การศึกษาผลของยาอีทาเนอร์เซ็บในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดันหลอดเลือดแดงปอดในหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง

นางสาวนิวัน กลิ่นงาม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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.

PREVENTIVE EFFECT OF ETANERCEPT ON PULMONARY ARTERIAL PRESSURE IN CHRONIC INTERMITTENT HYPOXIC RAT MODEL

Miss Niwan Klinngam

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาผลของยาอีทาเนอร์เซ็บในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดันหลอดเลือดแดงปอดในหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง
โดย	นางสาวนิวัน กลิ่นงาม
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมพล สงวนรังศิริกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมพล สงวนรังศิริกุล)

....กรรมการ

(อาจารย์ นายแพทย์ณัฐวุฒิ โตวนำชัย)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ กิตติพงศ์ มณีโชติสุวรรณ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นิวัน กลิ่นงาม : การศึกษาผลของยาอีทาเนอร์เซ็บในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดันหลอดเลือดแดงปอดในหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง. (PREVENTIVE EFFECT OF ETANERCEPT ON PULMONARY ARTERIAL PRESSURE IN CHRONIC INTERMITTENT HYPOXIC RAT MODEL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. นพ.ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. นพ.สมพล สงวนรังศิริกุล, 78 หน้า.

ที่มาของงานวิจัยนี้ จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาผลของยาอีทาเนอร์เซ็บต่อการเปลี่ยนแปลงระบบไหลเวียนโลหิต, การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการอักเสบ ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง ที่มีความใกล้เคียงกับการเกิดความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงจากภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับในคน

วิธีการศึกษา หนูแรทสายพันธุ์ Sparge Dawley จำนวน 30 ตัว ถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่มๆละ 6 ตัว เพื่อศึกษาผลของยาอีทาเนอร์เซ็บขนาด 0.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดใต้ชั้นผิวหนัง 2 ครั้งต่อสัปดาห์ ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องติดต่อกัน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 28 วันตลอดการศึกษา

ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรังมีการเปลี่ยนแปลงความดันหลอดเลือดแดงปอด, การเปลี่ยนแปลงหลอดเลือดแดงปอดขนาดกลางและการหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา, การเปลี่ยนแปลงระดับ TNF-α ในเลือดและในน้ำล้างเนื้อปอด ส่วนยาอีทาเนอร์เซบมีผลต่อการลดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงขนาดกลางและลดระดับ TNF-α ทั้งในเลือดและในน้ำล้างเนื้อปอด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผลการศึกษา ยาอีทาเนอร์เซ็บสามารถลด inflammatory factor คือ TNF-α แต่ไม่มีผลในการลดความดันหลอดเลือดปอด แสดงว่าการเกิดกระบวนการอักเสบไม่ใช่กลไกเดียวที่ทำให้เกิดความดันในเลือดแดงปอดสูงในภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นระหว่างนอนหลับ

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต ....
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....

5574138030 : MAJOR MEDICINE
KEYWORDS: ETANERCEPT / PULMONARY VASCULATURE / CHRONIC INTERMITTENT HYPOXIA / INFLAMMATION / TNF-α

NIWAN KLINNGAM: PREVENTIVE EFFECT OF ETANERCEPT ON PULMONARY ARTERIAL PRESSURE IN CHRONIC INTERMITTENT HYPOXIC RAT MODEL. ADVISOR: ASST. PROF. NATTAPONG JAIMCHARIYATAM, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMPOL SANGUANRUNGSIRIKUL, M.D., 78 pp.

Background This study aim to assess the hemodynamic and inflammatory responses to chronic intermittent hypoxia (CIH) and examine the morphologic and hemodynamic effects of etanercept, Anti-TNF, in an animal model of OSA/CIH induced pulmonary hypertension (PH)

Methods Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups(six rats in each group) including two normoxic-groups, two CIH-groups and one normal rat- group. Rats in CIH-groups were exposed to alternating cycles of normoxia for 8 h/day during the light phase for 28 days. Etanercept 0.4 mg/kg was given subcutaneously twice a week to one normoxic and one CIH-group.

Results In CIH-groups, studies revealed significant increase in mean pulmonary arterial pressure(mPAP), serum level of TNF-alpha and lung tissue suspension level of TNF-alpha. In etenercept-treated group, significant reduction in serum level of TNF-alpha and lung tissue suspension level of TNF-alpha.

Conclusions CIH induces inflammatory responses, increased mPAP, pulmonary vascular remodeling and RVH. Etanercept reduced inflammation, with no effect on hemodynamic and histopathological changes. In contrast to pulmonary arterial hypertension (PAH), inflammation appears not to be the important role in the development of OSA/CIH induced pulmonary hypertension(PH).

Department:	Medicine	Student's Signature	....
Field of Study:	Medicine	Advisor's Signature	....
Academic Year:	2013	Co-Advisor's Signature	....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุกๆท่านที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยครั้งนี้ ให้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

หน่วยโรคระบบทางเดินหายใจและภาวะวิกฤตทางการหายใจ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.นพ. ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ.พญ.เอกฤทัย สุวรรณนาคินทร์ ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำในทุกๆเรื่อง ฝึกฝน

และควบคุมการทำหัตถการอย่างใกล้ชิด

รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในเรื่องของอุปกรณ์ที่ใช้ใน

การศึกษาวิจัย

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ.นพ.สมพล สงวนรังศิริกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ.นพ.ปุณชวิษณ์ จันทรานุวัฒน์ ที่สละเวลาในการศึกษาเรื่องพยาธิวิทยาเป็นอย่างดี

ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.นพ.เจตทะนง แกล้วสงคราม ที่ให้ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการศึกษา inflammatory factors ต่างๆ

ดร. สุปราณี บูรณประดิษฐ์กุล ที่คอยช่วยเหลือในการเก็บชิ้นเนื้อ และการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นอย่างดี

สาขาวิชาโรคระบบการหายใจและวัณโรค ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ศ.นพ.กิตติพงศ์ มณีโชติสุวรรณ ที่ให้ข้อเสนอแนะและความคิดเห็นในการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกคนในศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความร่วมมือในการประสานงานกับหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง ให้ความร่วมมือเกี่ยวกับสถานที่ การเตรียมอุปกรณ์ และให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับสัตว์ทดลองเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์เรื่องเบิกจ่ายยา และการจัดเตรียมยาเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่มอบทุนทุนรัชดาภิเษกสมโภช เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ... จ
กิตติกรรมประกาศ ... ฉ
สารบัญ ... ช
บทที่ 1 ... 1
บทนำ ... 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ... 1
คำถามของการวิจัย ... 6
วัตถุประสงค์ของการวิจัย ... 7
สมมติฐาน ... 8
กรอบแนวความคิดในการวิจัย ... 8
ขอบเขตของการวิจัย ... 8
ข้อตกลงเบื้องต้น ... 10
ข้อจำกัดของการวิจัย ... 11
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย ... 12
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ... 12
วิธีการดำเนินการวิจัย ... 13
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย ... 15
บทที่ 2 ... 16
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ... 16
แนวคิดและทฤษฏี ... 16
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ... 16
บทที่ 3 ... 20
วิธีการดำเนินการวิจัย ... 20
ประชากร ... 20
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ... 21
การเก็บรวบรวมข้อมูล ... 22

หน้า

การวิเคราะห์ข้อมูล 26
บทที่ 4 36
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 36
ผลการวิเคราะห์ 36
ผลการเปรียบเทียบ 40
ผลการวิเคราะห์ปัจจัย 43
บทที่ 5 63
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 63
สรุปผลการวิจัย 63
อภิปรายผลการวิจัย 64
ข้อเสนอแนะ 67
รายการอ้างอิง 69
ภาคผนวก........ 73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 78

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

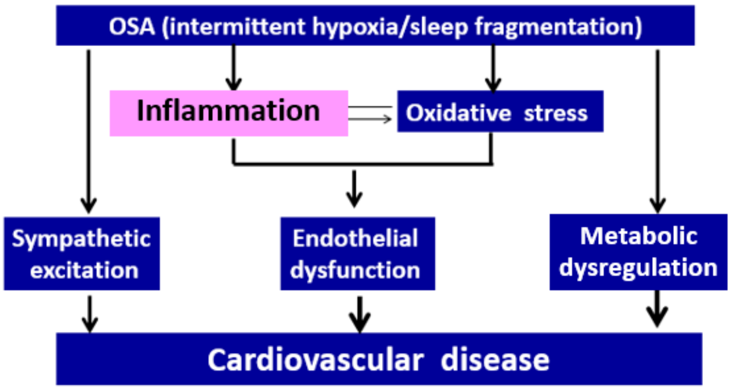
บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Obstructive sleep apnea (OSA) เป็นภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นระหว่างนอนหลับ พบได้ในผู้หญิงประมาณร้อยละ 9 และในผู้ชายมากถึงร้อยละ 24 [1] ภาวะทางเดินหายใจอุดกลั้นขณะนอนหลับส่งผลรบกวนคุณภาพการนอน รบกวนคุณภาพชีวิต และทำให้ผู้ป่วยมีอาการง่วงนอนในเวลากลางวัน นอกจากนั้นการที่มีทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับ ยังก่อให้เกิดภาวะ intermittent hypoxia ส่งผลให้หลอดเลือดเกิดภาวะ hypoxic vasoconstriction และเกิด hypoxic pulmonary hypertension ตามมา รวมทั้งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหัวใจและหลอดเลือด นำมาสู่การเกิดโรคของระบบหัวใจและหลอดเลือดต่างๆ เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด โรคอัมพฤตอัมพาต โรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ โรคหัวใจวายเรื้อรัง และเพิ่มอัตราการเสียชีวิตจาก cardiovascular complication [2-6] อีกด้วย

ในผู้ป่วย OSA ที่มีทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับ จะเกิดการอุดกั้นซ้ำๆ (repetitive) ของทางเดินหายใจส่วนบน มีอาการหายใจแผ่วเบา (hypopnea) และอาจเกิดร่วมกับการหยุดหายใจ (apnea) เป็นช่วงๆ ทำให้เกิดการขาดออกซิเจนสลับกับการได้รับออกซิเจนปกติ เกิดเป็นภาวะ chronic intermittent hypoxia (CIH) ซึ่งภาวะchronic intermittent hypoxia ดังกล่าวมีผลกระตุ้นระบบประสาทซิมพาทิติก (sympathetic nervous systems overactivity) ทำให้เกิดความดันโลหิตสูง, มีผลทำให้ reactive oxygen species (ROS) เพิ่มขึ้น เกิดการเพิ่มของ oxidative stress จนทำให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือด และภาวะ chronic intermittent hypoxia นี้ยังมีผลทำให้ vasoactive substances เช่น angiotensin II, endothelin-1 เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) นำไปสู่ความผิดปกติของ endothelium (endothelial dysfunction) และเกิด cardiovascular disease ตามมา[6-9]ดังแสดงในแผนผังที่ 1



แผนผังที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของ OSA กับการเกิดโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด

ภาวะ chronic intermittent hypoxia ในผู้ป่วย OSA นั้น นอกจากจะมีผลกระตุ้นระบบต่างๆดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีผลกระตุ้น pro-inflammatory pathway ทำให้เกิด systemic inflammation ผ่าน 2 กระบวนการ คือ

1) กระบวนการอักเสบ (inflammatory pathway) ผ่าน hypoxic-sensitive transcription factor nuclear factor (NF-kB)

2) กระบวนการปรับตัวต่อภาวะขาดออกซิเจน (adaptive pathway) ผ่าน hypoxic inducible factor-1 (HIF-1)[7, 8]

นอกจากจะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ transcription factor คือ NF-kB และ HIF-1 แล้ว intermittent hypoxia ยังมีผลต่อเนื่องทำให้มีการเพิ่มของ inflammatory cytokines ต่างๆ โดยเฉพาะ tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) , interleukin-8 (IL-8), C-reactive protein (CRP) ซึ่ง oxidative stress และ systemic inflammation ที่เกิดขึ้นนั้น เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิด endothelial dysfunction, เกิดการอักเสบของหลอดเลือดและเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดปอด (pulmonary vascular remodeling) จนนำไปสู่ภาวะความดันของหลอดเลือดปอดสูง (pulmonary hypertension) และเกิด cardiovascular complication ตามมา [3, 8-14]

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดปอด (pulmonary vascular remodeling) คือ การเปลี่ยนแปลงที่มีการเพิ่มความหนาของผนังหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้นกับสมดุลของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และขบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ต่างๆ คือ fibroblasts, pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC), pulmonary arterial endothelial cells (PAEC) และเมื่อมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ดังกล่าวมากกว่าขบวนการตายของเซลล์ จะทำให้ผนังหลอดเลือดหนาตัว มีการตีบแคบของหลอด

เลือด ส่งผลให้มีการเพิ่ม pulmonary vascular resistance (PVR) และเกิดความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง (pulmonary hypertension) ตามมา [15]

พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดปอด (pulmonary vascular remodeling) ซึ่งทำให้เกิดโรคความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง (pulmonary hypertension) นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิด inflammation โดยพบว่าในแบบจำลอง monocrotaline (MCT) induced pulmonary hypertension ซึ่งเป็นการฉีดสารสะกัดจากพืช MCT ในหนูแรท แล้วทำให้เกิด endothelial injury, มีการเพิ่มเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือด (perivascular inflammatory cells) และทำให้เกิดความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงขึ้นอย่างรุนแรง[16][17] และในหนูแรทที่มีภาวะ chronic hypoxia จนเกิดโรคความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง พบว่ามีการสะสมของเซลล์อักเสบรอบเส้นเลือด (perivascular inflammatory cells) สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนและการหนาตัวของ pulmonary arterial smooth muscle เช่นเดียวกับที่พบในผู้ป่วยโรคถุงลมปอดโป่งพอง (chronic obstructive pulmonary disease หรือ COPD) ที่เกิด pulmonary vascular remodeling ก็พบว่ามีจำนวนเซลล์อักเสบ (inflammatory cell) เพิ่มขึ้นทั้งในทางเดินหายใจและในผนังหลอดเลือดปอด ซึ่งสัมพันธ์กับความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงในปอดเช่นกัน [18]

มีข้อมูลการศึกษาในผู้ป่วย OSA พบว่าผู้ป่วย OSA มีระดับ inflammatory cytokines ต่างๆ คือ IL-6, IL-8 , CRP, TNF-α เพิ่มขึ้น และสัมพันธ์กับการเกิด cardiovascular risk ซึ่ง inflammatory cytokines ดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับการรักษาเฉพาะด้วยการใช้ continuous positive airway pressure (CPAP) ซึ่งเป็นการรักษาที่มีหลักฐานว่าสามารถลดการเกิด cardiovascular complication ในผู้ป่วย OSA ได้ [19-22] แต่ CPAP มีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่าย ความร่วมมือของผู้ป่วยในการใช้เครื่อง CPAP และยังขาดข้อมูลในการรักษาในผู้ป่วย OSA ที่มีอาการไม่รุนแรง

เนื่องจาก systemic inflammation โดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นของ NF-kB activity และ TNF-α มีผลต่อการเกิด cardiovascular complication และการเกิด perivascular inflammation ก็มีผลต่อการเกิดความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงดังกล่าวข้างต้น ร่วมกับมีการศึกษาพบว่าการลดการสร้าง TNF-α สามารถลดทั้ง systemic และ pulmonary vascular resistance ได้ และมีข้อมูลจากหลายการศึกษาที่สนับสนุนว่า TNF-α มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของ pulmonary vascular physiology[3, 23, 24] จึงเกิดแนวความคิดว่าการให้ยายับยั้ง TNF-α (anti-TNF) ในภาวะ chronic intermittent hypoxia ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย OSA น่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดปอด, ลดการเกิด pulmonary

vascular remodeling, ลดความดันในหลอดเลือดแดงปอด และลดการเกิด cardiovascular complication ได้

มีการศึกษานำร่อง (pilot study) ในผู้ป่วย OSA ที่มีอาการง่วงนอนในเวลากลางวัน (excessive daytime sleepiness) เมื่อได้รับยา anti-TNF คือ etanercept 25 mg 2 ครั้งต่อสัปดาห์นาน 3 สัปดาห์พบว่าผู้ที่ได้รับยา etanercept มีอาการง่วงนอนในเวลากลางวันลดลง และมีอัตราการเกิดการหยุดหายใจ อย่างน้อย 10 วินาที (apnea) และการหายใจแผ่ว (hypopnea) ที่เกิดขึ้นภายใน 1 ชั่วโมง (apnea-hypopnea index; AHI) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ป่วย OSA ที่ได้รับยา etanercept มีระดับ inflammatory cytokines โดยเฉพาะ IL-6 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p น้อยกว่า 0.01) รวมทั้งระดับ TNF-α activity และ CRP ก็มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเป็นหลักฐานสนับสนุนว่า pro-inflammatory cytokines น่าจะสัมพันธ์กับการเกิด OSA และอาการง่วงนอนของผู้ป่วย และการให้ยายับยั้งการอักเสบคือ etanercept มีผลทำให้การรักษา OSA ดีขึ้น [23]

มีอีกหนึ่งการศึกษาที่พบว่าผู้ป่วย OSA มีระดับของ TNF-α, NF-kB dependent cytokines และ IL-8 สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของ OSA รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงลดลง เมื่อได้รับการรักษาด้วยเครื่องแรงดันบวกต่อเนื่อง (continuous positive airway pressure; CPAP) นาน 6 สัปดาห์ [25]

จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าเมื่อทำให้หนูแรทมีภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสั้นๆ สลับกับการหายใจปกติ เป็นระยะเวลา 5-8 ชั่วโมงต่อวันต่อเนื่องกันนาน 14-35 วัน จะทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia (CIH) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการเกิดทางเดินหายใจอุดกั้นเป็นช่วงๆในผู้ป่วย OSA ทั้งในเรื่องการเปลี่ยนแปลงของความดันในหลอดเลือดแดงปอดและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด (26) และมีการศึกษาพบว่าแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia ในหนูแรทนั้น มีการเพิ่มขึ้นของ NF-kB และ inflammatory cytokines ต่างๆ โดยเฉพาะ TNF-α, IL-6 อย่างมีนัยสำคัญ [27] คล้ายคลึงกับการเกิด systemic inflammation ในผู้ป่วย OSA และยังนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงในปอด เกิดภาวะความดันในเลือดแดงปอดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับหนูแรทในกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่าความดันในหลอดเลือดแดงปอดปกติ อยู่ในช่วง 12-15 mmHg แสดงว่าการเกิดภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสั้นๆสลับกับการหายใจปกติในสัตว์ทดลองนั้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของหลอดเลือดปอด (pulmonary vascular remodeling) และหัวใจตามมา [27, 28]

นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อเกิด pulmonary vascular remodeling ในสัตว์ทดลองจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความดันในหลอดเลือดปอดเพิ่มขึ้น จากการเพิ่มของ right ventricular afterload และเกิดภาวะหัวใจห้องขวาล่างโตตามมา (right ventricular hypertrophy; RVH) [29]

มีการศึกษาในสัตว์ทดลองหนูแรท monocroline-induced pulmonary arterial hypertension ซึ่งเป็นการสร้างแบบจำลอง pulmonary arterial hypertension (PAH) จากการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือดแดงปอดโดยตรง พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ TNF-α และ NF-kB activity ในเนื้อปอด และเมื่อได้รับยา anti-TNF ขนาด 0.4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ฉีดใต้ผิวหนัง 3 ครั้งต่อสัปดาห์ นาน 3 สัปดาห์ ส่งผลให้มีการลดลงของความดันในหลอดเลือดแดงปอด (mean pulmonary arterial pressure) ลดการเกิด pulmonary vascular remodeling คือ ลด การหนาตัวของผนังหลอดเลือดปอดขนาด 50-100 ไมครอน และลดการเกิดหนาตัวของหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูแรทที่ได้ยาหลอก[24, 30]

จากการศึกษาเรื่องผลของยาโบเซนแทนต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอดในกลุ่มหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรังของ เอกฤทัยและคณะ[31] พบว่าหนูแรทที่ได้รับระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซนต์ สลับกับ 21 เปอร์เซนต์ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกันนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน ในช่วงกลางวัน เป็นเวลา 14 วัน (chronic intermittent hypoxic model) สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหัวใจและหลอดเลือดแดงปอดจนเกิดความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง และการให้ยาโบเซนแทนสมารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความดันในหลอดเลือดแดงปอดและ pulmonary vasculature ได้

ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดว่า หากสามารถลดระดับของ inflammatory cytokines ต่างๆ โดยเฉพาะ TNF-α โดยการให้ยายับยั้ง TNF-α (anti-TNF) คือ etanercept แล้ว จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง inflammatory cytokines, พยาธิสภาพและความดันของหลอดเลือดแดงในปอดได้หรือไม่ แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในการศึกษาในคนที่ต้องอาศัยระยะเวลาในการศึกษานานกว่าจะเห็นการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหัวใจและหลอดเลือด และยังไม่มีการศึกษาในคนมาก่อน จึงเกิดเป็นการศึกษาเบื้องต้นในสัตว์ทดลองแบบจำลองของ chronic intermittent hypoxia (CIH) ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มผู้ป่วย OSA ที่มีภาวะ chronic intermittent hypoxia ที่เกิดความดันในหลอดเลือดปอดสูง (CIH- induced pulmonary hypertension) ในแบบจำลองเดียวกับการศึกษาของเอกฤทัยและคณะ[31] โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการอักเสบ วัดระดับ TNF-α และระดับ inflammatory cytokines ต่างๆ และศึกษาผลของยา etanercept ในการลดการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพในหลอดเลือดปอด การลดความดันของหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งนำไปสู่การลดการเกิด

cardiovascular complication แล้วพัฒนาเป็นการศึกษาต่อยอดในคนต่อไป อันนำไปสู่การอัตรา การเสียชีวิตของผู้ป่วย OSA ในอนาคต

คำถามของการวิจัย (Research Questions)

คำถามหลัก (primary research question)

ผลของยา etanercept 0.4 mg/kg body weight ฉีด subcutaneous 2 ครั้งต่อสัปดาห์กับแบบจำลองหนูแรทที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้นาน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน จะสามารถลดการเปลี่ยนแปลงความดันในหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary arterial pressure) โดยวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) ได้หรือไม่

คำถามรอง (secondary research questions)

ผลของยา etanercept 0.4 mg/kg body weight ฉีด subcutaneous 2 ครั้งต่อสัปดาห์ กับแบบจำลองหนูแรทที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้นาน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน จะสามารถลดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) ได้หรือไม่

ผลของยา etanercept 0.4 mg/kg body weigh ฉีด subcutaneous 2 ครั้งต่อสัปดาห์ กับแบบจำลองหนูแรทที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้นาน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน จะสามารถลดการหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) ได้หรือไม่

ผลของยา etanercept 0.4 mg/kg body weight ฉีด subcutaneous 2 ครั้งต่อสัปดาห์ กับแบบจำลองหนูแรทที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้นาน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน จะสามารถลดจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells), ลดระดับ inflammatory cytokines คือ TNF-α , IL-6 และ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB activity ได้หรือไม่

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประเมินผลของยา etanercept กับกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดเป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ต่อเนื่องกันนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก ในการลดการเปลี่ยนแปลงความดันในหลอดเลือดแดงปอด

2. เพื่อประเมินผลของยา etanercept กับกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดเป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ต่อเนื่องกันนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก ในการลดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling)

3. เพื่อประเมินผลของยา etanercept กับกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดเป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ต่อเนื่องกันนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก ในการลดการหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา

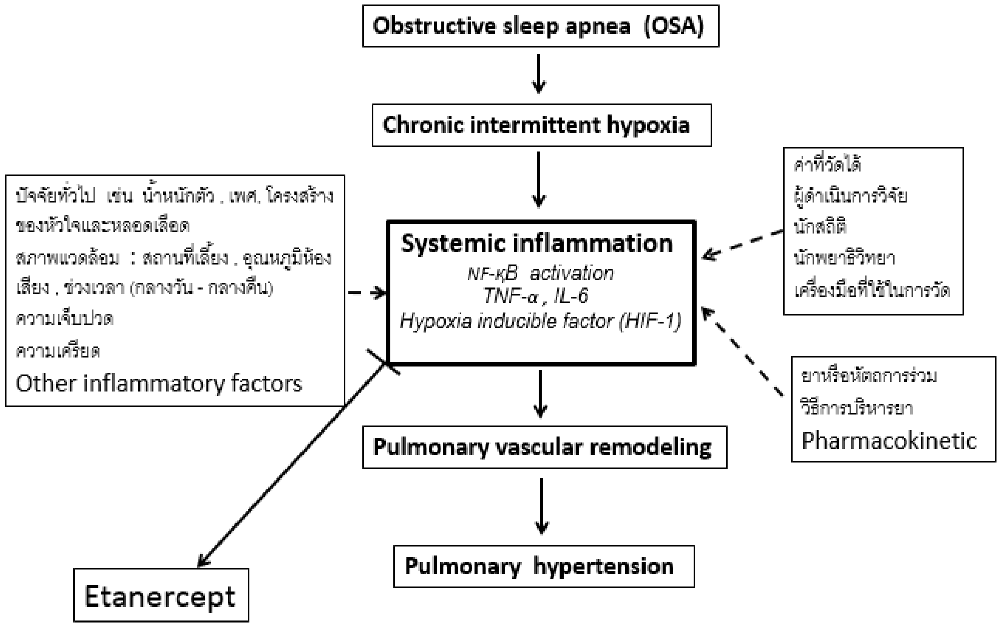
4. เพื่อประเมินผลของยา etanercept กับกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดเป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ต่อเนื่องกันนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก ในการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells), ระดับ inflammatory cytokines ต่างๆ คือ TNF-α, IL-6 และ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) activity

5. เพื่อประเมินผลของการเกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดเป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ต่อเนื่องกันนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ hypoxic inducible factor-1 (HIF-1) ในกลุ่ม chronic intermittent hypoxia เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมออกซิเจนปกติ (normoxic groups) และกลุ่มหนูแรทปกติ (normal group)

สมมติฐาน (Hypothesis)

ยา etanercept สามารถลดความดันในหลอดเลือดแดงปอด , ลดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling), ลดการหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา, ลดจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells), ลดระดับ TNF-α, IL-6 และ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) activity ในกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิด ที่กำหนดระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซนต์ สลับกับ 21 เปอร์เซนต์ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกันเป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ต่อเนื่องกันนาน 28 วัน ในช่วงกลางวัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมที่ได้รับยาหลอก

กรอบแนวความคิดในการวิจัย



ขอบเขตของการวิจัย

Study population หมายถึง กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

Sample population หมายถึง กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ถูกสุ่มตามจำนวนขนาดตัวอย่างจากการคำนวณ

ตัวแปรอิสระ หมายถึง การเกิด chronic intermittent hypoxia และการได้รับยา etanercept

ตัวแปรตาม หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของความดันในหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary arterial pressure), การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular remodeling) โดยการวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP), การหนาตัวของหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy), จำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells) โดยการนับเป็นจำนวน neutrophils และ macrophages ที่อยู่รอบๆหลอดเลือดแดงปอด, การเปลี่ยนแปลงของระดับ inflammatory cytokines ต่างๆโดยการวัดระดับของ TNF-α, IL-6 และ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) activity, การเปลี่ยนแปลงของ hypoxic inducible factor-1 (HIF-1), การเปลี่ยนแปลงของก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas; ABG)

ตัวแปรควบคุม (confounding factors) คือ วิธีการให้ยา etanercept, ความเครียดและความเจ็บปวดของหนูแรทโดยติดตามดูพฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงของหนูแรท, น้ำหนักตัวที่ลดลง, สถานที่เลี้ยงดู, สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงดูและการปฏิบัติต่อหนูแรท, ช่วงเวลากลางวัน-กลางคืน

เครื่องมือที่ใช้ในการวัด คือ เครื่องมือสำหรับวัดระดับความดันในหลอดเลือดแดงปอดและความดันโลหิต, เครื่องมือสำหรับใช้ในการตรวจทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดกับหัวใจห้องล่างขวาและวัดจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells), เครื่องมือในการตรวจวัดระดับ inflammatory cytokines ต่างๆ , NF-kB และ HIF-1, เครื่องมือสำหรับใช้ในการตรวจก๊าซในเลือดแดง

การทดสอบ reliability ของเครื่องมือที่ใช้วัดระดับความดันในหลอดเลือดแดงปอด (วัดเป็น right ventricular systolic pressure หน่วยมิลลิเมตรปรอท และมีการวัดเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลสองชุดในหนูทดลองตัวเดียวกัน ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) และการวัดจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells) ใช้เป็น intra-observer reliability ในการแปรผล โดยทำ repeatability test ในชิ้นเนื้อเดียวกัน แต่ต่างเวลากันโดยพยาธิแพทย์ที่มีความชำนาญ

เพียงคนเดียว เช่นเดียวกับการตรวจวัดระดับ inflammatory cytokines ต่างๆnuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) activity และ hypoxic inducible factor-1 (HIF-1)

การศึกษาเป็น double blinded โดยใช้รหัส (code) เป็นตัวแทนในหนูแรทแต่ละตัว โดยในช่วงที่ทำการเก็บข้อมูลทั้งในเรื่องการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต, การวัดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา และการวัดการเปลี่ยนแปลงของ inflammation นั้น ผู้วิจัยและผู้วิเคราะห์ข้อมูลไม่ทราบว่าหนูแรทแต่ละตัวอยู่ในกลุ่มการศึกษาใด (blinded) เพื่อความปลอดภัยของสัตว์ทดลอง ผู้วิจัยจะทราบว่าหนูแรทแต่ละตัวอยู่ในกลุ่มการศึกษาใด (unblinded) เฉพาะช่วงเวลาที่มีการสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia และฉีดยา subcutaneous route เพื่อให้สามารถติดตามพฤติกรรม อาการผิดปกติ และผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการศึกษาได้

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ใช้ในการทดลอง เบื้องต้นไม่มีความแตกต่างกันในแง่เพศ, อายุ, น้ำหนักตัว, ความดันในหลอดเลือดปอด, โครงสร้างหัวใจ โดยไม่มีการตีบของทางออกของหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular outflow tract obstruction), ไม่มีความแตกต่างของภาระที่เกิดขึ้นก่อนหัวใจจะเริ่มหดตัว (preload), ภาระที่หัวใจเกิดขึ้นก่อนหัวใจจะเริ่มหดตัว (afterload), การบีบตัวของหัวใจ และอัตราการเต้นของหัวใจ รวมทั้งไม่มีความแตกต่างกันของพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด, ความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวา, ระดับ inflammatory cytokines ต่างๆ คือ TNF-α และ IL-6, ระดับ NF-kB activity, รวมทั้งระดับ hypoxic inducible factor-1 (HIF-1) โดยจะมีการสุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ จำนวน 6 ตัว มาวัดความดันในหลอดเลือดแดงปอด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นว่าหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติไม่มีความผิดปกติของระบบหัวใจและหลอดเลือดจริงก่อนที่จะเริ่มทำการศึกษา
2. กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ใช้ในการทดลอง เบื้องต้นไม่มีความแตกต่างกันของก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas; ABG)
3. กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ใช้ในการทดลองมาจากที่เดียวกัน ถูกเลี้ยงดูภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกัน และได้รับอาหารเหมือนกันโดยเจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพียงคนเดียว

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. การบริหารยาในสัตว์ทดลอง และการศึกษาผลของยาในแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia ในสัตว์ทดลอง โดยดูการเปลี่ยนแปลงความดันในหลอดเลือดแดงปอด การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจ เป็นสิ่งที่ผู้ดำเนินการวิจัยไม่เคยทำมาก่อน ผู้วิจัยจึงต้องศึกษาวิธีการเลี้ยงสัตว์ วิธีการปฏิบัติต่อสัตว์ วิธีการฉีดยาทาง subcutaneous route การเจาะเลือดในสัตว์ การวัดความดันหลอดเลือดแดงปอดและการวัดความดันโลหิต และเข้าฝึกอบรมเพิ่มเติมกับคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วฝึกฝนจนเกิดความชำนาญก่อนเริ่มการศึกษาจริง

2. ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง อาจไม่สามารถบอกผลของยาในคนได้ จึงต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อดูประสิทธิภาพของยาทางคลินิกต่อไป แต่ที่ไม่ได้เลือกทำการศึกษาในคน เนื่องจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหัวใจและหลอดเลือดในคน โดยเฉพาะการเกิด pulmonary vascular remodeling ต้องอาศัยระยะเวลานานกว่าจะพบการเปลี่ยนแปลง

3. วิธีการตรวจเลือดและการแปรผลเลือดในสัตว์ทดลอง เป็นสิ่งที่แตกต่างจากการตรวจในคน จึงต้องศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม เลือกเครื่องมือและวิธีการทดสอบที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถนำผลการศึกษามาอ้างอิงสู่คนได้ในแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia

4. ไม่ได้มีการควบคุมระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อาจทำให้ระดับก๊าซ CO_2 ในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงต่างจากภาวะที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย OSA จริงๆ

5. รูปแบบการศึกษาเป็นการสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ pulmonary vasculature พร้อมๆกับการให้ยา etanercept ที่เชื่อว่าน่ามีผลต่อลดการเปลี่ยนแปลงของ pulmonary vasculature จึงเปรียบเสมือนเป็นการให้ยาเพื่อป้องกันการเกิด pulmonary vascular remodeling (preventive effect) ไม่ใช่เพื่อการรักษา จึงไม่อาจสรุปผลเพื่อนำมาใช้ในการรักษาในคนได้ แต่เป็นการพิสูจน์หาความสัมพันธ์ระหว่าง inflammation และ hypoxic pulmonary hypertension ในสัตว์ทดลองแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia ซึ่งคล้ายกับที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย OSA (OSA/CIH induced pulmonary hypertension)

6. รูปแบบการศึกษาเป็นการวัดผลการศึกษา ณ จุดหนึ่งของเวลา (cross-sectional study) จึงไม่สามารถบอกว่าปัจจัยใด หรือการเปลี่ยนแปลงใด เกิดขึ้นก่อนหรือหลังได้

7. ไม่สามารถบอกข้อมูลเบื้องต้นที่ต้องการศึกษาในหนูแรทตัวเดียวกันได้ตั้งแต่ก่อนเริ่มศึกษา (baseline pulmonary pressure) เนื่องจากการวัดทางระบบไหลเวียนโลหิต จะต้องทำการการุณฆาตภายหลังสิ้นสุดการศึกษา จึงเลือกสุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8

สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ จำนวน 6 ตัว มาวัดความดันในหลอดเลือดแดงปอด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นแทน

8. ข้อจำกัดของแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia ในสัตว์ทดลองนี้ คือ ไม่ได้เกิดทางเดินหายใจอุดกั้นขึ้นจริงขณะนอนหลับ และไม่สามารถประเมินลักษณะการนอนหลับ หรือ sleep fragmentation ซึ่งอาจมีผลต่อการศึกษาได้ แต่ก็เป็นแบบจำลองในสัตว์ทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพใกล้เคียงกับที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย OSA มากที่สุด และเป็นที่ยอมรับในการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Pulmonary vasculature คือ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิของเส้นเลือดแดงในปอด (pulmonary vascular remodeling) โดยใช้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของความดันในหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary pressure) จากการวัดค่าความดันในหัวใจห้องล่างขวาขณะบีบตัว (right ventricular systolic pressure: RVSP) และข้อมูลทางพยาธิวิทยาของเส้นเลือดแดงในปอด
2. Chronic intermittent hypoxic model คือ การกำหนดสภาวะของออกซิเจนให้กับหนูแรท โดยกำหนดให้มีระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ สลับ 21 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกันนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน ในระบบปิด เป็นระยะเวลานานทั้งหมด 28 วัน ในช่วงเวลากลางวัน (light period)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสัมพันธ์และการเกิดกระบวนการอักเสบทั้ง local inflammation และ systemic inflammation จากภาวะ chronic intermittent hypoxia อันนำมาสู่การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดง, การหนาตัวของหัวใจห้องล่างขวา และการเกิดภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง

2. ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา พยาธิวิทยาและ inflammatory response ภายหลังให้ยายับยั้ง TNF-α (anti-TNF; etanercept) อันเป็นความรู้เบื้องต้น เพื่อนำไปสู่การศึกษาต่อยอดในคนต่อไปในอนาคต

3. นำความรู้มาใช้ในการพัฒนาการรักษากลุ่มผู้ป่วยความดันในหลอดเลือดปอดสูงจากทางเดินหายใจอุดกั้น (obstructive sleep apnea) ซึ่งมีภาวะ chronic intermittent hypoxia

เพื่อลดภาวะแทรกซ้อนเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือด อันนำไปสู่การลดอัตราความพิการและอัตราการเสียชีวิตจากโรคได้

4. นำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการป้องกัน (prevention) การเกิดความดันในหลอดเลือดปอดสูงเนื่องจากภาวะ chronic intermittent hypoxia ในผู้ป่วย OSA หรือใช้เสริมกับการรักษามาตรฐานเช่น การใช้เครื่อง continuous positive airway pressure (CPAP) ซึ่งยังมีข้อจำกัดในการใช้รักษาดังกล่าวข้างต้น

5. อาจนำผลการศึกษาที่ได้ไปปรับใช้ในการรักษาความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงจากสาเหตุอื่นๆได้ ที่มีความสัมพันธ์กับ inflammation ได้

6. สามารถที่จะตีพิมพ์ในวารสารในประเทศ และต่างประเทศได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ติดต่อประสานงานกับศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อจัดเตรียมหนูแรทที่ใช้ในการศึกษา ให้ได้สายพันธุ์ เพศ น้ำหนักตัว และอายุตามที่ต้องการ
2. ติดต่อประสานงานกับเจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเตรียมความพร้อมในการจัดสถานที่เลี้ยงดูหนูแรท การให้อาหารและการติดตามอาการ พฤติกรรมของหนูแรทขณะทำการศึกษา และการประสานงานกับบริษัทเอกชนในการจัดส่งก๊าซที่ใช้ในการสร้างแบบจำลอง
3. ติดต่อประสานงานกับอาจารย์ในภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกี่ยวกับการเก็บข้อมูลและการใช้อุปกรณ์ในการสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia, การตรวจวัดค่าความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ และความดันในหลอดเลือดแดงปอด
4. ติดต่อประสานงานกับเจ้าหน้าที่เภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อจัดซื้อยา etanercept รวมทั้งการเตรียมยาและเก็บรักษาสภาพยาที่ใช้ในการศึกษา
5. ติดต่อประสานงานกับอาจารย์และเจ้าหน้าที่ในสาขาวิชาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกี่ยวกับการศึกษากระบวนการเกิด inflammation, การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจ รวมทั้งวิธีการตรวจระดับ hypoxic inducible factor-1 (HIF-1), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) activity, TNF-α และ IL-6
6. ติดต่อประสานงานกับอาจารย์และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกี่ยวกับการเก็บข้อมูลในส่วนของการตรวจทางพยาธิวิทยา

ตั้งแต่การเตรียมชิ้นเนื้อ, การจัดส่งชิ้นเนื้อ, การย้อมพิเศษ และการวัดผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

7. ประชุมชี้แจงวัตถุประสงค์ของการศึกษา วิธีดำเนินการ และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับกับผู้ร่วมงานทุกคน และสรุปอภิปรายผลหลังเสร็จสิ้นการศึกษาร่วมกัน

8. ติดต่อประสานงานกับเจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อขอเข้ารับการอบรมการใช้สัตว์เพื่อการวิจัย กับคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนเริ่มทำการศึกษาจริง

9. ทดลองในห้องปฏิบัติการสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia เจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจะเป็นผู้นำหนูแรทเข้าในกรงระบบปิด ที่มีการกำหนดสภาวะของออกซิเจน ให้มีระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์สลับ 21 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกันนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน ทุกวันเป็นระยะเวลานานทั้งหมด 28 วัน ในช่วงเวลากลางวัน (light period)

10. ระหว่างการศึกษา ผู้วิจัยจะทำการชั่งน้ำหนัก, สังเกตพฤติกรรมของหนูแรทที่อยู่ในการศึกษาทุกวัน และเป็นผู้ฉีดยา etanercept และยาหลอกคือ normal saline (NSS) ทาง subcutaneous route เพียงคนเดียว

11. ทดสอบในห้องปฏิบัติการสรีรวิทยา ภายหลังให้ยาสลบหนูแรทที่จะศึกษา ผู้วิจัยจะทำการใส่สายสวนทาง femoral vein เพื่อวัดความดันโลหิต และแทงเข็มฉีดยาขนาด 24 นิ้วด้วยวิธี subxiphoid approach แล้วต่อกับเครื่อง Polygraph Biopac® System เพื่อวัดค่าความดัน แสดงเป็นกราฟและหน่วยเป็นมิลลิเมตรปรอท เพื่อวัดค่าและแปรผลความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจและความดันในหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) ภายใต้คำแนะนำของอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญในการใช้เครื่องมือ โดยผู้วิจัยต้องมีการฝึกฝนให้เกิดความชำนาญก่อนเริ่มเก็บข้อมูลในการศึกษาจริง

11. ทดสอบในห้องปฏิบัติการ ในการตรวจก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas analysis; ABG) ก่อนเริ่มการศึกษาทางระบบไหลเวียนเลือด (hemodynamic study) ผู้วิจัยจะทำการเก็บเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตรทาง femoral catheter ใส่เข็มฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตรซึ่งใส่ heparin ป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วแช่ในกระติกน้ำแข็ง เพื่อส่งตรวจหาค่าก๊าซในเลือดแดงต่อไป โดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซออกซิเจน

12. ทดสอบในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา (histopathological study) เมื่อเสร็จสิ้นการศึกษาทางระบบไหลเวียนเลือดแล้ว ผู้วิจัยจะทำการผ่าหนูแรท และแช่ส่วนของหัวใจและปอดบางส่วนที่จะทำการศึกษาทางพยาธิวิทยาในน้ำยาฟอร์มาลีน และส่งห้องตรวจทางพยาธิวิทยาต่อไป โดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยาของระบบหัวใจและระบบทางเดินหายใจโดยตรง จะเป็นผู้ทำ

การตัดแบ่งปอดเพื่อส่งย้อมพิเศษ และตัดแบ่งหัวใจออกเป็นผนังห้องล่างขวาและห้องล่างซ้ายรวมผนังกั้นระหว่างหัวใจเพื่อนำไปน้ำหนัก

13. ทดสอบในห้องปฏิบัติการทางเคมีเกี่ยวกับการอักเสบ (inflammatory study) ภายหลังเสร็จสิ้นการศึกษาทางระบบไหลเวียนเลือดแล้ว ผู้วิจัยจะทำการเก็บเลือดหนูแรทแต่ละตัวผ่านทางสาย femoral arterial catheter ปริมาณ 2-3 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่นแยกเซรั่มที่ใช้ในการตรวจระดับ TNF-α และ IL-6 นอกจากนั้นผู้วิจัยยังเป็นผู้ผ่าแบ่งปอดบางส่วนเก็บใส่ในน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ แช่ในกระติกน้ำแข็ง ก่อนจะทำการบดเนื้อปอดด้วยตะแกรงกรองพิเศษ และเก็บแยกน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) เพื่อส่งตรวจระดับ TNF-α และ NF-kB activity และเซลล์เนื้อเยื่อปอด (lung cell) เพื่อส่งตรวจระดับ HIF-1 ต่อไป

14. เก็บรวบรวมข้อมูลต่างๆ เพื่อนำมาแปรผลการศึกษา

15. สรุปผลการศึกษาและเตรียมนำเสนอผลงานวิจัยต่อไป

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ภายในประเทศ
    - การนำเสนอผลงานการวิจัยในงานประชุมวิชาการประจำปี 2557 ของสมาคมอุรเวชช์แห่งประเทศไทย และได้รับรางวัลชนะเลิศการประกวดผลงานวิจัยประจำปี 2557
    - เข้าร่วมการนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการประจำปี 2557 ของราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย
2. ต่างประเทศ
    - ส่งผลงานวิจัยเข้าร่วมในการประชุมวิชาการนานาชาติ American Thoracic Society 2014 International Conference
    - ส่งผลงานวิจัยเข้าร่วมในการประชุมวิชาการนานาชาติ Chest 2014 ของ American College of Chest Physicians

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

ภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้เกิดความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงและความดันโลหิตสูง เนื่องจากเกิดภาวะการขาดออกซิเจนสลับกับภาวะออกซิเจนปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง (chronic intermittent hypoxia) ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบประสาทซิมพาทิติก (sympathetic excitation) เกิดการทำงานผิดปกติของหลอดเลือด (vascular endothelial dysfunction) จากหลายๆกลไก และหนึ่งในกลไกของการเกิดโรคที่สำคัญ คือ การกระตุ้นกระบวนการอักเสบ (inflammation) ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ transcription factor คือ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) และ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) และทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ inflammatory cytokines โดยเฉพาะระดับ TNF-α ซึ่งพบว่า TNF-α มีค่าสูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่มีทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับ และสัมพันธ์กับการเกิด cardiovascular complication อีกด้วย ดังนั้นการใช้ยายับยั้ง TNF-α (anti-TNF) น่าจะมีบทบาทสำคัญในการลดความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง ซึ่งเกิดจากทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับ และลดการเกิด cardiovascular complication ได้ [3, 4, 7-9]

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยาอีทาเนอร์เซ็บ (etanercept) เป็น tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) antagonist เป็นยาที่มีการใช้แพร่หลายในการรักษาโรคเกี่ยวกับ immune-mediated inflammation ต่างๆ โดยเฉพาะโรคข้อรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis), โรคข้ออักเสบจากสะเก็ดเงิน (psoriatic arthritis), โรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) และโรคหลังแข็ง (ankylosis spondylitis)[32]

Etanercept (ชื่อการค้า Enbrel) เป็นยาที่มีโปรตีนที่มีหน่วยย่อยสองหน่วยจับตัวกัน (soluble P 75 TNF- a receptor fusion protein) ประกอบด้วย human type II (P 75) TNF receptor (TNF-RII) ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่นอกเซลล์และจับกับ TNF 2 ส่วนมาต่อกับส่วน Fc ของ human IgG1 1 ส่วน Etanercept เป็น soluble receptor antagonist ที่โมเลกุลมีคุณสมบัติเหมือน receptor ที่ผิวเซลล์ซึ่งสามารถจับกับ cytokines ได้ แต่เนื่องจากยาชนิดนี้ไม่มี

transmembrane และ intracytoplasmic domain อันเป็นโครงสร้างสำคัญที่ช่วยตรึงตัวยานี้ไว้กับเซลล์เป้าหมาย ยาจึงต้องแย่งจับกับ cytokines ไว้ก่อนที่ cytokines จะจับกับ receptor ที่ผิวเซลล์ได้ และยา etanercept มีความจำเพาะในการจับกับ cytokines ได้เป็นอย่างดี จึงออกฤทธิ์ได้ดีแม้จะใช้ยาในปริมาณน้อย นอกจากนั้นยายังมีการดัดแปลงโครงสร้างเพื่อทำให้มีระยะครึ่งชีวิตยาวขึ้น [33]

ยา etanercept ออกฤทธิ์สูงสุดหลังได้ยา 69 $\pm$ 34 ชั่วโมง ค่าความเข้มข้นสูงสุดของยาในซีรัม (C_{max}) เป็น 1.1 $\pm$ 0.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าครึ่งชีวิต 102 $\pm$ 30 ชั่วโมง จึงไม่มีความจำเป็นต้องฉีดทุกวัน โดยขนาดยาที่ใช้ในเด็กคือ 0.8 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมต่อสัปดาห์ และขนาดในผู้ใหญ่คือ 25 มิลลิกรัม ฉีด 2 ครั้งต่อสัปดาห์หรือ 50 มิลลิกรัมฉีด 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ส่วนขนาดยาที่ใช้ในสัตว์ทดลองหนูแรท มีตั้งแต่ 0.2-15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม 1-3 ครั้งต่อสัปดาห์ ซึ่งพบความเข้มข้นของยาสูงสุดที่ 12 ชั่วโมงหลังฉีดยาใต้ผิวหนังในหนู และยาจะมีการกระจายเข้าสู่เลือด ไต ตับ ปอด หัวใจ และม้าม โดยตรวจพบระดับยาในเลือดจะสูงกว่าในเนื้อเยื่อต่างๆ ยา etanercept มีเวลาที่ระดับยาในพลาสมามีค่าสูงสุด (t_{max}) เท่ากับ 720 นาที และค่าครึ่งชีวิต 19 ชั่วโมง ขนาดยาสูงสุดที่ทำให้เกินอันตรายในสัตว์ทดลองคือ 1,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ฉีดทางเส้นเลือด หรือ 2,000 มิลลิกรัมน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ฉีดใต้ผิวหนัง [32-35]

ผลข้างเคียงของยา etanercept ที่อาจเกิดขึ้นได้คือ เกิดการอักเสบของผิวหนังบริเวณที่ฉียา, อาการแพ้ยาในผู้ป่วยบางราย, เพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจส่วนต้นและการติดเชื้อวัณโรค รวมทั้งความผิดปกติของระบบโลหิต เช่น ภาวะ pancytopenia, aplastic anemia และการเกิด lymphoproliferative disease ส่วนในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาตามขนาดที่ระบุข้างต้น ไม่พบว่ามีอาการข้างเคียง อาจมีเพียงน้ำหนักตัวที่ลดลงเท่านั้น [33, 34, 36]

Quiang Wang และคณะ ศึกษาผลของ TNF-α antagonist ในหนูแรท โดยการให้ยา anti-TNF ขนาด 0.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดใต้ผิวหนัง 2 ครั้งต่อสัปดาห์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในแบบจำลอง monocrotaline-induced pulmonary hypertension (MCT- induced pulmonary hypertension) พบว่ายา anti-TNF สามารถลดการเกิด TNF-α expression และ NF-kB pathway ในหนูแรทได้ โดยการศึกษานี้แบ่งหนูแรทเป็น 4 กลุ่มๆละ 12 ตัว คือ กลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ, กลุ่มควบคุมที่ได้รับยา anti-TNF, กลุ่ม MCT และได้รับการฉีดน้ำเกลือและกลุ่ม MCT ที่ได้รับยา anti-TNF พบว่า anti-TNF ทำให้ TNF-α level ในเนื้อปอด และ NF-kB activation ลดลง รวมทั้งทำให้เกิดการลดลงของ mean pulmonary arterial pressure (mPAP), right ventricular hypertrophy index (RVHI) และลดการเกิด vascular remodeling ได้ [24]

T.Henriques-Coelho และคณะทำการศึกษาประสิทธิภาพของ etanercept ในหนูแรทที่ถูกทำให้เกิด pulmonary hypertension จากการได้รับ monocrotaline (MCT induced pulmonary hypertension) โดยแบ่งหนูแรทเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม, กลุ่มปกติที่ได้ยา etanercept, กลุ่มที่ทำให้เกิด pulmonary hypertension แต่ไม่ได้ยา และกลุ่มที่ทำให้เกิด pulmonary hypertension และได้รับยา โดยขนาดของยา etanercept ทีใช้ในการศึกษานี้คือ 0.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 3 ครั้งต่อสัปดาห์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงของ hemodynamic; end diastolic pressure, peak rates of pressure rise, relaxation velocity และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาคือ สัดส่วนน้ำหนักของ right ventricular free wall ต่อผลรวมน้ำหนักของ left ventricle และ septum พบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทั้งทาง hemodynamic และพยาธิวิทยา[30]

Silke Ryan และคณะศึกษาความสัมพันธ์ของ NF-kB และ TNF-α กับผู้ป่วย OSA พบว่ามีการเพิ่มของ NF-kB dependent genes และ TNF-α อย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยที่มี OSA มากกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี OSA และลดลงเมื่อได้รับการรักษาด้วย CPAP รวมทั้งมีการลดลงของ IL-8 ด้วย ในขณะที่ IL-1, IL-6, IL-10 และ IL-12 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังได้รับการรักษา [8]

Shuo Li และคณะ ทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยดูการเปลี่ยนแปลงของ inflammatory factor และ transcription factor nuclear factor kappa B (NF-kB) ในหนูแรทจำนวน 160 ตัว ที่ทำให้เกิดภาวะการขาดออกซิเจนระดับต่างๆ 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้ normal oxygen, 5% intermittent hypoxia, 7.5% intermittent hypoxia, 10% intermittent hypoxia และ 10% sustained hypoxia พบว่า มีการเพิ่ม NF-kB activation, เพิ่มระดับของ TNF-α, IL-6, IL-8 และมีการลดลงของระดับ IL-10 ในกลุ่มที่มีภาวะขาดออกซิเจน (both intermittent and sustained hypoxemia groups) มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีภาวะขาดออกซิเจน ที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ หลังเริ่มการศึกษา [14]

พบว่ายังไม่มีการศึกษาผลของยา etanercept ในสัตว์ทดลองที่มีภาวะ chronic intermittent hypoxia ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ inflammatory cytokines อันนำไปสู่การเกิด pulmonary hypertension

จากการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพการเกิด vascular complication ในผู้ป่วย OSA ที่มี chronic intermittent hypoxia และการทบทวนวรรณกรรมข้างต้น จึงนำไปสู่การศึกษาผลของยา etanercept ในหนูแรทที่ให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดเป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ต่อเนื่องกันนาน 28 วัน ในช่วง

เวลากลางวัน ต่อการเปลี่ยนแปลงระบบไหลเวียนเลือด (hemodynamic study),การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพหลอดเลือดแดงปอดร่วมทั้งการเกิด pulmonary vascular remodeling (histopathological study) และการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการอักเสบ (inflammatory study)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลองในสัตว์ทดลอง (Experimental study in animal model) แบบ Randomized, placebo-controlled clinical trial โดยศึกษาผลของยา etanercept ต่อการเปลี่ยนแปลงความดันในหลอดเลือดปอด, การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดปอด, การหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา และการเปลี่ยนแปลงของ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) activity, TNF-α, IL-6 และ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) ในสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia

ประชากร

กลุ่มหนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Sprague Dawley อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยหนูแรททุกตัวจะถูกเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกัน ให้หนูแรทได้ปรับสภาพกับสิ่งแวดล้อมใหม่หลังย้ายมาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดลเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มการศึกษา

หลังจากนั้น กลุ่มหนูแรท Sprague Dawley อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัวจะถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัวโดยการสุ่มแบบ blocked randomization โดยสร้างกรงเลี้ยงจำลองเป็นช่วงกลางวันและกลางคืนอย่างละ 12 ชั่วโมง ยกเว้นในหนูแรทกลุ่มปกติที่เลี้ยงในกรงเลี้ยงปกติ

ขนาดตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบผลของยา etanercept คำนวณได้จาก

$$N / group = \frac{2\,(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2\,\sigma^2}{(\overline{X}_1 - \overline{X}_2)^2}$$

แทนค่าในสูตรโดยใช้การศึกษาของ Quiang Wang และคณะ[24]

($\overline{X}$ แทน ค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด โดย $\overline{X1}$ = 38, $\overline{X2}$ = 28)

และกำหนด α = 0.05 (two-tailed), β = 0.2 (power = 0.8)

คำนวณ $\sigma = 5$ จากสูตร $\sigma^2 = \dfrac{(n_1 - 1)\,SD_1^2 + (n_2 - 1)\,SD_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$

($n_1 = n_2 = 12$, $SD_1 = 4.97$, $SD_2 = 5.48$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ได้ผลลัพธ์เท่ากับ 5 , คำนวณเพิ่ม 10 เปอร์เซ็นต์ (dropout rate) และปรับตามกฎการกระจายตัวของสัตว์ทดลองเป็น 6 ตัวต่อกลุ่ม

เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาผลของยา etanercept ใน chronic intermittent rat model มาก่อน จึงแบ่งการศึกษาเป็น 2 ชุดคือ ชุดแรก 5 กลุ่มๆละ 3 ตัวก่อน เพื่อเป็นการศึกษานำร่อง (pilot study) แล้วนำค่าจากการศึกษามาคำนวณเพื่อยืนยันขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมอีกครั้ง

มีการสุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ จำนวน 6 ตัว มาวัดความดันในหลอดเลือดแดงปอด เพื่อเป็นตัวแทนของข้อมูลเบื้องต้นว่าหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติไม่มีความผิดปกติของระบบหัวใจและหลอดเลือดจริงก่อนที่จะเริ่มทำการศึกษาจริง

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. แบบบันทึกข้อมูลการวิจัย
2. เครื่องมือสำหรับใช้สร้างแบบจำลองของ chronic intermittent hypoxia และ artificial light-dark cycle
3. เครื่องวิเคราะห์ระดับก๊าซ (gas analyzer – O2, CO2 analyzer ML206 powerLab, Ad instruments)
4. เครื่องมือสำหรับวัดความดันหลอดเลือดแดงปอด โดย TSD 104A blood pressure transducer and Biopac System
5. เครื่องมือสำหรับวัดความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ โดย TSD 104A blood pressure transducer and Biopac System
6. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการแสดงค่าความดันของระบบหัวใจและหลอดเลือด (Biopac system, MP 100, AcqKnowledge Software version 3.4)
7. อุปกรณ์และยาสลบ pentobarbital sodium ที่ใช้ในการวางสลบสัตว์ทดลองและการุณยฆาต
8. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการวัดความดันโลหิตและความดันในหลอดเลือดแดงปอด
9. อุปกรณ์ที่ใช้การเตรียมสิ่งส่งตรวจ เก็บรักษาสภาพเลือดและเนื้อปอด และน้ำยาต่างๆ ในการตรวจระดับ TNF-α, IL-6, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) activity และ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)
10. ชุดการตรวจ inflammatory cytokines ต่างๆ ได้แก่

a. Rat TNF-alpha Quantikine ELISA kit สำหรับตรวจระดับ TNF- α ในเลือดและน้ำบดเนื้อปอด (lung suspension)
b. Rat IL-6 Quantikine ELISA kit สำหรับตรวจระดับ IL-6 ในเลือด
c. Phospho-RelA/NFkB p65 (S536) Cell-Based ELISA ของบริษัท R&D Systems INc.,USA สำหรับตรวจระดับ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) activity ในน้ำบดเนื้อปอด (lung suspension)

11. ชุดการตรวจ ab133104 - HIF-1 alpha Transcription Factor Assay Kit ของบริษัท abcam สำหรับตรวจระดับ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) ในเนื้อเยื่อปอด (lung cell)
12. เครื่องวิเคราะห์ระดับก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas analysis)
13. เครื่องมือสำหรับใช้ชั่งน้ำหนักตัวหนูแรทระหว่างการศึกษา และเครื่องมือสำหรับชั่งน้ำหนักหัวใจหนูที่มีความละเอียด 4 จุดทศนิยม
14. กล้องจุลทรรศน์ในการศึกษาทางพยาธิวิทยา

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ทำการเก็บและบันทึกข้อมูลโดยผู้วิจัยทั้งหมด ซึ่งข้อมูลทั้งหมดได้มาจากภาควิชาสรีรวิทยา, ภาควิชาพยาธิวิทยา และหน่วยโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีการดำเนินการศึกษา ดังนี้

1. เตรียมหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley จากศูนย์วิจัยสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ทำการสุ่มกลุ่มตัวอย่างของหนู (blocked randomization) แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว คือ

a. กลุ่มที่ 1 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia model และได้รับยา etanercept (etanercept-treated CIH-group; CIH-E group)
b. กลุ่มที่ 2 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia model และไม่ได้รับยา etanercept แต่ได้รับน้ำเกลือ (etanercept-untreated CIH-group; CIH-N group)
c. กลุ่มที่ 3 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในสภาพออกซิเจนปกติ และได้รับยา etanercept (etanercept-treated normoxic-group; N-E group)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

d. กลุ่มที่ 4 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในสภาพออกซิเจนปกติ และไม่ได้รับยา etanercept แต่ได้รับน้ำเกลือ
(etanercept-untreated normoxic-group; N-N group)

e. กลุ่มที่ 5 กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในสภาพออกซิเจนปกติ เลี้ยงดูปกติ ไม่ได้รับทั้งยา etanercept และน้ำเกลือ (normal rat-group)

3. เตรียมอุปกรณ์ในการสร้างแบบจำลองของ chronic intermittent hypoxia ซึ่งเป็นระบบปิดที่กำหนดสภาวะของออกซิเจนให้กับหนูแรท โดยกำหนดให้มีระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ สลับ 21 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกันนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้อุปกรณ์ในการควบคุมก๊าซระหว่างไนโตรเจนและเครื่องอัดอากาศ และมีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิด โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ระดับก๊าซ (gas analyzer) ก่อนเริ่มการศึกษาจริง

4. ให้ยา etanercept ขนาด 0.4 mg/kg body weight ฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous route) 2 ครั้งต่อสัปดาห์เป็นเวลา 28 วัน ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 28 ของการศึกษา และน้ำเกลือ (normal saline) ในขนาดที่เท่ากันในกลุ่มควบคุม ซึ่งทำโดยผู้ดำเนินการวิจัยเพียงคนเดียว และติดตามชั่งน้ำหนักและสังเกตอาการทั่วไปของหนูแรทขณะทำการศึกษาทุกวัน

5. เก็บข้อมูลของหนูแรททั้ง 5 กลุ่มพร้อมกันในวันที่ 29 ของการวิจัย ประกอบด้วย

a. การเจาะเลือดจาก femoral artery ส่งตรวจก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas)

b. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study)โดยวัดความดันของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary pressure) เป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) วัดความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ โดยทำให้หนูสลบก่อนที่จะทำการศึกษา ด้วยยา pentobarbital sodium ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมต่อครั้ง ผ่านทางช่องท้อง (intraperitoneal route) แล้วใส่สายซึ่งต่อกับระบบวัดความดันโลหิตเรียบร้อยแล้วผ่านทาง femoral artery เพื่อใช้วัดความดันโลหิตขณะทำการศึกษา แล้วใช้เข็มฉีดยาขนาด 24 นิ้วซึ่งต่อกับระบบอ่านกราฟและความดันอัตโนมัติเข้ากับคอมพิวเตอร์ และทำการแทงเข็มด้วยวิธี subxiphoid approach จนได้กราฟที่ถูกต้อง โดยผู้วิจัยไม่ทราบว่าหนูแรทที่ทำการศึกษาอยู่ในกลุ่มการศึกษาใด (blinded)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

c. หลังเสร็จสิ้นการศึกษาทางระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study) แล้ว ผู้วิจัยจะทำการเก็บเลือดจาก femoral artery catheter เพื่อส่งตรวจระดับ TNF-α และ IL-6 ในเลือด

6. หลังจากสิ้นสุดการศึกษาเกี่ยวกับระบบไหลเวียนโลหิต จึงทำการการุณยฆาต (euthanasia) โดยใช้ยา pentobarbital sodium ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมต่อครั้ง เข้าทางหลอดเลือดแดงผ่านสายวัดความดันโลหิตจนหัวใจหยุดเต้น จึงเริ่มเก็บข้อมูลเพื่อศึกษา inflammatory cytokines และศึกษาทางพยาธิวิทยาของปอดและหัวใจต่อไป

7. ในส่วนของการศึกษาทาง inflammation (inflammatory study) ผู้วิจัยจะเป็นผู้ผ่าแบ่งปอดบางส่วนเก็บใส่ในน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ แช่ในกระติกน้ำแข็ง ก่อนจะทำการบดเนื้อปอดด้วยตะแกรงกรองพิเศษ และเก็บแยกเซลล์เนื้อเยื่อปอด (lung cell) และน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) เพื่อ

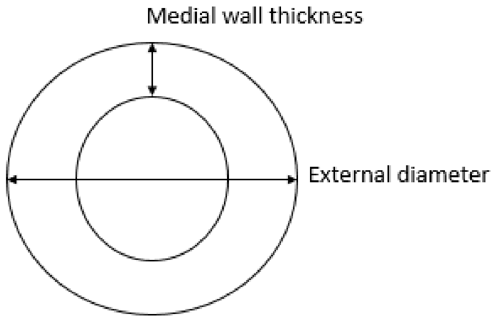
a. ส่งตรวจระดับ TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension)
b. ส่งตรวจระดับ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) activity ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) ซึ่งวัดเป็น phosphorylation of RelA/NFkB p65
c. ส่งตรวจระดับ hypoxic inducible factor-1 (HIF-1) ในเซลล์เนื้อเยื่อปอด (lung cell) โดยผู้ศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลไม่ทราบว่าสิ่งส่งตรวจทั้งหมดดังกล่าวมาหนูแรทกลุ่มใด (blinded)

8. ในส่วนของการศึกษาทางพยาธิวิทยา (histopathological study) ผู้วิจัยจะทำการเก็บหัวใจและปอดส่วนที่เหลือใส่น้ำยาฟอร์มาลีน เพื่อเก็บข้อมูลทางพยาธิวิทยาปอดและหัวใจของหนูแรทต่อไป ซึ่งทำโดยโดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเพียงคนเดียวที่ไม่ทราบว่าชิ้นเนื้อปอดและหัวใจที่ศึกษานั้นมาจากหนูในกลุ่มการศึกษาใดในงานวิจัย (blinded) ซึ่งการศึกษาทางพยาธิวิทยานั้น แบ่งการศึกษาเป็น 3 กลุ่มคือ

a. ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) หลังได้รับยา โดยประเมินจากเปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด (ขนาด 50 – 100 ไมครอน) โดยอาศัยวิธีการย้อม hematoxylin และ eosin stain (% wall thickness of pulmonary arteriole) นับจำนวนเส้นเลือดอย่างน้อย 20 เส้น แล้วเข้าสูตรดังนี้

CHULALONGKORN UNIVERSITY

$$\% \text{ Wall thickness of pulmonary arteriole} = 2 \times \frac{\text{Medial wall thickness}}{\text{External diameter}} \times 100$$



Medial wall thickness คือ ความหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดง

External diameter คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดแดงปอด

b. ความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) โดยดูจากอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสองห้อง (ratio of right ventricle weight and left ventricle weight + septal weight) ดังแสดงในสูตร

$$\text{Right ventricle weight ratio} = \frac{\text{Right ventricular free wall weight}}{\text{Left ventricular plus septal weight}}$$

Right ventricular free wall weight คือ น้ำหนักของหัวใจห้องล่างขวาที่ตัดแยกมาจากผนังห้องหัวใจล่างซ้ายและผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจทั้งสองห้อง

Left ventricular plus septal weight คือ น้ำหนักของผนังกั้นห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจทั้งสองห้อง

c. ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงทาง local inflammation หลังได้รับยา โดยประเมินจากจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells) โดยการนับเป็นจำนวน neutrophils และ macrophages ที่อยู่รอบๆหลอดเลือดแดง (ขนาด 50 – 100 ไมครอน) โดยอาศัยวิธีการย้อม hematoxylin และ eosin นับจำนวนเส้นเลือดอย่างน้อย 5 เส้น หน่วยเป็นจำนวนเซลล์ต่อเส้นเลือด (cells/vessel)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

9. เก็บรวบรวมข้อมูลและทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากการศึกษา
10. สรุปผลที่ได้จากการศึกษา และนำเสนอข้อมูลจากการศึกษา

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS version 17.0 โดยใช้สถิติดังต่อไปนี้

1. สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) ได้แก่ ร้อยละ, ค่าเฉลี่ยเลขคณิต และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean±SD) เพื่อแสดงผลของข้อมูล continuous data เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงความดันของหลอดเลือดแดงในปอด, การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด, ความหนาตัวของหัวใจห้องล่างขวา, การเปลี่ยนแปลงระดับ TNF-α, IL-6 ในเลือด, TNF-α และ NF-kB activity ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) รวมทั้ง ระดับ hypoxic inducible factor-1(HIF-1) ในเซลล์เนื้อปอด (lung cell) และผลก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas)

2. สถิติเชิงอนุมาน (Inferential statistics) ใช้ในการพิสูจน์สมมติฐาน (hypothesis testing) โดยใช้ one-way ANOVA แล้วใช้ post hoc comparison ชนิด Bonferroni เพื่อเปรียบเทียบหาคู่ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ p-value น้อยกว่า 0.05, independent sample T-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับ etanercept และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ p-value น้อยกว่า 0.05 (one tailed) เพื่อทดสอบสมมติฐานในการวิจัย และใช้ Pearson correlation ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธระหวางตัวแปร 2 ตัวที่เปนขอมูลชนิดจำนวนแบบตอเนื่อง

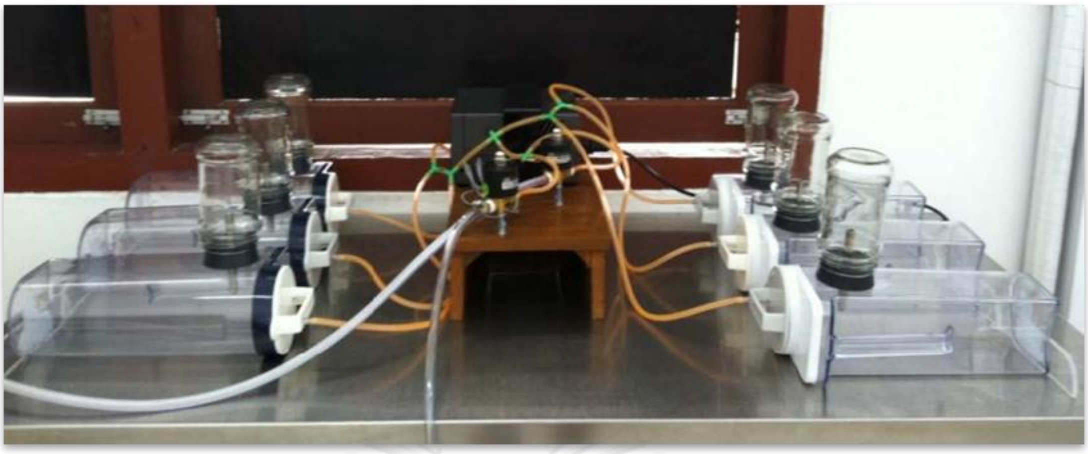
เกณฑ์เทียบระดับความคิดเห็น

การวิจัยนี้ใช้ค่า p – value น้อยกว่า 0.05 เพื่อแสดงถึงความแตกต่างของผลการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

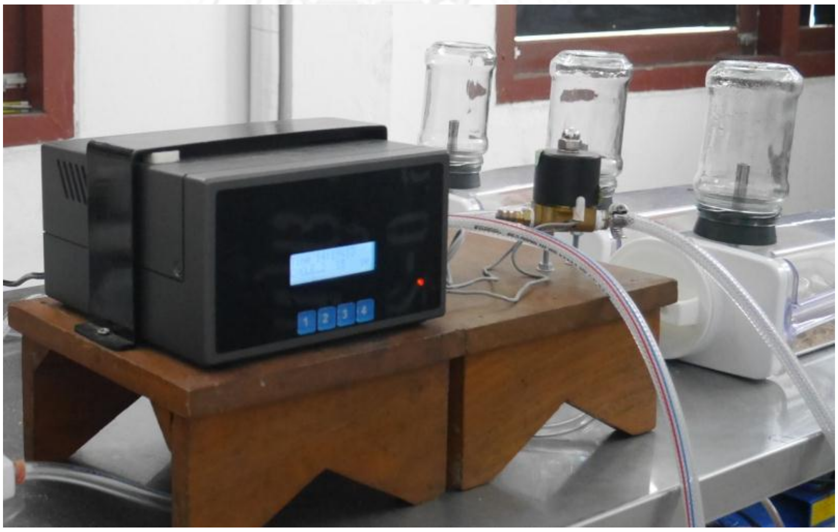
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 3.1 แสดงสถานที่ในการเลี้ยงสัตว์หนูแรทในการศึกษา และสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia

ภาพที่ 3.2 แสดงกรงที่ใช้ในการเลี้ยงหนูแรทในงานวิจัย



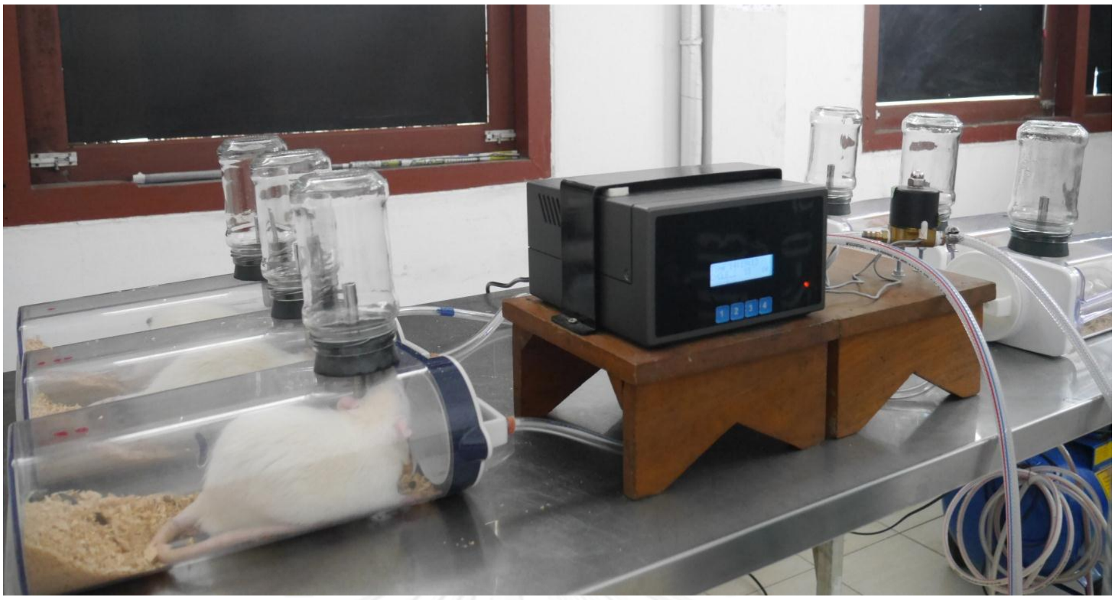
ภาพที่ 3.3 แสดงอุปกรณ์ในการสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia



ภาพที่ 3.4 แสดงอุปกรณ์ในการควบคุมการจ่ายก๊าซอัตโนมัติในการสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia

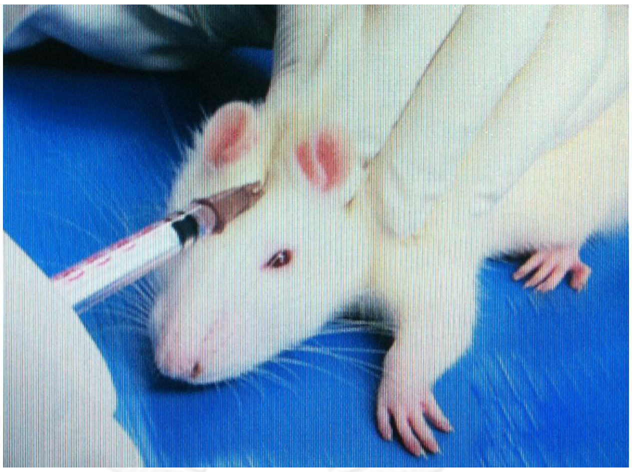
ภาพที่ 3.5 แสดงอุปกรณ์อัดก๊าซออกซิเจน 21 เปอร์เซนต์ ในการสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia

ภาพที่ 3.6 แสดงถังก๊าซไนโตรเจนพร้อมหัวควบคุม ในการสร้างแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia

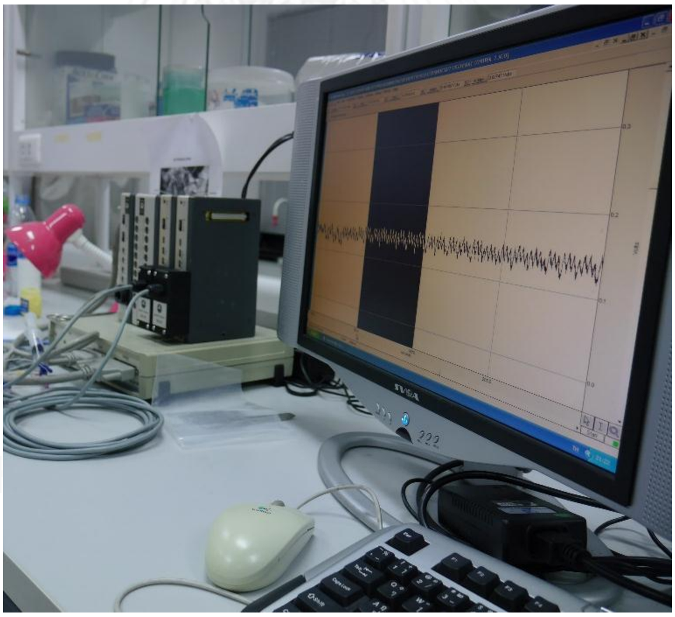


ภาพที่ 3.7 แสดงการทดลองหนูแรทในกลุ่ม chronic intermittent hypoxia

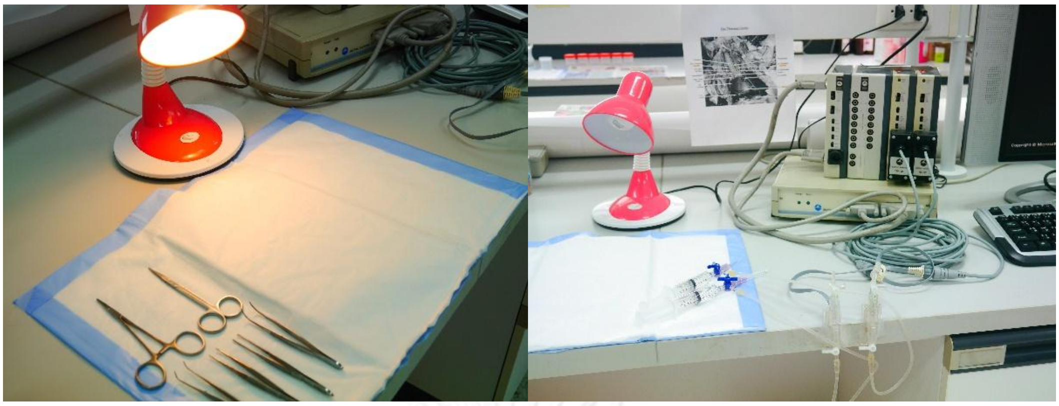
ภาพที่ 3.8 แสดงการทำแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia ในช่วงกลางวัน (light phase) ในระบบปิด (จำลองช่วงนอนหลับของหนูแรท)



ภาพที่ 3.9 แสดงวิธีการฉีดยา etanercept และน้ำเกลือทาง subcutaneous route ในหนูแรทกลุ่มทดลอง



ภาพที่ 3.10 แสดงอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และเครื่องมือที่ติดตั้งโปรแกรมในการวัดค่าความดันในการศึกษาทางระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study)

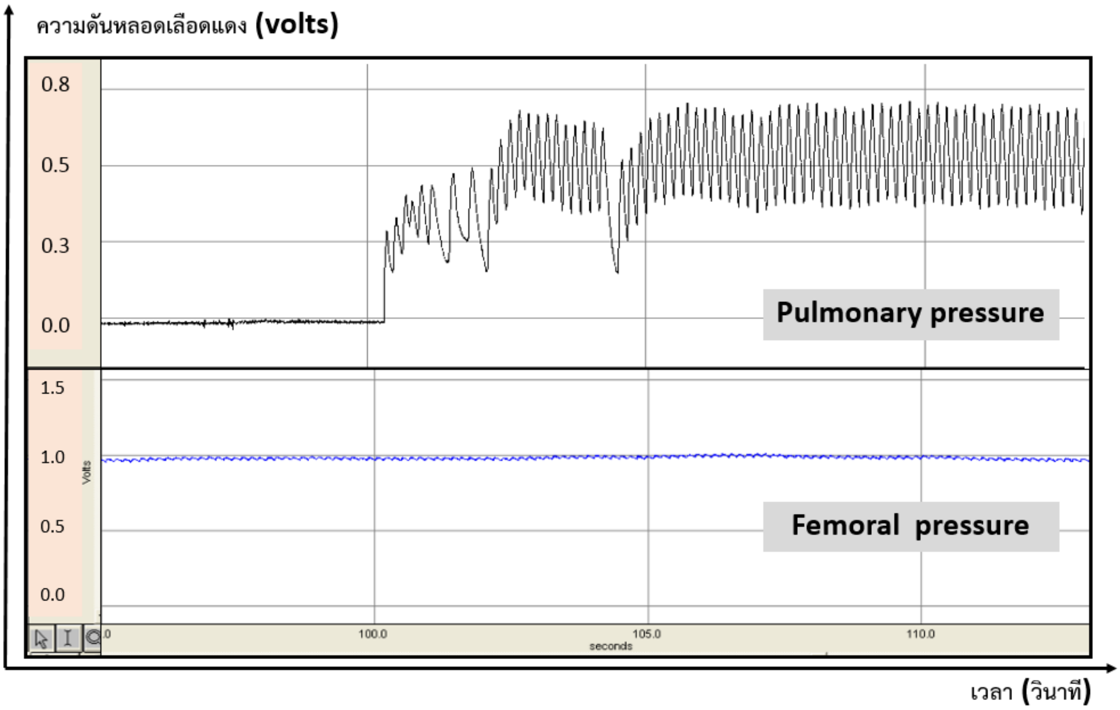


ภาพที่ 3.11 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าของระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study)

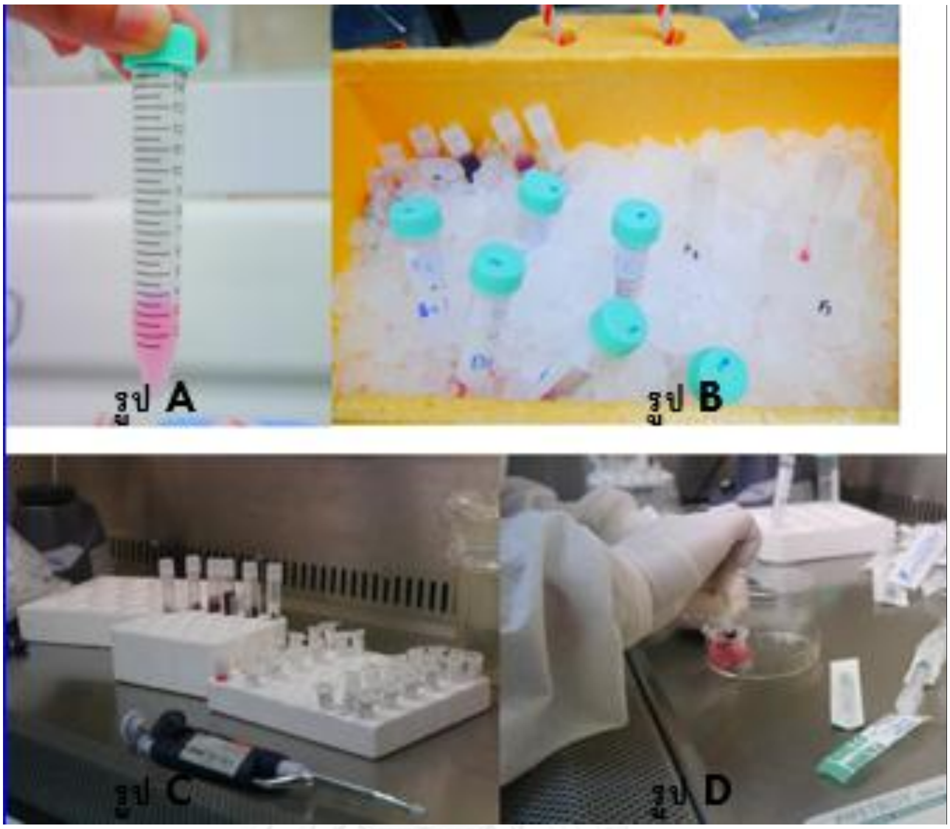
รูป A   รูป B

ภาพที่ 3.12 แสดงการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study) : รูป A แสดงการใส่สายทาง femoral artery เพื่อวัดความดันโลหิตขณะทำการศึกษา และรูป B แสดงเทคนิค subxiphoid approach โดยการแทงเข็มเพื่อวัดความดันในหลอดเลือดแดงปอด

ภาพที่ 3.13 แสดงวิธีการศึกษาระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study)

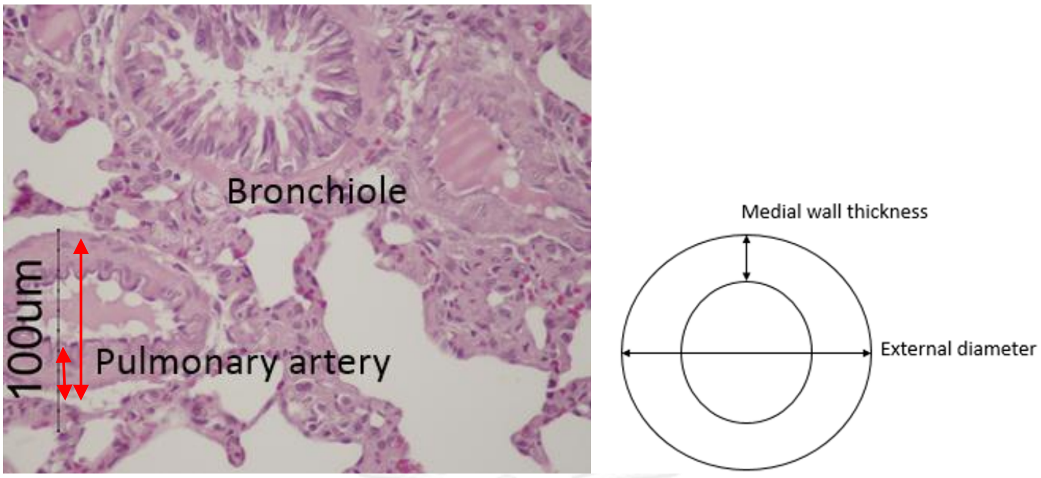


ภาพที่ 3.14 แสดงกราฟของค่าความดันในหลอดเลือดแดงปอด เทียบกับความดันโลหิตที่วัดทาง femoral artery (arterial blood pressure) โดยแกน X แทนเวลา (หน่วยเป็นวินาที), แกน Y แทนความดันหลอดเลือดแดง (หน่วยเป็น volts ซึ่ง 1 volts เท่ากับ 100 มิลลิเมตรปรอท)

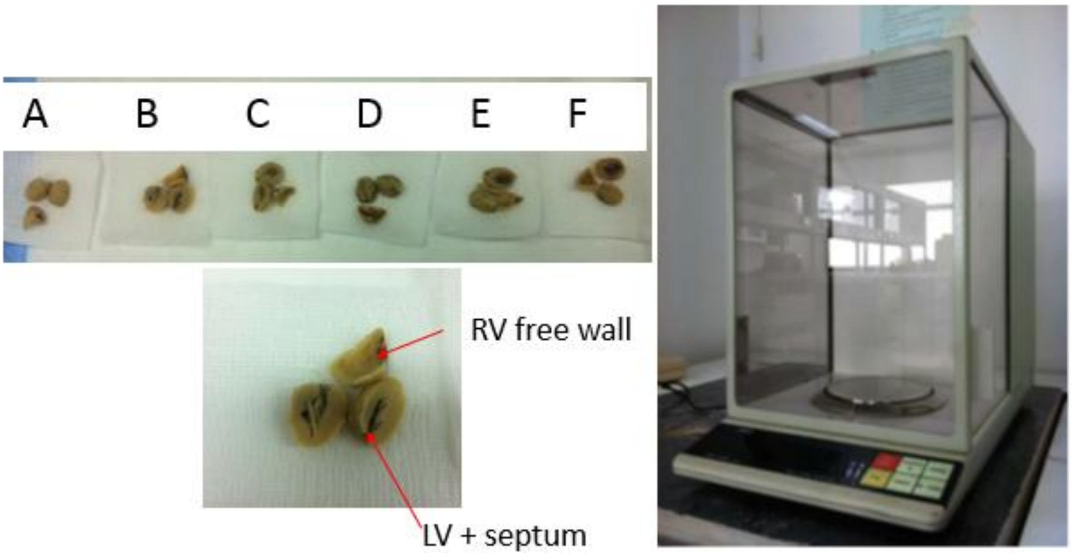


ภาพที่ 3.15 แสดงการเก็บสิ่งส่งตรวจทาง inflammation (inflammatory study) : รูป A แสดงน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ, รูป B แสดงการเก็บรักษาเลือดและชิ้นเนื้อในกระติกน้ำแข็ง, รูป C แสดงการปั่นแยกซีรั่ม, รูป D แสดงการบดชิ้นเนื้อปอดก่อนแยกเป็นเซลล์เนื้อปอด (lung cell) และน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 3.16 แสดงการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด (ขนาด 50-100 ไมครอน)



ภาพที่ 3.17 แสดงการวัดความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) โดยดูจากอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่างทั้งสองห้อง ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักที่มีความละเอียดที่จุดทศนิยม 4 หลัก

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาครั้งนี้ มีหนูแรทเพศผู้ อายุ 7 สัปดาห์ ที่ใช้ในการวิจัยจำนวนทั้งหมด 30 ตัว และหนูแรทเพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 6 ตัว ซึ่งหนูแรททุกตัวได้รับการเลี้ยงดูที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยผู้วิจัยได้ผ่านการอบรมการใช้สัตว์ทดลองเพื่อการศึกษาวิจัยจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนเริ่มการวิจัยการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และได้รับการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee, CU-ACUC) ตามเลขที่ใบรับรอง 13/55

ผลการวิเคราะห์

จากการสุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ จำนวน 6 ตัว มาวัดความดันในหลอดเลือดแดงปอด เพื่อเป็นตัวแทนของข้อมูลเบื้องต้นก่อนที่จะเริ่มทำการศึกษาจริง ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มหนูแรทดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยความดันโลหิตในหลอดเลือดแดงปอด โดยวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) เท่ากับ 16.16±2.15 มิลลิเมตรปรอท, ค่าเฉลี่ยความดันโลหิต (arterial blood pressure) เท่ากับ 98±2 มิลลิเมตรปรอท และค่าเฉลี่ยอัตราการเต้นของหัวใจเท่ากับ 380±12 ครั้งต่อนาที ซึ่งข้อมูลดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ปกติ แสดงว่าหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติเป็นหนูแรทที่ไม่มีความผิดปกติก่อนเริ่มการศึกษา

จากการศึกษาพบว่ากลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley จำนวนทั้งหมด 30 ตัว สามารถอยู่ร่วมการวิจัยจนสิ้นสุดการศึกษาได้ น้ำหนักตัวพื้นฐานของหนูแรทก่อนเริ่มการศึกษาในแต่ละกลุ่มการศึกษาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.056) แต่มีแนวโน้มว่ากลุ่มหนูแรท CIH จะมีน้ำหนักลดลงในช่วงสัปดาห์แรกของการศึกษา จากการปรับตัวกับภาวะ chronic intermittent hypoxia จากนั้นน้ำหนักตัวจึงค่อยๆเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการศึกษาเป็นต้นไป แสดงว่ากลุ่มหนูแรท CIH ไม่ได้มีอาการป่วยระหว่างที่ทำการศึกษา และสุดท้ายมีน้ำหนักตัวก่อนเริ่มการศึกษาทางระบบไหลเวียนโลหิต ในกลุ่ม

หนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 375±29, 371±28, 420±21, 415±22, 422±14 กรัม ตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.001)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study)พบว่า

- ค่าเฉลี่ยของความดันโลหิตในหลอดเลือดแดงปอดซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) ในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 52.07±6.15, 55.44±4.30, 23.09±3.97, 22.80±9.76, 22.53±8.51 มิลลิเมตรปรอท ตามลำดับ (ค่า p-value น้อยกว่า 0.001) โดยกลุ่มที่แตกต่าง คือ กลุ่มหนูแรท CIH ทั้งที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา etanercept มีค่าเฉลี่ยของความดันโลหิตในหลอดเลือดแดงปอดมากกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia และกลุ่มหนูแรทปกติ
- ค่าเฉลี่ยความดันโลหิต (arterial blood pressure) ในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 102±16, 103±11, 95±4, 98±5, 97±5 มิลลิเมตรปรอท ตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.501)
- ค่าเฉลี่ยอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate) ในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 370±18, 375±8, 358±10, 364±17, 356±10 ครั้งต่อนาที ตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.091)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด (histopathological study) พบว่า

- ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์ความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน ในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 16.99±2.12, 19.89±2.10, 13.13±1.45, 14.47±3.34, 14.36±3.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.001) กลุ่มที่แตกต่างคือ กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับน้ำเกลือ มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์ความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอด

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอนมากกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia และกลุ่มหนูแรทปกติ

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) พบว่า ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่างทั้งสอง ในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 0.22±0.01, 0.22±0.02, 0.14±0.01, 0.16±0.01, 0.15±0.03 ตามลำดับ (ค่า p-value น้อยกว่า 0.001) กลุ่มที่แตกต่างคือ กลุ่มหนูแรท CIH ทั้งที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา etanercept มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่างทั้งสองมากกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia และกลุ่มหนูแรทปกติ

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells) พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด โดยนับเป็นจำนวน neutrophils และ macrophage รอบๆหลอดเลือดแดงปอด ในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 1±1, 2.33±0.29, 0.33±0.58, 0.33±0.58, 1±0.5 เซลล์ต่อเส้นเลือด ตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.018)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทาง inflammation (inflammatory study) พบว่า

- ค่าเฉลี่ยของระดับ TNF-α ในเลือดของในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 1.93±0.90, 3.21±0.79, 3.16±1.60, 3.05±1.43, 2.77±1.33 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
- ค่าเฉลี่ยของระดับ TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) ของกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 4.33±1.51, 7.05±2.47, 4.62±1.17, 4.04±1.81, 3.61±1.41 พิโคกรัมต่อ

มิลลิลิตร ตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.018) กลุ่มที่แตกต่าง กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept มีค่าสูงกว่ากลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูควบคุม normoxia และกลุ่มหนูปกติ โดยพบว่าระดับ TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) มีค่าสูงกว่าระดับ TNF-α ทั้งในเลือดในทุกกลุ่มการศึกษา

- ค่าเฉลี่ยของระดับ IL-6 ในเลือดของกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 47.37±6.46, 52.14±4.51, 46.35±8.04, 45.78±8.63, 52.73±7.72 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.314)
- ค่าเฉลี่ยของระดับ NF-kB activity ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) โดยวัดจากค่า phosphorylated RelA/NFkB p65 (normalized RFUs) ของกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 420.94±133.45, 322.40±98.64, 196.01±144.84, 154.53±117.59, 203.63±82.15 normalized RFUs (ค่า p-value เท่ากับ 0.005) กลุ่มที่แตกต่างคือ กลุ่มหนูแรท CIH ทั้งที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา etanercept มีค่าเฉลี่ยของระดับ NF-kB activity มากกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia และกลุ่มหนูแรทปกติ

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ hypoxia inducible factor (HIF-1) ในซลล์เนื้อปอด (lung cell) ของกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 8.01±0.09, 8.08±0.34, 7.51±0.63, 7.54±0.74, 6.85±0.60 ไมโครกรัม ตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.004) กลุ่มที่แตกต่างคือ กลุ่มหนูแรท CIH และกลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia ทั้งที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา etanercept มีค่าเฉลี่ยของระดับ hypoxia inducible factor (HIF-1) ในเนื้อปอดมากกว่าและกลุ่มหนูแรทปกติ

ผลการศึกษาระดับระดับก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas analysis) พบว่า

- ค่าเฉลี่ยของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในเลือดแดง (partial pressure of CO_2 in arterial blood; $PaCO_2$) ของกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่

ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 41.57±2.99, 39.53±5.68, 44.93±0.60, 40.37±1.27 และ 36.35±2.05 มิลลิเมตรปรอท ตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.123)

- ค่าเฉลี่ยของก๊าซออกซิเจนในเลือดแดง (partial pressure of O_2 in arterial blood; PaO_2) ในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ เท่ากับ 100.73 ±8.25, 97.43±5.43, 89.13±3.90, 85.63±6.90 และ 97.15±14.78 มิลลิเมตรปรอทตามลำดับ (ค่า p-value เท่ากับ 0.183)

ผลการเปรียบเทียบ

จากการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มหนูแรททั้งหมด 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ได้รับยา etanercept, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรทปกติ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต ในส่วนของค่าเฉลี่ยของความดันในหลอดเลือดแดงปอดซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP), การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดในส่วนของค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์ความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน และความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy), การเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับinflammation ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells) ซึ่งวัดเป็นจำนวน neutrophils และ macrophage รอบๆหลอดเลือดแดงปอด, ระดับ TNF-α ในเลือดและในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) รวมทั้ง NF-kB activity ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) และ hypoxic inducible factor-1 (HIF-1) ในเซลล์เนื้อปอด (lung cell) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. **ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต** พบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ทั้งที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา etanercept มีค่าเฉลี่ยของความดันโลหิตในหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) สูงกว่ากลุ่มหนูควบคุม normoxia และกลุ่มหนูปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value น้อยกว่า 0.001) แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มหนู CIH ที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา etanercept (ค่า p- values เท่ากับ 0.45)

2. **ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา** พบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept มีเปอร์เซนต์ความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอนมากกว่ากลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.038) และมากกว่ากลุ่มหนูควบคุม normoxia ที่ได้รับยา etanercept, ไม่ได้รับยา etanercept และหนูแรทปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value น้อยกว่า 0.001, เท่ากับ 0.001 และ เท่ากับ 0.001 ตามลำดับ)

3. **ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวา**ของกลุ่มหนูแรท CIH ทั้งที่ได้ยาและไม่ได้รับยา etanercept มีค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของน้ำหนักผนังหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักผนังหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่างทั้งสองสูงกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia และกลุ่มหนูปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value น้อยกว่า 0.001) แต่เมื่อเทียบระหว่างกลุ่มหนูแรท CIH ทั้งที่ได้ยาและไม่ได้รับยา etanercept พบว่ามีค่าใกล้เคียง ไม่แตกต่างกัน (ค่า p-value เท่ากับ 0.793)

4. **ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทาง perivascular inflammation** พบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept มีจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia และกลุ่มหนูแรทปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.018) และเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยาและไม่ได้รับ etanercept พบว่ากลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept มีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.045)

5. **ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทาง inflammation** พบว่าระดับ TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) มีแนวโน้มสูงกว่าระดับ TNF-α ในเลือด โดยพบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept มีค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α ในเลือดน้อยกว่าในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.02) และ กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept มีค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) น้อยกว่าในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.01) นอกจากนั้นยังพบว่า

ค่าเฉลี่ย NF-kB activity ซึ่งวัดเป็นค่า phosphorylated RelA/NFkB p65 ในกลุ่มหนูแรท CIH ทั้งที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา etanercept มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value เท่ากับ 0.04) แต่ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มหนูแรทปกติและไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มหนูแรท CIH ทั้งได้รับยาและไม่ได้รับยา etanercept (ค่า p-value เท่ากับ 0.08) ส่วน hypoxic inducible factor-1 (HIF-1) มีแนวโน้มสูงขึ้นในกลุ่มหนูแรท CIH และกลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia มากกว่ากลุ่มหนูแรทปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p-value น้อยกว่า 0.001) โดยพบว่ากลุ่มหนูแรท CIH มีค่าเฉลี่ยของระดับ HIF-1 ใกล้เคียงกับหนูแรทกลุ่มควบคุม normoxia และไม่มีความแตกต่างในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยาและไม่ด้รับยา etanercept (ค่า p-value เท่ากับ 0.3)

6. **การศึกษาความสัมพันธ์ค่าเฉลี่ยของระดับ TNF-α และ NF-kB ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension)** กับการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดปอดและการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vasculature) พบว่าค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอดและความดันหลอดเลือดแดงปอด วัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) มีความสัมพันธไปในทางบวก โดยเมื่อค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α มากขึ้น คา RVSP มีแนวโนมเพิ่มขึ้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (ค่า r) เท่ากับ 0.414 (ค่า p-value เท่ากับ 0.023) ในส่วนของค่าเฉลี่ยระดับ NF-kB ในน้ำจากการบดเนื้อปอด มีความสัมพันธ์ไปในทางบวกกับค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอดและค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของน้ำหนักผนังหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักผนังหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่างทั้งสอง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (ค่า r) เท่ากับ 0.584 (ค่า p-value เท่ากับ 0.001) และ 0.494 (ค่า p-value เท่ากับ 0.008) ตามลำดับ ซึ่งมีความสัมพันธ์มากกว่าค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด

ผลการวิเคราะห์ปัจจัย

1. **สภาวะ chronic intermittent hypoxia (CIH)** ทำให้หนูแรทเกิดการเปลี่ยนแปลงในด้านต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังต่อไปนี้

- เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต พบว่าค่าเฉลี่ยความดันโลหิตในหลอดเลือดแดงปอด โดยวัดจาก right ventricular systolic pressure (RVSP) มีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p-value น้อยกว่า 0.001
- เกิดการเปลี่ยนแปลงของพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด ในส่วนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอนเพิ่มขึ้น โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.009
- เกิดการเปลี่ยนแปลงของพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด ในส่วนของค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่างทั้งสองเพิ่มขึ้น โดยมีค่า p-value น้อยกว่า 0.001
- เกิดการเปลี่ยนแปลงของ perivascular inflammation โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดง (perivascular inflammatory cells) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.005
- เกิดการเปลี่ยนแปลงของ inflammation โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ย TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอดสูงมีแนวโน้มสูงกว่าค่าเฉลี่ย TNF-α ในเลือด และค่าเฉลี่ย TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอดสูงในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้ยา etanercept สูงกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia ที่ไม่ได้ยาและกลุ่มหนูแรทปกติ อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.016 และเกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนของ NF-kB activity ในน้ำจากการบดเนื้อปอด โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.04
- เกิดการเปลี่ยนแปลงของ hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) ในเซลล์เนื้อปอด (lung cell) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.008

2. **การได้รับยา etanercept ของหนูแรทในกลุ่ม CIH** มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในผลการศึกษาดังต่อไปนี้

- เกิดการเปลี่ยนแปลงของพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด ในส่วนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน มีแนวโน้มลดลงต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value เท่ากับ 0.019)

ส่วนค่าเฉลี่ยความดันโลหิตในหลอดเลือดแดงปอด โดยวัดจาก right ventricular systolic pressure (RVSP) มีแนวโน้มลดลง ในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้ยา etanercept เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้ยา etanercept แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value เท่ากับ 0.1475)

- เกิดการเปลี่ยนแปลงของ perivascular inflammation โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดง (perivascular inflammatory cells) ลดลงในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value เท่ากับ 0.045)
- เกิดการเปลี่ยนแปลงของ inflammatory cytokines ในส่วนของระดับ TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) และ TNF-α ในเลือดมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต (p-value เท่ากับ 0.02 และ 0.01 ตามลำดับ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

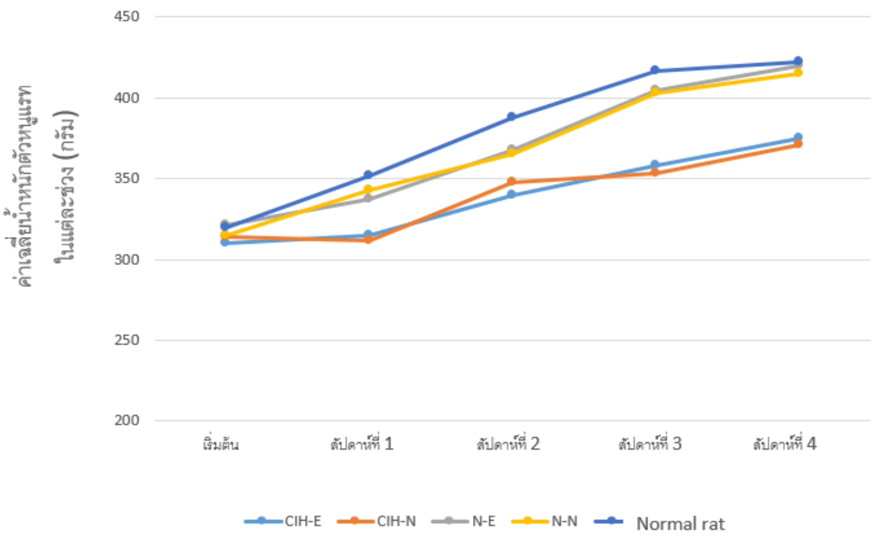
ตารางที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวหนูแรทในแต่ละกลุ่มขณะทำการศึกษาในช่วงเวลาต่างๆ

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ที่ระยะเวลาต่างๆ หน่วยเป็นกรัม (mean±SD)	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม Normal rat	P value
ก่อนเริ่มการศึกษา (ขณะอายุ 8 สัปดาห์)	310±3	314±9	321±9	315±6	320±3	0.056
สัปดาห์ที่ 1	315±13	312±22	348±14	343±8	352±5	0.000*
สัปดาห์ที่ 2	340±25	337±30	368±9	365±15	388±2	0.001*
สัปดาห์ที่ 3	358±28	353±28	405±19	403±18	417±3	0.000*
สัปดาห์ที่ 4	375±29	371±28	420±21	415±22	422±14	0.001*

*p-value < 0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติ (มีอย่างน้อย 1 คู่ที่ต่างกัน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แผนภูมิที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวหนูแรทในแต่ละกลุ่มขณะทำการศึกษาในช่วงเวลาต่างๆ



หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของระบบไหลเวียนโลหิตพื้นฐานในตัวแทนหนูแรทอายุ 8 สัปดาห์ (baseline hemodynamic studies)

การศึกษา	ค่าเฉลี่ย (mean±SD)
ความดันในหลอดเลือดแดงปอด (วัดเป็น RVSP หน่วยมิลลิเมตรปรอท)	16.16±2.15
ความดันโลหิต (มิลลิเมตรปรอท)	98±2
อัตราการเต้นของหัวใจ (ครั้งต่อนาที)	380±12

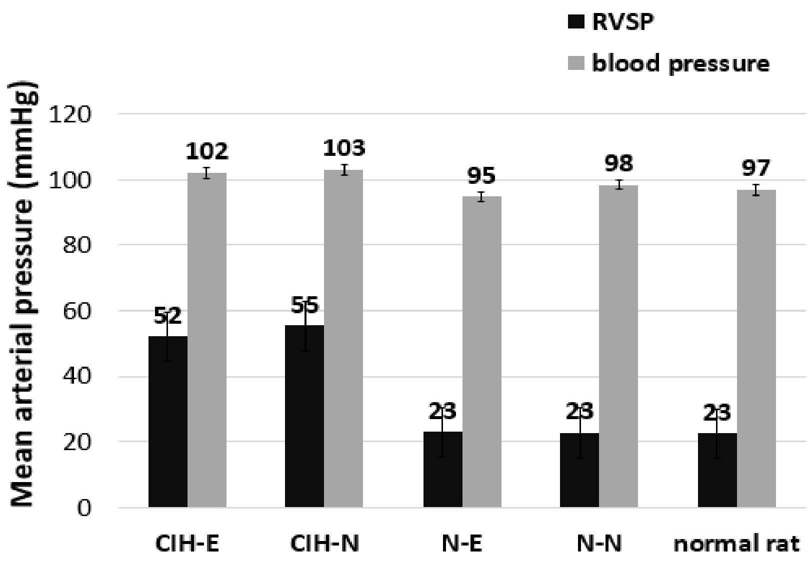
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic studies)

การเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต (mean±SD)	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม Normal rat	P value
ความดันในหลอดเลือดแดงปอด (วัดเป็น RVSP หน่วยมิลลิเมตรปรอท)	52.07±6.15	55.44±4.30	23.09±3.97	22.80±9.76	22.53±8.51	< 0.001*
ความดันโลหิต (มิลลิเมตรปรอท)	102±16	103±11	95±4	98±5	97±5	0.501
อัตราการเต้นของหัวใจ (ครั้งต่อนาที)	370±18	375±8	358±10	364±17	356±10	0.091

*p-value < 0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติ (มีอย่างน้อย 1 คู่ที่ต่างกัน)

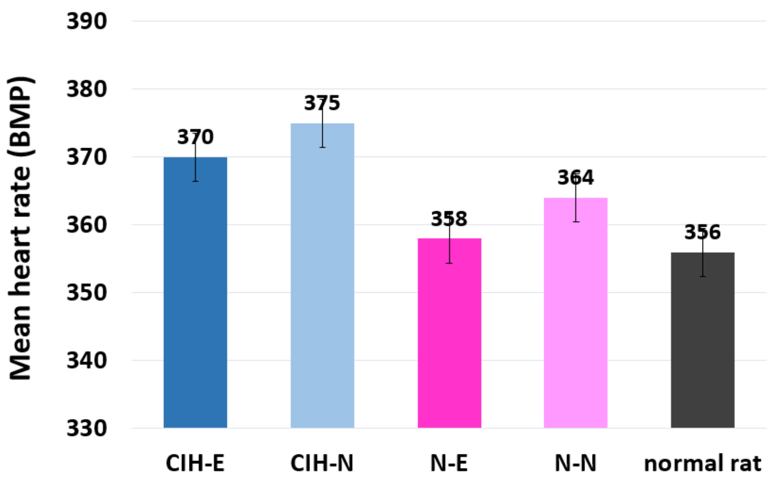
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แผนภูมิที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด (วัดเป็น RVSP) และค่าเฉลี่ยความดันโลหิต (หน่วยเป็นมิลลิเมตรปรอท)



หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

แผนภูมิที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยอัตราการเต้นของหัวใจ (หน่วยเป็นครั้งต่อนาที)



หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

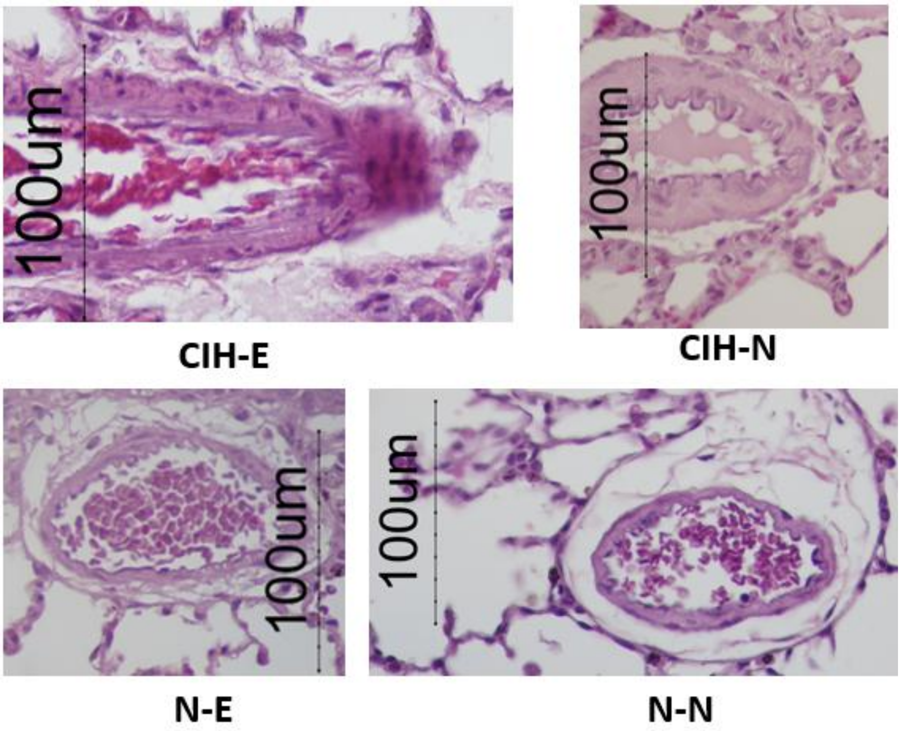
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและความหนาตัวของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา (histopathological studies)

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและความหนาตัวของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา (mean±SD)	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม Normal rat	P value
เปอร์เซนต์ความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดง (ขนาด 50-100 ไมครอน)	16.99±2.12	19.89±2.10*	13.13±1.45*	14.47±3.34*	14.36±3.43*	0.001*
อัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่าง	0.22±0.01	0.22±0.02	0.14±0.01	0.16±0.01	0.15±0.03	< 0.001*

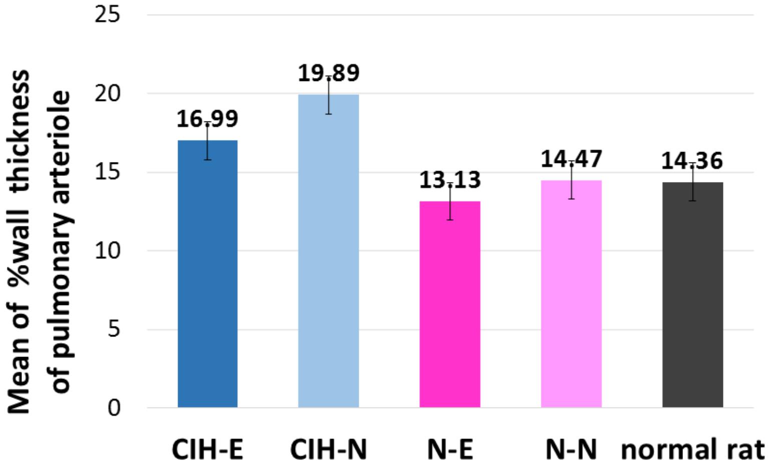
*p-value < 0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติ (มีอย่างน้อย 1 คู่ที่ต่างกัน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.1 แสดงหลอดเลือดแดงปอดขนาด 50-100 ไมครอน โดยการย้อมด้วย hematoxylin และ eosin stain ของหนูแรทในแต่ละกลุ่ม

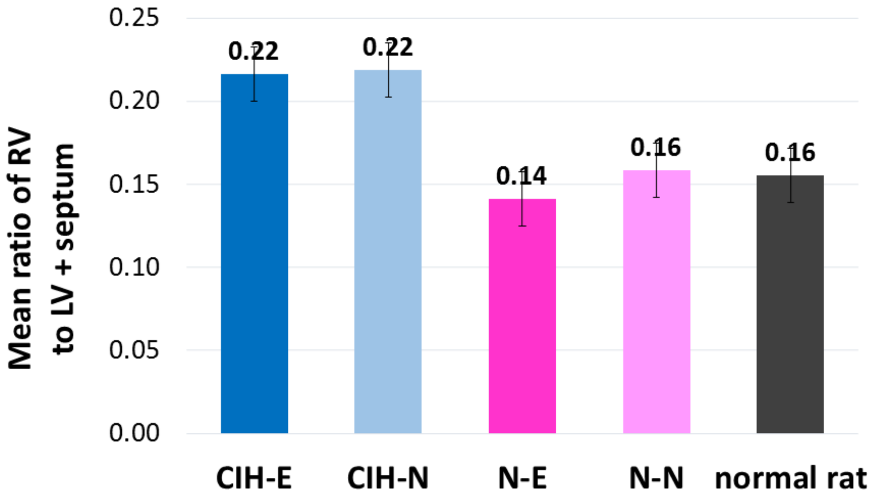


แผนภูมิที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์ความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดง (ขนาด 50-100 ไมครอน)



หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

แผนภูมิที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่าง



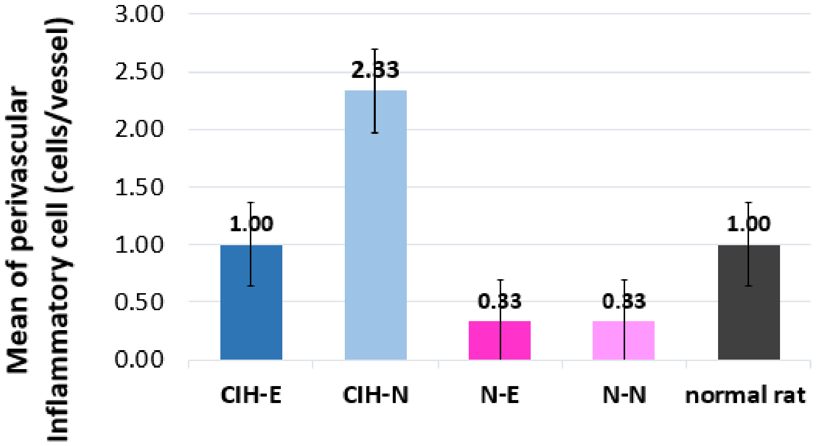
หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells)

การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆ หลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammation) (mean±SD)	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา Etanercept	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา Etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ได้รับยา Etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ไม่ได้รับยา Etanercept	กลุ่ม Normal rat	P value
จำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (เซลล์ต่อเส้นเลือด)	1±1	2.33±0.29*	0.33±0.58*	0.33±0.58 *	1±0.5	0.018*

แผนภูมิที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammatory cells) หน่วยเป็นจำนวนเซลล์ต่อหลอดเลือด



หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

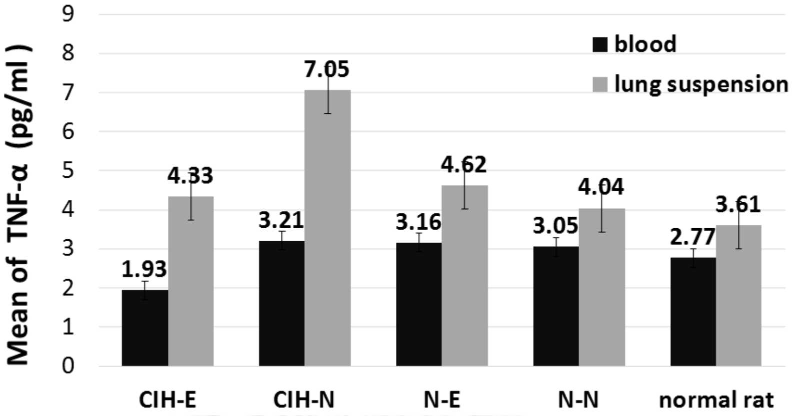
ตารางที่ 4.6 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับ inflammation ในเลือดและเนื้อปอด

การเปลี่ยนแปลงของ inflammatory cytokines ในเลือดและเนื้อปอด (mean±SD)	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม Normal rat	P value
ค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α ในเลือด (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.93±0.90	3.21±0.79	3.16±1.60	3.05±1.43	2.77±1.33	0.398
ค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด หรือ lung suspension (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	4.33±1.51	7.05±2.47*	4.62±1.17	4.04±1.81	3.61±1.41*	0.018*
ค่าเฉลี่ยระดับ IL-6 ในเลือด (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	47.37±6.46	52.14±4.51	46.35±8.04	45.78±8.63	52.73±7.72	0.314
ค่าเฉลี่ยระดับ NF-kB ในน้ำจากการบดเนื้อปอด หรือ lung suspension (normalized RFUs)	420.9±133.5	322.4±98.6	196.0±144.8	154.5±117.6	203.6±82.2	0.005*
ค่าเฉลี่ยระดับHIF-1 ในเซลล์เนื้อปอด หรือ lung cell (ไมโครกรัม)	8.01±0.09	8.08±0.34	7.51±0.63	7.54±0.74	6.85±0.60*	0.004*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

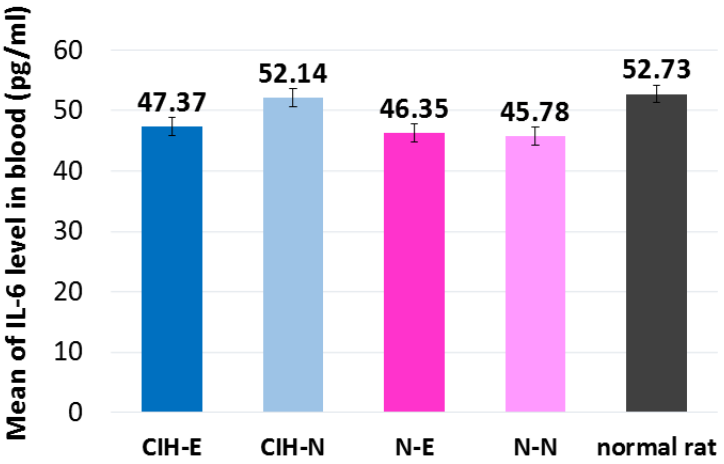
*p-value < 0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติ (มีอย่างน้อย 1 คู่ที่ต่างกัน)

แผนภูมิที่ 4.7 แสดงค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α ในเลือดและในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension)



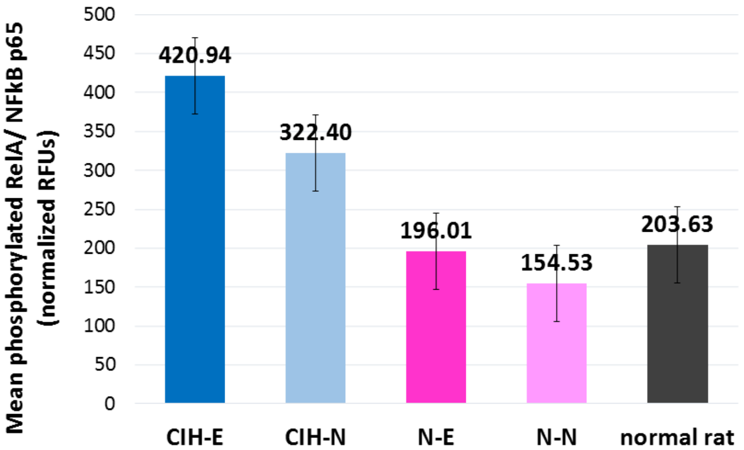
หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

แผนภูมิที่ 4.8 แสดงค่าเฉลี่ยระดับ IL-6 ในเลือด



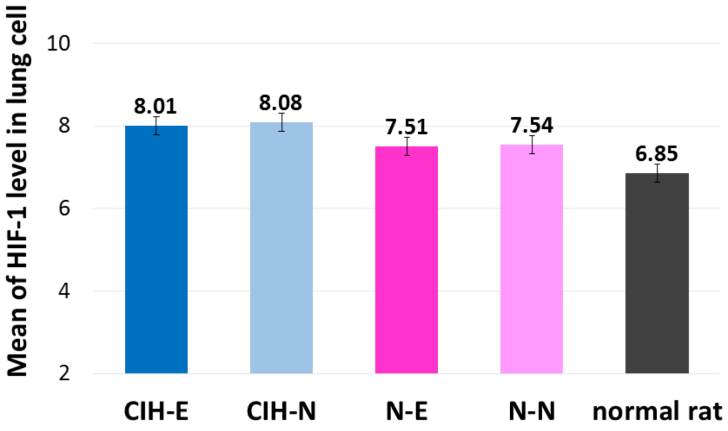
หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

แผนภูมิที่ 4.9 แสดงค่าเฉลี่ยของ NF-kB activity ใน lung suspension ซึ่งวัดจากค่า phosphorylated RelA/NFkB p65 (normalized RFUs)



หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

แผนภูมิที่ 4.10 แสดงค่าเฉลี่ยระดับ hypoxic inducible factor-1 (HIF-1) ในเซลล์เนื้อปอด หรือ lung cell



หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

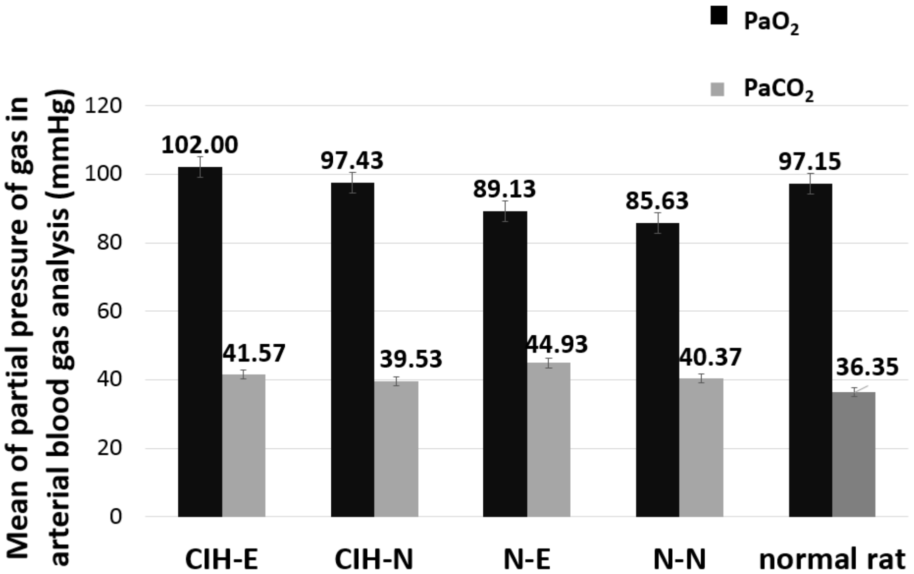
ตารางที่ 4.7 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของก๊าซในเลือดแดง (arterial blood gas analysis)

ผล arterial blood gas analysis (mean±SD)	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept	กลุ่ม Normal rat	P value
ค่าเฉลี่ย pH	7.36±0.05	7.35±0.03	7.33±0.01	7.36±0.03	7.39±0.04	0.291
ค่าเฉลี่ย $PaCO_2$ (มิลลิเมตรปรอท)	41.57±2.99	39.53±5.68	44.93±0.60	40.37±1.27	36.35±2.05	0.123
ค่าเฉลี่ย PaO_2 (มิลลิเมตรปรอท)	100.73±8.25	97.43±5.43	89.13±3.90	85.63±6.90	97.15±14.78	0.183
ค่าเฉลี่ย HCO_3 (มิลลิโมลต่อลิตร)	24.03±0.55	24.50±1.04	24.57±0.35	24.17±0.96	22.70±3.39	0.613
ค่าเฉลี่ย Lactate (มิลลิโมลต่อลิตร)	1.8±1.0	2.3±0.3	1.6±0.3	1.3±0.6	1.4±0.6	0.346

*p-value < 0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติ (มีอย่างน้อย 1 คู่ที่ต่างกัน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แผนภูมิที่ 4.11 แสดงค่าเฉลี่ยของ partial pressure of CO_2 และ partial pressure O_2 in arterial blood



หมายเหตุ : CIH-E แทน etanercept-treated CIH-group, CIH-N แทน etanercept-untreated CIH-group, N-E แทน etanercept-treated normoxic-group, N-N แทน etanercept-untreated normoxic-group, normal แทน normal rat-group

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบในกลุ่มหนูแรท CIH, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูปกติ

รูปแบบการศึกษา	ผลการศึกษาต่างๆ เฉพาะกลุ่มที่ไม่ได้รับยา etanercept (mean±SD)	กลุ่ม CIH (n = 6)	กลุ่ม normoxia (n = 6)	กลุ่ม Normal rat (n = 6)	P value
การเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study)	ความดันในหลอดเลือดแดงปอด (วัดเป็น RVSP หน่วยมิลลิเมตรปรอท)	55.44±4.30*	22.8±9.76*	22.53±8.51*	<0.001*
	ความดันโลหิต (มิลลิเมตรปรอท)	103±11	98±5	97±5	0.35
	อัตราการเต้นของหัวใจ (ครั้งต่อนาที)	375±8	364±17	356±10	0.053
การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและความหนาตัวของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา (histopathological study or pulmonary vascular remodeling)	เปอร์เซนต์ความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดง (50-100ไมครอน)	19.89±2.1*	14.47±3.34*	14.36±3.43*	0.009*
	อัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่าง	0.22±0.02*	0.16±0.01*	0.15±0.03*	<0.001*
การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammation)	จำนวนเซลล์อักเสบต่อเส้นเลือดแดงปอด (เซลล์ต่อเส้นเลือด)	2.33±0.29*	0.33±0.58*	1±0.5*	0.005*

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบในกลุ่มหนูแรท CIH, กลุ่มหนูแรท normoxia ที่ไม่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูปกติ

รูปแบบการศึกษา	**ผลการศึกษาต่างๆ เฉพาะกลุ่ม ที่ไม่ได้รับยา etanercept (mean±SD)**	กลุ่ม CIH (n = 6)	กลุ่ม normoxia (n = 6)	กลุ่ม Normal rat (n = 6)	P value
การเปลี่ยนแปลงของ inflammatory cytokines ในเลือดและเนื้อปอด (inflammatory studies)	ค่าเฉลี่ย TNF-α ในเลือด (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	3.21±0.79	3.05±1.43	2.77±1.33	0.819
	ค่าเฉลี่ย TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด หรือ lung suspension (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	7.05±2.47*	4.04±1.81	3.61±1.41*	0.016*
	ค่าเฉลี่ยระดับ IL-6 ในเลือด (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	52.14±4.51	45.78±8.63	52.73±7.72	0.212
	ค่าเฉลี่ยระดับ NF-kB ในน้ำจากการบดเนื้อปอด หรือ lung suspension (normalized RFUs)	322.4±98.6*	154.5±117.6*	203.6±82.2	0.04*
	ค่าเฉลี่ยระดับHIF-1 ในเซลล์เนื้อปอด หรือ lung cell (ไมโครกรัม)	8.08±0.34*	7.54±0.74	6.85±0.6*	0.008*

*p-value < 0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติ และแสดงถึงคู่ที่ต่างกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept

รูปแบบการศึกษา	ผลการศึกษาต่างๆ เฉพาะในกลุ่ม CIH (mean±SD)	ได้รับยา Etanercept (n = 6)	ไม่ได้รับยา etanercept (n = 6)	P value (two-tailed)	P value (one-tailed)
การเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต (hemodynamic study)	ความดันในหลอดเลือดแดงปอด (วัดเป็น RVSP หน่วยมิลลิเมตรปรอท)	52.07±6.15	55.44±4.27	0.295	0.1475
	ความดันโลหิต (มิลลิเมตรปรอท)	102±16	103±11	0.911	0.45
	อัตราการเต้นของหัวใจ (ครั้งต่อนาที)	370±18	375±8	0.577	0.29
การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและความหนาตัวของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา (histopathological study or pulmonary vascular remodeling)	เปอร์เซนต์ความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดง (50-100ไมครอน)	16.99±2.12	19.89±2.10	0.038	0.019*
	อัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจล่าง	0.22±0.01	0.22±0.02	0.793	0.39
การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอด (perivascular inflammation)	จำนวนเซลล์อักเสบต่อเส้นเลือดแดงปอด (เซลล์ต่อเส้นเลือด)	1±1	2.33±0.29	0.09	0.045*

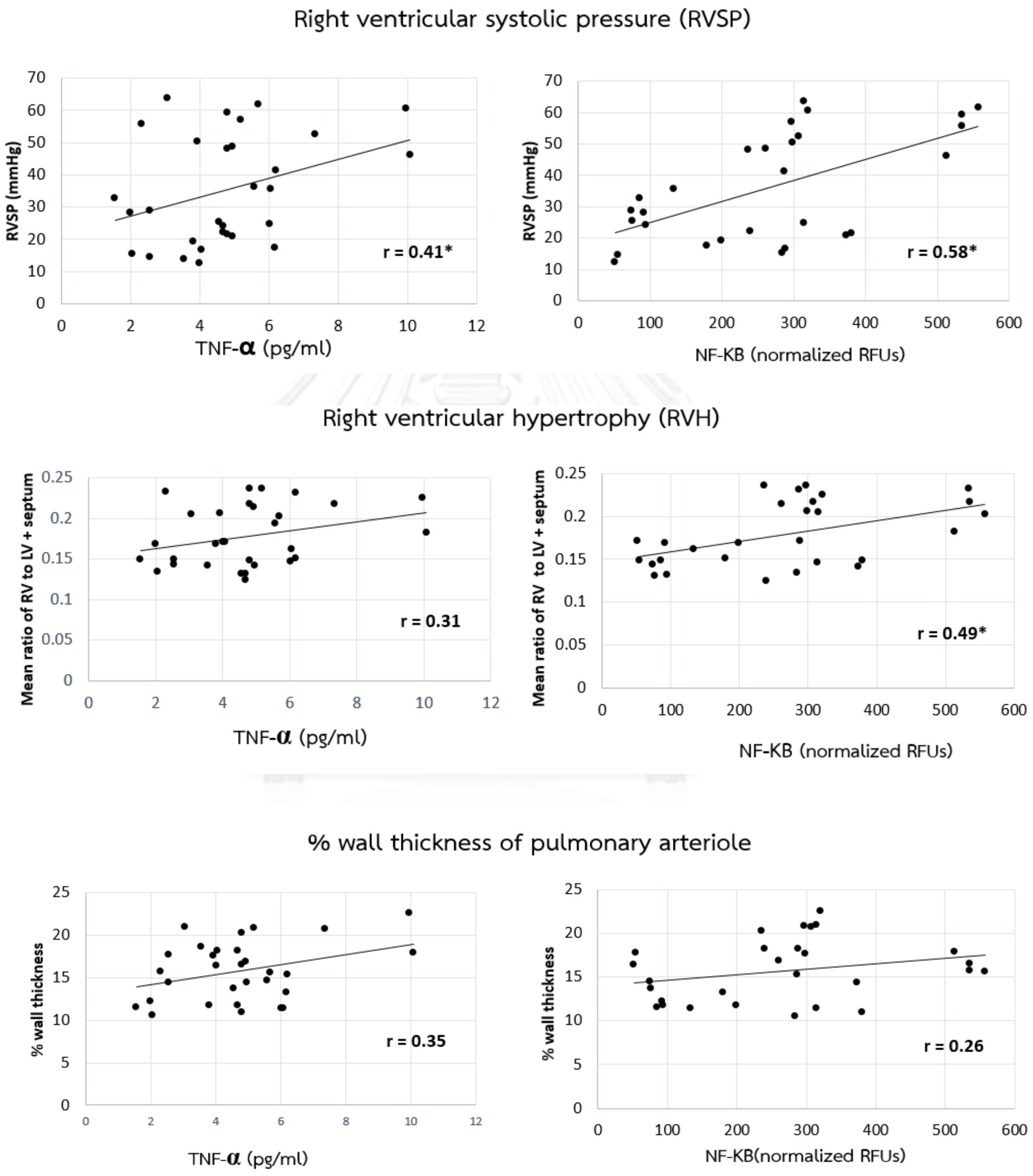
ตารางที่ 4.9 (ต่อ) แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา etanercept และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา etanercept

รูปแบบการศึกษา	ผลการศึกษาต่างๆ เฉพาะในกลุ่ม CIH (mean±SD)	ได้รับยา Etanercept (n = 6)	ไม่ได้รับยา etanercept (n = 6)	P value (two-tailed)	P value (one-tailed)
การเปลี่ยนแปลงของ inflammatory cytokines ในเลือดและเนื้อปอด (inflammatory studies)	ค่าเฉลี่ย TNF-α ในเลือด (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	1.93±0.91	3.21±0.79	0.027	0.01*
	ค่าเฉลี่ย TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด หรือ lung suspension (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	4.33±1.51	7.05±2.47	0.044	0.02*
	ค่าเฉลี่ยระดับ IL-6 ในเลือด (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	47.37±6.46	52.14±4.51	0.169	0.08
	ค่าเฉลี่ยระดับ NF-kB ในน้ำจากการบดเนื้อปอด หรือ lung suspension (normalized RFUs)	420.9±133.5	322.4±98.6	0.176	0.08
	ค่าเฉลี่ยระดับHIF-1 ในเซลล์เนื้อปอด หรือ lung cell (ไมโครกรัม)	8.01±0.09	8.08±0.34	0.634	0.30

*p-value (one-tailed) < 0.05 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

แผนภูมิที่ 4.12 แสดงการศึกษาคาสหสัมพันธระหวางค่าเฉลี่ยของระดับ TNF-α และ NF-kB activity ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) กับการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดปอดและการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vasculature)



*p-value (two-tailed) < 0.05 ตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาพบว่ากลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยการควบคุมระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์ทุกๆ 30 วินาทีในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องนาน 28 วันนั้น สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต คือ มีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งวัดเป็นค่า right ventricular systolic pressure (RVSP) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูควบคุม normoxia และกลุ่มหนูแรทปกติ, สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจห้องล่างขวา (pulmonary vascular remodeling) โดยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอนเพิ่มขึ้น, ความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวาเมื่อคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของผนังหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมน้ำหนักผนังหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างหัวใจห้องล่างทั้งสองเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนั้น ยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทาง inflammation โดยเฉพาะมีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α ทั้งในเลือดและในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าค่า TNF-α ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) มีค่ามากกว่าในเลือดอย่างชัดเจน อาจเป็นเพราะการเกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia นั้นส่งผลกระตุ้นการอักเสบให้เกิดพยาธิสภาพที่หลอดเลือดในปอดโดยตรง จึงทำให้ระดับ TNF-α ในเนื้อปอดมีค่ามากกว่าในเลือด สอดคล้องไปกับการเพิ่มขึ้นของเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน (perivascular inflammatory cells) รวมทั้งยังมีการเพิ่มขึ้นของ NF-kB activity ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) เช่นกัน แต่จากการศึกษานี้ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่า IL-6 ในเลือด

จากการศึกษายังพบว่ามีเปลี่ยนแปลงของ hypoxic inducible factor-1(HIF-1) ซึ่งเป็น adaptive pathway ต่อภาวะขาดออกซิเจน และมีการเพิ่มขึ้นของ HIF-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูแรทปกติ แสดงว่ากลุ่มหนูแรท CIH มีการตอบสนองต่อการเกิดภาวะขาดออกซิเจนที่เกิดขึ้นจริง และเมื่อตรวจระดับก๊าซในเลือดแดง พบว่าค่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซออกซิเจนในแต่ละกลุ่มการศึกษาอยู่ในเกณฑ์ปกติ และไม่มีความแตกต่างกัน โดยไม่พบว่ามีการคั่ง

ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 retention) ในกลุ่มหนูแรทที่เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia แสดงว่าผลการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระบบไหลเวียนโลหิต, การเกิด pulmonary vascular remodeling และการเปลี่ยนแปลงของระบบ inflammation นั้น เป็นผลจากการเกิดภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงๆ (intermittent hypoxia) ไม่ใช่ผลจากการขาดออกซิเจนถาวร (sustained hypoxia) และไม่ใช่ผลจากการมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงเป็นเวลานาน (hypercapnia)

เมื่อศึกษาผลของการให้ยา etanercept ซึ่งยับยั้ง TNF-α เทียบกับการให้น้ำเกลือ (normal saline) ซึ่งเป็นยาหลอกนั้น พบว่ายา etenercept ไม่สามารถลดความดันในหลอดเลือดแดงปอด แต่มีผลต่อ pulmonary vasculure คือ สามารถลดค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน โดยไม่มีผลต่อการลดความหนาตัวของหัวใจห้องล่างขวา ซึ่งวัดเป็นค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นไม่ระหว่างห้องหัวใจล่าง นอกจากนั้น จากการศึกษานี้ยังพบว่ายา etanercept สามารถลดจำนวนเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอดได้ (perivascular inflammatory cells) ควบคู่กับการลดค่าเฉลี่ยระดับ TNF-α ทั้งในเลือดและในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยระดับ NF-kB activity ในน้ำจากการบดเนื้อปอด (lung suspension), ระดับ IL-6 และ hypoxic inducible factor-1 (HIF-1)

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นงานวิจัยแรกที่ทำการศึกษาผลของยา etanercept ต่อการเปลี่ยนแปลงความดันในหลอดเลือดแดงปอด, การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดปอดและหัวใจ รวมทั้งการเกิด inflammation ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่มีภาวะ chronic intermittent hypoxia ซึ่งเป็นแบบจำลองการศึกษาที่เลียนแบบการเกิดทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับในคน ซึ่งทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงๆอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงสารอักเสบต่างๆ จนเกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอด และเกิดความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง (OSA/CIH induced pulmonary hypertension) ตามมา[3, 9, 10]

จากการประเมินผลของแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia โดยการตรวจระดับก๊าซในเลือดแดงนั้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ บ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นข้างต้นไม่ได้เกิดจากการคั่งของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือเกิดจากภาวะ

ขาดออกซิเจนถาวร ดังนั้นผู้วิจัยเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจึงมีความสอดคล้องกับการเกิดภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงในผู้ป่วยที่มีทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับ ตามพยาธิสรีระวิทยาพื้นฐานของ chronic intermittent hypoxia และทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตในหลอดเลือดแดงปอดสูงจริง

ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้ พบว่าสภาวะ chronic intermittent hypoxia ทำให้การเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต คือมีการเพิ่มขึ้นของ right ventricular systolic pressure (RVSP) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหัวใจและหลอดเลือด เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้[31] และจากการศึกษาถึงกระบวนการอักเสบ (inflammatory study) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอดเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นของสารอักเสบต่างๆโดยเฉพาะ TNF-α และ NF-kB activity จนเกิดการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจห้องขวา ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของระบบไหลเวียนโลหิต เกิดความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง สอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้ว่ากระบวนการอักเสบ (inflammation) มีผลต่อการเกิด vascular remodeling และทำให้เกิด cardiovascular complication ตามมา [3, 8-14] สำหรับ IL-6 ที่ไม่มีความแตกต่างในแต่ละกลุ่มการศึกษานั้น อาจเป็นเพราะการเกิด chronic intermittent hypoxia ในการศึกษานี้อาจไม่นานพอที่จะทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของ systemic inflammation และการเพิ่มขึ้นของ IL-6 ได้

ผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยพบว่ายา etanercept ไม่สามารถลดค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด แม้จะมีแนวโน้มว่าลดลง แต่มีผลต่อลดค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน ซึ่งเป็นหลอดเลือดปอดขนาดกลางและลดเซลล์อักเสบรอบๆหลอดเลือดแดงปอดขนาดกลางได้ ร่วมกับลดระดับ TNF-α ทั้งในเลือดและเนื้อปอด ซึ่งเป็นคำถามรอง (secondary research question) ของการวิจัยและเป็นการแสดงถึงผลของ etanercept ต่อการเปลี่ยนแปลงเฉพาะส่วนของหลอดเลือดแดงปอด โดยเฉพาะในส่วนของ local inflammation ส่วน NF-kB activity และ IL-6 นั้นไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มที่ได้รับยาและไม่ได้รับยา etanercept อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องมาจากยา etanercept มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ TNF-α โดยตรง ไม่ได้มีผลในการยับยั้ง NF-kB activity ซึ่งเป็น transcription factor ตั้งต้นในการสร้าง TNF-α และไม่มีผลในการยับยั้ง IL-6 เช่นกัน อาจเป็นเพราะ IL-6 เป็น proinflammatory cytokines ที่เกิดคนละส่วนกับ TNF-α และระดับ IL-6 อาจมีค่าไม่มากพอที่จะทำให้เห็นความแตกต่างภายหลังได้รับยา

ส่วน hypoxic inducible factor-1(HIF-1) ซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้นในกลุ่มหนูแรท chronic intermittent hypoxia เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูแรทปกติ แต่กลับมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia อาจเพราะสภาพแวดล้อมบางอย่างในการสร้างแบบจำลองกลางวัน-กลางคืน เช่น การคลุมด้วยถุงดำเพื่อป้องกันแสงแดดส่อง อาจมีผลให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนชั่วคราวในกลุ่มหนูแรทควบคุม normoxia จึงส่งผลให้ HIF-1 ซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้นได้ในหนูแรทกลุ่มควบคุม normaxia ส่วนการที่ค่า HIF-1 ที่ตรวจได้จากการศึกษานี้ มีค่าน้อยกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาอื่นๆ นั้น เนื่องจากผู้วิจัยไม่ได้ออกแบบการศึกษาเพื่อดูการตอบสนองของ CIH ผ่าน adaptive pathway คือ HIF-1 โดยตรง รวมทั้งอาจมีขั้นตอนในการตรวจ ที่ผู้วิจัยอาจไม่สามารถแยกส่วนของนิวเคียร์ส (nuclear extraction) เพื่อตรวจหา HIF-1 ได้อย่างสมบูรณ์ อาจจำเป็นต้องมีการออกแบบการศึกษาเพิ่มเติม หากต้องการศึกษาในส่วนของ HIF-1 ที่สัมพันธ์กับภาวะ chronic intermittent hypoxia ต่อไป

จากการศึกษาในแบบจำลอง monocroline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension ซึ่งเป็นการสร้างแบบจำลอง pulmonary arterial hypertension (PAH) พบว่า inflammation มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหัวใจและหลอดเลือดแดงปอด ทำให้เกิด pulmonary arterial hypertension (PAH) ได้ และเมื่อให้ยา etanercept ยับยั้งการอักเสบ สามารถที่จะป้องกันการเกิด PAH ได้[30]

จากการศึกษาของเอกฤทัยและคณะ [31] ซึ่งศึกษาผลของยา bosantan ในแบบจำลองหนูแรทที่อยู่ในภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับต่อเนื่องเรื้อรังนั้น พบว่ายา bosantan ซึ่งเป็น endothelin receptor antagonist ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออก endothelin-1 อันทำให้เกิด vasoconstrictor สามารถลดการเกิด pulmonary vascular remodeling และป้องกันการ pulmonary hypertension (PH) ในแบบจำลอง OSA/CIH induced PH ได้ ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่า vasoactive substances เป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิด endothelial dysfunction ในภาวะ chronic intermittent hypoxia ซึ่งคล้ายกับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย OSA

แตกต่างจากผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้ ที่พิสูจน์ให้เห็นว่า inflammation เป็นอีกหนึ่งกลไกที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ pulmonary vasculature โดยพบว่าภาวะ chronic intermittent hypoxia ทำให้เกิด inflammation โดยเฉพาะ local inflammation ของหลอดเลือดแดงปอด แต่การให้ยา etanercept ซึ่งเป็น selective pathway ในการยับยั้ง TNF-α มีผลลด local inflammation, ลดระดับ TNF-α, และยับยั้งการเกิด pulmonary vascular

remodeling โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในหลอดเลือดปอดขนาดกลางได้ แต่ไม่สามารถป้องกันการเกิด PH ในแบบจำลอง OSA/CIH induced PH ได้

ดังนั้นจากผลการศึกษานี้ ผู้วิจัยเห็นว่ายา etanercept ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบโดยเฉพาะการยับยั้ง TNF-α นั้น มีผลในการลด perivascular inflammation, มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอด แต่ไม่มีผลต่อความดันในหลอดเลือดแดงปอด เนื่องจากการเลือกยับยั้ง inflammatory selective pathway อาจไม่เพียงพอในการป้องกันการเกิด PH หรืออาจเป็นเพราะกระบวนการ inflammation ที่เกิดขึ้นในภาวะ chronic intermittent hypoxia โดยเฉพาะ TNF-α pathway อาจไม่ใช่กลไกหลักที่สำคัญกลไกเดียวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular remodeling) และทำให้เกิด OSA/CIH induced PH แต่กระบวนการเกิด inflammation ที่น่าสนใจอีกอันหนึ่งจากการศึกษานี้คือ NF-kB activity pathway ซึ่งพบว่ามีค่าสูงขึ้นและมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดปอดและการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vasculature) ดังนั้นหากมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของ inflammation โดยการยับยั้ง NF-kB activity pathway หรืออาจมีผลป้องกันการเกิด OSA/CIH induced PH ได้ เพื่อพัฒนาต่อยอดการรักษาในคนต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง และมีการให้ยา etanercept พร้อมๆกับการทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ดังนั้นต้องมีการศึกษาต่อยอดในแง่มุมอื่นๆ และมีการศึกษาวิจัยในคนต่อไป ซึ่งผู้วิจัยเสนอแนวทางดังต่อไปนี้

1. ควรมีการออกแบบงานวิจัยที่มีการเพิ่มระยะเวลาในการศึกษานานขึ้น เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของความดันหลอดเลือดแดงปอด การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจห้องล่างขวา การเปลี่ยนแปลงของ transcription factor และ inflammatory cytokines ต่างๆในแบบจำลอง chronic intermittent hypoxia ชัดเจนมากขึ้น และทำให้เห็นผลของยา etanercept ซึ่งเป็นยาที่ต้องใช้ระยะเวลานานในการออกฤทธิ์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด
2. แบบจำลอง chronic intermittent hypoxia ควรปรับให้สามารถวัดและควบคุมระดับก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจริงในขณะที่

สัตว์ทดลองอยู่ในกล่องระบบปิดขณะทำการศึกษา และควรมีการควบคุมระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้เสมือนจริง เช่น ใช้ก๊าซผสมระหว่าง 21% ของก๊าซออกซิเจน, 95% ซองก๊าซไนโตรเจนและ 5% ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น แต่ก็มีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายในการสร้างแบบจำลองดังกล่าว

3. รูปแบบการศึกษานี้เป็นการวัดผลการศึกษา ณ จุดหนึ่งของเวลา (cross-sectional study) จึงไม่สามารถบอกว่าปัจจัยใด หรือการเปลี่ยนแปลงใดเกิดขึ้นก่อนหรือหลังได้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในแต่ละช่วงของเวลา เช่น อาศัย non-invasive procedure ในการวัดผลการศึกษา หรือเพิ่มจำนวนประชากรในการศึกษา
4. มีอีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความดันในหลอดเลือดปอด เช่น ภาระที่เกิดขึ้นก่อนหัวใจระเริ่มหดตัว (preload), ภาระที่หัวใจเกิดขึ้นก่อนหัวใจจะเริ่มหดตัว (afterload), การบีบตัวของหัวใจ และอัตราการเต้นของหัวใจ อาจต้องอาศัย non-invasive monitoring เช่น การอัตราซาว์ดหัวใจ (echocardiogram) ในช่วงต่างๆของการศึกษาหากสามารถทำได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. N Engl J Med. 1993;328(17):1230-5.
2. Engleman HM, Douglas NJ. Sleep. 4: Sleepiness, cognitive function, and quality of life in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome. Thorax. 2004;59(7):618-22.
3. Garvey JF, Taylor CT, McNicholas WT. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation. Eur Respir J. 2009;33(5):1195-205.
4. Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. Obstructive sleep apnea and inflammation: relationship to cardiovascular co-morbidity. Respir Physiol Neurobiol. 2011;178(3):475-81.
5. McNicholas WT, Bonsigore MR. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. Eur Respir J. 2007;29(1):156-78.
6. Parati G, Lombardi C, Narkiewicz K. Sleep apnea: epidemiology, pathophysiology, and relation to cardiovascular risk. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007;293(4):R1671-83.
7. Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. Pflugers Arch. 2005;450(6):363-71.
8. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? Thorax. 2009;64(7):631-6.
9. Kohler M, Stradling JR. Mechanisms of vascular damage in obstructive sleep apnea. Nat Rev Cardiol. 2010;7(12):677-85.
10. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. Circ Res. 2006;99(7):675-91.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

11. Arnardottir ES, Mackiewicz M, Gislason T, Teff KL, Pack AI. Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: a review and perspective. Sleep. 2009;32(4):447-70.

12. Atkeson A, Jelic S. Mechanisms of endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. Vasc Health Risk Manag. 2008;4(6):1327-35.

13. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. Circulation. 2005;112(17):2660-7.

14. Li S, Qian XH, Zhou W, Zhang Y, Feng J, Wan NS, et al. Time-dependent inflammatory factor production and NFkappaB activation in a rodent model of intermittent hypoxia. Swiss Med Wkly. 2011;141:w13309.

15. Ramar K, Caples SM. Vascular changes, cardiovascular disease and obstructive sleep apnea. Future Cardiol. 2011;7(2):241-9.

16. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmuller P, Huertas A, Montani D, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. Chest. 2012;141(1):210-21.

17. Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, et al. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. J Am Coll Cardiol. 2009;54(1 Suppl):S10-9.

18. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol. 2004;43(12 Suppl S):13S-24S.

19. Levy P, Pepin JL, Arnaud C, Tamisier R, Borel JC, Dematteis M, et al. Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: current concepts and perspectives. Eur Respir J. 2008;32(4):1082-95.

20. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(5):1313-6.

21. Guo Y, Pan L, Ren D, Xie X. Impact of continuous positive airway pressure on C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. Sleep Breath. 2012.

22. Kohler M, Ayers L, Pepperell JC, Packwood KL, Ferry B, Crosthwaite N, et al. Effects of continuous positive airway pressure on systemic inflammation in patients with moderate to severe obstructive sleep apnoea: a randomised controlled trial. Thorax. 2009;64(1):67-73.

23. Vgontzas AN, Zoumakis E, Lin HM, Bixler EO, Trakada G, Chrousos GP. Marked decrease in sleepiness in patients with sleep apnea by etanercept, a tumor necrosis factor-alpha antagonist. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(9):4409-13.

24. Wang Q, Zuo XR, Wang YY, Xie WP, Wang H, Zhang M. Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension is attenuated by TNF-alpha antagonists via the suppression of TNF-alpha expression and NF-kappaB pathway in rats. Vascul Pharmacol. 2012.

25. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174(7):824-30.

26. Foster GE, Poulin MJ, Hanly PJ. Intermittent hypoxia and vascular function: implications for obstructive sleep apnoea. Exp Physiol. 2007;92(1):51-65.

27. Del Rio R, Moya EA, Iturriaga R. Differential expression of pro-inflammatory cytokines, endothelin-1 and nitric oxide synthases in the rat carotid body exposed to intermittent hypoxia. Brain Res. 2011;1395:74-85.

28. McGuire M, Bradford A. Chronic intermittent hypercapnic hypoxia increases pulmonary arterial pressure and haematocrit in rats. Eur Respir J. 2001;18(2):279-85.

29. Sluiter I, van Heijst A, Haasdijk R, Kempen MB, Boerema-de Munck A, Reiss I, et al. Reversal of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertensive rats. Exp Mol Pathol. 2012;93(1):66-73.

30. Henriques-Coelho T, Brandao-Nogueira A, Moreira-Goncalves D, Correia-Pinto J, Leite-Moreira AF. Effects of TNF-alpha blockade in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Rev Port Cardiol. 2008;27(3):341-8.

31. Akeruetai S, Nattapong J, Sompol S, Poonchavist C. Effect Of Bosentan On Pulmonary Vasculature In An Animal Model Of Obstructive Sleep Apnea. B109 SLEEP DISORDERED BREATHING AND CARDIOVASCULAR DISEASE: OF RODENTS AND HUMANS.

American Thoracic Society International Conference Abstracts: American Thoracic Society. p. A6812-A.

32. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. Rheumatology (Oxford). 2010;49(7):1215-28.

33. Data sheet : enbrel Etanercept (rch).

34. สมาคมรูมาติซั่มแห่งประเทศไทย. การรักษาแนวใหม่ในโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์

35. Arenas IA, Armstrong SJ, Xu Y, Davidge ST. Chronic tumor necrosis factor-alpha inhibition enhances NO modulation of vascular function in estrogen-deficient rats. Hypertension. 2005;46(1):76-81.

36. D. M. Clinical Pharmacokinetics Review of BLA 98-0286 (Enbrel, TNFR:Fc). Available from: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm088681.pdf.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การดูแลสัตว์ทดลอง (Animal care)

1. Husbandry consideration:

1.1 Housing Place: ตึกพยาธิวิทยา ชั้น3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 Experimental Place: ตึกพยาธิวิทยาชั้น 3 และตึกแพทยพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 Housing System : strictly hygienic conventional

1.4 Caging : solid bottom, open top

1.5 Caging materials : stainless steel

1.6 Cage size (W x L x H) standard

1.7 Number of animals / cage = 5 rats

1.8 Environmental requirements :

- Temperature 25 °C, Humidity 60-70 %

- Standard fluorescent light, Standard light cycle 12 hours per cycle

1.9 Food : standard diet, Ad libitum feeding

1.10 Water : RO-UV type of water, Ad libitum

1.11 Bedding/housing media : wood shaving

2. Attending veterinary care : standard venterinary care

3. Potential animal pain and distress assessment:

3.1 Pain or Distress Classification **(USDA Classifications)**
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 a particular area
- Guarding (protecting the painful area)
- Loss of mobility
- Unresponsiveness
- Labored breathing

4. Anesthesia (Pre-anesthetic and anesthetic)

4.1 medication : pentobarbital sodium (5.47 g/100 ml) 50 mg/kg body weight intraperitoneal route

4.2 criteria use to assess level of anesthesia

- Respiration rate
- Toe pinch
- Tail pinch
- Corneal reflex
- Muscular relaxation

4.3 Describe post-anesthetic treatment or intervention : สังเกตอาการที่ผิดปกติต่างๆภายหลังการให้ยา anesthesia รวมไปถึงระหว่างการทำหัตถการ ถ้ามีอาการแสดงผิดปกติจะมีการจดบันทึกโดยผู้ทำการวิจัยและแก้ไขก่อนการวัดผลการทดลอง

5. **Surgery:**

5.1 Surgical procedure : Non-survival, One time

5.2 Location / Room number for surgical procedure : ตึกพยาธิวิทยาชั้น 3 บริเวณห้องสัตว์ทดลองและห้องปฏิบัติการของภาคสรีรวิทยา พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 Procedure: ทำการเก็บตัวอย่างเลือด และวัดความดันในหลอดเลือดแดงปอด โดยการใช้เข็มเจาะผ่านผนังทรวงอกตรงกลางบริเวณใต้ต่อกระดูกหน้าอกเข้าไปยังหัวใจห้องล่างขวา

6. **Blood or Body Fluid Withdrawal / Tissue Collection / Injections, Tail Clip, Gavaging:**

6.1 Injection

- subcutaneous route

- Volume Administered : 0.4 mg/kg body weight

- Frequency (per day) : twice a week (once a day)

- Chemical/Drug : Etanercept

6.2 Blood Withdrawal:

- Anatomic Location : pulmonary artery

- Frequency : one time at the end of study

6.3 Tissue Collection: Dead animal

- Anatomic Location/organ(s) : pulmonary artery/heart/lungs (entire)

- Biopsy size : entire organ (Heart and lungs)

- Frequency : one time at the end of study

7. Euthanasia / Disposition of animals:

7.1 Disposal of animals after completion of activity:

- Euthanatized

- Chemicals/Drugs used for euthanasia : Pentobarbital sodium 100 mg/kg body weight intraarterial line via heart catheter

8.. Experimental endpoint

8.1 Early Endpoint is used (the animals are humanely euthanized prior to the expected terminate study day): ในกรณีที่หนูแรทได้รับความทุกข์ทรมานเกินกว่าจะดำเนินการต่ออาจพิจารณาสิ้นสุดการทดลองก่อนกำหนดได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ พญ.นิวัน กลิ่นงาม

วันเดือนปีเกิด 5 มีนาคม พ.ศ.2524 เชื้อชาติไทย สัญชาติไทย ศาสนาพุทธ

ประวัติการศึกษา

ระดับมัธยมศึกษาตอนต้นโรงเรียนเบญจมเทพอุทิศ จังหวัดเพชรบุรี ปี 2535-2538

ระดับมัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนพรหมานุสรณ์ จังหวัดเพชรบุรี ปี 2538-2541

ระดับปริญญาตรีคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2542-2548

แพทย์ประจำบ้านสาขาอายุรศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ปี2551-2554

แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โรคปอดปี2555-ปัจจุบัน

ประวัติการทำงาน

แพทย์ใช้ทุนปีที่ 1 โรงพยาบาลพระจอมเกล้าจ.เพชรบุรี ปี 2548-2549

แพทย์ใช้ทุนปีที่ 2-3 โรงพยาบาลท่ายาง อ.ท่ายางจ.เพชรบุรีปี 2549-2551

ฝึกอบรมแพทย์ประจำบ้านสาขาอายุรศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ปี2551-2554

อายุรแพทย์โรงพยาบาลชะอำ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี ปี 2554 - 2555

ฝึกอบรมแพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาอายุรศาสตร์โรคปอดปี 2555-ปัจจุบัน

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

สมาชิกสมาคมอุรเวชช์แห่งประเทศไทย

สมาชิกมูลนิธิแพทย์อาสาสมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University