

### บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

#### กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มอาสาสมัครที่ออกกำลังกายไม่สม่ำเสมอ คือต่ำกว่า 3 ครั้งต่อสัปดาห์และมีสุขภาพแข็งแรง เพศชาย มีอายุระหว่าง 18-23 ปี จำนวน 29 คน ทำการแบ่งออกไป 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองที่ได้รับ NAC และกลุ่มควบคุม (control) โดยใช้วิธีการสุ่มเลือกกลุ่มแบบบล็อก (block randomization) ดังนี้

กลุ่มทดลอง จำนวน 16 คน ได้รับการรับประทาน NAC (FLUIMUCIL A600) ซึ่งผลิตโดย ZAMBON Switzerland Ltd. นำเข้ามาในประเทศไทยโดย บริษัท เสริมมิตรพาณิชย์ จำกัด กรุงเทพมหานคร (ภาพ 8) เป็นระยะเวลา 7 วัน

กลุ่มควบคุม จำนวน 13 คน ไม่ได้รับการรับประทาน NAC เป็นระยะเวลา 7 วัน

#### เกณฑ์คัดเข้าร่วมการวิจัย

1. กลุ่มอาสาสมัครที่ออกกำลังกายไม่สม่ำเสมอ คือต่ำกว่า 3 ครั้งต่อสัปดาห์ และมีสุขภาพแข็งแรง เพศชาย ช่วงอายุ 18-23 ปี
2. ไม่เคยได้รับสารกระตุ้นหรือวิตามินที่เสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะการได้รับกาแฟเป็นประจำ
3. มีค่าดัชนีมวลกาย (body mass index: BMI) อยู่ในเกณฑ์ปกติ (18.5-24.9 กิโลกรัมต่อเมตร<sup>2</sup> (อ้างอิง WHO และ International Obesity Task Force) และมีสมรรถภาพปอด (pulmonary function test) อยู่ในเกณฑ์ปกติ อ้างอิงจาก ATS (1991) (ทำการประเมินก่อนร่วมการศึกษา)
4. ต้องไม่มีประวัติโรคเลือดหรือได้รับการบาดเจ็บในทุกระบบมาก่อน โดยเฉพาะระบบโครงร่างกล้ามเนื้อ หรือระบบหัวใจและหลอดเลือด รวมทั้งเจ็บป่วยด้วยโรคใด ๆ มาก่อนหน้านี้เป็นเวลา 6 เดือน และต้องไม่มีความผิดปกติเรื้อรัง เช่น เป็นหวัด ไอ วิงเวียนศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ หรือคลื่นไส้อย่างต่อเนื่อง เป็นต้น

### เกณฑ์คัดออกหรือยกเลิกในขณะร่วมการวิจัย

1. มีความผิดปกติ เช่น ใจสั่น หน้ามืด วิงเวียนศีรษะ ปวดขามาก ทั้งก่อนและขณะทำการศึกษา รวมทั้งมีอาการปวดเมื่อยอย่างรุนแรง หรืออัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเริ่มออกกำลังกาย
2. ผู้เข้าร่วมการศึกษามีความประสงค์ขอยกเลิกการเข้าร่วมการศึกษาวិจัยครั้งนี้ด้วยตนเองขณะทำการศึกษา

### สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการกลาง และห้องปฏิบัติการ Oxidative Stress and Exercise Biochemistry Laboratory ของภาควิชากายภาพบำบัด ชั้น 4 อาคาร 12 ชั้น คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### ขั้นตอนการวิจัย

