

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการศึกษา

#### กลุ่มตัวอย่าง

##### เกณฑ์คัดเข้าร่วมการศึกษา

กลุ่มคนสุขภาพแข็งแรง และกลุ่มนักกีฬา กลุ่มละ 20 คน อายุระหว่าง 18-24 ปี ที่ไม่เคยได้รับสารกระตุ้นหรือวิตามินที่เสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีดัชนีมวลรวมของร่างกาย (Body Mass Index - BMI) อยู่ในเกณฑ์ปกติ ( $18.5-24.9 \text{ Kg/m}^2$ ) (ได้ทำการประเมินก่อนร่วมการศึกษา) โดยผู้เข้าร่วมจะต้องเข้าใจ และยินดีเข้าร่วมการทดลองโดยการเซ็นใบยินยอม ข้อมูลทั้งหมดจะถือเป็นความลับนอกจากผลการทดลองที่เกี่ยวข้องทางวิชาการเท่านั้น และผู้เข้าร่วมทุกคนจะต้องถูกประเมินสุขภาพก่อนและหลังการออกกำลังกาย ได้แก่ วัดความดัน ชีพจร และ อัตราการหายใจ โดยแพทย์และพยาบาล

##### เกณฑ์คัดออกหรือยกเลิกในขณะทำวิจัย

1. มีประวัติโรคเลือดหรือ ได้รับการบาดเจ็บทุกระบบ โดยเฉพาะระบบโครงร่างกล้ามเนื้อ หรือ ระบบหายใจและไหลเวียนโลหิต รวมทั้งเจ็บป่วยด้วยโรคใดๆมาก่อนหน้านี้เป็นเวลา 6 เดือน และต้องไม่มีความผิดปกติเรื้อรัง เช่น เป็นหวัด ไอ วิงเวียนศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ หรือ คัดจมูกอย่างต่อเนื่อง เป็นต้น

2. มีความผิดปกติ เช่น ใจสั่น หน้ามืด วิงเวียนศีรษะ ทั้งขณะหรือก่อนหน้าการศึกษา รวมทั้งมีอาการปวดเมื่อยอย่างรุนแรง หรือ อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเริ่มออกกำลังกาย

3. ผู้เข้าร่วมการศึกษามีความประสงค์ขอยกเลิกการศึกษาวิจัยครั้งนี้ด้วยตนเอง ทั้งก่อนและขณะทำการศึกษารั้งนี้

#### สถานที่ทำการวิจัย

- ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชากายภาพบำบัด ชั้น 4

- ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาเคมีคลินิก ชั้น 7

อาคาร 12 ชั้น คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

## อุปกรณ์ และสารเคมี

### อุปกรณ์

1. Treadmill Marquette Series 2000 (USA)
2. Heart Rate Monitor (Polar Coded, Finland)
3. กระดานค่า RPE Borg Scale
4. นาฬิกาจับเวลา ความละเอียด 0.01 วินาที
5. UV-spectrophotometer (Shimadzu-1600A, Japan)
6. Microcentrifuge Tube (1.5 ml) (Hycon)
7. Centrifuge
8. Vortex
9. แบบฟอร์มไบอินซอม และแบบบันทึกผล

### สารเคมี

- |                                      |                             |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1. Meta-phosphoric acid              | Sigma, St. Louis, MO, USA   |
| 2. Phosphate Solution ( $K_2HPO_4$ ) | Merck, Germany              |
| 3. DTNB                              | Sigma, St. Louis, MO, USA   |
| 4. Normal Saline Solution (NSS)      | Merck, Darmstadt, Germany   |
| 5. Trichloroacetic Acid (TCA)        | Aldrick, Milwaukee, MI, USA |
| 6. Thiobarbituric Acid (TBA)         | Aldrick, Milwaukee, MI, USA |
| 7. Sodium Dithionite                 | Merck, Darmstadt, Germany   |
| 8. GuHCl                             | BDH Chemical, Sydney        |
| 9. Perchloric Acid (PCA)             | Merck, Darmstadt, Germany   |
| 10. Xylenol Orange (XO)              | Sigma, St. Louis, MO, USA   |
| 11. Ammonium Ferrous Sulphate        | BDH Chemical, Sydney        |
| 12. Chloroform                       | Merck, Darmstadt, Germany   |
| 13. EDTA                             | BDH Chemical, Sydney        |
| 14. Malondialdehyde                  | Aldrick, Milwaukee, MI, USA |
| 15. t-Butyl Hydroperoxide            | Sigma, St. Louis, MO, USA   |
| 16. Reduced Glutathione              | Sigma, St. Louis, MO, USA   |

## ขั้นตอนการศึกษา

### โปรแกรมการออกกำลังกาย

โปรแกรมการออกกำลังกาย จะใช้ Modified Bruce Protocol ซึ่งเป็นรูปแบบการออกกำลังกายอย่างหนัก ตามคำแนะนำจาก ACSM's Guideline (2000) ดังรายละเอียด ดังต่อไปนี้

1. ยืดกล้ามเนื้อ Hip Flexors (กล้ามเนื้องอสะโพก), Hip Extensor (กล้ามเนื้อเหยียดสะโพก), Quadriceps (กล้ามเนื้อเหยียดเข่า), Hamstrings (กล้ามเนื้องอเข่า), Gastrocnemius และ Soleus (กล้ามเนื้อน่อง) 30 วินาทีต่อกล้ามเนื้อต่อข้าง ใช้เวลารวมประมาณ 3 นาที

2. อบอุ่นร่างกายด้วยการวิ่งบนลู่วิ่ง (Treadmill) อย่างเบาๆ อัตราการเต้นของหัวใจไม่เกิน 35% ของอัตราการเต้นของหัวใจสูงสุด ( $HR_{max}$ ) หรือ อัตราความรู้สึกเหนื่อย หรือ Rate Perceived Exertion (RPE) น้อยกว่า 10 โดยใช้เวลาประมาณ 5 นาที

3. ผู้ถูกทดสอบวิ่งบนลู่วิ่งตามวิธีของ Bruce ดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1	ความเร็ว 1.7 mph	ความชัน	0 %
ขั้นที่ 2	ความเร็ว 1.7 mph	ความชัน	5 %
ขั้นที่ 3	ความเร็ว 1.7 mph	ความชัน	10 %
ขั้นที่ 4	ความเร็ว 2.5 mph	ความชัน	12 %
ขั้นที่ 5	ความเร็ว 3.4 mph	ความชัน	14 %
ขั้นที่ 6	ความเร็ว 4.2 mph	ความชัน	16 %
ขั้นที่ 7	ความเร็ว 5.0 mph	ความชัน	18 %
ขั้นที่ 8	ความเร็ว 5.5 mph	ความชัน	20 %

ในแต่ละขั้นใช้เวลาวิ่ง 3 นาที จนกระทั่งมีอัตราการเต้นของหัวใจ 70-89%  $HR_{max}$  (Target 85%) หรือ RPE มีค่าระหว่าง 14-16 (Target 15)

4. วัดอัตราการเต้นของหัวใจ และ อัตราความรู้สึกเหนื่อย หรือ Rate Perceived Exertion (RPE) เมื่อสิ้นสุดในแต่ละขั้นของการออกกำลังกาย

5. ท่อขยับ หุดยุคสายพานให้เครื่องช้าลง ในเวลา 5 นาที เพื่อให้ผู้เข้าร่วมวิจัยได้ผ่อนคลาย

### ขั้นตอนการทดสอบ

1. นำเสนอ โครงการวิจัยแก่คณะกรรมการสิทธิมนุษยชน และ ได้รับการอนุมัติให้ดำเนินการ เก็บข้อมูลเรียบร้อยแล้ว

2. อธิบายจุดประสงค์ ประโยชน์และวิธีการศึกษาแก่ผู้เข้าร่วม พร้อมให้เซ็นใบยินยอม

3. ทำการประเมินสุขภาพก่อนและหลังการออกกำลังกาย ได้แก่ วัดความดัน ชีพจร และ อัตราการหายใจ โดยแพทย์และพยาบาล

