บทที่ 3

วิธีการดำเนินการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

เกณฑ์คัดเข้าร่วมการศึกษา

กลุ่มอาสาสมัครที่ออกกำลังกายไม่สม่ำเสมอและมีสุขภาพแข็งแรง อายุระหว่าง18-35 ปี จำนวน 20 ราย ไม่เคยได้รับสารกระตุ้นหรือวิตามินที่เสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี และมีดัชนีมวลกาย (Body mass index; BMI) อยู่ในเกณฑ์ปกติ (18.5-24.9 กก./ม.^{2} อ้างอิง WHO และ International obesity task force) (ได้ทำการประเมินก่อนร่วมการศึกษา) และต้องเป็นผู้ออกกำลังกายไม่สม่ำเสมอ คือ ต่ำกว่า 3 ครั้งต่อสัปดาห์

เกณฑ์การคัดออกหรือยกเลิกในขณะทำวิจัย

1. มีความผิดปกติ เช่น ใจสั่น หน้ามืด วิงเวียนศีรษะ ทั้งขณะหรือก่อนหน้าการศึกษา รวมทั้งมีอาการปวดเมื่อยอย่างรุนแรง หรืออัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเริ่มออกกำลังกาย

2. ผู้เข้าร่วมการศึกษามีความประสงค์ขอยกเลิกการศึกษาวิจัยครั้งนี้ด้วยตนเอง ทั้งก่อนและขณะทำการศึกษาครั้งนี้

สถานที่ทำการวิจัย

- ห้องปฏิบัติ Oxidative Stress and Exercise Biochemistry ชั้น 4 ภาควิชากายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

- สถานที่ออกกำลังกาย ณ สถานีอนามัยบ้านหนองหลุม ตำบลป่าสัก อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. Spectrophotometer รุ่น Biochrom Libra S11 England
2. Treadmill รุ่น Marquette series 2000 USA
3. Heart rate monitor รุ่น Polar M22^{TM} Finland

4. Microcentrifuge tube

5. Centrifuge

6. Vortex

7. นาฬิกาจับเวลา ความละเอียด 0.01 วินาที

8. เครื่องชั่งน้ำหนัก

9. เครื่องวัดความดันโลหิต

10. กระดานค่า RPE Borg scale

11. แบบฟอร์มใบยินยอม และแบบบันทึกผล

สารเคมี

1. Trolox (Sigma, Germany)
2. 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulphonic Acid) (ABTS) (Sigma, Germany)
3. Potassium Persulfate (Sigma, Germany)
4. Sodium Chloride (Lab-Scan, Thailand)
5. Thiobarbituric Acid (TBA) (Fluka, Germany)
6. Orthophosphoric Acid (Merck, Germany)
7. Trichloroacetic acid
8. Xylenol orange
9. Ammonium ferrous sulfate
10. Perchoric acid

ขั้นตอนการศึกษา

การสร้างโปรแกรมการออกกำลังกาย

1. เตรียมเพลงที่จะใช้ประกอบการเต้นแอโรบิก
2. คิดท่าทางประกอบจังหวะเพลง
3. ให้ผู้นำซ้อมตามท่าที่คิดไว้
4. ปรับท่าทาง และจังหวะให้ได้ระดับความหนักของการออกกำลังกายในระดับปานกลาง (64-75%MHR) โดยสุ่มวัดจากผู้เข้าร่วมการทดลอง 5 คน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายละเอียดโปรแกรมการออกกำลังกายแอโรบิกโดยวิธีการเต้นแอโรบิก (ดังภาคผนวก ค)แบ่งเป็น 3 ช่วง คือ

1. ช่วงเร่งออกกำลังกาย ใช้เวลา 20 นาที ด้วยจังหวะ70 ครั้งต่อนาที ทำท่าละ 8 ครั้ง ทำท่าละ 2 ชุด

2. ช่วงอบอุ่นร่างกาย ใช้เวลา 4 นาที ด้วยจังหวะ 44 ครั้งต่อนาที ทำท่าละ1-4 ครั้ง ทำท่าละ 2 ชุด

3. ช่วงผ่อนออกกำลังกาย ประกอบด้วย

ก. ยืดกล้ามเนื้อ ใช้เวลา 5 นาที มีจังหวะ 42 ครั้งต่อนาที โดยนับ 1-5 ต่อ 1 ท่า ทำท่าละ 2 ชุด

ข. ท่าบริการหายใจ ใช้เวลา 1 นาที ทำท่าละ 3 ครั้ง

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. หลังจากกลุ่มตัวอย่างทุกคนได้รับข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัย และลงลายมือยินยอมเข้าร่วมวิจัยแล้ว ให้ปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

2. ระยะการเก็บข้อมูล แบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ

2.1 ระยะควบคุม 1 สัปดาห์ วันที่ 1-7 ของการศึกษา

2.1.1 ในวันแรกกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมดจะถูกเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดปริมาณสารชีวเคมีในเลือด ได้แก่ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเกิดอนุมูลอิสระจากภาวะออกซิเดทีฟสเตรส (oxidative stress) คือ สารโปรตีนไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Proteinhydroperoxide; PrOOH) และมาลอนไดออลดีไฮด์ (Malondialdehyde; MDA) และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Total antioxidant capacity; TAC) และผลิตภัณฑ์จากกระบวนการอักเสบ คือ อินเตอร์ลิวคินทู (Interleukin 2; IL-2) วัดปริมาณการใช้ออกซิเจนสูงสุด (Maximal Oxygen consumption; VO_2 max) และระยะเวลาที่ใช้วิ่งทั้งหมดจนหมดแรง (Time To Exhaustion) จากการทดสอบ Bruce maximal treadmill test

ในวันที่ 7 นักกีฬาทุกคนถูกเจาะเลือดและทดสอบร่างกายเป็นครั้งที่ 2 เช่นเดียวกับ ครั้งแรก

2.2. ระยะศึกษา 6 สัปดาห์

2.2.1 กลุ่มผู้เข้าร่วมการศึกษาเข้าโปรแกรมการออกกำลังกายระดับปานกลางแบบเต้นแอโรบิกที่สถานที่ออกกำลังกายของสถานีอนามัยบ้านหล่ม ตำบลป่าสัก อำเภอเมือง จังหวัดลำพูนอย่างน้อยอาทิตย์ละ 3 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 สิ้นสุดสัปดาห์ที่ 6 ผู้เข้าร่วมการศึกษาทุกคนถูกเจาะเลือดและทดสอบร่างกายเป็นครั้งที่ 3 เหมือนวันแรกและวันที่ 7 ของการศึกษา

วิธีการตรวจวัดปริมาณสารชีวเคมีในเลือด

1. สารโปรตีนไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (PrOOH)

ทำการตรวจวัดด้วยวิธี Ferric Xylenol Orange (FOX) ตามวิธีของ Gay และ Gebicki (2003) โดยนำน้ำเลือด (Plasma) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร มาเติม (0.2 M) Perchloric Acid (PCA) 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 ต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำด้านบนออกให้เหลือแต่ตะกอน จากนั้นเติมสารละลาย (6 M) GuHCl จำนวน 800 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย (0.5 M) PCA จำนวน 40 ไมโครลิตร, (5 mM) Xylenol orange (XO) จำนวน 25 ไมโครลิตร, และAmmonium ferrous sulphate (Fe^{2+}) จำนวน 10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด แล้วจึงนำมาปั่นให้ตกตะกอนอีก 5 นาที ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นำไปวัดค่ากระดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสาร Hydroperoxide โดยใช้สารมาตรฐาน Tert-Butyl Hydroperoxide หน่วยเป็นไมโครโมลาร์ (μM)

2. Malondialdehyde (MDA)

ทำการตรวจวัดด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) จะทำการตรวจวัดโดยนำจำนวนสาร มาลอนไดอัลดิไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) มาเป็นดัชนีชี้วัดปริมาณการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ด้วยวิธีของ Chirico (1994) โดยนำน้ำเลือดพลาสมา 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.9% Normal saline solution (NSS) จำนวน 0.45 มิลลิลิตร, 100% Trichloroacetic acid (TCA) จำนวน 1.0 มิลลิลิตร และ 4% Thiobarbituric acid (TBA) จำนวน 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้ม ณ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่น้ำเย็น 1-2 นาที ทำการปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐาน Malondialdehyde (MDA) เพื่อหาปริมาณ Malondialdehyde เป็น ไมโครโมลลาร์ (μM)

3. สภาวะต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant status; TAC)

ทำการตรวจวัดสภาวะต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant status) โดยการใช้วิธีการของ Re และคณะ (1999) ด้วยวิธี ABTs decolorization โดยการผสมสารละลาย ABTs (14 mM) กับตัวกระตุ้น Potassium persulfate ที่ความเข้มข้น 2.45 mM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยการกลั่นจนได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.7 $\pm$ 0.2 จากนั้นเติมพลาสมาในปริมาณ 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไมโครลิตร แล้วทำการติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเป็นระยะเวลา 3 นาที แล้วทำคำนวณเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงต่อนาที (ΔA/min) และทำการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพลาสมา โดยเปรียบเทียบกับอัตราการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox ที่เท่ากับ 0.1 และแสดงฤทธิ์เป็นหน่วยของมิลลิโมลของ Trolox ในเลือด1 ลิตร (mmol Trolox/L)

4. Interleukin-2 (IL-2)

ทำการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA kit Test โดยตามวิธีการตรวจวัดใน Quantikine®, R&D systems. นำน้ำเลือดพลาสมาจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงใน 96-wells ที่มี Anti-IL-2 polyclonal antibody ตรึงไว้ที่ก้นหลุม จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้างออกเป็นจำนวน 3 รอบ จากนั้นจึงเติมสารละลายที่ IL-2 และ HRP จำนวน 400 ไมโครลิตร แล้วทิ้วไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการดูดส่วนใส่ออกให้หมด ทำการเติมสารทำปฏิกิริยาหรือ TMB ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที จนเกิดสี แล้วจึงเติมสารหยุดปฏิกิริยา (Sulfuirc acid) จำนวน 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 450 นาโนเมตร ภายใน 30 นาที ปริมาณของ IL-2 ในพลาสมาคำนวณได้จากกราฟของค่าการดูดกลืนแสงของสาร IL-2 (31.2-2,000 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิธีการตรวจวัดปริมาณการใช้ออกซิเจนสูงสุด (VO_2 max) และระยะเวลาที่ใช้วิ่งจนรู้สึกเหนื่อย (Maximal exhaustive running time) จนอัตราความรู้สึกเหนื่อย หรือ Rate perceived exertion (RPE) มีค่าถึง 15 หรือที่ 85% ของอัตราการเต้นหัวใจสูงสุด(Maximal heart rate; MHR)

จะใช้ Modified bruce protocol และรูปแบบการออกกำลังกายอย่างหนักตามคำแนะนำจาก ACSM's Guideline (2005) ดังรายละเอียด ดังต่อไปนี้

1. ยืดกล้ามเนื้อ Hip flexors (กล้ามเนื้องอสะโพก) Hip extensor (กล้ามเนื้อเหยียดสะโพก) Quadriceps (กล้ามเนื้อเหยียดเข่า) Hamstring (กล้ามเนื้องอเข่า) Gastrocnemius และ Soleus (กล้ามเนื้อน่อง) ใช้เวลาประมาณ 3 นาที

2. อบอุ่นร่างกายด้วยการวิ่งบนลู่วิ่งอย่างเบาๆ อัตราการเต้นของหัวใจไม่เกิน 35% ของอัตราการเต้นของหัวใจสูงสุด (MHR) หรือ อัตราความรู้สึกเหนื่อย หรือ Rate perceived exertion (RPE) น้อยกว่า 10 (RPE 6-20 scale) โดยใช้เวลาประมาณ 5 นาที

3. ผู้ถูกทดสอบวิ่งบนสายพานเลื่อนไฟฟ้าจนกระทั่งอัตราความรู้สึกเหนื่อย หรือ Rate perceived exertion (RPE) มีค่าถึง 15 หรืออัตราการเต้นของหัวใจมีค่าเท่ากับ 85% ของอัตราการเต้นหัวใจสูงสุด(Maximal heart rate; MHR) ตามวิธีการทดสอบ Modified bruce treadmill Protocol ของ ดังตารางต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 แสดงการวิ่งตามการทดสอบของ Modified bruce treadmill protocol

ระดับ	เวลา (นาที)	ความเร็ว (กม./ชม.)	ระดับความชัน
1	0	2.74	0
2	3	4.02	2
3	6	5.47	4
4	9	6.76	6
5	12	8.05	8
6	15	8.85	10
7	18	9.65	12
8	21	10.46	14
9	24	11.26	15
10	27	12.07	15

4. วัดอัตราการเต้นของหัวใจ และอัตราความรู้สึกเหนื่อย หรือ Rate perceived exertion (RPE) ในแต่ละขั้นของการออกกำลังกาย หาก ถึง 15 (RPE 6-20 scale) ในขณะออกกำลังกายหรืออัตราการเต้นของหัวใจมีค่าเท่ากับ 85% ของอัตราการเต้นหัวใจสูงสุด(Maximal heart rate; MHR) ให้หยุดการออกกำลังกายได้ทันที พร้อมบันทึกผล

5. ค่อยๆ หยุดสายพานให้เครื่องทำงานช้าลง ในเวลา 5 นาที เพื่อให้ผู้เข้าร่วมศึกษาได้ผ่อนคลาย แล้วเก็บปัสสาวะทันทีเมื่อการทดสอบสิ้นสุดให้บันทึกเวลาที่ทำได้ และนำมาคำนวณปริมาณ VO_2 max ด้วยสูตร

เพศหญิง VO_2 max=4.38 × T - 3.9

โดยที่ T = ระยะเวลาที่ใช้วิ่งจนรู้สึกเหนื่อย(Maximal exhaustive running time) จนอัตราความรู้สึกเหนื่อย หรือ Rate perceived exertion (RPE) มีค่าถึง 15 หรือที่ 85% ของอัตราการเต้นหัวใจสูงสุด(Maximal heart rate; MHR) (นาที)

แล้วนำค่าที่ได้มาแทนในสมการ เพื่อหาค่าปริมาณการใช้ออกซิเจนสูงสุดของเพศหญิง (Pollock et al.,1982)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ข้อมูลทั่วไปน้ำหนัก, ส่วนสูง, อายุ, ความดันโลหิต ชีพจร แบ่งเป็นช่วงหาความถี่แล้วแสดงเป็นร้อยละเป็นร้อยละและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง สารโปรตีนไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Proteinhydroperoxide; PrOOH) และมาลอนไดออลดีไฮด์ (Malondialdehyde; MDA) และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Total antioxidant capacity; TAC) และผลิตภัณฑ์จากกระบวนการอักเสบ คือ อินเตอร์ลิวคินทู (Interleukin 2; IL-2) ในเลือด วัดปริมาณการใช้ออกซิเจนสูงสุด (Maximal Oxygen consumption; VO_2 max) และระยะเวลาที่ใช้วิ่งจนรู้สึกเหนื่อย(Maximal exhaustive running time) จนอัตราความรู้สึกเหนื่อย หรือ Rate perceived exertion (RPE) มีค่าถึง 15 หรือที่ 85% ของอัตราการเต้นหัวใจสูงสุด(Maximal heart rate; MHR)จำนวน 3 ครั้ง ตามระยะการเก็บข้อมูล โดยใช้สถิติ repeated ANOVA หรือ Friedman test (SPSS version 12) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แล้วแต่ความเหมาะสมของข้อมูล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved