

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยดำเนินไปตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

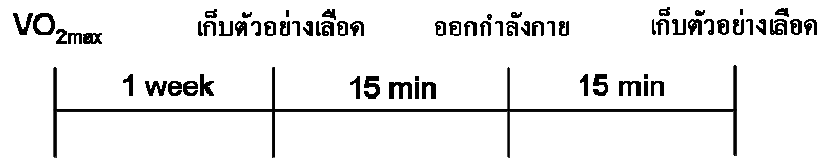
กลุ่มตัวอย่างซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่าผู้ถูกทดสอบเป็นนักศึกษามหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จ.สมุทรปราการ เพศชาย อายุ 18 – 25 ปีและมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงโดยประเมินจากแบบสอบถามและการตรวจร่างกายเบื้องต้น ซึ่งแบบสอบถามประกอบด้วยข้อคำถามเกี่ยวกับข้อมูลส่วนตัว น้ำหนัก ส่วนสูง ประวัติการเจ็บป่วย ตลอดจนการใช้ยาหรือสารเสพติด ผู้ถูกทดสอบแต่ละคนจะต้องมีน้ำหนักส่วนสูง อัตราการเต้นของหัวใจ ความดันโลหิต และความสามารถในการใช้ออกซิเจนสูงสุด (VO_{2max}) อยู่ในช่วงปกติ และมีค่าใกล้เคียงกันโดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน และเป็นผู้ออกกำลังกายน้อยกว่า 3 ครั้ง/สัปดาห์ (Sedentary lifestyle)

ถ้าผู้ถูกทดสอบมีปัญหาเกี่ยวกับโรคเลือด หัวใจและหลอดเลือด ความดันโลหิต ปอด ตับ ไต หรือโรคระบบทางเดินหายใจ มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบกระดูกและกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องกับข้อเข่าและข้อสะโพก มีความผิดปกติเกี่ยวกับ metabolism เช่น โรคเบาหวาน ไทรอยด์ มีความผิดปกติทางด้านอารมณ์ จะถูกคัดออกจากการทดสอบ

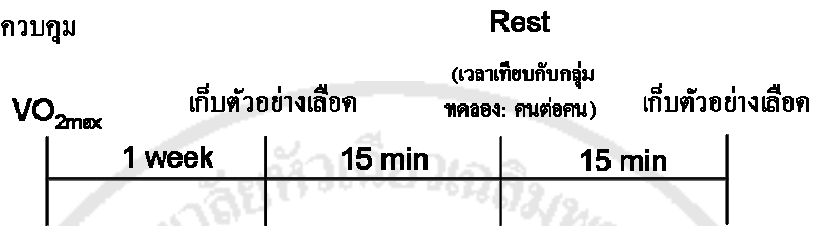
การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. คัดเลือกผู้ถูกทดสอบจากนักศึกษามหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โดยให้ทำแบบสอบถามและตรวจร่างกายเบื้องต้นเพื่อประเมินภาวะสุขภาพ
2. ผู้วิจัยอธิบายถึงวิธีและขั้นตอนของการทดสอบแก่ผู้ถูกทดสอบ
3. ให้ผู้ถูกทดสอบลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมวิจัย
4. แบ่งกลุ่มผู้ถูกทดสอบด้วยวิธีการสุ่มแบบจับฉลากเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (control group) 10 คน และกลุ่มออกกำลังกาย (exercise group) 10 คนดังแผนผัง

กลุ่มทดลอง



กลุ่มควบคุม



รูปที่ 3.1 แสดงแผนผังการทดลองของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองผู้ถูกทดสอบทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมต้องวัด VO_{2max} ก่อนออกกำลังกายหลังจากนั้น 1 สัปดาห์จึงทำการทดสอบโดยเก็บเลือดก่อนและหลัง ทดสอบ 15 นาที

5. วัดความดันเลือด (Mercurial Sphygmomanometer®, Rudolf Riester GmbH & Co.KG, Jungingen, Germany) และคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (Cardiac Fx-120, Fukuda Denshi co., LTD., Tokyo, Japan) ก่อนเริ่มการทดสอบ

6. คำนวณหาค่าความดันเลือดเฉลี่ย (mean arterial pressure) จากสูตร

$$MAP = [(2 \times \text{diastolic}) + \text{systolic}] / 3$$

ค่าปกติ 70-110 mmHg

7. วัดความสามารถในการใช้ออกซิเจนสูงสุด (VO_{2max}) โดยใช้วิธีวัดแบบ Åstrand and Ryhming ด้วยจักรยานวัดงาน (Tunturi® ergometer, Piispanristi Filand) ซึ่งมีขั้นตอนการวัดดังนี้

7.1 ให้ผู้ทดสอบขึ้นนั่งบนอาน ปรับอานให้พอเหมาะ ให้ระดับอานต่ำกว่าสะตือประมาณ 4 นิ้วมือ

7.2 ตั้งเครื่องเคาะจังหวะที่ความเร็ว 50 รอบ/นาที ให้ผู้ทดสอบปั่นจักรยานตามเสียงจังหวะเพื่อรักษาความเร็วให้คงที่

7.3 ให้ปั่นจักรยาน 2 – 3 นาทีเพื่ออบอุ่นร่างกายและสร้างความคุ้นเคยกับจักรยาน

7.4 เลื่อนน้ำหนักถ่วงที่ 2 กิโลปอนด์ เพื่อให้อัตราการเต้นของหัวใจอยู่ระหว่าง 120 – 170 ครั้ง/นาที

7.5 ให้ผู้ทดสอบปั่นจักรยานไปเรื่อย ๆ เริ่มจับเวลาเมื่อผู้ทดสอบสามารถปั่นจักรยานได้ความเร็วคงที่ 50 รอบ/นาที

7.6 นับและบันทึกอัตราการเต้นของหัวใจทุกนาที เป็นเวลา 6 นาที

7.7 ถ้าถึงนาทีที่ 2 อัตราการเต้นของหัวใจยังต่ำกว่า 120 ครั้ง/นาที ให้เพิ่มน้ำหนักถ่วงอีก 0.5 กิโลปอนด์และขยายเวลาออกไปอีก 1 นาทีหรือมากกว่า เพื่อให้อัตราการเต้นของหัวใจสม่ำเสมอและเข้าสู่สภาวะคงที่

7.8 นำอัตราการเต้นของหัวใจช่วงนาทีที่ 5 และนาทีที่ 6 มาหาค่าเฉลี่ย ถ้าอัตราการเต้นของหัวใจทั้ง 2 ช่วงแตกต่างกันมากกว่า 5 ครั้ง/นาที ให้ขยายระยะเวลาการทดสอบออกไปอีก 1 นาที หรือมากกว่าจนกว่าอัตราการเต้นของหัวใจจะแตกต่างกันไม่เกิน 5 ครั้ง/นาที

7.9 หาค่า VO_{2max} โดยนำค่าอัตราการเต้นของหัวใจเฉลี่ยที่นับได้และน้ำหนักที่ใช้ถ่วงไปเทียบอ่านค่าจากตารางก็จะได้ค่า VO_{2max} ออกมา

8. หลังจากวัด VO_{2max} 1 สัปดาห์เก็บเลือดกลุ่มตัวอย่างทั้ง 20 คนจำนวน 5 มล. ใส่ในหลอดที่มี 3.8 % sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็ง สำหรับนำไปวัดค่า factor VIII และ antithrombin III activity

9. หลังจากนั้น ทำ exercise test โดย 12 ชม. ก่อนวันที่จะออกกำลังกายผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง control และ exercise group จะต้องงดดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ กาแฟ และงดรับประทานยาทุกชนิด โดยการทดลองจะทำในช่วงเวลา 08.00 - 10.00 น. ส่วนกลุ่มควบคุมไม่ต้องออกกำลังกาย แต่เก็บตัวอย่างเลือดในช่วงเวลาใกล้เคียงกันกับกลุ่มทดลอง

วิธีการออกกำลังกาย (Exercise test)

9.1. อบอุ่นร่างกายโดยการปั่นจักรยานเบาๆ เป็นเวลา 20 นาที

9.2. ออกกำลังกายโดยใช้วิธี grade exercise ด้วยเครื่อง bicycle ergometer (Tunturi® ergometer, Piispanristi Filand) ซึ่งการทดสอบจะแบ่งออกเป็นช่วง ๆ ช่วงละ 2 นาที เริ่มต้นให้ตั้งค่าน้ำหนักถ่วงเป็น 1 กิโลปอนด์ (50 W) และเพิ่มน้ำหนักถ่วง 0.6 กิโลปอนด์ (30 W) ทุก ๆ 2 นาที จนกระทั่งอัตราการเต้นของหัวใจมีค่าเท่ากับอัตราการเต้นของหัวใจที่ 80 – 100 % HR_{max} และปั่นต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ จนกว่าผู้ถูกทดสอบไม่สามารถปั่นต่อได้ ซึ่งถือว่าการออกกำลัง

กายนั้นจัดเป็น maximal exercise บันทึกอัตราการเต้นของหัวใจตลอดช่วงที่ออกกำลังกายเพื่อประเมินความแรงของการออกกำลังกาย

เกณฑ์การหยุดทดสอบ (Bodegard et al. 2005) จะหยุดทดสอบเมื่อมีอาการอย่างใดอย่างหนึ่งดังนี้

มีอาการเจ็บหน้าอกหรือหายใจลำบาก

รู้สึกตาลาย หน้ามืด เวียนศีรษะ หรือเกิดการล้าของกล้ามเนื้อขา ไม่สามารถปั่นต่อไปได้ อัตราการหายใจไม่เพิ่มในขณะออกกำลังกายที่หนักขึ้น

ผู้ทดสอบต้องการให้หยุดทดสอบ

9.3 วัดความดันเลือด, คลื่นไฟฟ้าหัวใจและเก็บตัวอย่างเลือดนาที่ที่ 15 ภายหลังจากออกกำลังกายโดยเก็บเลือดใส่ในหลอดทดลองที่มี 3.8% sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็งเพื่อนำไปวัด factor VIII และ antithrombin III activity

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

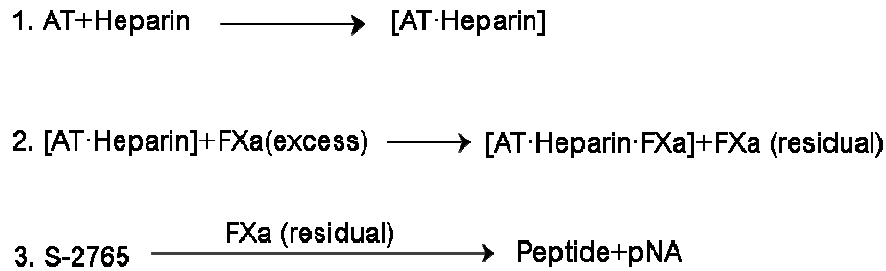
การวัด factor VIII activity

เก็บเลือดที่ต้องการทดสอบใส่ในหลอดทดลองที่มี 3.8% sodium citrate แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 g, 15 นาที แยกส่วนที่เป็น plasma ใส่หลอดทดลองอันใหม่สำหรับนำไปวัด factor VIII activity ด้วยวิธี one-stage clotting assay ตามวิธีของ Cinotti and Morfini ซึ่งมีค่าปกติอยู่ในช่วง 50-150 % (Cinotti and Morfini. 2006)

การวัด antithrombin III activity

หลักการวัด antithrombin III

Antithrombin III เป็นโปรตีนที่ร่างกายสร้างขึ้นมีฤทธิ์ยับยั้ง thrombin, factor Xa และ factor IXa เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันสามารถวัดปริมาณของ antithrombin III ได้โดยใช้หลักการของ chromogenic antithrombin III assay โดยนำ citrate plasma ผสมกับ factor Xa with heparin จะได้เป็นสารประกอบ AT·Heparin complex ซึ่งจะเข้าไปทำปฏิกิริยาต่อกับ factor Xa ได้เป็น AT·Heparin·FXa complex แล้วจึงวัดปริมาณของ factor X ส่วนที่เหลือโดยการเติม chromogenic substrate (S-2765) เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับ factor Xa เกิดเป็นสีขึ้นแล้ววัดปริมาณความเข้มของสีที่ขนาดความยาวคลื่น 405 nm โดยความเข้มของสีเป็นปฏิภาคผกผันกับปริมาณของ antithrombin III ค่าปกติของ antithrombin III เมื่อวัดด้วยวิธีนี้มีค่า 0 – 120 %



รูปที่ 3.2 แสดงหลักการวัด antithrombin III

สารเคมี

1. The coamatic® Antithrombin III kits (Chromogenix Instrumentation Laboratory S.p.A. Milan, Italy) ซึ่งประกอบด้วย Lyophilized chromogenic substrate (N- α -Cbo-D-Arg-pNA•2HCl), Buffer with heparin, และ Lyophilized purified bovine factor Xa and bovine albumin

2. Deionized water
3. Saline (0.9% NaCl)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. Chromogenic substrate S-2765 ละลายด้วย 10 ml NCCLS Type II water
2. Factor Xa ละลายด้วย 10 ml buffer with heparin

ขั้นตอนและวิธีวัด

1. นำตัวอย่างเลือดที่เก็บในหลอดทดลอง 3.8% sodium citrate มาปั่นที่ความเร็ว 2,000 rpm เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำเลือด (plasma) ไปใช้สำหรับวัด antithrombin III activity

2. นำตัวอย่างเลือดที่ต้องการจะวัดมา 25 μ l ผสมกับน้ำเกลือ (0.9% normal saline) 3,000 μ l แล้วดูมา 200 μ l ไปใส่ในหลอดทดลองอันใหม่

3. เติม factor Xa ลงไป 200 μ l เพื่อให้แน่ใจว่าในตัวอย่างเลือดมีปริมาณ factor Xa เพียงพอที่จะเกิดปฏิกิริยา

4. หลังจากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 90 วินาที (ในระหว่างนี้ควรอุ่น chromogenic sunstrate (S-2765) ไว้ที่ 37 °C)

5. เติม chromogenic sunstrate (S-2765) ซึ่งจะถูกละลายด้วย factor Xa ในขนาด 200 μ l

6. เติม 2% citric acid เพื่อหยุดปฏิกิริยาต่าง ๆ ของเซลล์
7. วัดความเข้มของสีโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 405 nm
8. นำค่าที่ได้ไปเทียบกับ standard curve ค่าปกติ 0-120 %

การวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงผลของข้อมูลในรูปแบบ mean \pm SEM เปรียบเทียบข้อมูลในกลุ่มเดียวกันโดยใช้ paired student's t-test ส่วนข้อมูลระหว่างกลุ่มเปรียบเทียบโดยใช้ unpaired student's t-test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปปริซึม (prism statistical software) โดยมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

