

การศึกษากลไกของยาโบเซนแทนต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอดในกลุ่มหนูแรท  
ที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง

นางสาวเอกกฤษฎ์ สุวรรณนาคินทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

EFFECT OF BOSENTAN ON PULMONARY VASCULATURE IN  
CHRONIC INTERMITTENT HYPOXIC RAT MODEL

Miss Akeruetai Suwannakin

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาผลของยาโบเซนแทนต่อการเปลี่ยนแปลงของ  
หลอดเลือดแดงปอดในกลุ่มหนู แรท ที่อยู่ในสภาวะขาด  
ออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง

โดย

นางสาวเอกกฤษฎ์ สุวรรณนาคินทร์

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ นายแพทย์ ญัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมพล สงวนรังศิริกุล

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิชัย จิตะพันธุ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ นายแพทย์ ญัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมพล สงวนรังศิริกุล)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ถาวร สุทธิไชยากุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ กฤตย์วิกรม ดุรงค์พิศิษฐ์กุล)

เอกฤทัย สุวรรณนาคินทร์ : การศึกษาผลของยาโบเซนแทนต่อการเปลี่ยนแปลงของ  
หลอดเลือดแดงปอดในกลุ่มหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับ  
สภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง . (EFFECT OF BOSENTAN ON PULMONARY  
VASCULATURE IN CHRONIC INTERMITTENT HYPOXIC RAT MODEL) อ. ที่  
ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.นพ.ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม , อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์  
ร่วม : รศ.นพ.สมพล สงวนรังศิริกุล, 47 หน้า.

ที่มา งานวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาผลของยาโบเซนแทนต่อการเปลี่ยนแปลงทาง  
พยาธิสภาพและความดันโลหิตของหลอดเลือดแดงปอดในสภาวะขาดออกซิเจนจำลองที่มี  
พยาธิสภาพหลักใกล้เคียงกับภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับของคน

วิธีการศึกษา หนูแรทพันธุ์ Wistar จำนวน 18 ตัวถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มเพื่อศึกษาผล  
ของยาโบเซนแทนขนาด 100 มิลลิกรัมต่อวันในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะ  
ปกติ ซึ่งทำติดต่อกัน 8 ชั่วโมงต่อวัน รวมทั้งหมด 14 วันตลอดการศึกษา

ผลการศึกษา กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติ  
อย่างต่อเนื่องเรื้อรัง มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอดขนาดเล็กและมีการหนาตัว  
ของผนังหัวใจห้องล่างขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.042$  และ  $p=0.015$ ) ส่วนผลของ  
ยาโบเซนแทนสามารถลดระดับความดันในหลอดเลือดแดงปอดและอัตราการเต้นของหัวใจได้  
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.001$  และ  $p=0.011$ )

สรุปผลการศึกษา ยาโบเซนแทนมีโอกาสเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและรักษา  
ภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงที่พบในภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นระหว่างนอนหลับ

ภาควิชา.....อายุรศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
สาขาวิชา.....อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....  
ปีการศึกษา.....2554.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5374675530 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS : BOSENTAN / PULMONARY VASCULATURE / CHRONIC  
INTERMITTENT HYPOXIA

AKERUETAI SUWANNAKIN : EFFECT OF BOSENTAN ON PULMONARY  
VASCULATURE IN CHRONIC INTERMITTENT HYPOXIC RAT MODEL.

ADVISOR : NATTAPONG JAIMCHARIYATAM, M.D., CO-ADVISOR : ASSOC.  
PROF. SOMPOL SANGUANRUNGSIRIKUL, M.D., 47 pp.

**Background** This experimental study was designed to examine the effect of bosentan, endothelin receptor antagonist, on overall aspect of pulmonary vasculature in chronic intermittent hypoxic (CIH) rat model, an animal model of OSA.

**Methods** Eighteen Wistar rats were divided into 3 groups. Rats in both CIH groups were exposed to alternating cycles of normoxia and hypoxia 8 h/day in light phase for 14 days and one CIH group was received bosentan 100 mg/kg/day.

**Results** Neomuscularization of small pulmonary arterioles and right ventricular hypertrophy (RVH) were significantly increased in CIH group ( $p=0.042$  and  $p=0.015$ ). In bosentan-treated CIH group, significant reduction in mean pulmonary pressure and heart rate were found ( $p<0.001$  and  $p=0.011$ ).

**Conclusions** CIH induces RVH and pulmonary vascular remodeling. The beneficial effect of bosentan for lessen pulmonary pressure suggests it as possible role in prevention and therapeutic option in OSA-associated pulmonary hypertension.

Department : ..... Medicine ..... Student's Signature .....

Field of Study : ..... Medicine ..... Advisor's Signature .....

Academic Year : ..... 2011 ..... Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย  
หน่วยโรคทางเดินหายใจและภาวะวิกฤตทางการหายใจ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อ.นพ.ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.นพ.ฉันทชาย สิทธิพันธุ์ ให้ข้อเสนอแนะและความคิดเห็น

เจ้าหน้าที่ในหน่วยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในส่วนของอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย  
ภาควิชาสูรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ.นพ.สมพล สงวนวงศ์ศิริกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์

น.ส.จิรวรรณ มาลา นิสิตปริญญาโท สาขาสูรวิทยา

ที่คอยให้ความช่วยเหลือและช่วยฝึกฝนการทำหัตถการในการวิจัยอย่างใกล้ชิด  
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ.นพ.บุญชูวิษฐ์ จันทรานูวัฒน์ อาจารย์พยาธิวิทยาที่ให้ความ

ช่วยเหลือในผลงานวิจัยในส่วนของพยาธิวิทยาเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกคนในศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัยที่ให้ความร่วมมือทั้งสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมถึงให้ความช่วยเหลือ  
เกี่ยวกับสัตว์ทดลองเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่  
จัดอบรมการทำงานวิจัยในสัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยอย่างมาก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ให้ความ  
ร่วมมือในการเตรียมยาให้กับสัตว์ทดลองในงานวิจัย

ขอขอบคุณทบวงมหาวิทยาลัยที่มอบเงินอุดหนุนส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับ  
ปริญญาโท -เอก และขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่มอบเงินทุน  
รัชดาภิเษกสมโภช สำหรับใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

# สารบัญ

. หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามการวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.4 สมมติฐาน.....	4
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
1.6 ขอบเขตการวิจัย.....	4
1.7 ข้อจำกัดของการวิจัย.....	5
1.8 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	6
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
1.10 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	7
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
3.1 รูปแบบการวิจัย.....	12
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย.....	12
3.3 ประชากรและการคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	12
3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	13
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	25

บทที่ 5 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	37
รายการอ้างอิง.....	41
ภาคผนวก.....	44
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	48



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและ ความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา.....	29
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต.....	34

## สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 3.1 แสดงการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความหนาของชั้นกล้ามเนื้อ ในผนังหลอดเลือดแดงปอด.....	17
ภาพที่ 3.2 แสดงสถานที่เลี้ยงหนูแรททั้งสามกลุ่ม.....	17
ภาพที่ 3.3 แสดงอุปกรณ์ในการทำสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia.....	18
ภาพที่ 3.4 แสดงอุปกรณ์ในการควบคุมการจ่ายก๊าซอัตโนมัติ.....	18
ภาพที่ 3.5 แสดงอุปกรณ์อัดก๊าซในระดับออกซิเจน 21 เปอร์เซ็นต์ (air compressor).....	19
ภาพที่ 3.6 แสดงถังก๊าซไนโตรเจนที่ใช้ในการสร้างสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia.....	19
ภาพที่ 3.7 แสดงการเริ่มทดลองหนูแรทในกลุ่ม chronic intermittent hypoxia.....	20
ภาพที่ 3.8 แสดงการทำสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia ในช่วง light phase ในระบบปิด (จำลองช่วงนอนหลับของหนูแรท).....	20
ภาพที่ 3.9 แสดงการเตรียมอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และติดตั้งโปรแกรมใน การวัดค่าทางระบบไหลเวียนโลหิต.....	21
ภาพที่ 3.10 แสดงการติดตั้งโปรแกรมและปรับค่ามาตรฐานของเครื่องมือ ก่อนเริ่มการทดลอง.....	21
ภาพที่ 3.11 แสดงการเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าของระบบไหลเวียนโลหิต.....	22
ภาพที่ 3.12 แสดงการใส่สายเข้าทางหลอดเลือดดำใหญ่ที่ขาหนีบ (femoral vein) เพื่อทำการวัดค่าความดันโลหิตของหนูแรท.....	22
ภาพที่ 3.13 แสดงการวัดค่าความดันในหลอดเลือดแดงปอด โดยการแทงเข็มพร้อม อุปกรณ์ต่อ ใช้เทคนิค subxiphoid approach.....	23
ภาพที่ 3.14 แสดงกราฟของค่าความดันในหลอดเลือดแดงปอดเทียบกับค่าของ ความดันโลหิตของหนูแรท.....	23
ภาพที่ 3.15 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการวัดน้ำหนักหัวใจของหนูแรท โดยมีความละเอียดที่จุดทศนิยม 4 หลัก.....	24
ภาพที่ 3.16 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการวัดน้ำหนักของหนูแรทเพื่อใช้ในการติดตาม อาการระหว่างการศึกษาและใช้ในการคำนวณยาสลบของหนูแรท.....	24

ภาพที่ 4.1 แสดงหลอดเลือดแดงปอดขนาด 50-100 ไมครอน โดยการย้อม hematoxylin และ eosin stain ของหนูแรทในแต่ละกลุ่ม.....	32
ภาพที่ 4.2 แสดงหลอดเลือดแดงปอดขนาด 15-50 ไมครอน โดยการย้อม Elastin stain ของหนูแรทในแต่ละกลุ่ม.....	33

## สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อ ในผนังหลอดเลือดแดงปอด.....	30
แผนภูมิที่ 4.2 แสดงค่าจำนวนของหลอดเลือดแดงปอดที่มีการเปลี่ยนแปลง หนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อ.....	30
แผนภูมิที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อ ผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่าง ห้องหัวใจล่าง.....	31
แผนภูมิที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด.....	35
แผนภูมิที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยอัตราการเต้นของหัวใจ.....	35
แผนภูมิที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยความดันโลหิต.....	36

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ABP	Arterial blood pressure
CIH	Chronic intermittent hypoxia
HR	Heart rate
LV	Left ventricle
PAP	Pulmonary arterial pressure
RV	Right ventricle
RVH	Right ventricular hypertrophy
RVSP	Right ventricular systolic pressure

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับหรือ obstructive sleep apnea (OSA) เป็นสภาวะที่เกิดการอุดกั้นของทางเดินหายใจส่วนต้นระหว่างการนอนหลับ ถือเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขที่พบได้บ่อยมากขึ้นในปัจจุบันและนำไปสู่การเกิดปัญหาทางสุขภาพในระบบอื่นตามมา ได้แก่ ผลแทรกซ้อนทางระบบหัวใจและหลอดเลือด จากข้อมูลทางสถิติพบว่า ความชุกของภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับอยู่ประมาณ 3 ถึง 28 เปอร์เซ็นต์ในประชากรทั่วไป โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามภาวะโรคอ้วนที่เพิ่มขึ้น ภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอัตราการตาย ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด ได้แก่ ความดันโลหิตสูง , โรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ , โรคหลอดเลือดสมองตีบ , โรคความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง และโรคเกี่ยวกับความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม ได้แก่ โรคเบาหวานและไขมันในเลือดสูง โดยสามารถเกิดกับภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับได้ตั้งแต่ความรุนแรงระดับต่ำถึงระดับสูง [1-6]

พยาธิสรีรวิทยาในระหว่างการเกิดภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับเกิดจากการอุดกั้นซ้ำๆของทางเดินหายใจส่วนบน ตามมาด้วยภาวะขาดออกซิเจนสลับกับภาวะออกซิเจนปกติ จนมีการกระตุ้นของระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทอัตโนมัติ โดยมีการกระตุ้นของ peripheral chemoreceptor ร่วมกับการหดตัวของหลอดเลือดส่วนปลาย ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิต นอกจากนี้ช่วงที่เกิดภาวะขาดออกซิเจน มีผลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ตามมาด้วย reactive oxygen species ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของกระบวนการอักเสบในร่างกาย เกิดการอักเสบของหลอดเลือดและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular remodeling) ผ่านการเปลี่ยนแปลงความสมดุลของสารต่างๆในร่างกาย ได้แก่ vasodilators (nitric oxide, prostacyclin), vasoconstrictors (endothelin-1) และ growth factors (vascular endothelial growth factor) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง endothelin-1 มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือด กระตุ้นการแบ่งตัวของ fibroblast และกระตุ้น pulmonary smooth muscle cell ให้มีการสร้าง type V collagen จนเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอดขึ้น ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ pulmonary vascular resistance นำไปสู่ภาวะความดันของหลอดเลือดแดงปอดสูง (pulmonary hypertension) [7-9] อุบัติการณ์ของการเกิดภาวะความดันของหลอดเลือดแดงปอดสูงอยู่ประมาณ 15-20 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความสัมพันธ์กับ

