonary hypertension in patients with obstructive sleep apnea: the effect of continuous positive airway pressure on pulmonary hemodynamics. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2001;68(6):566-572.
8. Kholdani C, Fares WH, Mohsenin V. Pulmonary hypertension in obstructive sleep apnea: is it clinically significant? A critical analysis of the association and pathophysiology. *Pulmonary circulation*. Jun 2015;5(2):220-227.

9. Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, et al. Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *International journal of cardiology*. Aug 23 2012;159(2):100-106.
10. Akagi S, Nakamura K, Miura D, et al. Delivery of imatinib-incorporated nanoparticles into lungs suppresses the development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *International heart journal*. May 13 2015;56(3):354-359.
11. Speich R, Ulrich S, Domenighetti G, et al. Efficacy and Safety of Long-Term Imatinib Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2015;89(6):515-524.
12. Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, et al. Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation*. Mar 12 2013;127(10):1128-1138.
13. Olschewski H. Imatinib for Pulmonary Arterial Hypertension - Wonder Drug or Killer Drug? *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2015;89(6):513-514.
14. Abe K, Toba M, Alzoubi A, et al. Tyrosine kinase inhibitors are potent acute pulmonary vasodilators in rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. Oct 2011;45(4):804-808.
15. Pankey EA, Thammasiboon S, Lasker GF, Baber S, Lasky JA, Kadowitz PJ. Imatinib attenuates monocrotaline pulmonary hypertension and has potent vasodilator activity in pulmonary and systemic vascular beds in the rat. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. Nov 1 2013;305(9):H1288-1296.
16. Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. Sep 29 2005;353(13):1412-1413.
17. Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, et al. Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy.

- American journal of respiratory and critical care medicine*. Nov 1 2010;182(9):1171-1177.
18. Gambaryan N, Perros F, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Mazmanian GM, Humbert M. Imatinib inhibits bone marrow-derived c-kit⁺ cell mobilisation in hypoxic pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. Nov 2010;36(5):1209-1211.
 19. Ciucan L, Hussey MJ, Burton V, et al. Imatinib attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension pathology via reduction in 5-hydroxytryptamine through inhibition of tryptophan hydroxylase 1 expression. *American journal of respiratory and critical care medicine*. Jan 1 2013;187(1):78-89.
 20. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of clinical investigation*. Oct 2005;115(10):2811-2821.
 21. Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer research*. Mar 15 2001;61(6):2429-2433.

ภาคผนวก

การดูแลสัตว์ทดลอง (Animal care)

1. Husbandry consideration

1.1 Housing place: ตึกพยาบาลวิทยา ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 Experimental place: ตึกแพทยพัฒน์ ชั้น 9 ห้อง 911 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 Housing system: conventional housing system

1.4 Caging: Solid bottom, open top, size 36 x 75.5 x 18 cm

1.5 Number of animal per cage: 4

1.6 Environmental requirements: Temperature 23-25 °C, Humidity 55 ± 10°C, standard fluorescent light and standard light cycle

1.7 Food: Standard diet (ad libitum) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.8 Water: RO-UV (ad libitum)

1.9 Bedding/housing media: wood shavings

2. Attending veterinary care: standard veterinary care

3. Potential animal pain and distress assessment

3.1 Pain and Distress Classification: USDA Classification D

3.2 Clinical condition of animals be monitored everyday by investigator and staffs

3.3 Criteria use to assess pain, distress, or discomfort: inactivity, loss of appetite, loss of weight 20% of initial weight, restlessness, abnormal resting postures, somnolence or hunched posture, licking, biting, scratching, or shaking in particular area, unresponsiveness

4. Anesthesia: pentobarbital sodium 50 mg/kg body weight intraperitoneal route

Criteria use to assess level of anesthesia

- Respiration

- Toe pinch

- Tail pinch
- Corneal reflex
- Muscular relaxation

5. Surgery

5.1 Procedure: Non-survival, one time โดยการเก็บตัวอย่างเลือดและวัดความดัน
หลอดเลือดแดงปอดโดยใช้เข็มเจาะผ่านทรวงอก

5.2 Location/ room number for procedure: ตึกพยาธิวิทยาชั้น 3 ศูนย์สัตว์ทดลอง
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. Blood or body fluid withdraw/tissue collection/ injections, tail, clip, gavaging

6.1 Injection: Intraperitoneal route

6.2 Blood withdrawl: Anatomic location: pulmonary artery, frequency: one
time at the end of the study

6.3 Tissue collection: dead animal (heart and lung), frequency: one time at
the end of study

7. Euthanasia/disposition of animals

7.1 Disposal of animals after completion of activity: euthanasia ด้วย
pentobarbital sodium เกินขนาด

8. Experimental endpoint: early endpoint is used กรณีที่หนูได้รับความทรมานเกินกว่าจะ
ทนได้ อาจพิจารณาสิ้นสุดการทดลองก่อนได้

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นายนพพล นามสกุล ลีลาญวัฒน์กุล วัน เดือน ปี เกิด 28 พฤษภาคม พ.ศ. 2528

ประวัติการศึกษา

ระดับประถมศึกษาจนถึงมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเซนต์คาเบรียล ปี พ.ศ. 2535
- 2543

ระดับมัธยมปลาย โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา ปี พ.ศ. 2544 - 2546

ระดับปริญญาตรี คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2547 -
2552

แพทย์ประจำบ้านสาขาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2555-2557

แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาโรคระบบทางเดินหายใจและภาวะวิกฤตทางการ
หายใจ ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2558-2559

ประวัติการปฏิบัติงานหลังจบการศึกษา

ปี การศึกษา ๒๕๕๓ ปฏิบัติงานเป็นแพทย์เพิ่มพูนทักษะ ณ โรงพยาบาลสวรรค์
ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ และโรงพยาบาลหนองบัว จังหวัดนครสวรรค์

ปี การศึกษา ๒๕๕๔ - ๒๕๕๕ ปฏิบัติงานเป็น นแพทย์ใช้ทุน ณ โรงพยาบาลส่งเสริม
สุขภาพ ศูนย์อนามัยที่ ๘ จังหวัดนครสวรรค์

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุแพทย์แห่งประเทศไทย

สมาชิกสมาคมออร์เวซซ์แห่งประเทศไทย