1. หลังจากกลุ่มตัวอย่างทั้ง 29 คน ได้รับข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัย และลงลายมือยินยอมเข้าร่วมวิจัยแล้ว จึงแบ่งกลุ่มอาสาสมัครออกเป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 13 คน และกลุ่มทดลองที่ได้รับ NAC (FLUIMUCIL) จำนวน 16 คน โดยวิธีการสุ่มแบบบล็อก (block randomization)
2. ช่วงก่อนการทดลอง (วันที่ 0) อาสาสมัครทุกคนจะได้รับการเจาะเลือดครั้งที่ 1 ที่เส้นเลือดดำบริเวณข้อพับศอกด้านหน้า ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร โดยนักเทคนิคการแพทย์ เพื่อตรวจวัดปริมาณ Lactate, Total creatine kinase และ TNF-alpha ขณะพัก เลือดบางส่วนจะถูกนำไปตรวจความสมบูรณ์ของเลือด (complete blood count: CBC) และทุกคนจะได้รับการทดสอบหาค่าความล้าของกล้ามเนื้อต้นขาด้านหน้า (Quadriceps fatigue index) รวมถึงค่าความสามารถในการใช้ออกซิเจนโดยรวม (gross VO<sub>2</sub>) ตามโปรแกรมที่ได้ตั้งไว้
3. จากนั้นอาสาสมัครทุกคนต้องเข้ารับการออกกำลังกายอย่างหนักกระชั่น (short heavy exercise) โดยการวิ่งบนสายพานยนต์ (treadmill) ตามโปรแกรม Modified Bruce Protocol (Lawrence และคณะ, 2005; ACSM's Guideline, 2005) ที่ได้ตั้งไว้ที่ตัวเครื่องสายพานยนต์ซึ่งจะมีการปรับทั้งความชันและความเร็วทุก ๆ 3 นาที โดยจะให้วิ่งออกกำลังกายอย่างหนักจนกระทั่งอัตราการเต้นของหัวใจถึงที่ระดับ 85% ของอัตราการเต้นของหัวใจสูงสุดที่ควรเป็นของแต่ละคน โดยการตรวจวัดด้วยเครื่องติดตามอัตราชีพจรชนิดหนีบที่ปลายนิ้ว รุ่น PM-50 pulse oximeter แล้วให้คงระดับไว้ จนกระทั่งวิ่งได้ครบ 20 นาที จากนั้นให้พักเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงทำการเจาะเลือดอีกครั้งหนึ่งซึ่งถือเป็นการเจาะเลือดครั้งที่ 2 ที่เส้นเลือดดำบริเวณข้อพับศอกด้านหน้า ในปริมาณ 10

มิลลิลิตร โดยนักเทคนิคการแพทย์ เพื่อนำไปตรวจวัดสาร Lactate, Total creatine kinase และ TNF-alpha

4. ในวันถัดมาซึ่งถือเป็นระยะทดลอง (trial period) อาสาสมัครที่อยู่ในกลุ่มทดลอง จำนวน 16 คน จะได้รับ NAC (FLUIMUCIL® A600, Zambon Switzerland Ltd.) ซึ่งผลิตขึ้นโดยตรงจากตัวแทนจากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยให้รับประทานครั้งละ 1 เม็ด (600 มิลลิกรัม) หลังอาหารทันที เป็นจำนวน 2 ครั้งต่อวัน (เช้า-เย็น) รวมทั้งสิ้น 1,200 มิลลิกรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยในช่วงนี้ อาสาสมัครทุกคนต้องไม่มีการออกกำลังกายหนักหรือหนักจนทำให้พักผ่อนไม่เพียงพอ ไม่ดื่มสุราหรือสิ่งเสพติด และในแต่ละวันจะมีการโทรศัพท์เพื่อสอบถามอาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้ เช่น ปวดท้อง ท้องอืด วิงเวียน เป็นต้น และมีการสัมภาษณ์การใช้ NAC ทุกวัน เพื่อป้องกันการลืมรับประทาน NAC ส่วนอาสาสมัครในกลุ่มควบคุม อีกจำนวน 13 คน ในช่วง 7 วันนี้ จะไม่ได้รับการรับประทาน NAC แต่อย่างใด

5. หลังการได้รับ NAC ครบ 7 วันในกลุ่มทดลอง หรือช่วงหลังการทดลอง (วันที่ 8) ให้อาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษาทุกคน เข้ามารับการเจาะเลือดเช่นเดียวกับก่อนการทดลอง ซึ่งถือเป็น การเจาะเลือดครั้งที่ 3 ที่เส้นเลือดดำบริเวณข้อพับศอกด้านหน้า ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร โดยนักเทคนิคการแพทย์ เพื่อนำไปตรวจวัดสาร Lactate, Total creatine kinase และ TNF-alpha (เฉพาะกลุ่มทดลอง จะมีการส่งเลือดบางส่วนไปตรวจการทำงานของตับว่ามีความผิดปกติหลังได้รับ NAC หรือไม่ด้วย) จากนั้นให้ทำการประเมินค่า Quadriceps Fatigue index และค่าความสามารถในการใช้ออกซิเจนโดยรวม (gross VO<sub>2</sub>)

6. จากนั้นให้อาสาสมัครทุกคนมาออกกำลังกายอย่างหนักระยะสั้น (short heavy exercise) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้เช่นเดิม เป็นเวลา 20 นาที หลังจากหยุดวิ่งแล้วเป็นเวลา 20 นาที ก็จะทำการเจาะเลือดเป็นครั้งที่ 4 ซึ่งถือเป็นครั้งสุดท้าย ในปริมาณครั้งละ 10 มิลลิลิตร เพื่อทำการตรวจวัด ปริมาณของ Lactate, Total creatine kinase และ TNF-alpha

#### การทดสอบค่าดัชนีความล้าของกล้ามเนื้อต้นขาด้านหน้า (Quadriceps Fatigue index)

การทดสอบความเมื่อยล้า (fatigue testing) เป็นการทดสอบความสามารถของกล้ามเนื้อวิธีหนึ่งซึ่งมักจะใช้การหดตัวแบบเกร็งค้างไว้ (isometric) สามารถทดสอบความทนทานของกล้ามเนื้อได้เฉพาะส่วนโดยการหดตัวค้างไว้ด้วยแรงมากที่สุดในช่วงเวลาหนึ่ง และรายงานผลในค่าของดัชนีความเมื่อยล้า (fatigue index) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการทดสอบหาค่า Quadriceps Fatigue index จากการหาแรงหดตัวของกล้ามเนื้อต้นขาด้านหน้า (quadriceps femoris muscle) ของขาข้างที่ถนัด โดยใช้เครื่องมือ hand-held dynamometer รุ่น Chatillon DMG-250, USA (250x2.5) (ภาพ 9)

ซึ่งเป็นเครื่องวัดความแข็งแรงของกล้ามเนื้อที่ผู้ถูกทดสอบต้องออกแรงต้านกับผู้ทดสอบผ่านเครื่องวัดแรง ส่วนใหญ่จะใช้ทดสอบแรงหดตัวสูงสุดแบบค้างไว้ (isometric contraction) เป็นอุปกรณ์ที่ราคาไม่สูงมากนัก สามารถนำไปทดสอบนอกสถานที่ได้ และผลการทดสอบมีค่าความเชื่อมั่นสูงเมื่อผู้ทดสอบได้รับการฝึกฝนตามวิธีทดสอบมาตรฐานแล้ว (Dunn และ Iversen, 2003)

1. ก่อนเริ่มการทดสอบให้อาสาสมัครซึ่งเป็นผู้ถูกทดสอบยึดกล้ามเนื้อต้นขาด้านหน้าค้างไว้ 15-20 วินาที จำนวน 4-5 ครั้ง
2. ให้ผู้ถูกทดสอบนั่งบนเก้าอี้ทดสอบที่ไม่เคลื่อนที่ นั่งตัวตรงมือกอดอก จัดให้ข้อเข่าข้างที่ทดสอบอยู่ในตำแหน่งงอ 60 องศาโดยใช้ standard goniometer วัดมุมข้อเข่า
3. ผู้ทดสอบจะทำการติดตั้งอุปกรณ์วัดแรงเหยียดเข่า (quadriceps force) โดยทำการวัดระยะทางบนปลายขาข้างที่ทดสอบของผู้ถูกทดสอบด้วยสายวัด จากปุ่มกระดูก tibial tuberosity ถึงด้านบนของตาตุ่มด้านนอก (superior aspect of the lateral malleolus) ของขาข้างที่ทดสอบในหน่วยเซนติเมตรแล้วบันทึกค่าไว้ แล้วนำค่าระยะทางที่วัดได้มาคำนวณโดยคูณกับ 0.6 ก็จะได้ค่าตัวเลขที่นำมาใช้วัดระยะห่างจาก tibial tuberosity ลงมาตามหน้าแข้งด้านหน้าอีกที เพื่อให้ได้ตำแหน่ง (mark placed) ที่จะวางแผ่นรองรับของเครื่อง hand-held dynamometer (antero-inferior region of the leg) ของผู้ถูกทดสอบแต่ละคน (Dunn และ Iversen, 2003; Kelln และคณะ, 2008)
4. ก่อนการทดสอบจริง ให้ผู้ถูกทดสอบออกแรงเหยียดเข่าที่แรงระดับต่ำกว่าแรงเหยียดสูงสุด (submaximal contraction) ประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เกิดความคุ้นชินกับอุปกรณ์ทดสอบและเป็นการอบอุ่นกล้ามเนื้อก่อนการทดสอบ
5. จากนั้นให้ผู้ถูกทดสอบออกแรงเหยียดข้อเข่าเต็มที่ให้มากที่สุดเท่าที่ทำได้ (maximal contraction) ซึ่งผู้ทดสอบจะออกคำสั่งในแต่ละครั้งคือ “หนึ่ง สอง สาม เตะ” แล้วให้เกร็งค้างไว้ 2 วินาที โดยต้องไม่เอนลำตัวช่วยขณะทดสอบ ผู้ทดสอบจะทำการบันทึกค่าแรงที่กล้ามเนื้อทำงานได้แต่ละครั้ง และเมื่อผู้ทดสอบปรับเข็มของเครื่องวัดแรงมาที่ 0 แล้ว ให้ผู้ถูกทดสอบทำการออกแรงเหยียดเข่าซ้ำติดต่อกันไปจนครบ 60 ครั้ง จึงหยุดทำการทดสอบ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาดัชนีการล้าตามสมการ (Pincivero และคณะ, 1997) โดยขณะทดสอบ ผู้ถูกทดสอบต้องไม่มองตรงหน้าปัดของเครื่อง hand-held dynamometer ที่แสดงค่าแรงที่กล้ามเนื้อทำงานได้

$$\text{Fatigue index (\%)} = [\text{ผลรวมค่าแรง 10 ครั้งสุดท้าย} \div \text{ผลรวมค่าแรง 10 ครั้งแรก}] \times 100$$

**โปรแกรมสำหรับการออกกำลังกายอย่างหนักระยะสั้น (Short heavy exercise Program) และการทดสอบหาความสามารถในการใช้ออกซิเจนโดยรวม (gross VO<sub>2</sub>)**

ใช้วิธีของ Modified Bruce Protocol (graded treadmill running) โดยปฏิบัติตามคำแนะนำจาก ACSM's Guideline (2005) ดังรายละเอียด ดังต่อไปนี้

1. ยืดกล้ามเนื้อองสะโพก (Hip flexors) กล้ามเนื้อเหยียดสะโพก (Hip extensor) กล้ามเนื้อเหยียดเข่า (Quadriceps) กล้ามเนื้องอเข่า (Hamstring) และกล้ามเนื้อน่อง (Gastrosoleus) ค้างไว้ใช้เวลา 20 วินาทีต่อหนึ่งมัดกล้ามเนื้อ ทำซ้ำ 3 ครั้ง ใช้เวลารวมประมาณ 5 นาที
2. อบอุ่นร่างกายด้วยการวิ่งบนสายพานเลื่อนไฟฟ้า (treadmill) ที่ความหนักระดับเบา โดยใส่เครื่องติดตามอัตราการเต้นของหัวใจที่ปลายนิ้ว รุ่น PM-50 pulse oximeter (ภาพ 10) ขณะวิ่งเพื่อวัดค่าอัตราการเต้นของหัวใจในขณะที่ทำการทดสอบ ให้ผู้เข้าร่วมการศึกษาวิ่งโดยมีอัตราการเต้นของหัวใจไม่เกิน 35% ของอัตราการเต้นของหัวใจสูงสุด (MHR) [ค่าอัตราการเต้นสูงสุดของหัวใจ (MHR) คำนวณได้จากสูตร คือ Maximum Heart Rate = 220-อายุ(ปี)] โดยใช้เวลารวมประมาณ 5 นาที
3. จากนั้นผู้ถูกทดสอบวิ่งบนสายพานเลื่อนไฟฟ้าตามวิธีของ Modified Bruce Protocol ดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1	ความเร็ว 1.7 mph (2.74 km/hr)	ความชัน 0 %
ขั้นที่ 2	ความเร็ว 1.7 mph (2.74 km/hr)	ความชัน 5 %
ขั้นที่ 3	ความเร็ว 1.7 mph (2.74 km/hr)	ความชัน 10 %
ขั้นที่ 4	ความเร็ว 2.5 mph (4.02 km/hr)	ความชัน 12 %
ขั้นที่ 5	ความเร็ว 3.4 mph (5.47 km/hr)	ความชัน 14 %
ขั้นที่ 6	ความเร็ว 4.2 mph (6.76 km/hr)	ความชัน 16 %
ขั้นที่ 7	ความเร็ว 5.0 mph (8.05 km/hr)	ความชัน 18 %

โดยในแต่ละขั้นใช้เวลาวิ่ง 3 นาที ให้อาสาสมัครวิ่งไปจนกระทั่งมีอัตราการเต้นของหัวใจถึง 85% ของอัตราการเต้นของหัวใจสูงสุดที่ควรเป็น หรือระดับความรู้สึกเหนื่อย (rate perceived exertion: RPE) ถึงระดับ 15 (RPE: 6-20 scale ดังแสดงในภาพ 2) ก็จะให้ทำการคงระดับความหนักหรือความชันของโปรแกรมไว้ แล้วให้วิ่งจนครบเวลา 20 นาที (โดยในขณะที่ทำการวิ่ง หากอาสาสมัครมีอาการผิดปกติ เช่น วิงเวียนศีรษะ หน้ามืด ใจสั่น คล้ายจะเป็นลม ปวดกล้ามเนื้อขามากจนทนไม่ไหว เป็นต้น สามารถหยุดวิ่งได้) จากนั้นค่อย ๆ ลดความเร็วและความชันของผู้วิ่งลงแล้ววิ่งต่อ 3-5 นาที (cool-down) ก่อนที่จะหยุดวิ่ง

คะแนน	ระดับความเหนื่อย
6	
7	รู้สึกสบาย (very, very light)
8	
9	ไม่เหนื่อย (very light)
10	
11	เริ่มรู้สึกเหนื่อย (fairly light)
12	
13	ค่อนข้างเหนื่อย (somewhat hard)
14	
15	เหนื่อยมาก (hard)
16	
17	เหนื่อยมากมาก (very hard)
18	
19	เหนื่อยมากถึงมากที่สุด (very, very hard)
20	

ภาพ 2 แสดงค่าระดับความเหนื่อย (Rate perceived exertion: RPE)  
(อ้างอิงจาก ACSM's Guideline, 2005)

4. ค่า gross VO<sub>2</sub> จะคำนวณโดยการนำค่าของความเร็วและความชันของสายพานเลื่อนไฟฟ้าที่ผู้เข้าร่วมการศึกษาวิ่งจนถึงระดับระยะเวลาที่ใช้วิ่งจนหมดแรง (maximal running time) ที่มีอัตราการเต้นของหัวใจถึง 85% ของอัตราการเต้นของหัวใจสูงสุดที่ควรเป็น หรือมีค่า RPE ถึงระดับ 15 จาก 20 หรือเหนื่อยมาก มาเข้าสู่สูตรสมการ running VO<sub>2</sub> เพื่อคำนวณหาค่า gross VO<sub>2</sub> (Metabolic equations for estimating gross VO<sub>2</sub>) (ACSM's Guideline, 2005) ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Gross VO}_2 \text{ (ml/kg/min)} &= \text{speed} + (\text{grade} \times \text{speed}) + \text{resting VO}_2 \\ &= [\text{speed(m/min)} \times 0.2] + [\text{grade(decimal)} \times \text{speed(m/min)} \times 0.9] + 3.5 \end{aligned}$$

#### วิธีการตรวจวัดปริมาณสารต่าง ๆ ในเลือด

ทำการตรวจวัดปริมาณสารต่าง ๆ ในเลือดตามวิธีการ ดังต่อไปนี้

1. Lactate ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแยกสารเคมีภายใต้ความดันของเหลว (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) (Khantipongse, 2008)

2. TNF-alpha ด้วย Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit test (R&D systems: Europe, Ltd.; United Kingdom)

3. Total creatine kinase โดยการส่งไปตรวจที่ห้องปฏิบัติการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Bleiberg และคณะ, 1991)

#### การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

1. ข้อมูลทั่วไป ได้แก่ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง และดัชนีมวลกาย แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า Gross VO<sub>2</sub> และ Quadriceps fatigue index ที่ประเมินได้จากก่อนและหลังการทดลอง จำนวน 2 ครั้ง จากทั้ง 2 กลุ่มการศึกษาตามระยะการเก็บข้อมูล โดยใช้สถิติ Wilcoxon signed ranks test และ Mann-Whitney-U-Test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง TNF-alpha, Total CK และ Lactate ที่ตรวจวัดได้จากก่อนและหลังการทดลอง จำนวน 4 ครั้ง จากทั้ง 2 กลุ่มการศึกษาตามระยะการเก็บข้อมูล โดยใช้สถิติ repeated measurement ANOVA และ Least Significant Difference (LSD) test (SPSS version 13) ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p \leq 0.05$