ภาวะพร่องออกซิเจนในช่วงกลางวัน ซึ่งอาจพบร่วมในภาวะ obesity-hypoventilation syndrome และภาวะ chronic obstructive pulmonary disease [10] มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง chronic intermittent hypoxia (CIH) กับการเกิดภาวะความดันในหลอดเลือดแดงสูง ออกมาจำนวนมาก มีความหลากหลายของแบบจำลองของ CIH แต่ทุกการศึกษายึดตามธรรมชาติของการเกิดภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับ ซึ่งผลการศึกษาล้วนชี้ให้เห็นว่า ภาวะ CIH ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) การเพิ่มขึ้นของความดันในหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary hypertension) และการเพิ่มขึ้นของความหนาตัวของหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) [11-14]

จากข้อมูลการศึกษาปัจจุบัน การรักษาภาวะความดันของหลอดเลือดแดงปอดสูงจากภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับได้แก่ การรักษาโดยใช้เครื่องสร้างความดันอากาศบวกเข้าทางเดินหายใจ (positive airway pressure therapy) มีผลต่อการลดลงของความดันในหลอดเลือดแดงปอดในระดับความรุนแรงของโรคที่ไม่มาก และในบางการศึกษายังไม่พบการลดลงของความดันของหลอดเลือดแดงปอดด้วย [15] นอกจากนี้ยังมีการรักษาโดยใช้ยาเพื่อลดความดันของหลอดเลือดแดงปอด ปัจจุบันมีข้อมูลการใช้ยาในกลุ่มของ phosphodiesterase type 5 inhibitors ได้แก่ ยาซิลденаฟิล (sildenafil) ในสัตว์ทดลองที่มีภาวะขาดออกซิเจนอย่างต่อเนื่องเรื้อรังมากกว่า 1 เดือนขึ้นไป พบว่า มีผลลดการเปลี่ยนแปลงของระดับความดันของหลอดเลือดแดงปอดและลดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด [16] ยังขาดข้อมูลในกลุ่มสัตว์ทดลองที่มี ภาวะขาดออกซิเจนสลับกับภาวะออกซิเจนปกติ ซึ่งถือเป็นแบบจำลองของทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับ แต่พบว่ามีการศึกษาในกลุ่มคนที่มีภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับโดยมีความรุนแรงระดับสูง ยา sildenafil มีผลเพิ่มภาวะการหยุดหายใจ ระหว่างการนอนหลับและมีภาวะพร่องของออกซิเจนมากขึ้น รวมทั้งยังเพิ่มโอกาสในการเกิดภาวะการเต้นของหัวใจผิดปกติอีกด้วย [17,18] ต่อมาจึงมีการศึกษาของยาในกลุ่ม Endothelin receptor antagonist ได้แก่ โบเซนแทน (bosentan) โดยเริ่มมีการทดลองในกลุ่มสัตว์ทดลองที่มีภาวะขาดออกซิเจนติดต่อกันเรื้อรัง พบว่ายา มีผลลดการเปลี่ยนแปลงความดันในหลอดเลือดแดงปอด ลดการเปลี่ยนแปลงความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวาและลดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดงปอด [19] ต่อมามีการศึกษาในกลุ่มสัตว์ทดลองที่มีภาวะพร่องออกซิเจนฉับพลัน พบว่า มีผลลดการเพิ่มขึ้นของ pulmonary vascular resistance ที่จะนำไปสู่การเกิดภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง [20] ภายหลังจากมีการศึกษาในกลุ่ม CIH model ตามมา พบว่า ยา bosentan มีผลลดการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิตในสัตว์ทดลอง [21]

ดังนั้นจึงนำไปสู่แนวคิดของงานวิจัยเพื่อศึกษาการใช้ยา bosentan ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพและความดันของหลอดเลือดแดงปอด (ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะขาดออกซิเจนสลับกับภาวะออกซิเจนปกติ ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีภาวะ ทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับ) โดยเริ่มต้นการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ถือเป็นแบบจำลองของทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับ เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยใหม่ ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาในคนมาก่อน เพื่อประโยชน์ต่อการวิจัยต่อยอดในอนาคต

## คำถามของการวิจัย (Research Questions)

### คำถามหลัก (primary research question)

ผลของยา bosentan กับกลุ่มหนู แรทสายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้ 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่อง 14 วัน จะสามารถลดการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) ได้หรือไม่

### คำถามรอง (secondary research question)

ผลของยา bosentan กับกลุ่มหนู แรทสายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้ 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 14 วัน จะสามารถลดการเปลี่ยนแปลงของความดันในหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary pressure) และลดการหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) ได้หรือไม่

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประเมินผลของยา bosentan กับกลุ่มหนู แรทสายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้ 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก ในการลดการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling)

2. เพื่อประเมินผลของยา bosentan กับกลุ่มหนู แรทสายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้ 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก ในการลดความดันในหลอดเลือดแดงปอด

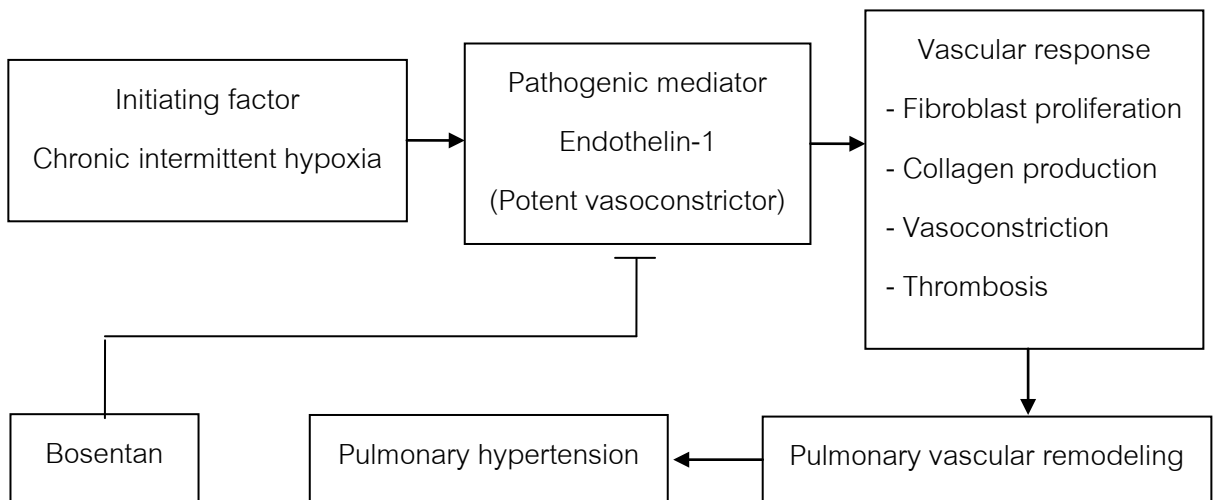


3. เพื่อประเมินผลของยา bosentan กับกลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้ 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอกในการลดการหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา

### สมมติฐาน (Hypothesis)

ยา Bosentan สามารถลดการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) ลดความดันในหลอดเลือดแดงปอดและลดการหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวาในกลุ่มหนู แรท สายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ Chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจนในระบบปิดที่กำหนดไว้ 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 14 วัน

### กรอบแนวความคิดในการวิจัย



### ขอบเขตของการวิจัย

Target population หมายถึง กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Wistar (Outbred) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

Sample population หมายถึง กลุ่มหนูแรทสายพันธุ์ Wistar (Outbred) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ถูกสุ่มตามจำนวนขนาดตัวอย่างจากการคำนวณ

ตัวแปรอิสระ หมายถึง การได้สัมผัส chronic intermittent hypoxia และการได้รับยา bosentan

ตัวแปรตาม หมายถึง การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular remodeling), การหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) และการเปลี่ยนแปลงของความดันในหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary pressure) โดยวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) แสดงข้อมูลเป็น continuous data

เครื่องมือที่ใช้ในการวัด ได้แก่ การตรวจทางพยาธิวิทยาของเส้นเลือดแดงปอดกับหัวใจห้องล่างขวา และเครื่องมือสำหรับวัดระดับความดันในเส้นเลือดแดงปอด ถือเป็น construct validity

การทดสอบ reliability ของเครื่องมือที่ใช้วัด ใช้เป็น intra-observer reliability ในการแปรผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) เนื่องจากมีพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคปอดในสถาบันเพียงคนเดียว โดยทำเป็น repeatability test ในชิ้นเนื้อเดียวกันแต่ต่างเวลา ส่วนการวัดระดับความดันในหลอดเลือดแดงปอด (วัดเป็น right ventricular systolic pressure) มีการวัดเปรียบเทียบกันระหว่าง ข้อมูลสองชุด ในหนูทดลองตัวเดียวกัน

### ข้อตกลงเบื้องต้น

1. กลุ่มหนูแรทที่ใช้ในการวิจัยเป็นหนูสายพันธุ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันในแง่ของเพศ, อายุ, น้ำหนักตัว, ความดันในหลอดเลือดแดงปอด, พยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวาก่อนเริ่มต้นการศึกษา

2. กลุ่มหนูแรทที่ใช้ในการวิจัยได้รับการเลี้ยงดูในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมือนกันโดยเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยอาจไม่สามารถขยายผลไปยังคนได้ ต้องทำการศึกษาต่อเนื่องในคนเพื่อทดสอบผลของงานวิจัยต่อไป

2. รูปแบบของ chronic intermittent hypoxic model และการวัดผลของการศึกษาทั้งในส่วนของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) ความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) และระดับความดันในเส้นเลือดแดงปอด (pulmonary pressure) ทางคณะผู้วิจัยเริ่มทำเป็นการศึกษาแรก ทำให้ขาดประสบการณ์ ดังนั้นจึงต้อง เข้ารับการอบรมที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเกี่ยวกับการทำวิจัยในสัตว์ทดลองและต้อง มีการฝึกฝนจนเกิดความชำนาญ เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่ได้จากการวิจัย

## คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Pulmonary vasculature คือการศึกษาการเปลี่ยนแปลง ทางพยาธิสภาพของ เส้นเลือดแดงในปอด (pulmonary vascular remodeling) โดยอาศัยข้อมูลทางด้านพยาธิวิทยา และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความดันในหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary pressure) โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการวัดค่าความดันในหัวใจห้องล่างขวาช่วงหัวใจบีบตัว (right ventricular systolic pressure)

2. Chronic intermittent hypoxic model คือการกำหนดสภาวะของออกซิเจน ให้กับกลุ่มหนูแรทที่กำหนดไว้ในระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์ทุกๆ 30 วินาทีติดต่อกันนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน ระยะเวลาของการศึกษาทั้งหมด 14 วัน ในช่วงกลางวัน (light period)

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบพยาธิสภาพของภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงจาก สภาวะ จำลองของ chronic intermittent hypoxia เพื่อนำไปสู่งานวิจัยขั้นต่อยอดในอนาคต

2. องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลง ทาง พยาธิสรีรวิทยาและ ความสัมพันธ์ของยาในกลุ่ม endothelin receptor antagonist ต่อการเปลี่ยนแปลง ทาง พยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling), การลดการหนา ตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) และการลดความดันของ หลอดเลือดแดงในปอด (pulmonary pressure) ใน chronic intermittent hypoxic rat model

3. สามารถที่จะตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติได้

4. นำองค์ความรู้ที่ได้มาพัฒนาการรักษาและป้องกันการเกิดภาวะความดันของ หลอดเลือดแดงปอดสูงในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น (obstructive sleep apnea) ทางคลินิกต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

1. ติดต่อประสานงานกับอาจารย์ในภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์เกี่ยวกับการเก็บข้อมูลของงานวิจัย ในส่วนของอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าความดัน โลหิต, ความดันในหลอดเลือดแดงปอดและอัตราการเต้นของหัวใจ

2. ติดต่อประสานงานกับอาจารย์ในภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์เกี่ยวกับการเก็บข้อมูลของงานวิจัย ในส่วนของผลการตรวจทางพยาธิวิทยา ได้แก่ การเตรียมชิ้นเนื้อ, การจัดส่งชิ้นเนื้อ, การย้อมพิเศษของชิ้นเนื้อและการวัดผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

3. ติดต่อประสานงานกับเจ้าหน้าที่ที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเกี่ยวกับงานวิจัย เพื่อเตรียมความพร้อมในการติดตามดูแลหนูแรทและการสั่งซื้อหนูแรทในงานวิจัย

4. ติดต่อประสานงานกับเจ้าหน้าที่ประจำฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ เพื่อจัดเตรียมยา bosentan และชั่งปริมาณตามน้ำหนักตัวของหนูแรท

5. ชี้แจงวัตถุประสงค์ของงานวิจัย วิธีการศึกษาและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับให้กับผู้ร่วมงานทุกคน จากนั้นสรุปรวบรวมขั้นตอนทั้งหมดจากการอภิปรายร่วมกันและเข้ารับการอบรมเพิ่มเติมที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนเริ่มทำการศึกษา

6. ทดสอบในห้องปฏิบัติการสัตววิทยาที่จัดเตรียมอุปกรณ์ไว้ โดยผู้วิจัยจะทำการใส่สายสวนเพื่อวัดความดันโลหิตเข้าทาง femoral vein และแทงเข็มขนาด 24 นิ้วเพื่อวัดความดันในหลอดเลือดแดงปอด โดยใช้ subxiphoid approach จากนั้นต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์ที่ติดตั้งโปรแกรมในการวัดค่าความดันแสดงผลเป็นกราฟ หน่วยเป็นมิลลิเมตรปรอท (polygraph system) ขั้นตอนดังกล่าวทางผู้วิจัยต้องฝึกฝนทำจนเกิดความชำนาญก่อนการเก็บข้อมูลจริง

7. ทดสอบในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา โดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยา ระบบหัวใจและหลอดเลือด ทำการตัดแบ่งหัวใจออกเป็นผนังหัวใจห้องล่างขวาแยกออกจากห้องล่างซ้ายรวมผนังกันระหว่างห้องหัวใจ จากนั้นจึงทำการตัดชิ้นเนื้อปอดเพื่อทำการย้อมพิเศษต่อไป

8. เก็บรวบรวมข้อมูลเพื่อทำการแปรผล

9. สรุปผลการศึกษาและเตรียมนำเสนอผลงานวิจัย

#### ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ภายในประเทศ

- การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการประจำปี 2555 ของสมาคมอุรเวชช์แห่งประเทศไทยในวันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2555

- การนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการประจำปี 2555 ของราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

2. ต่างประเทศ

- ส่งผลงานวิจัยเข้าร่วมในงานประชุมวิชาการนานาชาติและได้รับการตอบรับ  
ทั้งหมด 2 งาน ได้แก่ American Thoracic Society International Conference Committee และ  
SLEEP (American Academy of Sleep Medicine)

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

ภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับมีพยาธิสรีรวิทยาที่สำคัญที่สุดที่นำไปสู่การเกิดภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง คือ การเกิดภาวะการขาดออกซิเจนสลับกับภาวะออกซิเจนปกติอย่างเรื้อรัง (chronic intermittent hypoxia) ทำให้มีการกระตุ้นของระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทอัตโนมัติทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ ระดับความดันโลหิต ตามมาด้วยการเกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นส่วนสำคัญ ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงในปอด (Pulmonary vascular remodeling) ผ่านการเปลี่ยนแปลงความสมดุลของสารต่างๆในร่างกายได้แก่ vasodilators (nitric oxide, prostacyclin) vasoconstrictors (Endothelin-1) และ growth factors (vascular endothelial growth factor) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Endothelin-1 พบว่ามีระดับในกลุ่มผู้ป่วยที่มี ภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับ ดังนั้นการใช้ยาในกลุ่มของ endothelin receptor antagonist น่าจะมีบทบาทสำคัญในการป้องกันหรือรักษาภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนของ ภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับ [7-9]

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยาโบเซนแทน (bosentan) เป็นยาในกลุ่มของ endothelin receptor antagonist ออกฤทธิ์โดยการจับกับ endothelin receptor A/B ซึ่งตัวยา bosentan ถือเป็น dual (ET<sub>A</sub> และ ET<sub>B</sub>) endothelin-receptor antagonist แต่มีการออกฤทธิ์ที่ receptor A มากกว่า B ประมาณ 20 ถึง 30 เท่า มีผลยับยั้งการแสดงออกของสาร endothelin-1 ซึ่งถือเป็น potent vasoconstrictor ที่นำไปสู่การเกิดภาวะ pulmonary vascular remodeling และ pulmonary hypertension ตามมา [22] จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่า

McCulloch และคณะ [23] ศึกษาการทำงานของ endothelin receptor ในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกทำให้เกิดภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง โดยใช้สภาวะจำลองของการขาดออกซิเจนต่อเนื่องเรื้อรังเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นให้ยา bosentan ให้กับหนูทดลองสายพันธุ์ Wistar ผลการศึกษาพบว่า bosentan มีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ของ endothelin-1 ต่อ endothelin receptor ในกลุ่มหนูทดลองที่ทำให้เกิดภาวะการขาดออกซิเจนเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้เป็นการศึกษาของสัตว์ทดลองโดยศึกษาถึงระดับโมเลกุลที่อธิบายการออกฤทธิ์ของ bosentan ต่อ endothelin receptor แต่การศึกษานี้ไม่ได้มีการพิสูจน์การ

ยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับความดันในหลอดเลือดแดงปอด และพยาธิสภาพของเส้นเลือดแดงปอด

Chen และคณะ [19] ศึกษาผลของยา bosentan ในกลุ่มหนูทดลองสายพันธุ์ Sprague drawley ที่อยู่ในสภาวะจำลองของการขาดออกซิเจนเรื้อรังเป็นเวลา 2 และ 6 อาทิตย์ตามลำดับ โดยมีการให้ยา bosentan ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โดยวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของยา แยกออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (กลุ่มหนูทดลองที่อยู่ในสภาพแวดล้อมปกติ 1 กลุ่ม กลุ่มหนูทดลองที่อยู่ในสภาวะจำลองของการขาดออกซิเจนเรื้อรัง 2 และ 6 อาทิตย์ตามลำดับ) แต่ละกลุ่มมีการแบ่งกลุ่มย่อยเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ให้ยาและกลุ่มที่ไม่ให้ยา มีจำนวนหนูทดลองทั้งหมด 30 ตัว ผลการศึกษาพบว่า ยา bosentan สามารถลดการเปลี่ยนแปลงของระดับความดันในหลอดเลือดแดงปอด การหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวา การหนาตัวของผนังเส้นเลือดแดงในปอดและลดระดับของ endothelin-1 ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้มีการออกแบบงานวิจัยที่เหมาะสม กำหนดกลุ่มควบคุมเพื่อการเปรียบเทียบผลของยาอย่างชัดเจนในการบรรลุวัตถุประสงค์ของงานวิจัย นอกจากนี้รูปแบบของการศึกษาในแง่ของการรักษาด้วยยา bosentan (เริ่มให้ยาหลังจากอยู่ในสภาวะจำลองที่ทำให้เกิดภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง) ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับงานวิจัยนี้ได้

Jeffrey และคณะ [20] ศึกษาผลของยา bosentan ในกลุ่มหนูทดลองที่อยู่ในสภาวะจำลองของการขาดออกซิเจนเป็นเวลา 90 นาทีรอบเดียวและกลับสู่อากาศ รวมเวลาทั้งหมด 4.5 ชั่วโมง จำนวนหนูทดลองในการศึกษาทั้งหมด 20 ตัว พบว่า bosentan สามารถลดการเพิ่มขึ้นของความดันในหลอดเลือดแดงปอด ลดแรงต้านทานในหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vascular resistance) และลดระดับของ endothelin-1 ในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการศึกษานี้ใช้ยา Bosentan ในรูปฉีดขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามด้วย 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง ซึ่งถือว่า สามารถควบคุม intervention ในกลุ่มทดลองได้ดีกว่าการศึกษาทั่วไป แต่ขาดข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด และมีขั้นตอนการศึกษาที่ยากโดยเฉพาะอย่างยิ่งรูปแบบของการให้ยา ดังนั้นจึงมีโอกาสความผิดพลาดได้มากขึ้น

Yuyama และคณะ [24] ศึกษาการออกฤทธิ์ของ Selective endothelin ET<sub>A</sub> receptor antagonist (YM598) ซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพมากกว่ายา bosentan 100 เท่า ในกลุ่มหนูทดลองสายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดการขาดออกซิเจนต่อเนื่องเรื้อรังติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน โดยให้ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตั้งแต่วันแรกของการศึกษา พบว่า มีผลต่อการลดระดับของความดันในหลอดเลือดแดงปอด การลดลงของการเปลี่ยนแปลงความหนาของหัวใจห้องล่างขวา และการเพิ่มขึ้นของระดับออกซิเจนในเลือดแดง การศึกษานี้เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลองโดย

ศึกษาผลของยาต่อการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตแดงปอดเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งกลุ่มที่ไม่ได้ทำให้เกิดการขาดออกซิเจนต่อเนื่องเรื้อรังและกลุ่มที่ทำให้เกิดการขาดออกซิเจนต่อเนื่องเรื้อรังแต่ไม่ได้ให้ยา จะเห็นว่าการศึกษาไม่ได้มีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับความดันโลหิตแดงปอด ซึ่งถือเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญที่สุดของภาวะความดันโลหิตแดงปอดสูง

Belaidi และคณะ [21] ได้ศึกษาถึงผลของยา bosentan ต่อการเปลี่ยนแปลงทางระบบหัวใจและหลอดเลือด ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของระดับความดันโลหิต ในกลุ่มหนูทดลองสายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง (chronic intermittent hypoxia) เป็นเวลานาน 14 วัน โดยศึกษาการออกฤทธิ์ของยาในระบบของ endothelin ผ่านการออกฤทธิ์ของ hypoxia inducible factor (HIF-1) การให้ยา bosentan ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันในกลุ่มหนูทดลอง พบว่า ยาสามารถลดการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิตได้ จะเห็นว่าการศึกษาเป็นการศึกษาผลของยา bosentan ที่เริ่มต้นทำในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในอดีตที่ผ่านมา โดยมีการกำหนดกลุ่มควบคุมในการศึกษาและขนาดของยาที่ใช้ในการศึกษาชัดเจน แต่ยังคงขาดข้อมูลการศึกษาถึงผลของยา bosentan ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและระดับความดันโลหิตแดงปอด

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาผลของยาโบเซนแทน (bosentan) ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพและความดันของหลอดเลือดแดงปอดในกลุ่มสัตว์ทดลองที่มีภาวะขาดออกซิเจนสลับกับภาวะออกซิเจนปกติ (chronic intermittent hypoxia) ซึ่งถือเป็นแบบจำลองของทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับมาก่อน โดยมีการกำหนดแบบจำลองในงานวิจัยอ้างอิงมาจากการศึกษาของ Fagan ที่ทำการศึกษาวิจัยในหนูทดลอง ผลสรุปการศึกษาคือ การกำหนดสภาวะออกซิเจนเป็น 10 เปอร์เซ็นต์สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์ทุกๆ 2 นาที ติดต่อกัน 8 ชั่วโมงต่อวัน นาน 30 วัน มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด มีการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิตแดงปอดและความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็นงานวิจัยแรกและถือเป็นต้นแบบที่มีความใกล้เคียงกับธรรมชาติของภาวะทางเดินหายใจอุดกั้นขณะนอนหลับมากที่สุด [7] ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงทำการวิจัยนี้ขึ้น เพื่อนำไปสู่การวิจัยต่อยอดในคนต่อไป



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบผลของยา bosentan ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด, การหนาตัวของผนังหัวใจห้องล่างขวาและการเปลี่ยนแปลงของความดันในหลอดเลือดแดงปอด ในสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia โดยรูปแบบวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental study)

#### ประชากร

กลุ่มหนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar (outbred) อายุ 9 อาทิตย์ น้ำหนักประมาณ 300 กรัม โดยเหตุผลในการเลือกสายพันธุ์นี้เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องของพยาธิสภาพในระบบหัวใจและหลอดเลือดแดงปอดกับ คน ซึ่งกลุ่มตัวอย่างจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว เลี้ยงอยู่ในสภาวะแวดล้อมการเลี้ยงดูที่เหมือนกัน โดยสร้างเป็นช่วงกลางวันและกลางคืนจำลอง (artificial light-dark cycle) อย่างละ 12 ชั่วโมง

การกำหนดกลุ่มประชากรตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบผลของยา โดยใช้ในการวิจัยเชิงวิเคราะห์ สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$n/\text{group} = 2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 / (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2$$

กำหนด  $\alpha = 0.05$  (one-tailed),  $\beta = 0.2$  (power = 0.8), ค่าพารามิเตอร์  $\sigma = 2.67$  แทนค่าในสูตรโดยใช้การศึกษาของ Chen และคณะ [19] ( $\bar{X}_1 = 40$ ,  $\bar{X}_2 = 25$ )

ได้ผลลัพธ์เท่ากับ 0.66 ~ 1, คำนวณเพิ่ม 20 เปอร์เซ็นต์ (drop out rate) และปรับตามกฎการกระจายตัวของสัตว์ทดลองเป็น 6 ตัวต่อกลุ่ม

#### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. แบบบันทึกข้อมูลของการวิจัย
2. เครื่องมือที่ใช้ในการสร้างสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia
3. เครื่องมือวัดความดันหลอดเลือดแดงปอด (polygraph system) โดย TSD 104A blood pressure transducer and Biopac System
4. เครื่องมือวัดความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ (polygraph system) โดย TSD 104A blood pressure transducer and Biopac System

5. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้การแสดงความดันของระบบหัวใจและหลอดเลือด (Biopac system, MP 100, AcqKnowledge Software version 3.4)

6. อุปกรณ์และยาสลบ (pentobarbital sodium) ที่ใช้ในการทำสลบสัตว์ (anesthesia) และการทำการุณยฆาต (Euthanasia)

6. เครื่องมือที่ใช้ในการชั่งน้ำหนักและหัวใจหนู ความละเอียด 4 จุดทศนิยม

7. กล้องจุลทรรศน์ในการศึกษาทางพยาธิวิทยา

8. เครื่องวิเคราะห์ระดับก๊าซ (gas analyzer – O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> analyzer ML206 PowerLab, Ad instruments)

### การเก็บรวบรวมข้อมูล

มีการเก็บและบันทึกข้อมูลโดยผู้ดำเนินการวิจัย ทั้งหมด ซึ่งข้อมูลทั้งหมดได้มาจากภาควิชาสรีรวิทยาและภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยดำเนินงานตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมหนู แรท สายพันธุ์ Wistar ทางผู้วิจัยได้ทำการสั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

2. ทำการสุ่มกลุ่มตัวอย่างของหนู แรท เข้าแต่ละกลุ่ม (random allocation) ทั้งหมด 3 กลุ่มแบ่งออกเป็น

- กลุ่มที่ 1 ได้แก่ กลุ่มหนูแรทที่อยู่ในสภาพออกซิเจนปกติ (normoxic group)

- กลุ่มที่ 2 ได้แก่ กลุ่มหนู แรท ที่อยู่ในสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxic model แต่ไม่ได้รับยา bosentan (CIH without bosentan group)

- กลุ่มที่ 3 ได้แก่ กลุ่มหนู แรท ที่อยู่ในสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxic model และได้รับยา bosentan (CIH with bosentan group)

3. เตรียมอุปกรณ์ในการสร้างสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia ซึ่งเป็นระบบปิดที่กำหนดระดับออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกันนาน 8 ชั่วโมงต่อวันในช่วงกลางวัน มีการใช้อุปกรณ์อัดโนมิติในการควบคุมก๊าซระหว่างก๊าซไนโตรเจนและเครื่องอัดอากาศ (air compressor) ระดับออกซิเจนในระบบปิดดังกล่าวจะได้รับการวัดค่าระดับก๊าซออกซิเจนโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ระดับก๊าซ (gas analyzer – O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> analyzer ML206 PowerLab, Ad instruments) ก่อนเริ่มการศึกษาจริง

4. ให้ยา bosentan ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันกับกลุ่มหนู แรทกลุ่มที่ 3 ผ่านท่อสำหรับให้อาหาร (orogastric tube) ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 14 ของการศึกษา ซึ่งการให้ยา

ทำโดยเจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลองที่ได้รับมอบหมายเพียงคนเดียวตลอดการศึกษา และทางผู้วิจัย จะมีการติดตามซึ่งน้ำหนักและสังเกตอาการทั่วไปของหนูแรทด้วยตนเองทุกวัน

5. เก็บข้อมูลของหนู แรท ทั้งสามกลุ่มพร้อมกันในวันที่ 14 ของการวิจัย ซึ่ง ประกอบไปด้วย ผลของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling), ความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) และความดันของหลอดเลือดแดงในปอด (pulmonary pressure โดยวัดเป็น right ventricular systolic pressure) โดยก่อนการเก็บข้อมูลจะมีการการทำให้สลบ หนูแรท (anesthesia) ใช้ยา pentobarbital sodium ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อครั้ง ผ่านเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal route) ให้เข็มฉีดยาที่ต่อกับระบบอ่านค่ากราฟและความดันอัตโนมัติเข้ากับ เครื่องคอมพิวเตอร์ และดำเนินการแทงเข็มผ่านทาง subxiphoid approach จนได้กราฟที่ถูกต้อง ซึ่งในขั้นตอนนี้ ผู้ทำการวิจัยทราบกลุ่มของหนูแรทระหว่างการวัด (not blinded) หลังจากสิ้นสุด การเก็บข้อมูลเกี่ยวกับระบบไหลเวียนโลหิต จึงมี การทำการุณยฆาต (Euthanasia) กับหนูแรทโดย การฉีดยา pentobarbital sodium 100 มิลลิกรัมเข้าทางหลอดเลือดแดงผ่านสายวัดความดัน โลหิตจนหัวใจหยุดเต้นแล้วจึงเริ่มการเก็บข้อมูลทางพยาธิวิทยาของปอดและหัวใจของหนูแรท ใน ขั้นตอนการตรวจทางพยาธิวิทยา ทำโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยาเกี่ยวกับระบบทางเดิน หายใจและระบบไหลเวียนโลหิต 1 คนซึ่งไม่ทราบกลุ่มหนูแรทในงานวิจัย (Single-blinded) ดังนั้น จึงสามารถแบ่งผลการศึกษาทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

5.1 ผลของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ pulmonary vasculature (pulmonary vascular remodeling) ทำโดยการตรวจทางพยาธิวิทยาดังนี้

- เปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน โดยอาศัยวิธีการย้อม hematoxylin และ eosin stain (% Wall thickness of pulmonary arteriole) นับจำนวนเส้นเลือดอย่างน้อย 20 เส้น โดยมีการคำนวณเข้า สูตร ดังนี้

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

Medial wall thickness คือ ความหนาของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด

External diameter คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดแดงปอด

แสดงดังรูปที่ 3.1

- จำนวนของหลอดเลือดแดงปอดที่มี การเปลี่ยนแปลง หนาตัวของชั้น กล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาด 15-50 ไมครอน โดยอาศัยวิธีการย้อม elastin stain (number of neomuscularized pulmonary arteriole per 50 total pulmonary vessels) ซึ่ง

muscularized pulmonary arteriole คือ pulmonary arteriole ที่ล้อมติดชั้น elastic lamina 2 ชั้น อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ของเส้นรอบวงหลอดเลือด (vessel circumference)

5.2 ความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา (right ventricular hypertrophy) โดยมีการชั่งน้ำหนักของผนังห้องหัวใจ คำนวณออกมาเป็นอัตราส่วนของ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างทั้งสอง คำนวณเข้าสู่สูตร ดังนี้

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

Right ventricular free wall weight คือ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาที่ตัดแยกมาจากผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายและผนังกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างทั้งสองห้อง

Left ventricular plus septum weight คือ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายรวมกับผนังกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างทั้งสองห้อง

5.3 ความดันของหลอดเลือดแดงในปอด (pulmonary pressure โดย วัดเป็น right ventricular systolic pressure) ทำการวัดโดยใช้เข็ม ขนาด 24 แทงแบบ subxiphoid approach พร้อมอุปกรณ์ต่อวัดเข้ากับระบบวิเคราะห์กราฟเพื่ออ่านค่าระดับความดันของหลอดเลือดแดงในปอด (Polygraph system) รายงานหน่วยเป็นมิลลิเมตรปรอท ซึ่งการเก็บข้อมูลของค่าความดันในหลอดเลือดแดงปอดจะต้องมีระยะเวลาอย่างน้อย 30 วินาที และมีค่าความดันโลหิตอยู่ในเกณฑ์ปกติ

6. เก็บรวบรวมและทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากการศึกษา
7. สรุปผลการวิจัยและเตรียมนำเสนอข้อมูลจากการศึกษา

### การวิเคราะห์ข้อมูล

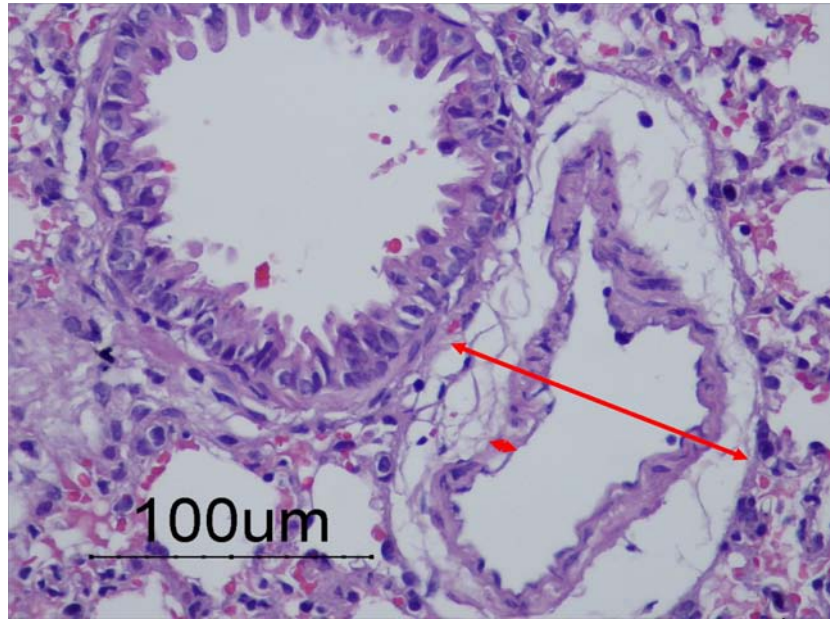
การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS Version 16.0 โดยใช้สถิติ ดังนี้

1. สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ได้แก่ ร้อยละ, ค่าเฉลี่ยเลขคณิต และความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SE) เพื่อแสดงผลของข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด ความดันของหลอดเลือดแดงในปอดและความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวา
2. สถิติเชิงอนุมาน (inferential statistics) เพื่อใช้ในการพิสูจน์สมมติฐาน (hypothesis testing) โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของ continuous variables ระหว่างกลุ่มหนูแรททั้งสามกลุ่ม ถ้ามีความแตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ จะใช้ post hoc comparison ชนิด bonferroni เปรียบเทียบหาคู่ที่แตกต่าง  
กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญ  $p\text{-value} < 0.05$

#### **เกณฑ์เทียบระดับความคิดเห็น**

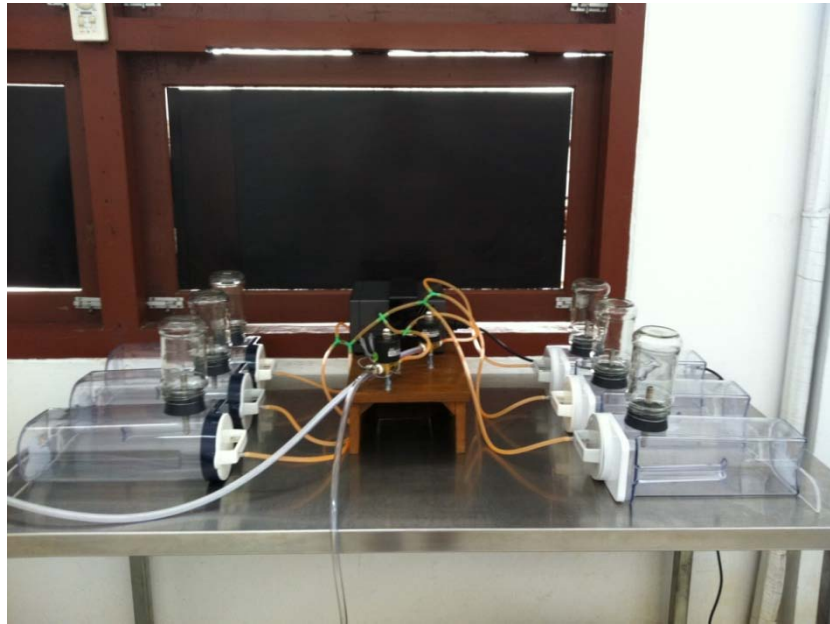
การวิจัยนี้ใช้ค่า  $p\text{-value}$  น้อยกว่า 0.05 เพื่อแสดงความแตกต่างกันอย่างมี  
นัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 3.1 แสดงการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความหนาของชั้น  
กล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปกติ

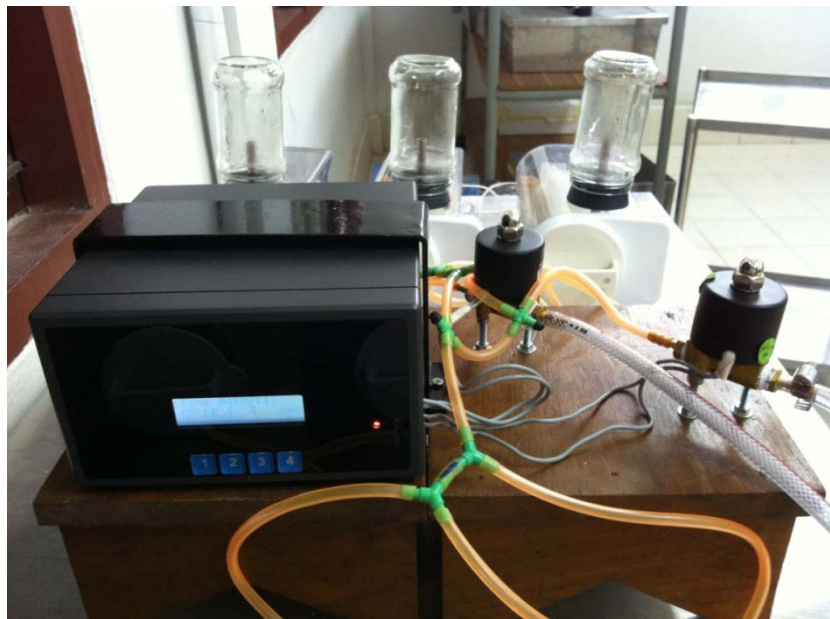


ภาพที่ 3.2 แสดงสถานที่เลี้ยงหนูแรททั้งสามกลุ่ม



ภาพที่

3.3 แสดงอุปกรณ์ในการทำภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia



ภาพที่

3.4 แสดงอุปกรณ์ในการควบคุมการจ่ายก๊าซออกไซด์ไนตริก



ภาพที่ 3.5 แสดงอุปกรณ์อัดก๊าซในระดับออกซิเจน 21 เปอร์เซ็นต์ (air compressor)



ภาพที่ 3.6 แสดงถังก๊าซไนโตรเจนที่ใช้ในการสร้างสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia





ภาพที่ 3.7 แสดงการเริ่มทดลองหนูแรทในกลุ่ม chronic intermittent hypoxia



ภาพที่ 3.8 แสดงการทำภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia ในช่วง light phase ในระบบปิด (จำลองช่วงนอนหลับของหนูแรท)



ภาพที่ 3.9 แสดงการเตรียมอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และติดตั้งโปรแกรมในการวัดค่าทางระบบไหลเวียนโลหิต



ภาพที่ 3.10 แสดงการติดตั้งโปรแกรมและปรับค่ามาตรฐานของเครื่องมือก่อนเริ่มการทดลอง



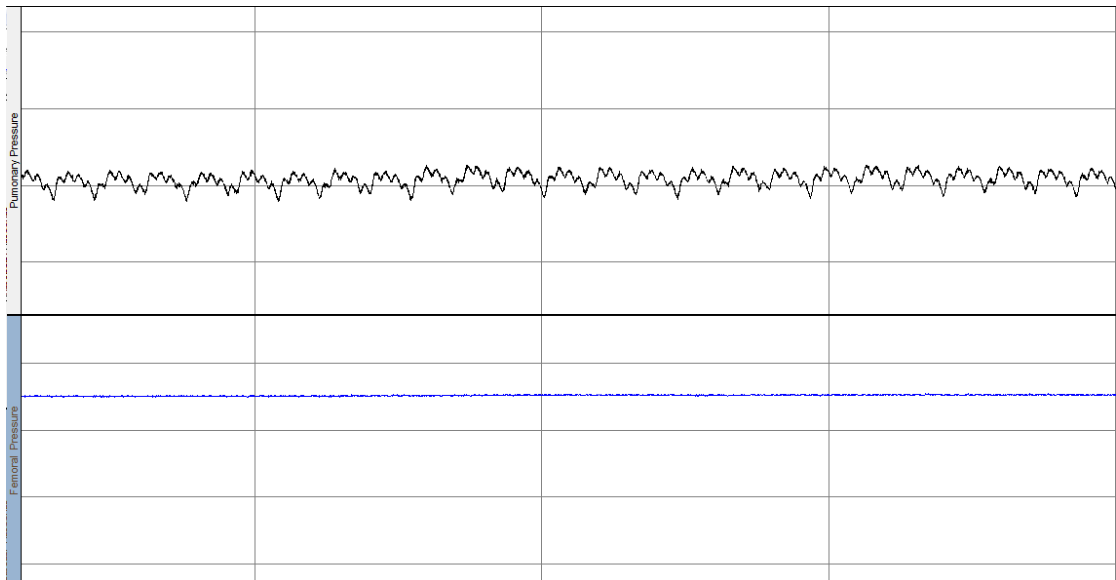
ภาพที่ 3.11 แสดงการเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าของระบบไหลเวียนโลหิต



ภาพที่ 3.12 แสดงการใส่สายเข้าทางหลอดเลือดดำใหญ่ที่ขาหนีบ (femoral vein) เพื่อทำการวัดค่าความดันโลหิตของหนูแรท



ภาพที่ 3.13 แสดงการวัดค่าความดันในหลอดเลือดแดงปอด  
โดยการแทงเข็มพร้อมอุปกรณ์ต่อ ใช้เทคนิค subxiphoid approach



ภาพที่ 3.14 แสดงกราฟของค่าความดันในหลอดเลือดแดงปอดเทียบกับค่าของ  
ความดันโลหิต



ภาพที่ 3.15 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการวัดน้ำหนักหัวใจ  
ของหนูแรท โดยมีความละเอียดที่จุดทศนิยม 4 หลัก



ภาพที่ 3.15 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการวัดน้ำหนักของหนูแรทเพื่อใช้ในการ  
ติดตามอาการระหว่างการศึกษาและใช้ในการคำนวณยาสลบของหนูแรท

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาครั้งนี้ มีจำนวนหนูแรทในงานวิจัยทั้งหมด 18 ตัว เป็นเพศผู้ อายุ 9 สัปดาห์ หนูแรททุกตัวได้รับการเลี้ยงดูที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยตลอดการศึกษา โดยผู้วิจัยต้องได้รับการอบรมที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนเริ่มการวิจัย ซึ่งครอบคลุมเนื้อหาทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการทำงานวิจัยในสัตว์ทดลอง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn university animal care and use committee, CU-ACUC)

### ผลการวิเคราะห์

ข้อมูลที่ได้จากการผลการศึกษา พบว่า กลุ่มหนูแรททั้งหมด 18 ตัว สามารถอยู่ร่วมการวิจัยจนถึงสิ้นสุดทั้งในขั้นตอนของการอยู่ในสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia (CIH) และการได้รับยา bosentan โดยไม่พบปัญหาในระหว่างการศึกษาแต่อย่างใด

ผลของการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด พบว่า ค่าเฉลี่ยของ เพอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน ในกลุ่มหนูแรทควบคุม, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan เท่ากับ  $20.2 \pm 5.2$ ,  $30.7 \pm 12.4$  และ  $26.2 \pm 11.3$  เพอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.231) จำนวนของหลอดเลือดแดงปอดที่มี การเปลี่ยนแปลงหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อใน ผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-50 ไมครอน (number of neomuscularized pulmonary arteriole per 50 total pulmonary vessels) ในกลุ่มหนูแรทควบคุม, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan เท่ากับ  $1.5 \pm 1.4$ ,  $6.3 \pm 4.9$ , และ  $4.8 \pm 1.3$  ตามลำดับ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.042)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ ความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา พบว่า ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกันระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสอง ในกลุ่มหนูแรทควบคุม, กลุ่ม

หนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan เท่ากับ  $0.14 \pm 0.02$ ,  $0.19 \pm 0.04$  และ  $0.18 \pm 0.01$  ตามลำดับ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.015)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต พบว่า ค่าเฉลี่ยของความดันในหลอดเลือดแดงปอดวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) ในกลุ่มหนูแรทควบคุม, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan เท่ากับ  $12.8 \pm 3.3$ ,  $64.7 \pm 6.5$  และ  $25.9 \pm 15.1$  มิลลิเมตรปรอทตามลำดับ (ค่า  $p$ -value น้อยกว่า 0.001) ค่าเฉลี่ยของอัตราการเต้นของหัวใจในกลุ่มหนูแรทควบคุม, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan เท่ากับ  $375.4 \pm 23.7$ ,  $408 \pm 12$  และ  $357.6 \pm 28.7$  ครั้งต่อนาทีตามลำดับ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.011) ค่าเฉลี่ยของความดันโลหิตในกลุ่มหนูแรทควบคุม, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan เท่ากับ  $110.9 \pm 10.1$ ,  $113.1 \pm 10.6$  และ  $111.3 \pm 13.7$  มิลลิเมตรปรอทตามลำดับ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.945)

### ผลการเปรียบเทียบ

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มหนูแรททั้งหมด 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มหนูแรทควบคุม, กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan และกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในข้อมูลของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดในส่วนของจำนวนหลอดเลือดแดงปอดที่มี การเปลี่ยนแปลงหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-50 ไมครอน (number of neomuscularized pulmonary arteriole per 50 total pulmonary vessels) การเปลี่ยนแปลงของ ความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา ได้แก่ อัตราส่วนของ ผนังของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของผนังของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกันระหว่างห้องหัวใจล่างทั้งสอง การเปลี่ยนแปลง ทางระบบไหลเวียนโลหิต ในส่วนของ ค่าเฉลี่ยของความดันในหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) และอัตราการเต้นของหัวใจ แสดงรายละเอียดได้ดังนี้

1. ผลของการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด พบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan มีจำนวนของหลอดเลือดแดงปอดที่มี การเปลี่ยนแปลงหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-50 ไมครอน (number of neomuscularized pulmonary arteriole per 50 total pulmonary vessels) มากกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.045) และในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan เทียบกับกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan

พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.98) ส่วนค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดง ปอด ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน ในกลุ่มหนูแรทควบคุม เทียบกับกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan และในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan เทียบกับกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.28 และ 0.966 ตามลำดับ)

2. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ ความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา พบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan มีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกันระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสอง สูงกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.019) ส่วนในกลุ่ม หนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan เทียบกับกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.99)

3. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลง ทางระบบไหลเวียนโลหิต พบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan มีค่าเฉลี่ยของความดันในหลอดเลือดแดงปอดวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) สูงกว่ากลุ่มหนูแรทควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value น้อยกว่า 0.001) และในกลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan มีค่าเฉลี่ยของความดันในหลอดเลือดแดงปอดวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) ต่ำกว่ากลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value น้อยกว่า 0.001) นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มหนูแรท CIH ที่ได้รับยา bosentan มีค่าเฉลี่ยของอัตราการเต้นของหัวใจต่ำกว่า กลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.01) แต่ในกลุ่ม หนูแรทควบคุม เทียบกับกลุ่มหนูแรท CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.085)

### ผลการวิเคราะห์ปัจจัย

1. การอยู่ในสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia (CIH) ของหนูแรท มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผลการศึกษาดังต่อไปนี้

- การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด ในส่วนจำนวนของ หลอดเลือดแดงปอดที่มี การเปลี่ยนแปลง หนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อใน ผนังหลอดเลือดแดง ปอด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-50 ไมครอน (number of neomuscularized pulmonary arterioles per 50 total pulmonary vessels), การเปลี่ยนแปลงของความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา คำนวณเป็น ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกันระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสอง และการ



เปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต ในส่วนของค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) โดยมีค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.045, 0.019 และ  $<0.001$  ตามลำดับ

- การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด ในส่วนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดง ปอด ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.28)

2. การได้รับยา Bosentan ของหนู แรทในกลุ่ม CIH มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผลการศึกษาดังต่อไปนี้

- การเปลี่ยนแปลง ทางระบบไหลเวียนโลหิต ในส่วนของ ค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) และค่าเฉลี่ยของอัตราการเต้นของหัวใจ โดยมีค่า  $p$ -value เท่ากับ  $<0.001$  และ 0.01 ตามลำดับ

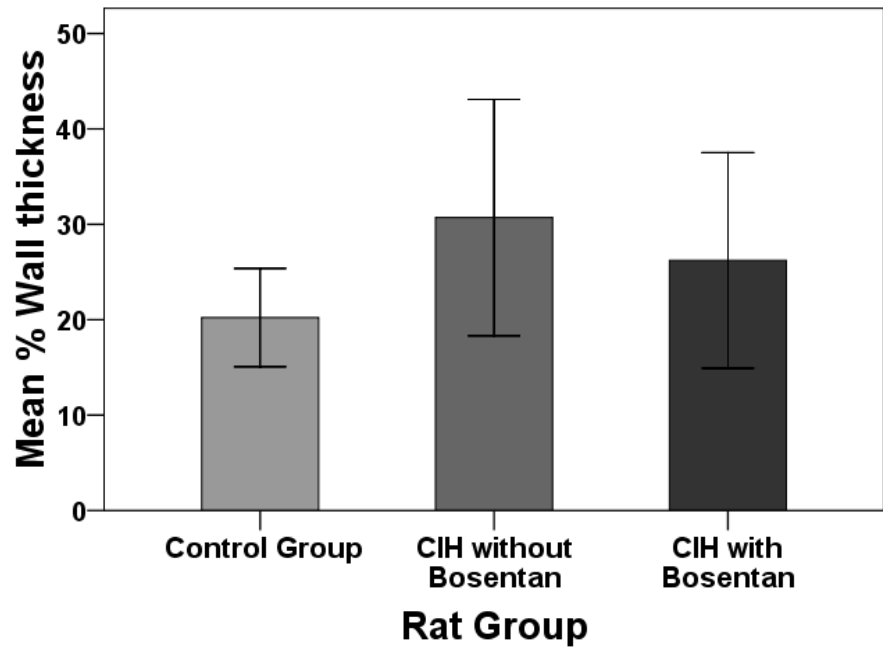
- การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด ในส่วนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของผนังหลอดเลือดแดง ปอด ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 ไมครอน, จำนวนของหลอดเลือดแดงปอดที่มี การเปลี่ยนแปลง หนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อใน ผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-50 ไมครอน (number of neomuscularized pulmonary arteriole per 50 total pulmonary vessels), การเปลี่ยนแปลงของความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา คำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกั้นระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสอง พบว่ามีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.28, 0.966 และ 0.99 ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ  
หลอดเลือดแดงปอดและความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา

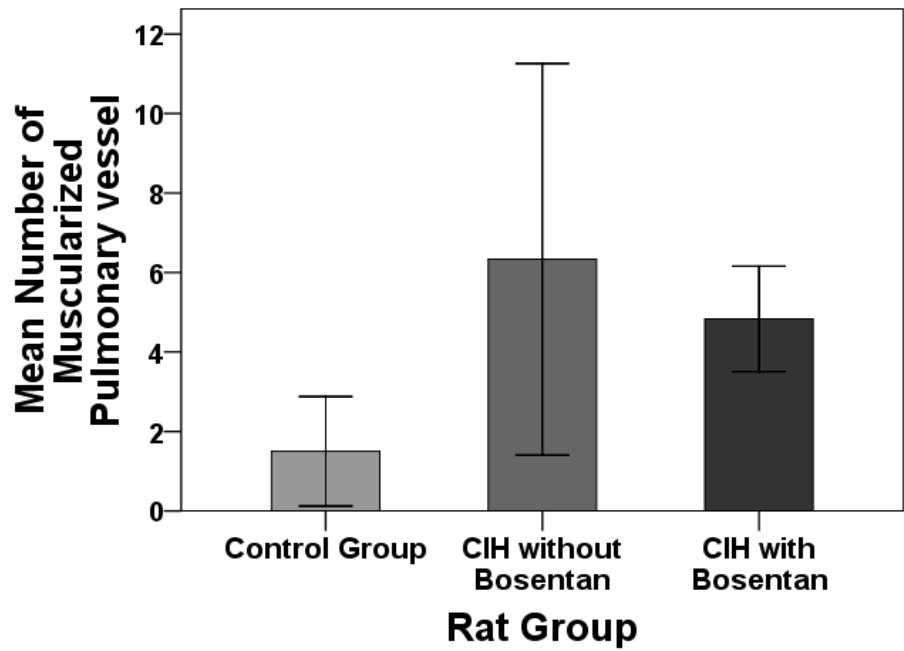
การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอดและ ความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา (Mean $\pm$ SE)	กลุ่มควบคุม	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา bosentan	P value
เปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของ ชั้นกล้ามเนื้อใน ผนังหลอดเลือดแดงปอด (ขนาด 50-100 ไมครอน)	20.2 $\pm$ 5.2	30.7 $\pm$ 12.4	26.2 $\pm$ 11.3	0.231
จำนวนของหลอดเลือดแดงปอดที่มีการเปลี่ยนแปลง หนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อใน ผนังหลอดเลือดแดงปอด (ขนาด 15-50 ไมครอน)	1.5 $\pm$ 1.4	6.3 $\pm$ 4.9	4.8 $\pm$ 1.3	0.042*
อัตราส่วนของ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของ น้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างทั้งสอง	0.14 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.01	0.015*

\* p-value < 0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติ

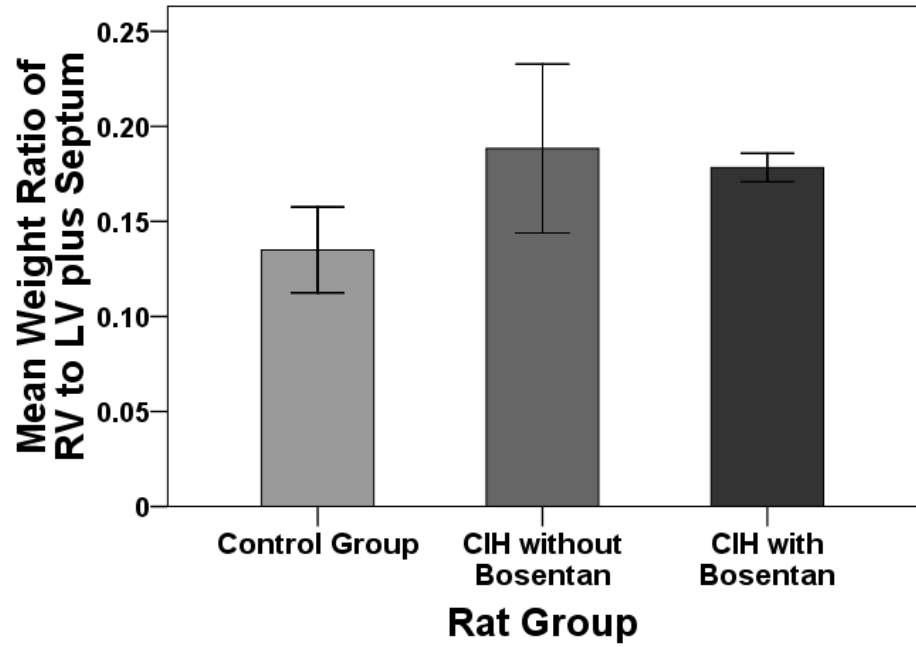
แผนภูมิที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของความหนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อในผนังหลอดเลือดแดงปอด



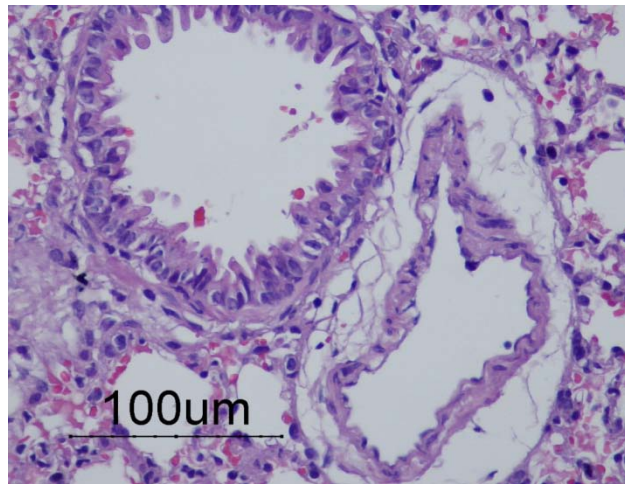
แผนภูมิที่ 4.2 แสดงค่าจำนวนของหลอดเลือดแดงปอดที่การเปลี่ยนแปลงขนาดตัวของชั้นกล้ามเนื้อ



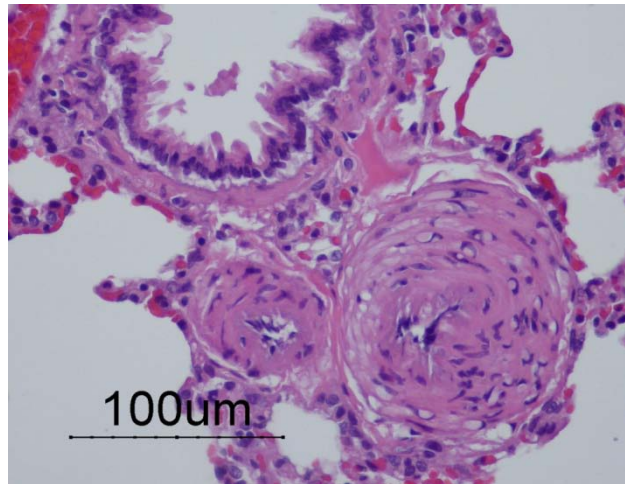
แผนภูมิที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ย อัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกันระหว่างห้องหัวใจล่าง



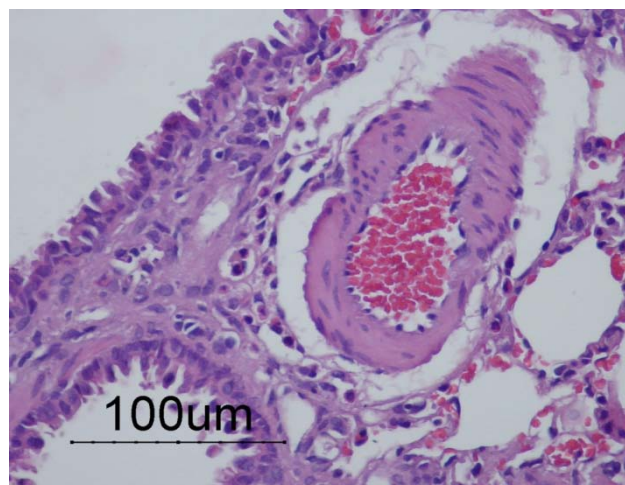
รูปที่ 4.1 แสดงหลอดเลือดแดงโปดขนาด 50-100 ไมครอน โดยการใช้ hematoxylin และ eosin stain ของหนูแรทในแต่ละกลุ่ม



กลุ่มที่ 1



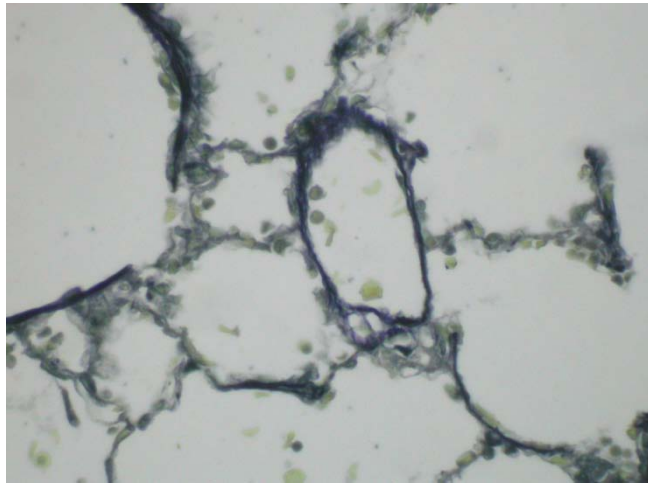
กลุ่มที่ 2



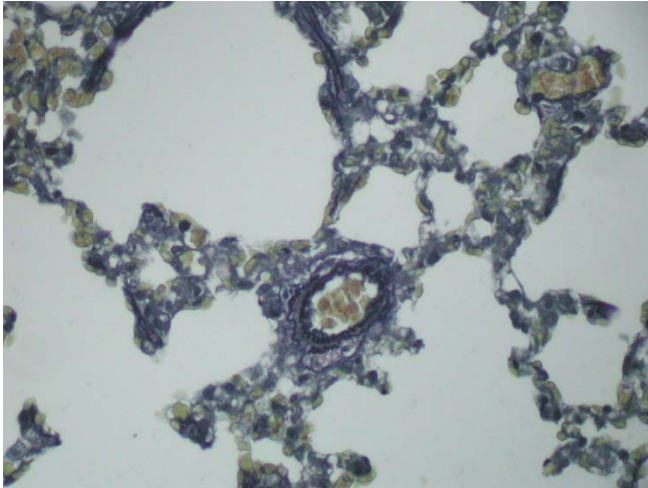
กลุ่มที่ 3

รูปที่ 4.2 แสดงหลอดเลือดแดงปอดขนาด 15-50 ไมครอน โดยการย้อม elastin stain ของหนูแรทในแต่ละกลุ่ม

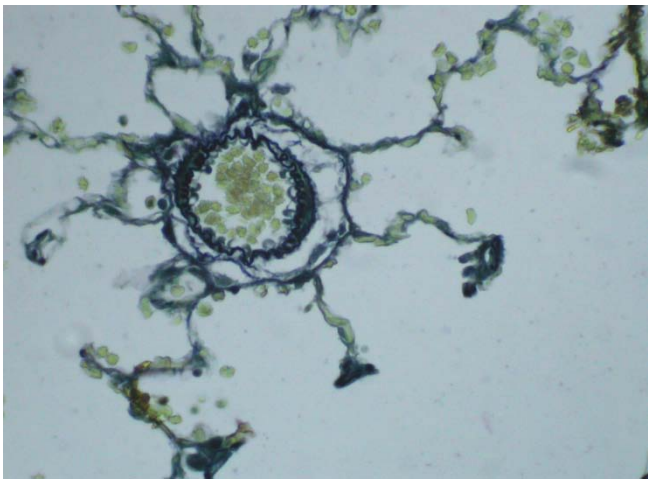
กลุ่มที่ 1



กลุ่มที่ 2



กลุ่มที่ 3

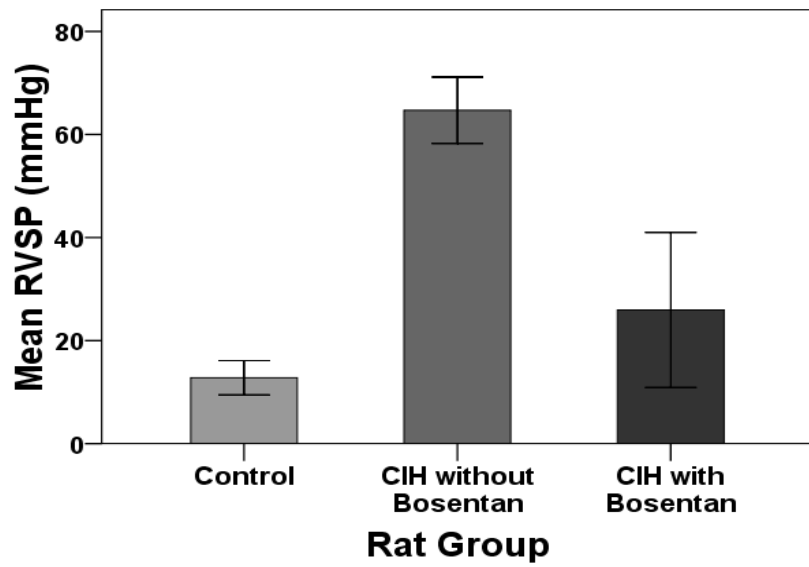


ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต

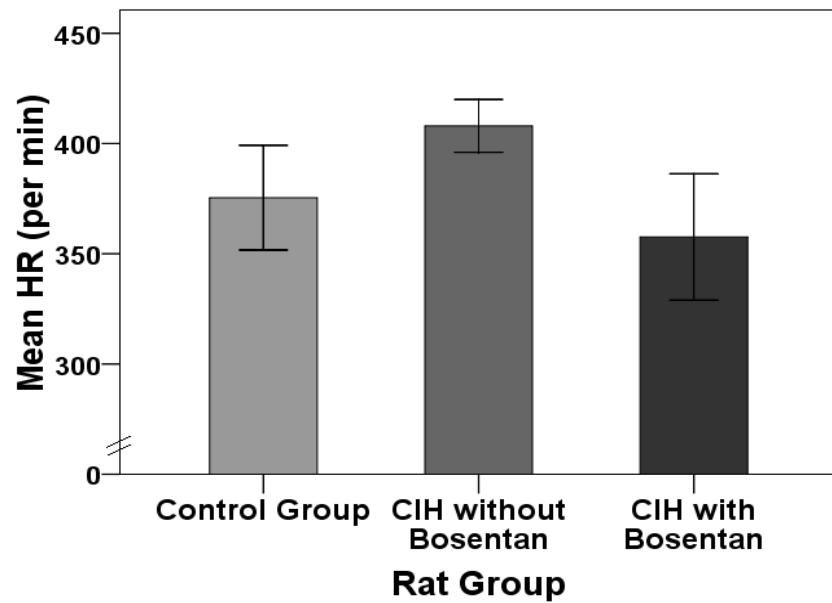
การเปลี่ยนแปลง ทางระบบไหลเวียนโลหิต (Mean $\pm$ SE)	กลุ่มควบคุม	กลุ่ม CIH ที่ไม่ได้รับยา bosentan	กลุ่ม CIH ที่ได้รับยา bosentan	<i>p</i> value
ความดันในหลอดเลือดแดงปอด (วัดเป็น RVSP หน่วยเป็นมิลลิเมตรปรอท)	12.8 $\pm$ 3.3	64.7 $\pm$ 6.5	25.9 $\pm$ 15.1	<0.001*
ความดันโลหิต (หน่วยเป็น มิลลิเมตรปรอท)	110.9 $\pm$ 10.1	113.1 $\pm$ 10.6	111.3 $\pm$ 13.7	0.945
อัตราการเต้นของหัวใจ (หน่วยเป็นครั้งต่อนาที)	375.4 $\pm$ 23.7	408 $\pm$ 12	357.6 $\pm$ 28.7	0.011*

\* *p*-value < 0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติ

แผนภูมิที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด (วัดเป็น RVSP)

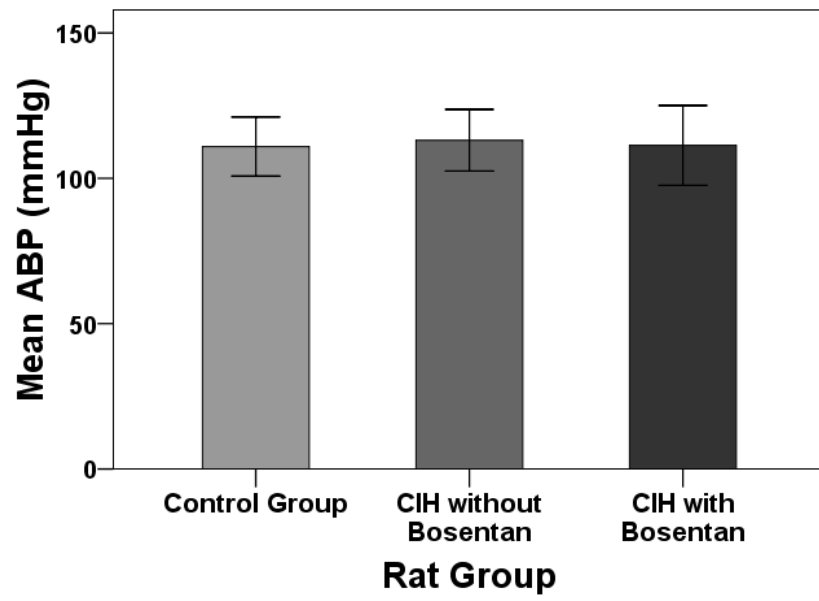


แผนภูมิที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยอัตราการเต้นของหัวใจ





แผนภูมิที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยความดันโลหิต



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาพบว่า กลุ่มหนู แรท สายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ chronic intermittent hypoxia ด้วยวิธีการควบคุมระดับออกซิเจน ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์ทุกๆ 30 วินาทีในระบบปิดนาน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 14 วัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจห้องล่างขวา ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของจำนวนหลอดเลือดแดงปอดที่มี การเปลี่ยนแปลง หนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อใน ผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-50 ไมครอน (number of neomuscularized pulmonary arteriole per 50 total pulmonary vessels), การเพิ่มขึ้นของความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา ซึ่งคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา ต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกันระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสอง และเกิดการเปลี่ยนแปลง ทางระบบไหลเวียนโลหิต ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของ ค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ การศึกษาผลของการ ได้รับยา Bosentan ของหนู แรท ในกลุ่ม CIH ซึ่ง เป็นคำถามของงานวิจัยนี้ พบว่า ยา bosentan มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต ได้แก่ การลดลงของ ค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด ซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) และการลดลงของค่าเฉลี่ยของ อัตราการเต้นของหัวใจ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

#### อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้ถือเป็นงานวิจัยแรกที่ทำขึ้นเพื่อศึกษา ผลของยาโบเซนแทน (bosentan) ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพและความดันของหลอดเลือดแดงปอดในกลุ่ม สัตว์ทดลองที่มีภาวะขาดออกซิเจนสลับกับภาวะออกซิเจนปกติ (chronic intermittent hypoxia) ซึ่งถือเป็นแบบจำลองของทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษา มาก่อน โดยมีการกำหนดแบบจำลองในงานวิจัยอ้างอิงมาจากการศึกษาของ Fagan [7] ที่ทำการศึกษา วิจัยในหนูทดลอง ผลสรุปการศึกษาคือ การกำหนดสภาวะออกซิเจนเป็น 10 เปอร์เซ็นต์สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์ทุกๆ 2 นาที ติดต่อกัน 8 ชั่วโมงต่อวัน นาน 30 วัน มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด มีการเพิ่มขึ้นของความดันในหลอดเลือดแดงปอดและ ความหนาของผนังหัวใจห้องล่างขวาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถือเป็นงานวิจัยแรกและมีความ

ใกล้เคียงกับธรรมชาติของภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับ มากที่สุดต้นแบบหนึ่ง เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพอยู่ระหว่างภาวะการขาดออกซิเจนเรื้อรังและภาวะปกติ นอกจากนี้ ยังได้อ้างอิงต้นแบบของสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia จากงานวิจัยของ Belaidi และคณะ [21] ซึ่งได้ศึกษาถึงผลของยา bosentan ต่อการเปลี่ยนแปลงทางระบบหัวใจและหลอดเลือด ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของระดับความดันโลหิต ในกลุ่มหนูทดลอง สายพันธุ์ Wistar ที่ถูกทำให้เกิดภาวะ ขาดออกซิเจนเป็นช่วงสลับกับสภาวะปกติอย่างต่อเนื่องเรื้อรัง (chronic intermittent hypoxia) โดยกำหนดสภาวะออกซิเจนเป็น 10 เปอร์เซ็นต์สลับกับ 21 เปอร์เซ็นต์ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกัน 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานาน 14 วัน มีศึกษาการออกฤทธิ์ของ ยา bosentan ในระบบของ endothelin ผ่านการออกฤทธิ์ของ hypoxia inducible factor (HIF-1) แต่ยังคงขาดข้อมูลการศึกษาถึงผลของยา bosentan ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของ หลอดเลือดแดงปอดและระดับความดันในหลอดเลือดแดงปอด จึงนำสู่การศึกษานี้ เพื่อศึกษาผล ของยา bosentan ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด (pulmonary vasculature) ใน chronic intermittent hypoxic rat model ซึ่งจากการศึกษาวิจัยนี้ให้ผลของ งานวิจัยเบื้องต้นเกี่ยวกับผลของสภาวะของ chronic intermittent hypoxia สามารถทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจห้องล่างขวา ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของ จำนวนหลอดเลือดแดงปอดที่มี การเปลี่ยนแปลง หนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อใน ผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-50 ไมครอน (number of neomuscularized pulmonary arteriole per 50 total pulmonary vessels), การเพิ่มขึ้นของความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่าง ขวา ซึ่งคำนวณเป็น ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวม ของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกันระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสอง และเกิด การเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของ ค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดง ปอด ซึ่งวัดเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การ เปลี่ยนแปลงดังกล่าวทางผู้วิจัยคิดเห็นว่าน่าจะสอดคล้องกับภาวะแทรกซ้อนของภาวะ ทางเดิน หายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับ ในคน ได้แก่ การเกิดภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูง ตาม พยาธิสรีรวิทยาพื้นฐานของ chronic intermittent hypoxia ที่เหมือนกัน

ผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย พบว่า ยา bosentan สามารถชะลอ การเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นของ ค่าเฉลี่ยความดันในหลอดเลือดแดงปอด วัดผลเป็น right ventricular systolic pressure (RVSP) และค่าเฉลี่ยของ อัตราการเต้นของหัวใจ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่ง เป็นคำถามรอง (secondary research question) ของงานวิจัย ส่วนผลของยาในการลดการ เปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอดและหัวใจห้องล่างขวา วัดผลเป็น การ เปลี่ยนแปลง หนาตัวของชั้นกล้ามเนื้อใน ผนังหลอดเลือดแดง ปอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-50

ไมครอน (number of neomuscularized pulmonary arteriole per 50 total pulmonary vessels), การเพิ่มขึ้นของ ความหนาของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวา ซึ่งคำนวณเป็น ค่าเฉลี่ยของ อัตราส่วนของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างขวาต่อผลรวมของน้ำหนักของผนังห้องหัวใจห้องล่างซ้ายกับผนังกระหว่างห้องหัวใจห้องล่างทั้งสอง พบว่า มีแนวโน้มที่ยาจะมีผลลดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแต่ยังไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทางผู้วิจัยคิดว่าน่าจะเป็นผลมาจาก ระยะเวลาของการศึกษาที่น้อยเกินไปที่จะแสดงให้เห็นถึงผลของการเปลี่ยนแปลงในส่วน ของพยาธิสภาพของหลอดเลือดและหัวใจห้องล่างขวา เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่ต้องใช้เวลา ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นก่อนก็คือการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต ซึ่งสอดคล้องกับ ผลของการศึกษา นอกจากนี้รูปแบบของการให้ยา bosentan ในวิจัยนี้ เป็นการให้ตั้งแต่หนูแรทยัง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสรีรวิทยาของ chronic intermittent hypoxia ซึ่งเทียบเท่ากับการ ให้เพื่อป้องกัน อาจทำให้ผลของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพไม่ชัดเจนเท่ากับการรักษาได้

นอกเหนือจากผลของการวิจัยเพื่อตอบคำถามของการวิจัยที่ได้กำหนดไว้ งานวิจัยนี้ยังสามารถที่จะให้ข้อมูลที่แตกต่างจากงานวิจัยอื่นในส่วนของการศึกษา การ เปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของหลอดเลือดแดงปอด มีการแบ่งออกเป็น 2 ระดับตามขนาดของ หลอดเลือดแดงปอด ได้แก่ หลอดเลือดขนาดใหญ่ (50-100 ไมครอน) และหลอดเลือดขนาดเล็ก (15-50 ไมครอน) ทำให้เห็นถึงลำดับของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่เกิดจากภาวะ chronic intermittent hypoxia ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอดขนาดเล็กก่อน แล้วจึงนำไปสู่ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงปอดขนาดใหญ่และการหนาตัวของหัวใจห้องล่างขวาในที่สุด ดังนั้นจากผลของการศึกษานี้ ทางผู้วิจัยคิดเห็นว่าย่า bosentan น่าจะมีบทบาท ในการป้องกัน และรักษาภาวะความดันในหลอดเลือดแดงปอดสูงจากภาวะทางเดินหายใจอุดกั้น ขณะนอนหลับ เพื่อนำไปสู่งานวิจัยต่อยอดต่อไปในอนาคต

## ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง ดังนั้นต้องมีงานวิจัยในคนเพื่อ ทดสอบผลการศึกษาต่อไป หรืออาจมีการศึกษาต่อยอดในแง่มุมอื่น ซึ่งทางผู้วิจัยขอเสนอแนวทาง ดังต่อไปนี้

1. ออกแบบงานวิจัยที่มีจำนวนสัตว์ทดลองและระยะเวลาของการศึกษาเพิ่มขึ้น เพื่อทดสอบผลของยา bosentan ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของหลอดเลือดแดงปอด และหัวใจห้องล่างขวาในรูปแบบจำลองของ chronic intermittent hypoxia ได้ชัดเจนมากขึ้น และ

มีการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในแง่ของการเปลี่ยนแปลง ของ hypoxia inducible factor (HIF-1) และ การเปลี่ยนแปลงของระดับปริมาณก๊าซในเลือดแดงของสัตว์ทดลอง

2. ออกแบบสภาวะจำลองของ chronic intermittent hypoxia ที่มีการควบคุม ปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ของ หลอดเลือดแดงปอดและหัวใจห้องล่างขวา รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิต

## รายการอ้างอิง

- [1] Arnaud C, Dematteis M, Pepin J-L, Baguet J-P, Lévy P. Obstructive sleep apnea, immuno-inflammation, and atherosclerosis. **Semin Immunopathol.** 2009;31:113-25.
- [2] Chiang AA. Obstructive Sleep Apnea and Chronic Intermittent Hypoxia: A Review. **Chinese Journal of Physiology.** 2006;49:234-43.
- [3] Golbin JM, Somers VK, Caples SM. Obstructive Sleep Apnea, Cardiovascular Disease, and Pulmonary Hypertension. **Proc Am Thorac Soc.** 2008;5:200-6.
- [4] Ozeke O, Ozer C, Gungor M, Celenk MK, Dincer H, Ilicin G. Chronic intermittent hypoxia caused by obstructive sleep apnea may play an important role in explaining the morbidity-mortality paradox of obesity. **Med Hypotheses.** 2011;76(1):61-3.
- [5] Hale CS. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease and mortality: the argument for causality. **J Insur Med.** 2005;37(4):272-82.
- [6] Lavie P, Lavie L. Cardiovascular morbidity and mortality in obstructive sleep apnea. **Curr Pharm Des.** 2008;14(32):3466-73.
- [7] Fagan KA. Physiological and Genomic Consequences of Intermittent Hypoxia Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. **J Appl Physiol.** 2001;90:2502-7.
- [8] Barman SA, Zhu S, White RE. RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. **Vascular Health and Risk Management.** 2009;5:663-71.
- [9] Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. **Pharmacology and Therapeutics.** 2001;92:1-20.
- [10] Kessler R, Chaouat A, Weitzenblum E, Ehrhart MOM, Apprill M, Krieger J. Pulmonary hypertension in the obstructive sleep apnoea syndrome: prevalence, causes and therapeutic consequences. **Eur Respir J.** 1996;9:787-94.

- [11] Nisbet RE, Graves AS, Kleinhenz DJ, Rupnow HL, Reed AL, Fan T-HM, et al. The Role of NADPH Oxidase in Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 2009;40:601-9.
- [12] Zielin´ski J. Effects of intermittent hypoxia on pulmonary haemodynamics: animal models versus studies in humans. **Eur Respir J**. 2005;25:173-80.
- [13] Bradford A. Effects of chronic intermittent asphyxia on haematocrit, pulmonary arterial pressure and skeletal muscle structure in rats. **Experimental physiology**. 2004;89.1:44-52.
- [14] McGuire M, Bradford A. Chronic intermittent hypercapnic hypoxia increases pulmonary arterial pressure and haematocrit in rats. **Eur Respir J**. 2001;18:279-85.
- [15] Alchanatis M, Tourkhoriti G, Kakouros S, Kosmas E, Podaras S, Jordanoglou JB. Daytime Pulmonary Hypertension in Patients with Obstructive Sleep Apnea. **Respiration**. 2001;68:566-72.
- [16] Sebkhii A, Strange JW, Phillips SC, Wharton J, Wilkins MR. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**. 2003;107(25):3230-5.
- [17] Neves C, Tufik S, Chediek F, Poyares D, Cintra F, Roizenblatt M, et al. Effects of sildenafil on autonomic nervous function during sleep in obstructive sleep apnea. **Clinics (Sao Paulo)**. 2010;65(4):393-400.
- [18] Roizenblatt S, Guilleminault C, Poyares D, Cintra F, Kauati A, Tufik S. A double-blind, placebo-controlled, crossover study of sildenafil in obstructive sleep apnea. **Arch Intern Med**. 2006;166(16):1763-7.
- [19] Chen S-J, Chen Y-F, Meng QC, Durand J, Dicarlo VS, Oparil S. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. **American Physiology Society**. 1995:2122-31.
- [20] Jeffrey M, Pearl M, Scott A, Wellmann M, Jerri L, McNamara C, John P, Lombardi C, Connie J, Wagner B, Jenni L, Raake R, et al. Bosentan Prevents Hypoxia-Reoxygenation-Induced Pulmonary Hypertension and Improves Pulmonary Function. **Ann Thorac Surg**. 1999;68:1714-22.

- [21] Elise Belaidi P, Marie Joyeux-Faure P, Christophe Ribuot P, Sandrine H. Launois M, PHD, Patrick Levy M, PHD, Diane Godin-Ribuot P. Major Role for Hypoxia Inducible Factor-1 and the Endothelin System in Promoting Myocardial Infarction and Hypertension in an Animal Model of Obstructive Sleep Apnea. **J Am Coll Cardiol**. 2009;53:1309-17.
- [22] Marc Humbert MD, Ph.D, Olivier Sitbon MD, Gérald Simonneau MD. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. **N Engl J Med**. 2004;351:1425-36.
- [23] McCulloch KM, Docherty C, MacLean MR. Endothelin receptors mediating contraction of rat and human pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia in the rat. **British Journal of Pharmacology**. 1998;123:1621-30.
- [24] Yuyama H, Fujimori A, Sanagi M, Koakutsu A, Noguchi Y, Sudoh K, et al. A novel and selective endothelin ETA receptor antagonist YM598 prevents the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats. **Vascular Pharmacology**. 2005;43:40 – 6.



ภาคผนวก

## การดูแลสัตว์ทดลอง (Animal care)

### 1. Husbandry consideration

#### 1.1 Experimental place and Nursing place

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาสัตววิทยาและสวนสัตว์ทดลอง ตึกพยาบาลวิทยา  
ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 1.2 Housing System

Strictly hygienic conventional

#### 1.3 Caging

Solid bottom, open top

#### 1.4 Cage size

Standard

#### 1.5 Caging materials

Stainless steel

#### 1.6 Environmental requirements

Temperature 25 Celsius degree, humidity 60-70 %

Standard fluorescent light, 12 hour per cycle

#### 1.7 Food

Standard diet, Ad libitum feeding

#### 1.8 Water

RO-UV type of water, Ad libitum feeding

#### 1.9 Bedding

Wood shaving

### 2. Attending veterinary care:

Standard

### 3. Potential animal pain and distress assessment:

#### 3.1 Pain or Distress Classification (USDA Classifications)

Classification E

#### 3.2 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. Anesthetic**

##### 4.1 Medication

Pentobarbital sodium 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

#### **5. Surgery:**

##### 5.1 Surgical procedure

Non-survival, One time

##### 5.2 Tissue Collection

Pulmonary artery/heart/lung

#### **6. Drug administration**

##### 6.1 Gavaging

Catheter 2 mm in diameter and 8 cm in length

Volume administered 1 ml

Frequency once daily

Drug - Bosentan dose 100 mg/kg body weight

## **7. Euthanasia / Disposition of animals:**

### 7.1 Disposal of animals after completion of activity

Euthanatized

Drugs used for euthanasia - Pentobarbital sodium 100 mg/kg  
body weight intraarterial route

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ พญ. เอกฤทัย สุวรรณนาคินทร์

วันเดือนปีเกิด 2 เมษายน พ.ศ. 2524 จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นิสิตคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	2543-2547
แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์	2548
แพทย์ประจำสาขาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์	2549-2551
แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์	2551-2553
ปริญญาและประกาศนียบัตร	
แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	2547
วุฒิปัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์	2553
สมาชิกสมาคมวิชาชีพ	
สมาชิกแพทยสภา	
สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย	
สมาชิกสมาคมอุรเวชช์แห่งประเทศไทย	