4. การเจาะเลือดจะทำก่อน และหลังการออกกำลังกาย โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่ บริเวณแขนด้านหน้า จากนั้นดูดเลือดจำนวน 3 มิลลิลิตร เก็บไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีสาร กันเลือดแข็งตัว (Heparin) 2 หลอด โดยนักเทคนิคการแพทย์ จากนั้นให้ผู้เข้าร่วมการวิจัยได้ออก กกำลังกายตามโปรแกรมที่ได้จัดไว้ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว หลังการออกกำลังกายเสร็จสิ้นทันที จะทำ การเจาะเลือดอีกครั้งในปริมาณเท่ากับปริมาณที่เจาะในครั้งก่อนออกกำลังกาย นำเลือดที่เจาะไปแช่ เย็น และทำการตรวจวัดภายในวันดังกล่าว

#### การตรวจวัดปริมาณสารชีวเคมีในเลือด

สารชีวเคมีที่จะตรวจวัด ได้แก่ Protein Hydroperoxide, Malondialdehyde และ Glutathione มีวิธีการดังนี้

##### 1. Protein Hydroperoxide (PrOOH) (Gay & Gebicki, 2003)

นำน้ำเลือด (Plasma) 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติม (0.2 M) Perchloric Acid (PCA) 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นให้ตกตะกอน แล้วนำไปแช่เย็นประมาณ 5 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำด้านบนออก ให้เหลือแต่ตะกอน (Pellet) เติม (6 M) GuHCl 1.1 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ตะกอนบริเวณก้นหลอด ตก และเติม Chloroform 1 มิลลิลิตร เพื่อให้เกิดการแยกชั้น ดูดสารน้ำส่วนบน (Aqueous Layer) ใส่ใน Micro Centrifuge 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Sodium Dithionite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) 0.1 มิลลิลิตร ใน หลอดควบคุม (Blank), 6M GuHCl 0.1 มิลลิลิตร ในหลอดที่มีน้ำเลือด รวมถึง 0.5 M PCA 40 ไมโครลิตร, (5 mM) Xylenol Orange (XO) 25 ไมโครลิตร, Ammonium Ferrous Sulphate ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วปั่นให้ตกตะกอนอีก 5 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสาร Hydroperoxide โดยใช้ สารมาตรฐาน Tert-Butyl Hydroperoxide (ภาคผนวก ข) เป็นหน่วยเป็นไมโคร โมลลาร์ ( $\mu\text{M}$ )

##### 2. Malondialdehyde (Chirico, 1994)

นำน้ำเลือด (Plasma) มา 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.9% Normal Saline Solution (NSS) 0.45 มิลลิลิตร, 100% Trichloroacetic Acid (TCA) 1.0 มิลลิลิตร และ 4% Thiobarbituric Acid (TBA) 0.2 มิลลิลิตร นำไปต้ม ณ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วจึงนำไปแช่น้ำเย็น 1-2 นาที ทำการปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟ

มาตรฐาน (ภาคผนวก ข) โดยใช้สารมาตรฐาน Malondialdehyde (MDA) เพื่อหาปริมาณ Malondialdehyde เป็น ไมโครโมลลาร์ ( $\mu\text{M}$ )

### 3. Glutathione (Beutler et. al, 1963)

นำเม็ดเลือดแดง 0.4 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1.6 มิลลิลิตร และ สารตกตะกอน โปรตีน (Precipitation Solution) 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอน 5 นาที นำสารน้ำด้านบน (Superior) แยกเป็น 2 หลอด (Duplicate) หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เติม Phosphate Solution 0.4 มิลลิลิตร และ DTNB 0.4 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมในเครื่องปั่น ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร Glutathione (ภาคผนวก ข) หน่วยของปริมาณสารแสดงเป็น มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรของเม็ดเลือดแดง (mg/dl Erythrocyte)

### การวิเคราะห์ข้อมูล

ปริมาณของสารชีวเคมีต่างๆ; แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ยและความคาดเคลื่อนมาตรฐานของ ค่าเฉลี่ย (Mean  $\pm$  SEM) และนำมาเปรียบเทียบด้วยสถิติ Mann-Whitney U Test ระหว่างกลุ่มคน ปกติและนักกีฬา และเปรียบเทียบปริมาณที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังการออกกำลังกายอย่างหนัก ในแต่ละกลุ่มด้วย Wilcoxon Signed Ranks Test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved