ผลของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง ณ โรงพยาบาลศิริราช

นางสาวดวงกมล งามภัทรางกูร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON OXIDATIVE STRESS IN RED BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH THALASSEMIA INTERMEDIA AT SIRIRAJ HOSPITAL

Miss Duangkamon Ngarmpattarangkoon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Food Chemistry and Medical Nutrition
Department of Food and Pharmaceutical Chemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	EFFECTS OF VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON OXIDATIVE STRESS IN RED BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH THALASSEMIA INTERMEDIA AT SIRIRAJ HOSPITAL
By	Miss Duangkamon Ngarmpattarangkoon
Field of Study	Food Chemistry and Medical Nutrition
Thesis Advisor	Assistant Professor Kulwara Meksawan, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Pithi Chanvorachote, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

…….Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

…….. Chairman
(Assistant Professor Linna Tongyonk, D.Sc.)

…….……. Thesis Advisor
(Assistant Professor Kulwara Meksawan, Ph.D.)

…….. Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Pithi Chanvorachote, Ph.D.)

…….. Examiner
(Assistant Professor Suyanee Pongthananikorn, Dr.P.H.)

…….. External Examiner
(Assistant Professor Bunchoo Pongtanakul, M.D.)

ดวงกมล งามภัทรางกูร : ผลของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง ณ โรงพยาบาลศิริราช. (EFFECTS OF VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON OXIDATIVE STRESS IN RED BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH THALASSEMIA INTERMEDIA AT SIRIRAJ HOSPITAL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ภญ. ดร.กุลวรา เมฆสวรรค์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ. ภก. ดร.ปิติ จันทร์วรโชติ, 112 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลางที่ไม่ได้รับการรักษาโดยการให้เลือดเป็นประจำ ณ โรงพยาบาลศิริราช มีผู้ป่วยอายุระหว่าง 5-20 ปีเข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 17 คน โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มวิตามินอี (ได้รับวิตามินอีวันละ 10 ยูนิตต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับวิตามินอี) ทำการวัดสัดส่วนของร่างกาย การตรวจนับเม็ดเลือดอย่างสมบูรณ์ ระดับวิตามินอีในซีรัม ระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) ในพลาสมา การแตกตัวของเม็ดเลือดแดง และการสร้างอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (ROS) ในเม็ดเลือดแดง ก่อน (สัปดาห์ที่ 0) และหลังสิ้นสุดการศึกษา (สัปดาห์ที่ 12) นอกจากนี้ยังทำการศึกษากลไกการต้านออกซิเดชันของวิตามินอีในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยอีกด้วย

ผลการศึกษาพบว่าสัดส่วนของร่างกาย การตรวจนับเม็ดเลือดอย่างสมบูรณ์ ระดับวิตามินอีในซีรัม และระดับ MDA ในพลาสมาระหว่างกลุ่มวิตามินอีและกลุ่มควบคุมเมื่อเริ่มต้นการศึกษาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการศึกษาพบว่า กลุ่มวิตามินอีมีระดับวิตามินอีในซีรัมสูงขึ้น ($p < 0.001$) และมีระดับ MDA ในพลาสมาลดลง ($p = 0.027$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.017$) สำหรับผลของการเกิด ROS ในเม็ดเลือดแดง พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม ขณะที่ผลการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยกลุ่มวิตามินอี พบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$) หลังการเสริมวิตามินอี เมื่อศึกษากลไกของวิตามินอีในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดง พบว่าวิตามินอีสามารถยับยั้งการเกิดซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไฮดรอกซิลเรดิคอล ซึ่งจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า การเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลางอาจมีประโยชน์ในการชะลอการดำเนินของโรคและป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่มีสาเหตุจากภาวะเครียดออกซิเดชันได้

ภาควิชา…….อาหารและเภสัชเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต……..
สาขาวิชา.อาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์.ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก…….....
ปีการศึกษา .....……2553……...ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม….....

##5176563033 : MAJOR FOOD CHEMISTRY AND MEDICAL NUTRITION
KEYWORDS: THALASSEMIA INTERMEDIA/ VITAMIN E/ OXIDATIVE STRESS

DUANGKAMON NGARMPATTARANGKOON: EFFECTS OF VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON OXIDATIVE STRESS IN RED BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH THALASSEMIA INTERMEDIA AT SIRIRAJ HOSPITAL. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. KULWARA MEKSAWAN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. PITHI CHANVORACHOTE, Ph.D., 112 pp.

The purpose of this study was to determine the effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in red blood cells (RBC) of the patients with thalassemia intermedia who did not require regular blood transfusion therapy at Siriraj Hospital. There were 17 subjects, aged between 5-20 years, participating in this study. They were assigned into 2 groups: the vitamin E group (supplemented with 10 IU/kg/day of vitamin E) and the control group (no vitamin E supplementation). Evaluations of anthropometric parameters, complete blood count (CBC), serum vitamin E and plasma malondialdehyde (MDA) levels, hemolysis, reactive oxygen species (ROS) production in RBC were performed at before (week 0) and at the end of the study (week 12). Antioxidative mechanism of vitamin E in RBC was also examined.

The results showed that there were no significant differences in anthropometric, CBC, serum vitamin E levels, and plasma MDA between the vitamin E and control groups at baseline. However, at the end of the study, the subjects in the vitamin E group had significantly increased serum vitamin E levels ($p < 0.001$) and significantly decreased plasma MDA levels ($p = 0.027$), compared to baseline, and these levels significantly differed from those in the control group ($p = 0.017$). No significant differences were found within group for the ROS production in erythrocytes in both groups. In vitamin E group, the percent hemolysis were significantly decreased as compared to baseline ($p = 0.001$) after vitamin E supplementation. In this study, vitamin E was able to inhibit ROS production including superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in erythrocytes. The results indicated that vitamin E supplementation in thalassemia intermedia patients may benefit these patients in delaying disease progression and preventing complications caused by oxidative stress.

Department : …Food and Pharmaceutical Chemistry… Student's Signature…….…..…..
Field of Study : Food Chemistry and Medical Nutrition.Advisor's Signature.…….
Academic Year : ……...…..…… 2010…….Co-advisor's Signature.…….

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my deep appreciate to my advisor, Assistant Professor Dr. Kulwara Meksawan, my co-advisor Assistant Professor Dr. Pithi Chanvorachote for valuable advice, meaningful guidance, giving a chance to perform experiments, continuous interest, kindness and encouragement throughout my thesis.

I am very grateful to Assistant Professor Dr. Bunchoo Pongtanakul, Division of Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, Siriraj Hospital for valuable knowledge, suggestion, kindness and helpfulness.

I am very much obliged and honored to the members of the Thesis Committee, Assistant Professor Dr. Linna Tongyonk, Assistant Professor Suyanee Pongthananikorn for their supportive attitude, constructive criticisms and for their invaluable discussions over my dissertation.

I would like to thank to all personnels in Division of Hematology and Oncology and Specimen Receiving Unit, Department of Pediatrics, Siriraj Hospital for their helpful cooperation, support and kindness.

Sincere thanks are also give to all staff members of Food Chemistry and Medical Nutrition Program, Department of Food and Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmacology and Physiology, Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy, and also Department of Immunology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for their assistance and great helpful support.

In addition, I am very grateful to my friends and other people, whose names have not been mentioned, for helping me in anyway during the time of my study.

I am really thankful to the Faculty of Graduate Studies, Chulalongkorn University for the supporting scholarship which enabled me to undertake this study.

Finally, my special gratitude is expressed to my beloved family for their love, care, understanding, moral support and tremendous encouragement throughout my life.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI)…….. iv

ABSTRACT (ENGLISH)…….. v

ACKNOWLEDGEMENTS…….. vi

CONTENTS……..... vii

LIST OF TABLES……. ix

LIST OF FIGURES……... x

LIST OF ABBREVIATIONS……...…….……... xi

CHAPTER

I INTRODUCTION……..... 1

II LITERATURE REVIEW……..... 5

2.1 Thalassemia……. 5

2.2 Reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress…….. 6

2.3 Vitamin E……..... 10

2.4 Role of vitamin E in thalassemia……..... 15

III MATERIALS AND METHODS……..... 17

3.1 Subjects……...……. 17

3.2 Research Procedure……. 17

3.3 Study Measurements and Data Collection…….. 19

3.4 Statistical Analysis…….. 26

IV RESULTS..... 27

4.1 Characteristics of the subjects……. 27

4.2 Energy distribution and nutrient intakes of the subjects……..... 29

4.3 Anthropometric measurement of the subjects……. 31

4.4 Complete blood count, serum vitamin E levels and plasma malondialdehyde of the subjects…… 31

4.5 Effect of vitamin E on ROS production in RBC …… 34

4.6 Effect of vitamin E on hemolysis of thalassemic erythrocytes…... 37

4.7 Defense mechanism of vitamin E against ROS in RBC...……... 40

4.8 Compliance and adverse effects of vitamin E supplementation..... 43

CHAPTER Page

V DISCUSSION..……. 45

5.1 Energy distribution and nutrient intakes…….. 45

5.2 Effect of vitamin E supplementation on anthropometric parameters…….. 46

5.3 Effect of vitamin E supplementation on hematological parameters…….. 47

5.4 Effect of vitamin E supplementation on serum vitamin E levels.... 48

5.5 Effect of vitamin E supplementation on lipid peroxidation…… 49

5.6 Effect of vitamin E supplementation on ROS production in RBC..…….. 50

5.7 Effect of vitamin E supplementation on hemolysis…… 51

5.8 Defense mechanism of vitamin E against ROS in RBC..…… 52

VI CONCLUSION…… 55

REFERENCES…….. 57

APPENDICES……...……. 66

APPENDIX A…….. 67

APPENDIX B…….. 69

APPENDIX C…….. 84

APPENDIX D…….. 93

APPENDIX E…….. 102

APPENDIX F…….. 105

BIOGRAPHY……. 112

LIST OF TABLES

TABLE		Page
1.	Biological activity of vitamin E forms……..	13
2.	Recommended Dietary Allowances (RDA) for RRR-alpha-tocopherol (d-alpha-tocopherol)…….	14
3.	Standard categories of BMI-for-age…….	21
4.	Characteristics of the subjects……...	28
5.	Energy distribution and nutrient intakes of the subjects at baseline and week 12 of the study…….	30
6.	Anthropometric of the subjects at week 0 and week 12 of the study…...	32
7.	Hematological and biochemical parameters of the subjects at week 0 and week 12 of the study……..	33

LIST OF FIGURES

FIGURE		Page
1.	Main free radical metabolism pathways in human erythrocytes……	8
2.	Formation of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 ……..	9
3.	Haber-Weiss reaction……....	10
4.	Fenton reaction……...	10
5.	Diagram of research procedure……..	19
6.	Reactive oxygen species (ROS) production in red blood cells generated by hydrogen peroxide (H_2O_2) ..…….	35
7.	Reactive oxygen species (ROS) production in red blood cells generated by AAPH ……..	36
8.	Percentage of hemolysis of thalassemic erythrocytes induced by H_2O_2…	38
9.	Percentage of hemolysis of thalassemic erythrocytes induced byAAPH..	39
10.	ROS scavenging activity of vitamin E against $O_2^{\bullet-}$ in RBC..……	41
11.	ROS scavenging activity of vitamin E against H_2O_2 in RBC..……..	42
12.	ROS scavenging activity of vitamin E against $OH^{\bullet}$ in RBC.…….	44

LIST OF ABBREVIATIONS

AAPH	=	2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide dihydrochloride
ANCOVA	=	analysis of covariance
BMI	=	body mass index
CAT	=	catalase
CBC	=	complete blood count
^{o}C	=	degree Celsius
cm	=	centimeter
d (s)	=	day (s)
DCFH-DA	=	2',7'-dichlorofluorescin diacetate
df	=	degree of freedom
DFO	=	deferoxamine
DMNQ	=	2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone
DRI	=	Dietary Reference Intake
et al.	=	et alia (and others)
etc.	=	et cetara
g	=	gram
GSH	=	reduced glutathione
GSH-Px	=	glutathione peroxidase
Hb	=	hemoglobin
Hct	=	hematocrit
hr	=	hour
IU	=	international unit
kcal	=	kilocalorie
kg	=	kilogram
kg/m^2	=	kilogram per square meter
l	=	litre
m^2	=	square in metres
MAC	=	mid arm circumference
MAMC	=	mid-arm muscle circumference
MCH	=	mean corpuscular hemoglobin

MCHC	=	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	=	mean corpuscular volume
MDA	=	malondialdehyde
mg	=	milligram
mg/dl	=	milligram per deciliter
min	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimetre
mmol/l	=	millimole per litre
MPV	=	mean platelet volume
n	=	number
nm	=	nanometer
NO	=	nitric oxide
NTBI	=	non transferrin bound iron
p	=	*p*-value
pH	=	the negative logarithm of the hydrogen ion concentration
PUFA	=	polyunsaturated fatty acid
RBC	=	red blood cells
RDA	=	Recommended Dietary Allowance
RDW	=	red cell distribution width
ROS	=	reactive oxygen species
rpm	=	revolutions per minute
SD	=	standard deviation
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
SEM	=	standard error of mean
SOD	=	superoxide dismutase
TBARs	=	ThioBarbituric Acid Reactive Substances
TSF	=	triceps skinfold thickness
µg	=	microgram

CHAPTER I

INTRODUCTION

Thalassemia is the most common hereditary chronic haemolytic anemia due to defective globin synthesis. Patients with thalassemia may suffer from several health problems such as anemia, growth retardation, delayed puberty, expanded bone marrow, jaundice and enlarged spleen, liver, and heart (Jones, 1983; Aessopos et al., 2005). In Thailand, approximately 40% of the population are thalassemia carriers, and 1% of the population are diagnosed as thalassemia disease (Dhamcharee, Ramyanan, and Ninlagarn, 2001).

Patients with thalassemia intermedia have moderate anemia and enlarged spleen and liver. These patients have hemoglobin (Hb) levels of 7-9 g/dl and require only occasional blood transfusion. In case of severe anemia due to fever and infection, blood transfusion may be required. In the patients who do not require regular blood transfusion, the body is able to compensate for their anemia by increasing iron absorption. This may increase the risk for iron overload as the body is unable to eliminate the excess iron (Rund and Rachamilewitz, 2000). Over time, the excess iron could deposit in several organs such as liver, spleen, heart and pancreas leading to organ damage and failure (Camaschella and Cappellini, 1995; Amer, Goldfarb, and Fibach, 2003).

Iron is an essential mineral for life. It is presented in every living cells and is necessary for the production of hemoglobin, myoglobin, and certain enzymes (Fraga and Oteiza, 2002). Iron is mainly absorbed in the duodenum and upper jejunum. However, only the ferrous form (Fe^{2+}) of iron can be absorbed. After uptake

through villi, the ferrous iron is transported to the subepithelial capillaries by transferrin and released into the bloodstream (Jordan and Kaplan, 1994). As transferrin becomes saturated in iron overload states, excess iron is found as non transferrin-bound iron (NTBI), which could be deposited within tissues. NTBI may cause tissue damage by the formation of highly reactive hydroxyl radicals ($OH^{\bullet}$) from superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) via Fenton or Haber-Weiss reactions (Cappellini et al., 2000). Furthermore, iron components are active catalysts of lipid peroxidation and thus could increase free radical generation (Ahmad, 1995).

Secondary iron overload results from excess absorption of iron and repeated blood transfusions. In addition, the excess unmatched globin chains in thalassemia patients cause the release of the iron atom from heme, which is susceptible to oxidation (Scott et al., 1993). Unbound labile plasma iron can generate toxic free radicals that cause cell death and damage of biomolecules, tissues and organs (Pfeifer et al., 2008). In addition, free iron serves as a catalyst for the formation of highly reactive $OH^{\bullet}$, which may then initiate the oxidative stress and contribute to increase several end products of lipid peroxidation (Gutteridge and Halliwell, 1988; Admad, 1995). Free radical production in thalassemia erythrocytes is due to increased oxidant damage in erythrocytes.

There is a balance within the body between the oxidant production and antioxidant defense within cells, which antioxidant can scavenge reactive oxygen species (ROS). The antioxidant systems consist of antioxidant enzymes including superoxide dismutases (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and non-enzyme antioxidants such as polyphenols, ascorbic acid and tocopherol. An increased oxidant and a decreased antioxidant status found in thalassemia patients can

lead to oxidative stress (Suthatvoravut et al., 1993; Phuapradit et al., 1999). This imbalance can lead to damage at the macromolecular level including DNA strand breakage, damage of membrane ion transport systems, enzymes and other proteins and lipid peroxidation (Al-Omar, Beedham, and Alsarra, 2004). Thus, antioxidants may have a protective effect by improving oxidative stress in thalassemia patients.

Vitamin E is a lipid-soluble antioxidant found in vegetable oils, nuts and green leafy vegetables. Alpha-tocopherol is the most active form and powerful biological antioxidant (Gallagher, 2008). An important role of vitamin E is to protect the membrane polyunsaturated fatty acids from peroxidation by scavenging peroxyl radicals ($LOO^{\bullet}$) (Chamulitrat and Mason, 1989). Tocopherol can scavenge ROS by termination of free-radical chain reaction (Neuzil, Weber, and Koutush, 2001). Vitamin E has been shown to effectively reduce $O_2^{\bullet-}$ production (Shimazu et al., 2001) and $OH^{\bullet}$ (Valgimigli et al., 2004), which are extremely reactive, and possesses a very high oxidation potential. Vitamin E interrupts free-radical chain reactions leading to reduce free radical damage in the body. It was assumed that vitamin E may be beneficial and useful in the treatment of patients with thalassemia.

Several studies have shown a benefit of vitamin E supplementation in thalassemia patients. In patients with thalassemia major, vitamin E supplementation in the dose of 750 to 1000 IU/d for 16 months prolonged red blood cells (RBC) survival (Rachmilewitz, Shifter, and Kahane, 1979). It was found that the body weight of thalassemia major patients undergoing transfusion was increased after vitamin E supplementation (10 mg/kg/d) for 4 weeks (Das et al., 2004). In patients with thalassemia intermedia, hypoxaemia and pulmonary vascular occlusion were delayed after supplementation of vitamin E (525 IU/d) for 3 months (Unchern et al., 2003). In addition, vitamin E (400 mg/d) has been used in combination with low dose of

vitamin C (100 mg/d) to promote antioxidant status and may enhance liver function in thalassemia major children (Dissayabutra, Tosukhowong, and Seksan, 2005).

As described above, the patient with thalassemia is associated with oxidative stress due to increased ROS. Previous studies indicated that vitamin E could decrease oxidative stress and lipid peroxidation in adult thalassemia major and intermedia who acquired transfusion dependence. However, the effects of vitamin E supplementation in children with thalassemia intermedia who do not required regular transfusion in the term of biochemical parameters, lipid peroxidation, oxidative stress, and hemolysis remains unclear.

The purposes of this study:

1. To investigate the effects of vitamin E supplementation on complete blood count (CBC), serum vitamin E levels, lipid peroxidation, ROS production in RBC, and hemolysis in patients with thalassemia intermedia
2. To investigate the adverse effect of vitamin E in patients with thalassemia intermedia
3. To investigate oxidative mechanism of vitamin E in RBC of patients with thalassemia intermedia

CHAPTER II

LITERATURE REVIEW

2.1 Thalassemia

Thalassemia is a genetic disorder that involves the decreased and defective production of hemoglobin. This can cause the formation of abnormal hemoglobin molecules. As a result, patients with thalassemia often have reduced number of RBC in bloodstream, thus causing anemia. Patients with thalassemia may have several health problems such as anemia, growth retardation, delayed puberty, expanded bone marrow, jaundice, and enlarged spleen, liver, and heart (Jones, 1983).

There are two types of thalassemia: alpha thalassemia which the synthesis of alpha globin is reduced or absent, and beta thalassemia which is due to a defect in the beta globin (Muncie and Campbell, 2009). Patients are classified into three types depending on the severity of symptoms: thalassemia minor, thalassemia intermedia and thalassemia major. Thalassemia intermedia, a condition intermediate between the major and minor forms which patients are able to maintain a hemoglobin level in the 7-9 g/dL. These patients do not require treatment with regular blood transfusions. Severe anemia due to fever and infection may require blood transfusion. The symptoms of thalassemia intermedia reflect ineffective erythropoiesis. Thalassemia intermedia patients have mild-to-moderate symptoms of anemia, enlarged spleen, slow or inadequate bone development, failure to thrive, endocrine system problems, and low immune system. (Aessopos et al., 2005).

In thalassemia patients, the abnormalities of erythrocytes resulted from the accumulation of the unmatched normal globin chains lead to chronic hemolytic

anemia (Mahjoub et al., 2007). The large excess globins cause the release of the iron atom from heme and consequently catalyzes the production of ROS such as $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 and $OH^{\bullet}$. Up-regulation of such ROS has been shown to be an important cause of damages to the erythroid precursor and mature erythrocyte membranes leading to clinical hemolysis in thalassemia patients (Ghone et al., 2008). In addition, patients with thalassemia intermedia who do not require regular blood transfusions may have increased dietary iron absorption. These may increase risk for iron overload because the body is unable to eliminate the excess iron (Rund and Rachamilewitz, 2000). The excess iron deposits in the liver, spleen, heart, pancreas, etc. resulting in organ failure (Amer, Goldfarb, and Fibach, 2003).

Iron is known to be involved in several chemical reactions that generate ROS. Unbound labile plasma iron can generate toxic free radicals that cause cell death and damage of biomolecules, tissues and organs (Pfeifer et al., 2008). Free iron serves as a catalyst for the formation of highly reactive $OH^{\bullet}$ (Gutteridge and Halliwell, 1988; Admad, 1995), which may then initiate the oxidative stress and contribute to increase several end products of lipid peroxidation. More severe oxidative stress can cause high severity of thalassemia which bring about a risk of serious complication. Those that might associate with severe thalassemia include bone deformities, enlarged spleen (splenomegaly), congestive heart failure, and abnormal heart rhythms (Taher, Musallam, and Cappellini, 2009).

2.2 Reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress

Free radicals are atoms, atomic groups, or molecules that are highly reactive species with one unpaired electron (Wlodek and Kusior, 2006). Sources of free radicals are respiratory precesses in mitochondria, and environmental pollutants

including pesticides, toxic chemical wastes, direct and second hand cigarette smoke and radiation (Moyano et al., 1997; Bagchi et al., 2000). ROS are oxygen-centered molecules including non-radicals H_2O_2 and singlet oxygen as well as radicals $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, and nitric oxide (NO) (Figure 1). Addition of one electron to O_2 produces the $O_2^{\bullet-}$, wheres addition of two electrons results in formation of H_2O_2. H_2O_2 can react with $O_2^{\bullet-}$ and ferric or cupric ions to produce the highly reactive $OH^{\bullet}$ (Cimen, 2008), resulting in oxidative deterioration of lipids, proteins and DNA, activation of procarcinogens, and inhibition of cellular, and antioxidant defense systems. In addition, ROS contribute significantly to human disease pathophysiology (Bagchi et al., 2000) such as aging, cancer, cardiovascular diseases, inflammatory diseases, brain dysfunction, and the development of cataracts (Ames, Shigenaga, and Hagen, 1993).

2.2.1 Superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$)

The $O_2^{\bullet-}$ created from molecular oxygen by the addition of an electron is, in spite of being a free radical, not highly reactive. The formation of superoxide takes place spontaneously, especially in the electron-rich aerobic environment in vicinity of the inner mitochondrial membrane with the respiratory chain (Ahmad, 1995; Cimen, 2008) (Figure 2).

2.2.2 Hydrogen peroxide (H_2O_2)

H_2O_2 is not a free radical, but it is involved in the production of many ROS (Cimen, 2008). Two molecules of superoxide rapidly dismutate to H_2O_2 and molecular oxygen. This reaction is further accelerated by superoxide dismutase (SOD). It plays a radical forming role as an intermediate in the production of more ROS molecules, especially, formation of $OH^{\bullet}$ via oxidation of transition metals (Nordberg and Arner, 2001) (Figure 2).

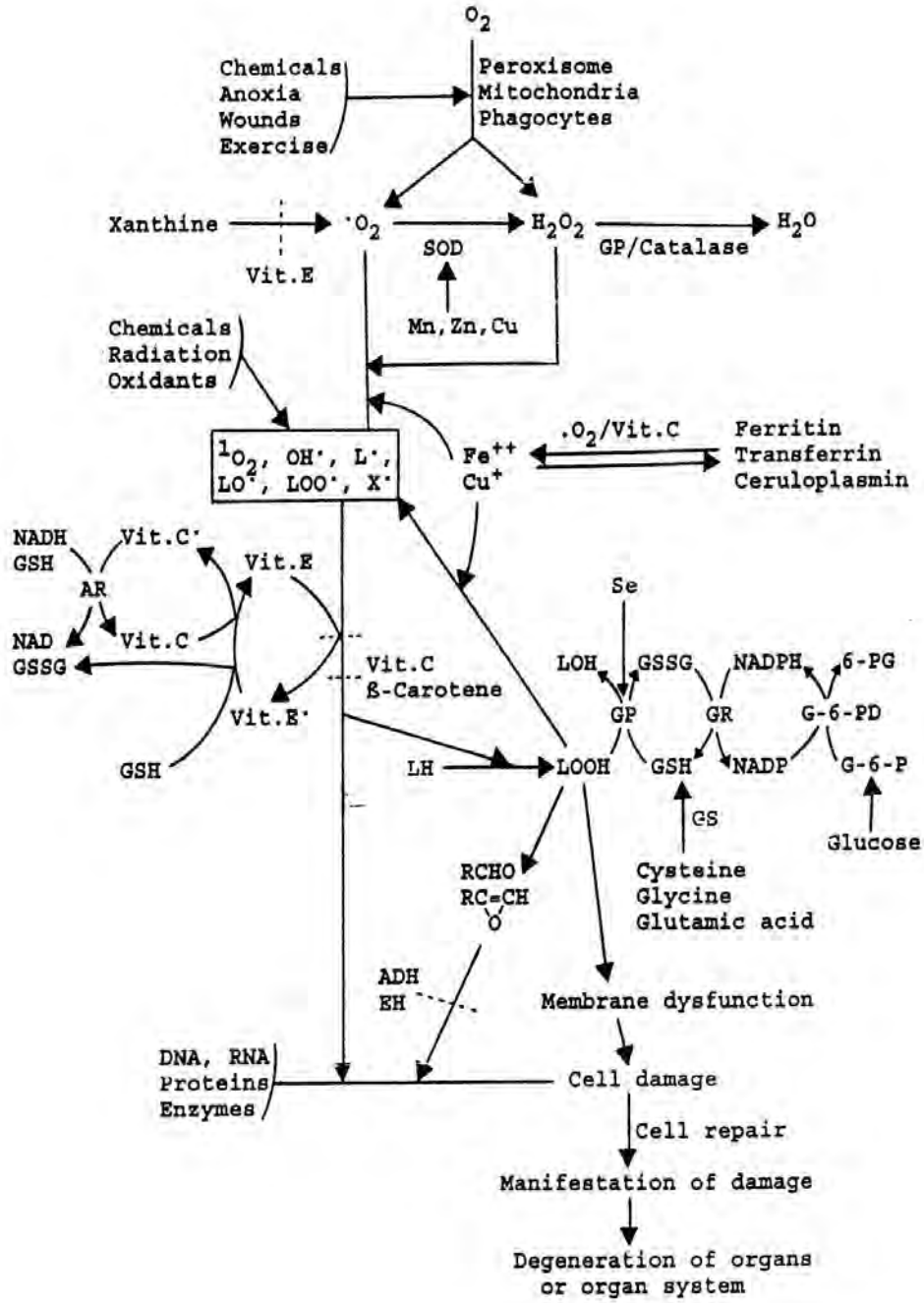


Figure 1 Main free radical metabolism pathways in human erythrocytes

(Rucker et al., 2001)

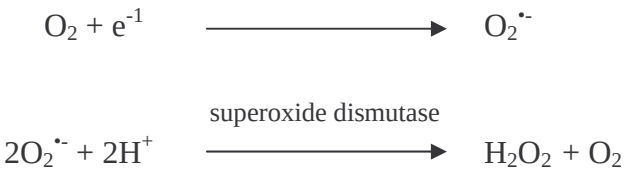


Figure 2 Formation of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 (Cimen, 2008)

2.2.3 Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$)

Due to its strong reactivity with biomolecules, $OH^{\bullet}$ is probably capable of doing more damage to biological systems than any other ROS. The main source of hydroxyl radicals is Haber-Weiss reaction (Figure 3), where superoxide radical reduces ferric ion (Fe^{3+}) to ferrous ion (Fe^{2+}) and in that way initiates the Fenton reaction between Fe^{2+} and H_2O_2 (Figure 4). The iron is oxidized to Fe^{3+} and becomes inactive for further reaction. In a chemical Fenton system, a reducing agent such as ascorbic acid is usually added to regenerate Fe^{2+}. This reaction can occur in cells and is therefore a possible source for oxidative stress (Ahmad, 1995; Nordberg and Arner, 2001).

Oxidative stress represents an imbalance between the production and manifestation of ROS and the ability of biological system in detoxification the reactive intermediates. A disturbance in the oxidant-antioxidant balance in favor of the former leads to oxidative damage in DNA bases, protein oxidation products, and lipid peroxidation products. Oxidative stress can be resulted from a lack of antioxidants or from excess free radicals. In humans, oxidative stress involves many diseases including atherosclerosis, parkinson's disease, heart failure, myocardial infarction, and alzheimer's disease (Al-Omar, Beedham, and Alsarra, 2004). Antioxidants are molecules which terminate the chain reaction by removing free radical intermediates and inhibiting other oxidation reactions. Several free radical

Figure 3 Haber-Weiss reaction

Figure 4 Fenton reaction

scavengers are naturally found such as thiols, ascorbic acid, polyphenols, beta-carotene and vitamin E (Tucker and Townsend, 2005).

2.3 Vitamin E

Vitamin E is a fat soluble vitamin found in vegetable oils, nuts and green leafy vegetables. It is a fat-soluble antioxidant that stops the production of ROS formed when fat undergoes oxidation (Tucker and Townsend, 2005). Vitamin E has a fundamental role in the normal metabolism of all cells. Therefore, its deficiency can affect several different organ systems. (Combs, 2008).

2.3.1 Biochemistry and biological activity of vitamin E

There are two classes of biologically active form of vitamin E, tocopherols and tocotrienols. The vitamers of each series are named according to the position and number of methyl groups on their ring systems (Gallagher, 2008). There are 4 different tocopherols, α-, β-, γ-, and δ-tocopherols, with minor structural differences (Saldeen and Saldeen, 2005).

α-tocopherol is the most active form; it is powerful biological antioxidant. The synthetic form is labeled *dl*, whereas the natural form is labeled *d*. The synthetic

form is only half as active as the natural form (Gallagher, 2008). The National Research Council defined dietary vitamin E activity in terms of RRR-α-tocopherol equivalents (α-TE). One α-TE is the activity of 1 mg of RRR-α-tocopherol. The Recommended Dietary Allowance (RDA) of vitamin E are presented in Tables 1 and 2 (Eitenmiller and Landen, 1999).

2.3.2 Antioxidant property of vitamin E

Vitamin E is the major antioxidant in the lipid environment of cellular and subcellular membranes and also in plasma lipoproteins by protecting the vital phospholipids from peroxidation. The α-tocopherol isoform of vitamin E inhibits the radical chain propagation within lipid domains by its own conversion into an oxidized product, α-tocopheroxyl free radical. By scavenging peroxyl radicals that otherwise would propagate the chain reaction of lipid peroxidation, vitamin E acts as a chain-breaking antioxidant. It does this by donating a hydrogen atom from its phenolic hydroxyl group to a lipid peroxyl radical ($LOO^{\bullet}$), forming the tocopheroxyl radical ($TO^{\bullet}$) and a lipid hydroperoxide (LOOH) (Eitenmiller and Landen, 1999).

The tocopheroxyl radical, which is relatively stable and unreactive, is unable to continue the chain reaction by attacking other species. Instead, it can be regenerated by ascorbate (vitamin C) or ubiquinol-10. This regeneration enhances the antioxidant capacity of vitamin E (Basu and Dickerson, 1996; Tucker and Townsend, 2005).

2.3.3 Vitamin E deficiency

Vitamin E deficiency can result from insufficient dietary intake or impaired absorption of the vitamin. Several other dietary factors affect the need for vitamin E. Selenium and polyunsaturated fatty acid (PUFA) are the most important nutrients in this regard. Although vitamin E deficiency is rare in humans, it is likely to

occur in specific situations. It is seen in persons who cannot absorb dietary lipid because of an inability to secrete bile or those who have rare disorders of fat metabolism, such as premature infant, infants with very low birth weight, and individuals with rare genetic abnormalities in the α-tocopherol transfer protein (Gallagher, 2008).

2.3.4 Vitamin E in health and disease

Vitamin E is the most important lipid-soluble antioxidant in the cell. It plays an important role in general health with specific implications regarding protection of cell from conditions that involve ROS. This antioxidant function suggests that vitamin E may be important in protecting the body against and treating condition related to oxidative stress. It is widely used as an ingredient in dietary supplements in the hope of maintaining health and preventing diseases. Vitamin E has frequently proven effective as a therapeutic measure in several disorders in humans, even though it may not be directly involved in their etiologies.

Many claims have been made about potential of vitamin E in promoting health and preventing and treatment of diseases. The mechanisms by which vitamin E might provide this protection include its function as an antioxidant and its roles in anti-inflammatory processes, inhibition of platelet aggregation, and immune enhancement. Thus, vitamin E may be useful in treating conditions related to oxidative stress such as arthritis (Bandt et al., 2002), cardiovascular disease (Devaraj et al., 2007), cancer (Kneki et al., 1991), diabetes (Skyrme-Jones et al., 2000), Alzheimer’s disease (Sano et al., 1997), hemolytic anemia of prematurity (Lo, Frank, and Hitzig, 1973) and chronic hemolysis (Corash et al., 1980).

Table 1 Biological activity of vitamin E forms

	Biological Activity	
Vitamin E Forms	**IU/mg**	**Compared to RRR- α-T (%)**
Natural Vitamin E (RRR-)		
α-tocopherol	1.49	100
β -tocopherol	0.75	50
γ -tocopherol	0.15	10
δ -tocopherol	0.05	3
α-tocotrienol	0.75	50
β -tocotrienol	0.08	5
γ -tocotrienol	not known	not known
δ -tocotrienol	not known	not known
Synthetic		
2R4´R8´R α-tocopherol	1.49	100
2S4´R8´R α-tocopherol	0.46	31
all-rac-α-tocopherol	1.10	74
2R4´R8´S α-tocopherol	1.34	90
2S4´R8´S α-tocopherol	0.55	37
2R4´S8´S α-tocopherol	1.09	73
2S4´S8´R α-tocopherol	0.31	21
2R4´S8´R α-tocopherol	0.85	57
2S4´S8´S α-tocopherol	1.10	60
RRR α-tocopheryl acetate	1.36	91
RRR α-tocopheryl acid succinate	1.21	81
all-rac-α-tocopheryl acetate	1.00	67
all-rac-α-tocopheryl acid succinate	0.89	60

Source: Eitenmiller and Landen (1999)

Table 2 Recommended Dietary Allowances (RDA) for *RRR*-alpha-tocopherol (*d*-alpha-tocopherol)

Age (years)	**Vitamin E (mg/day)**
Infants (0-0.5)	4
Infants (0.5-1)	5
Children	
1-3	6
4-8	7
Males	
9-13	11
14-18	15
19-30	15
31-50	15
51-70	15
>70	15
Females	
9-13	11
14-18	15
19-30	15
31-50	15
51-70	15
>70	15
Pregnancy	
≤ 18	15
19-30	15
31-50	15
Lactation	
≤ 18	19
19-30	19
31-50	19

Source: Sizer and Whitney, 2008

2.4 Role of vitamin E in thalassemia

Thalassemia is caused by an imbalance in the rate of globin chain synthesis. The accumulation of the unmatched normal globin chains leads to oxidative erythrocyte damage. Thalassemic erythrocytes are exposed to high oxidative stress, possibly contributing to shortened life span. In addition, previous studies showed that patients with thalassemia had low plasma levels of vitamin E (Dhawan et al., 2005; Palasuwan et al., 2006). It has been postulated that the low serum vitamin E levels may be due to increased requirements due to oxidative stress. (Mahjoub et al., 2007). Oxidative stress may be a major cause of hemolysis in thalassemia patients. This suggests that oxidative stress and reduced antioxidant defense mechanism play an important role in pathogenesis of thalassemia (Ghone et al., 2008).

Antioxidants are protective agents that may help guard cell against oxidative stress in thalassemia patients. Vitamin E is a lipid soluble antioxidant which can protect membrane PUFA in the RBC from lipid peroxidation and also prevents hemoglobin oxidation (Rund and Rachmilewitz, 2000). Vitamin E has been shown to effectively reduce $O_2^{\bullet-}$ (Shimazu et al., 2001) and $OH^{\bullet}$ (Valgimigli et al., 2004), which is extremely reactive, and possesses a very high oxidation potential. Vitamin E interrupts free-radical chain reactions leading to reduced free radical damage in the body.

Nowadays, treatments for thalassemia consist of blood transfusion and iron chelation. Trying to minimize the oxidative damage to cells and tissues in thalassemia, treatments with antioxidant, alone or in combination, have been used in the attempt to neutralize the deleterious effects of the ROS (Pfeifer et al., 2008). Several studies showed a benefit of vitamin E supplementation in thalassemia patients. Suthutvoravut et al. (1993) studied in 65 thalassemia children, aged 1-17

years, in comparison with 16 normal controls. It was found that the patients had lower plasma vitamin E level than the control. Ten vitamin E-deficiency thalassemia subjects (plasma vitamin E level < 0.5 mg/dL) had been supplemented with 200 mg of dl-alpha-tocopherol for 4-8 weeks. After supplementation, their plasma vitamin E increased and H_2O_2 hemolysis decreased to normal values. Their RBC glutathione peroxidase activity also decreased but hematocrit (Hct) did not change significantly. These results suggest that vitamin E supplementation in thalassemia patients increased resistant of RBC to oxidative stress.

Pfeifer et al. (2008) studied in 9 thalassemia intermedia aged 15-74 years who underwent occasional transfusion. These patients took oral daily administration of 400 IU vitamin E for 4 months. ROS was measured by flow cytometry; RBC reduced glutathione (GSH) was measured by dinitrothiocyanobenzene reduction. Patients presented a significant reduced ROS production and increased GSH levels in RBC, indicating a decrease in their oxidative status after vitamin E supplementation. Das et al. (2004) studied in 18 thalassemia patients aged 4-16 years who underwent transfusion every 3 to 4 weeks interval. Patients were given 10 mg/kg/d of vitamin E for 4 weeks. The level of malondialdehyde (MDA), a secondary end product of the oxidation of polyunsaturated fatty acids, was measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) assay. Treatment of the patients with vitamin E for a period of 4 weeks remarkably reduced the level of lipid peroxidation in erythrocyte membranes. Thus, vitamin E may be useful in protecting the erythrocytes in patients with thalassemia.

CHAPTER III

MATERIALS AND METHODS

3.1 Subjects

Patients with thalassemia intermedia from Pediatric Hematology Clinic, Siriraj Hospital who did not require chronic transfusional therapy were recruited into the study. The subjects, aged 5–20 years, were diagnosed with thalassaemia intermedia by hemoglobin typing. All of them had hemoglobin levels between 7-9 g/dl. All patients were not on iron chelation therapy and did not take vitamin E and any antioxidant supplements (e.g. vitamin C, curcumin) for at least 3 months prior to the study. They were free from acute or chronic infection or surgical operation for at least 1 month prior to the study. None of them had vitamin E allergy.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Faculty of Medicine, Siriraj Hospital (Appendix A). All subjects received the explanation of experimental protocol, and the written informed consent was obtained before the beginning of the study (Appendix C).

3.2 Research procedure

The study was conducted during the period from March to September 2010. At the beginning of the study (week 0), the subjects received nutrition counseling that involved a consideration of energy intake and the proportion of protein, fat, carbohydrate and other nutrients suitable for thalassemia management. Each subjects received dietary guideline for thalassemic patients (Appendix D). In addition, all subjects were interviewed about personal information, health history

on thalassemia and dietary and physical activity behaviors. Anthropometric measurements were performed. The subjects and subject's family were instructed how to record the 3-day dietary intake (1 weekend day and 2 weekdays). Peripheral blood sample (10 ml) was obtained from each subject to determine complete blood count (CBC), serum vitamin E levels, lipid peroxidation, reactive oxygen species (ROS) production in red blood cells (RBC), RBC hemolysis, and antioxidant mechanism of vitamin E. Each subject was asked to maintain amount of energy intake and level of physical activity throughout the study and to avoid taking other antioxidants such as vitamin C. Then, the subjects were assigned into a vitamin E group and a control group.

The subjects in vitamin E group received vitamin E (Mega®, Thailand) 10 IU/kg/day for 12 weeks. They were asked to consume their regular diet menus at home and take vitamin E in the morning every day until the end of the study (week 12). The subjects in control group did not receive any supplementation. They were also advised to maintain their regular diets at home. Three-day food records were done by the subjects or subject's families during 12-week of supplementation period. At the end of the study (week 12), peripheral blood sample (10 ml) was obtained from each subject for determining CBC, serum vitamin E levels, lipid peroxidation, ROS production in RBC, and RBC hemolysis. Anthropometric measurements were performed. The subject's compliance and adverse effects were assessed by interviewing and counting the remaining capsules of vitamin E at the end of the study. The research procedure of the study is presented in Figure 5.

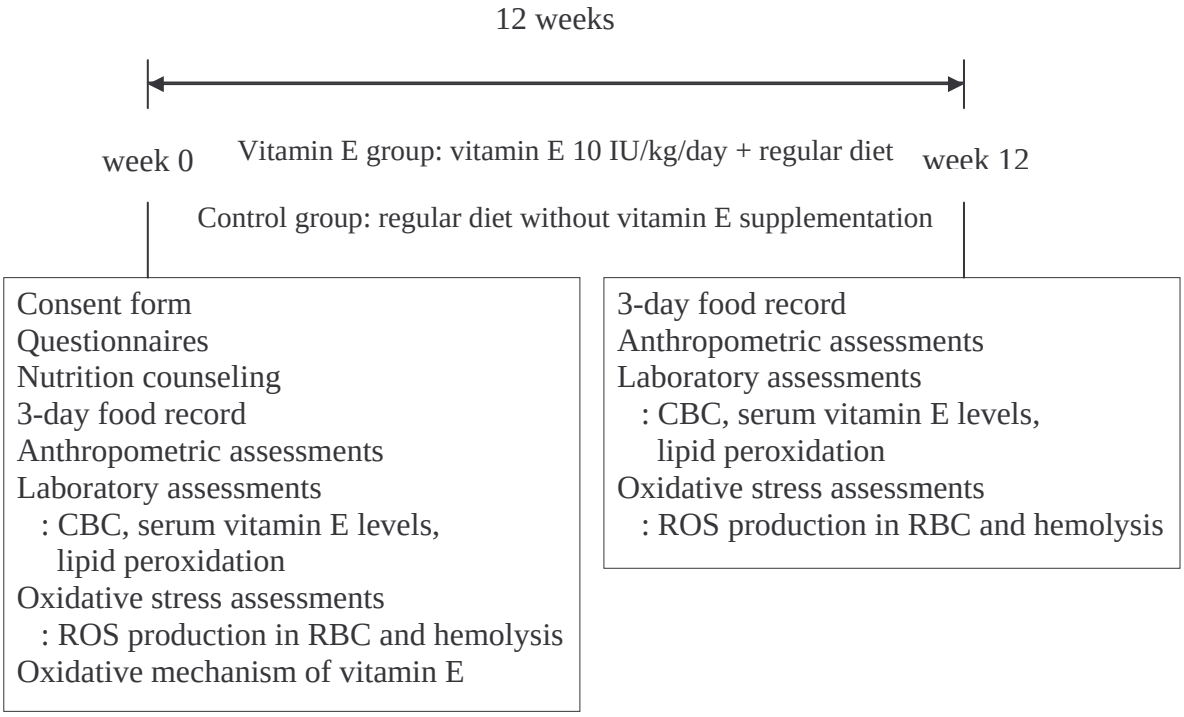


Figure 5 Diagram of research procedure

3.3 Study measurements and data collection

3.3.1 Dietary assessment

The 3-day food record (2 weekday and 1 weekend day) was done by the subjects or families at the begining of the study (week 0) and the end of the study (week 12). Subjects were provided with dietary record forms (Appendix B), labeled with the dates on which they had to be completed. All items and portions of food consumed including name and method of preparation and cooking were asked to record. The subjects estimated food portion size using standard household measuring cups and spoons. The food records were calculated for energy and nutrients intake using the software THAI NUTRISURVEY version 2 (2008) developed for Thai food by Department of Health, Ministry of Public Health and Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand. From each 3-day food record, average intakes of energy, protein, carbohydrate and fat were calculated.

3.3.2 Anthropometric assessments

Anthropometric data were assessed at week 0 and week 12 of the study. Anthropometric in this study included the measurements of body weight, height, triceps skinfold thickness (TSF) and mid-arm circumference (MAC). These measurements provided useful data for calculation of body mass index (BMI) and mid-arm muscle circumference (MAMC). Body weight and height was performed by weight with height meter (402 KL Health meter® Professional, USA). BMI was calculated from weight and height as followed:

$$\text{BMI } (kg/m^2) = \frac{\text{weight (kg)}}{[\text{height (m)}]^2}$$

Then, the data was interpreted using a graph of BMI-for-age and gender (Appendix E) and classified using standard categories of BMI-for-age (Table 3).

Triceps skinfold thickness (TSF) were measured by a conventional skinfold caliper (Cambridge scientific industries®, Maryland, USA). Skinfold thickness measurements were performed three times in each patient and the values were then averaged for final calculation. Mid arm circumference (MAC) was measured in centimeters halfway between the acromion process of the scapula and the olecranon process at the tip of the elbow with non-stretchable tape. The MAMC was calculated as followed:

$$\text{MAMC} = \text{MAC (cm)} - [0.314 \times \text{TSF (cm)}]$$

3.3.3 Laboratory assessments

At week 0 and week 12 of the study, 10 ml of peripheral blood samples were collected. Blood sample in the amount of 5 ml was collected in EDTA tube for determining CBC and RBC hemolysis. Other 2 ml of blood was collected in tube without anticoagulant for determining vitamin E levels. Serum vitamin E levels were

Table 3 Standard categories of BMI-for-age (CDC 2000)

BMI-for-age	Classification
<5th Percentile	Underweight
85th to <95th Percentile	At risk of overweight
≥95th Percentile	Overweight

BMI= body mass index; kg/m^2= kilogram/square meter

measured by high performance liquid chromatography (HPLC). Other 3 ml was collected in heparinized tube for determining lipid peroxidation, ROS production and antioxidative mechanism of vitamin E.

3.3.4 Determination red cell peroxidative products

Plasma lipid peroxidation was assessed by TBARs assay kit (Cayman, Germany) according to the kit booklet protocol. In brief, sodium dodecyl sulphate (SDS) solution was added to 100 µl of a plasma sample. After then, 4 ml of the thiobarbituric acid-trichloroacetic acid-sodium hydroxide reagent (TBA-TCA-NaOH) were added. The mixture was boiled in a boiling water-bath for 1 hour. After one hour, immediately remove the vials and place in ice bath to stop reaction for 10 minutes. After 10 minutes, centrifuge the vials for 10 minutes at 1,600×g at 4ºC. Plasma MDA concentration was measured spectrophotometrically at 532 nm using thiobarbituric acid reagents under acidic conditions to generate a pink colored product and recorded as µmol/L.

3.3.5 Determination of ROS production in RBC

3.3.5.1 RBC preparation

Venous blood samples (3 ml) were collected in heparinized containing tube. Erythrocytes were separated from the plasma by centrifugation at 1,200 rpm

(model B708318; Labnet International, Inc, USA) for 5 minutes at room temperature. The erythrocytes were then washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 (Invitrogen Corporation, USA) and diluted to 25 ml with PBS (concentration 1×10^6 cells/ml) in a 50 ml polypropylene test tube.

3.3.5.2 ROS generators

3.3.5.2.1 Preparation of hydrogen peroxide (H_2O_2) solution

H_2O_2 solution (30%v/v) (Merck, Germany) was used to generate intracellular H_2O_2. H_2O_2 (30%v/v) was diluted with PBS to obtain the final concentrations of 10, 20, 45, 90, 180 and 360 mmol/l.

3.3.5.2.2 Preparation of 2, 2'-azobis-2-methyl-propanimidamide dihydrochloride (AAPH) solution

AAPH (Cayman, USA) was used as free radical generator. AAPH was dissolved in PBS to make a final concentrations of 5, 10, 25, 50, 100, 200 mmol/l.

3.3.5.3 Preparation of fluorescent probs for ROS detection

3.3.5.3.1 Detection of ROS generation

2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich Inc., USA) was used as a fluorescent probe for detecting of ROS. DCFH-DA solution was freshly prepared prior to use by dissolving 0.5 mg of DCFH-DA in 1 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany) to give a stock solution at concentration of 1 mmol/l. Then, the solution was diluted with PBS to obtain the final concentration of 20 µmol/l.

3.3.5.3.2 Analysis of radical scavenging activity of vitamin E against ROS

RBC suspended in PBS was stained by incubating with 20 µmol/l of DCFH-DA at 4ºC for 20 minutes. After incubation, RBC was treated by ROS

generators (H_2O_2 and AAPH) at 37ºC in a humidified CO_2 incubator (95% air and 5% CO_2) for 2 hours. Intracellular ROS signals in each treated and non-treated groups were analyzed and quantitated by flow cytometry (Becton Dickinson, USA).

3.3.6 Determination of hemolysis

3.3.6.1 RBC preparation

Venous blood samples (3 ml) were collected in EDTA containing tube. Erythrocytes were separated from the plasma by centrifugation at 1,200 rpm (model B708318; Labnet International, Inc, USA) for 5 minutes at room temperature and washed 3 times with PBS pH 7.4. Then, the erythrocytes were diluted to a concentration of 5×10^8 cells/ml in PBS, counted using a hemocytometer.

3.3.6.2 Analysis of hemolysis

An aliquot of 50 µl of erythrocytes suspension was mixed with H_2O_2 or AAPH with different concentrations as decribed in 3.3.5.2 (absorbance A_{test}) and 50 µl of PBS buffer (pH 7.4) (absorbance A). The mixture was shaken gently while being incubated at 37ºC for 2 hours. The absorbance of the supernatant was measured at 570 nm by using spectrophotometer. Triton-X 1% was used as a positive control (absorbance $A_{positive}$).

The percentage of hemolysis was calculated by the following equation:

$$\%\text{Hemolysis} = (A-A_{test})/(A-A_{positive}) \times 100$$

A = absorbance of the negative control

A_{test} = absorbance of the sample

$A_{positive}$ = absorbance of the positive control

3.3.7 Antioxidant activity of vitamin E against ROS generators-induced ROS production in RBC

3.3.7.1 RBC preparation

Venous blood samples (3 ml) were collected in heparinized containing tube. Erythrocytes were separated from the plasma by centrifugation at 1,200 rpm (model B708318; Labnet International, Inc, USA) for 5 minutes at room temperature and washed 3 times with PBS pH 7.4. Then, the erythrocytes were diluted to final concentration of 1×10^6 cells/ml.

3.3.7.2 Vitamin E preparation

Vitamin E (Fluka®, USA) in the amount of 8.6 mg was dissolved in 1 ml of methanol to give a stock solution at concentration of 20 mmol/l and then diluted with PBS to give concentration of 200 µmol/l.

3.3.7.3 ROS generators

1) Preparation of $O_2^{\bullet-}$ solution

2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ) (Sigma-Aldrich Inc., USA) was used to generate $O_2^{\bullet-}$ radical in cells. Eleven milligram of DMNQ was dissolved in 1 ml DMSO to make 50 mmol/l of stock solution. The solution was then diluted with PBS to give concentration of 10 µmol/l.

2) Preparation of H_2O_2 solution

30%v/v H_2O_2 solution was used to generate intracellular H_2O_2. 30%v/v H_2O_2 solution was diluted with PBS to obtain the final concentrations of 10, 20, 45, 90, 180 and 360 mmol/l.

3) Preparation of AAPH solution

AAPH was used as free radical generator. AAPH was dissolved in PBS to make a final concentrations of 5, 10, 25, 50, 100, 200 mmol/l.

3.3.7.4 ROS scavengers

1) Preparation of catalase solution

Catalase (Sigma-Aldrich Inc., USA) was used for catalysting intracellular H_2O_2 to water and oxygen. Catalase in the amount of 0.074 mg was dissolved in 1 ml of PBS to obtain the final concentration of 1,000 units/ml.

2) Preparation of deferoxamine solution

Deferoxamine (DFO) (Sigma-Aldrich Inc., USA) was used for chelating cellular iron, and thus the reduction of iron would attenuate conversion of H_2O_2 to $OH^{\bullet}$. DFO in the amount of 56 mg was dissolved in 1 ml of PBS to make a stock solution at concentration of 100 mmol/l and the stock solution was diluted with PBS to give the final concentration of 1 mmol/l.

3.3.7.5 Preparation of fluorescent probs for ROS detection

3.3.7.3.1 Detection of $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 and $OH^{\bullet}$ generation

DCFH-DA was used as a fluorescent probe for detecting $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 and $OH^{\bullet}$. The DCFH-DA solution was prepared as described in 3.3.5.3.1

3.3.7.3.2 Analysis of antioxidant activity of vitamin E against ROS generators

RBC suspended in PBS was stained by incubating with 20 µmol/l of DCFH-DA at 4ºC for 20 minutes. After incubation, RBC was pre-treated with 200 µmol/l vitamin E for 30 minutes and then treated with ROS generators and ROS scavengers at 37ºC in a humidified CO_2 incubator (95% air and 5% CO_2) for 2 hours. Intracellular ROS signals in each treated and non-treated groups were analyzed and quantitated by flow cytometry (Becton Dickinson, USA).

3.3.8 Compliance and adverse effects of vitamin E

The subjects were called once a week throughout the vitamin E supplementation period to ensure their compliance. At the end of the supplementation period, the subjects returned all the packets of vitamin E capsules received. The returned capsules were counted for the percentage of compliance as followed:

$$\% \text{ of compliance} = \frac{\text{number of eaten capsules} \times 100}{\text{number of given capsules}}$$

In addition, any adverse effects that occurred during vitamin E supplementation were also asked.

3.4 Statistical analysis

Before statistical analysis, normal distribution of the variances was tested by Kolmogorov-Smirnov test (Appendix F). Categorical data were expressed as number of subjects. Continuous data were expressed as mean ± SEM. For comparison of the proportion of demographic data and subject characteristics, Chi-square was used to test for significant difference between groups. Paired *t*-test was used to test for significant difference between the values at week 0 and week 12 within group. Significant difference of values between groups at week 0 was tested by independent *t*-test and at week 12 was tested by analysis of covariance (ANCOVA). Statistical analysis was considered significant at $p < 0.05$.

CHAPTER IV

RESULTS

4.1 Characteristics of the Subjects

There were 21 subjects (11 males and 10 females) enrolled in this study. The subjects were assigned into two groups, the control and vitamin E groups. The control group comprised of 10 patients (8 males and 2 females) while the vitamin E group comprised of 11 patients (3 males and 8 females). The subjects in the vitamin E group were supplemented with vitamin E (10 IU/kg/d) for 12 weeks. Four subjects did not complete the study because 2 subjects in the control group lost follow-up, and 2 subjects in the vitamin E group consumed vitamin E less than 80%. Therefore, there were totally 17 subjects in the study (8 males and 9 females).

The characteristics of the subjects are shown in Table 4. The subjects who allocated to the vitamin E group were not statistically different from those in the control group with regard to age, weight, height, BMI-for-age, duration of thalassemia and other vitamin and mineral use. The vitamin E group included 9 subjects (2 males and 7 females), and the the control group included 8 subjects (6 males and 2 females). More than 70% of the subjects in the vitamin E group were females while most of the subjects in the control group were males. Mean age of the vitamin E and control groups were 15.56 ± 0.73 and 13.50 ± 1.43 years respectively. In the vitamin E group, 22.2% of the subjects were underweight (BMI-for-age < 5^{th} percentile), and 77.8% were normal (BMI-for-age between 5^{th} and 85^{th} percentile). In the control group, 37.5% of the subjects were underweight, and 62.5% were normal. Most of the subjects in both groups had diagnosis of thalassemia intermedia for more than

Table 4 Characteristics of the subjects

Characteristics	Vitamin E group (n = 9) n (%)	Control group (n = 8) n (%)	Total (n = 17) n (%)
Sex			
Male	2 (22.2)	6 (75.0)	8 (47.1)
Female	7 (77.8)	2 (25.0)	9 (52.9)
	$\chi^2 = 4.74$	df = 1	$p = 0.030$
Age (years)			
5-10	0	1 (12.5)	1 (5.9)
11-15	4 (44.4)	4 (50.0)	8 (47.1)
16-20	5 (55.6)	3 (37.5)	8 (47.1)
Mean of age[1] (years)	15.56 ± 0.73	13.50 ± 1.43	14.59 ± 0.79
	$\chi^2 = 6.97$	df = 8	$p = 0.540$
Weight[1] (kg)	44.33 ± 1.70	37.80 ± 5.14	41.26 ± 2.62
	$\chi^2 = 14.99$	df = 15	$p = 0.452$
Height[1] (m)	1.56 ± 2.63	1.48 ± 7.39	1.52 ± 3.73
	$\chi^2 = 17.00$	df = 16	$p = 0.386$
BMI-for-age (kg/m^2)			
Underweight	2 (22.2)	3 (37.5)	5 (29.4)
Normal	7 (77.8)	5 (62.5)	12 (70.6)
At risk of overweight	0	0	0
Overweight	0	0	0
	$\chi^2 = 17.00$	df = 16	$p = 0.386$
Duration of thalassemia (years)			
< 5	0	1 (12.5)	2 (11.8)
5 - 10	0	2 (25.0)	1 (5.9)
> 10	9 (100.0)	5 (62.5)	14 (82.4)
Mean of duration[1] (years)	13.33 ± 0.78	9.75 ± 1.57	11.65 ± 0.96
	$\chi^2 = 6.30$	df =9	$p = 0.710$
Other vitamin and mineral use			
Yes	3 (33.3)	4 (50.0)	7 (41.2)
No	6 (66.7)	4 (50.0)	10 (58.8)
	$\chi^2 = 0.49$	df = 1	$p = 0.486$

[1]mean±SEM

n = number; df = degrees of freedom; χ^2= compare frequency between groups by Chi-square test; kg = kilogram; m = meter; kg/m^2 = kilogram per metre square

10 years. The results showed that 33.3% and 50.0% of the subjects in the vitamin E and control groups respectively was taken other vitamin and mineral supplements such as calcium and multivitamin.

4.2 Energy distribution and nutrient intakes of the subjects

Dietary intakes assessed by 3-day food records at week 0 and week 12 in both groups were analyzed (Table 5). The results showed that energy distribution and nutrient intakes of the subjects in the vitamin E and control groups at week 0 of the study were not significantly different. It appeared that the subjects in both groups had total caloric intake less than the recommendation of the dietary reference intake for Thais 2003. The results showed that total energy intake and total fat intake did not change noticeably throughout the study in both groups. In the vitamin E group, the percentage of energy from protein at week 12 was significantly less than that at week 0 (12.68 ± 0.71 % at week 12 and 18.44 ± 1.62 % at week 0, $p = 0.036$). At week 12, the amount of carbohydrate consumption in the vitamin E group were significantly greater than those at week 0 (245.60 ± 10.44 g/day at week 12 and 170.34 ± 18.98 g/day at week 0, $p = 0.002$). It was found that at week 12 of the study the amount of total protein intake of the subjects in the vitamin E group were significantly less than those in the control group (1.14 ± 0.06 g/kg/day in the vitamin E group and 1.82 ± 0.20 g/kg/day in the control group , $p = 0.012$). However, the amount of carbohydrate intake in the vitamin E group were significantly greater than those in the control group (245.60 ± 10.44 g/day in the vitamin E group and 171.95 ± 22.03 g/day in the control group, $p = 0.007$).

Table 5 Energy distribution and nutrient intakes of the subjects at baseline and week 12 of the study[1]

Nutrient intake	Vitamin E group (n=9)		Control group (n=8)		Recommended range[2]
	Week 0	Week 12	Week 0	Week 12	
Total energy intake					
kcal/day	1334.67 ± 149.33	1610.74 ± 98.44	1432.18 ± 126.46	1550.64 ± 144.04	1600 - 1700
Total protein					
kcal/day	246.09 ± 21.68	204.29 ± 11.37†	223.86 ± 16.03	278.66 ± 31.18	
g/day	61.52 ± 5.42	51.07 ± 2.84†	55.96 ± 4.01	69.66 ± 7.79	40 - 41
g/kg/day	1.39 ± 0.12	1.14 ± 0.06*†	1.48 ± 0.11	1.82 ± 0.20	1.2
% of total energy	18.44 ± 1.62	12.68 ± 0.71*†	15.63 ± 1.12	17.97 ± 2.01	
Fat					
kcal/day	405.41 ± 93.05	427.19 ± 72.15	582.26 ± 94.50	562.87 ± 82.74	
g/day	45.05 ± 10.34	47.47 ± 8.02	64.70 ± 10.50	62.54 ± 9.19	-
% of total energy	30.38 ± 6.97	26.52 ± 4.48	40.66 ± 6.60	36.30 ± 5.34	
CHO					
kcal/day	681.34 ± 75.92	982.38 ± 41.76*††	628.62 ± 111.34	687.82 ± 88.14	
g/day	170.34 ± 18.98	245.60 ± 10.44*††	157.16 ± 27.84	171.95 ± 22.03	-
% of total energy	51.05 ± 5.69	60.99 ± 2.59†	43.89 ± 7.77	44.36 ± 5.68	
Protein : Fat : CHO	20 : 28 : 52	13 : 25 : 62	16 : 41 : 43	20 : 36 : 44	

[1] mean ± SEM
[2] Recommended ranges were obtained from Dietary Reference Intake For Thais 2003, Bureau of Nutrition , Ministry of Public Health
* Significant difference from week 0 within group ($p < 0.05$)
†Significant difference from the control group ($p < 0.05$) ††Significant difference from the control group ($p < 0.01$)
n = number; kcal/day = kilocalories per day; g/d = gram per day; g/kg/day = gram per kilogram per day; CHO = carbohydrate

4.3 Anthropometric measurement of the subjects

Anthropometric parameters in this study included body weight, height, BMI, TSF, MAC and MAMC. The results are shown in Table 6. There were no significant differences in body weight, height, BMI, TSF, MAC and MAMC at week 0 and week 12 between groups. The mean body weight of the subjects in the vitamin E group was significantly increased from 44.33 ± 1.70 kg at week 0 to 44.90 ± 1.66 kg at week 12 (p = 0.038). After 12 weeks of the study, the mean height of the subjects in the control group increased from 1.48 ± 7.39 m at week 0 to 1.49 ± 7.32 m at week 12 (p = 0.001).

4.4 Complete blood count, serum vitamin E levels and plasma malondialdehyde of the subjects

The results of CBC, serum vitamin E levels and plasma MDA are shown in Table 7. There were no significant differences in hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), red blood cell count (RBC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), mean platelet volume (MPV) at week 0 and week 12 between groups. It was found that there was no significant difference in serum vitamin E at week 0 between groups. However, at week 12, the serum vitamin E levels significantly increased from 397.44 ± 90.54 µg/dL at week 0 to 1318.24 ± 185.99 µg/dL (p < 0.001) in the vitamin E group. Serum vitamin E levels in the vitamin E group were significantly more than those in the control group (1318.224 ± 185.99 µg/dL in the viamin E group and 444.90 ± 80.95 µg/dL in the control group, p = 0.001).

Table 6 Anthropometric of the subjects at week 0 and week 12 of the study[1]

Characteristics	Vitamin E group (n=9)		Control group (n=8)	
	Week 0	Week 12	Week 0	Week 12
Body weight (kg)	44.33 ± 1.70	44.90 ± 1.66*	37.80 ± 5.14	38.24 ± 4.99
Height (m)	1.56 ± 2.63	1.56 ± 2.35	1.48 ± 7.39	1.49 ± 7.32*
BMI (kg/m^2)	18.13 ± 0.57	18.25 ± 0.58	16.52 ± 1.10	16.48 ± 1.00
TSF (mm)	14.91 ± 0.87	14.37 ± 1.03	9.81 ± 0.98	10.06 ± 1.01
MAC (cm)	22.37 ± 0.51	22.33 ± 0.59	20.59 ± 1.38	20.76 ± 1.36
MAMC (cm)	17.68 ± 0.43	17.82 ± 0.50	17.51 ± 1.26	17.61 ± 1.24

[1] mean ± SEM
* Significant difference from baseline within group ($p < 0.05$)
BMI = body mass index; TSF = triceps skinfold; MAC = mid-arm circumference;
MAMC = mid-arm muscle circumference; kg = kilogram; kg/m^2 = kilogram per metre square;
m = meter; cm = centimeter; mm = millimeter

At week 0 of the study, there was no significant difference in plasma MDA of the subjects in both groups. However, after vitamin E supplementation for 12 weeks, there was a decrease in plasma MDA levels (28.06 ± 2.94 µmol/l at week 12 and 38.11 ± 6.10 µmol/l at week 0, p = 0.027). Plasma MDA in the vitamin E group were significantly less than those in the control group (28.06 ± 2.94 µM in the vitamin E group and 63.57 ± 16.70 µM in the control group, p = 0.017).

Table 7 Hematological and biochemical parameters of the subjects at week 0 and week 12 of the study[1]

Parameters	Vitamin E group(n=9)		Control group(n=8)	
	Week 0	Week 12	Week 0	Week 12
Complete blood count				
Hb (g/dL)	8.20 ± 0.22	8.06 ± 0.18	7.74 ± 0.20	7.71 ± 0.35
Hct (%)	27.58 ± 0.94	27.07 ± 0.72	26.79 ± 0.67	26.68 ± 1.17
RBC (10^6/mL^3)	4.54 ± 0.27	4.37 ± 0.23	3.87 ± 0.20	3.91 ± 0.22
MCV (fl)	61.68 ± 2.54	62.89 ± 2.88	70.53 ± 4.23	69.94 ± 4.25
MCH (pg)	18.37 ± 0.87	18.68 ± 0.74	20.23 ± 1.02	20.10 ± 0.90
MCHC (g/dL)	29.77 ± 0.64	29.80 ± 0.64	28.79 ± 0.51	28.95 ± 0.69
RDW (%)	30.00 ± 3.71	26.70 ± 0.91	25.24 ± 1.01	25.21 ± 1.09
MPV (fl)	9.63 ± 0.21	9.56 ± 0.22	8.95 ± 0.40	8.99 ± 0.41
Serum vitamin E (µg/dL)	397.44 ± 90.54	1318.24 ± 185.99**††	393.00 ± 87.42	444.90 ± 80.95
Plasma MDA (µM)	38.11 ± 6.10	28.06 ± 2.94*†	36.94 ± 7.44	63.57 ± 16.70

[1] mean ± SEM

* Significant difference from baseline within group ($p < 0.05$), ** Significant difference from baseline within group ($p < 0.01$)

†Siginificant difference from the control group ($p < 0.05$), ††Siginificant difference from the control group ($p < 0.01$)

n = number; Hb = hemoglobin; Hct = hematocrit; RBC = red blood cell indicies; MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean corpuscular haemoglobin; MCHC = mean corpuscular haemoglobin concentration; RDW = red cell distribution width; MPV = mean platelet volume; 10^6/mL^3 = 1,000,000 per cubic meter; g/dL = gram/deciliter; fl = femtoliters; pg = picogram; µg/dL = microgram/deciliter; µM = micromole/liter

4.5 Effect of vitamin E on ROS production in RBC

4.5.1 ROS production in RBC generated by H_2O_2

RBC was treated with H_2O_2 at a concentration range of 0-360 mmol/l for 2 hours. The results showed that 2-hr H_2O_2 treatment significantly increased intracellular dichlorofluorescein (DCF) fluorescence intensity as compared to non-treated control (p = 0.003) (Figure 6). At week 0, the ROS production generated by H_2O_2 was in a concentration-dependent manner in both groups while at week 12, the ROS production generated by H_2O_2 was in a concentration-dependent manner only in the vitamin E group. At week 0 and week 12 of the study, there was no significant difference between the control and vitamin E groups in ROS production. There was no significant difference in ROS production induced by H_2O_2 at any concentration in the vitamin E group between week 0 and week 12. However, at week 12, the ROS production in response to 45 mM H_2O_2 and 90 mM H_2O_2 of the subjects in the control group were significantly greater those at week 0 (p = 0.019 and p = 0.041, respectively).

4.5.2 ROS production in RBC generated by AAPH

RBC was treated with AAPH at different concentrations (0-200 mM) for 2 hours. The results showed that 2-hr of AAPH treatment significantly increased intracellular DCF intensity as compared to non-treated control (p = 0.032) (Figure 7). At week 0 and week 12, the ROS production generated by AAPH was in concentration-dependent manner in the control group while the results in the vitamin E group did not display dose-dependent. At week 0 and week 12 of the study, there was no significant difference in ROS production between the vitamin E group and the control group. In the vitamin E group ROS production induced by AAPH at baseline

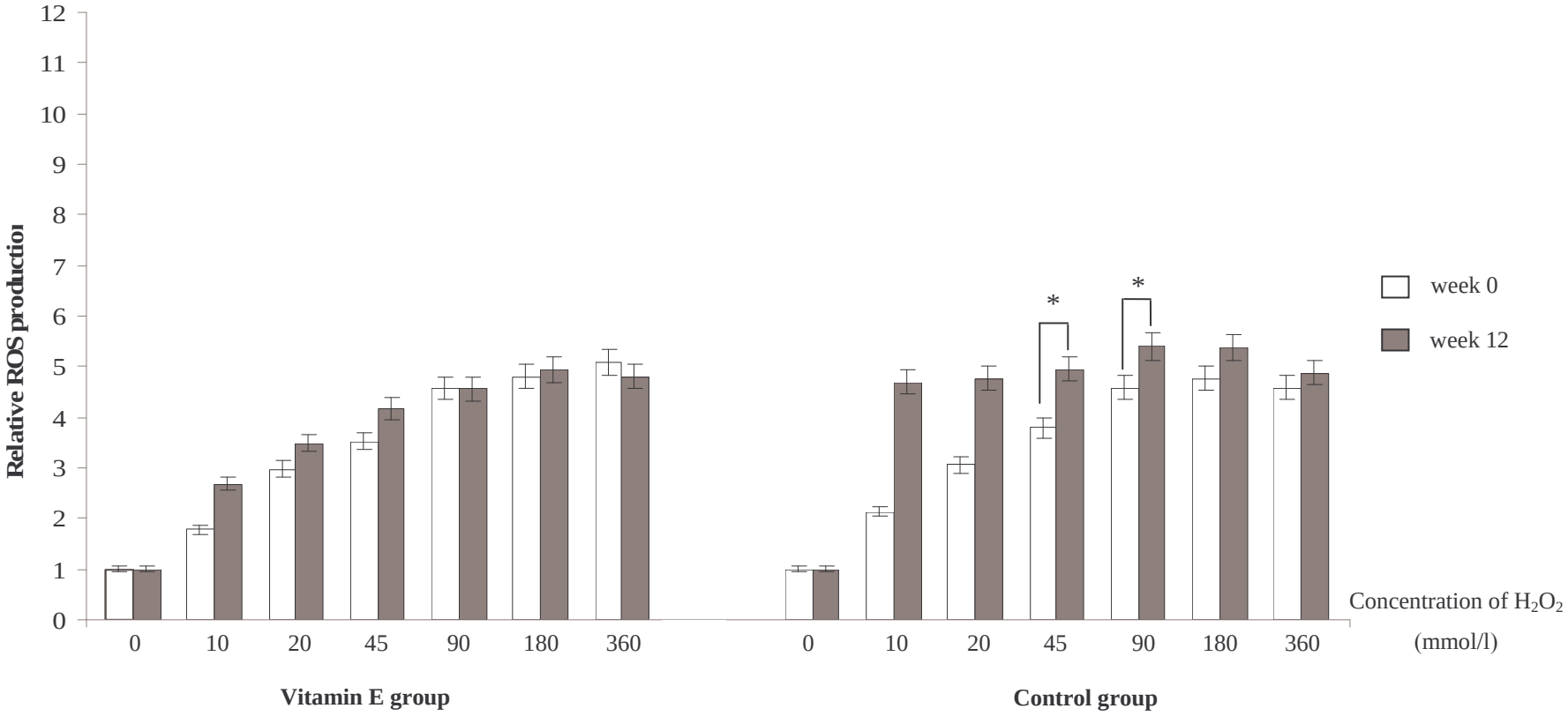


Figure 6 Reactive oxygen species (ROS) production in red blood cells generated by hydrogen peroxide (H_2O_2)

* Significant difference from week 0 within group ($p < 0.05$)

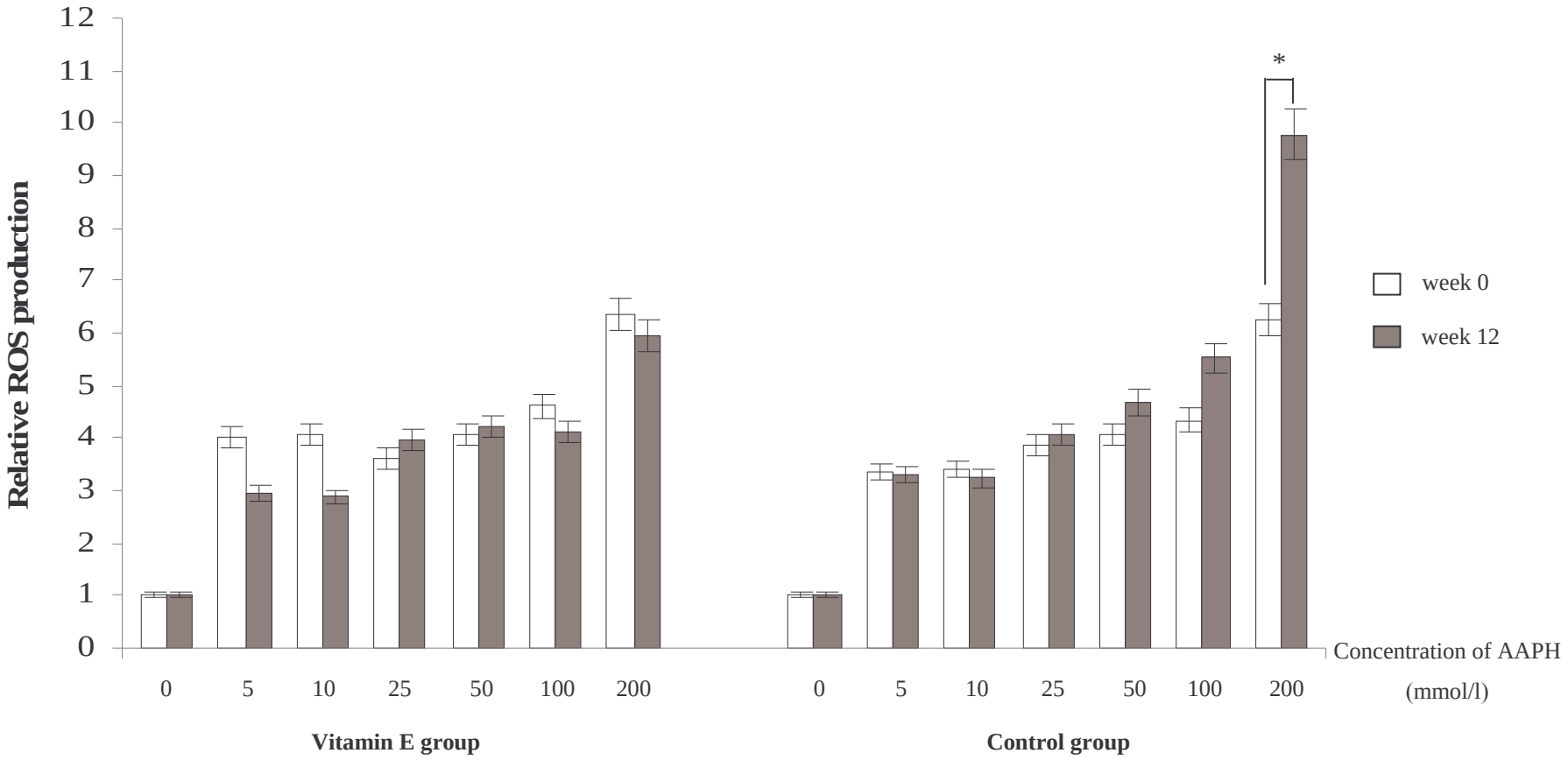


Figure 7 Reactive oxygen species (ROS) production in red blood cells generated by AAPH

* Significant difference from week 0 within group ($p < 0.05$)

was not significant different from that at week 12. However, it appeared that the ROS production in response to 200 mM AAPH of the subjects in the control group at week 12 was significantly greater than that at week 0 ($p = 0.027$).

4.6 Effect of vitamin E on hemolysis of thalassemic erythrocytes

4.6.1 Hemolysis of RBC generated by H_2O_2

The hemolysis result of erythrocytes treated with H_2O_2 is presented in Figure 8. RBC was incubated at 37°C with H_2O_2 at different concentrations (0-360 mM) for 2 hours. At week 0 and week 12 of the study, the percentage of hemolysis progressively increased in a dose-dependent manner in both groups. There was no significant difference between the vitamin E group and the control group in the percentage of hemolysis at both time points of the study. After vitamin E supplementation for 12 weeks, the percentage of hemolysis did not significantly differ from baseline. On the other hand, at week 12, the percentages of hemolysis in the control group was significantly greater than those at week 0 with 45 mM H_2O_2 ($p = 0.017$) and 90 mM H_2O_2 ($p = 0.041$).

4.6.2 Hemolysis of RBC generated by AAPH

The influence of vitamin E on erythrocyte hemolysis was examined by incubating thalassemic erythrocytes in the presence of AAPH at different concentrations (0-200 mM) for 2 hours (Figure 9). At week 0 and week 12 of the study, the percentage of RBC hemolysis progressively increased in a dose-dependent manner in both groups. There was no significant difference between the vitamin E group and the control group in the percentage of hemolysis at both time points of the study. At week 12, the percentages of hemolysis were significantly decreased as

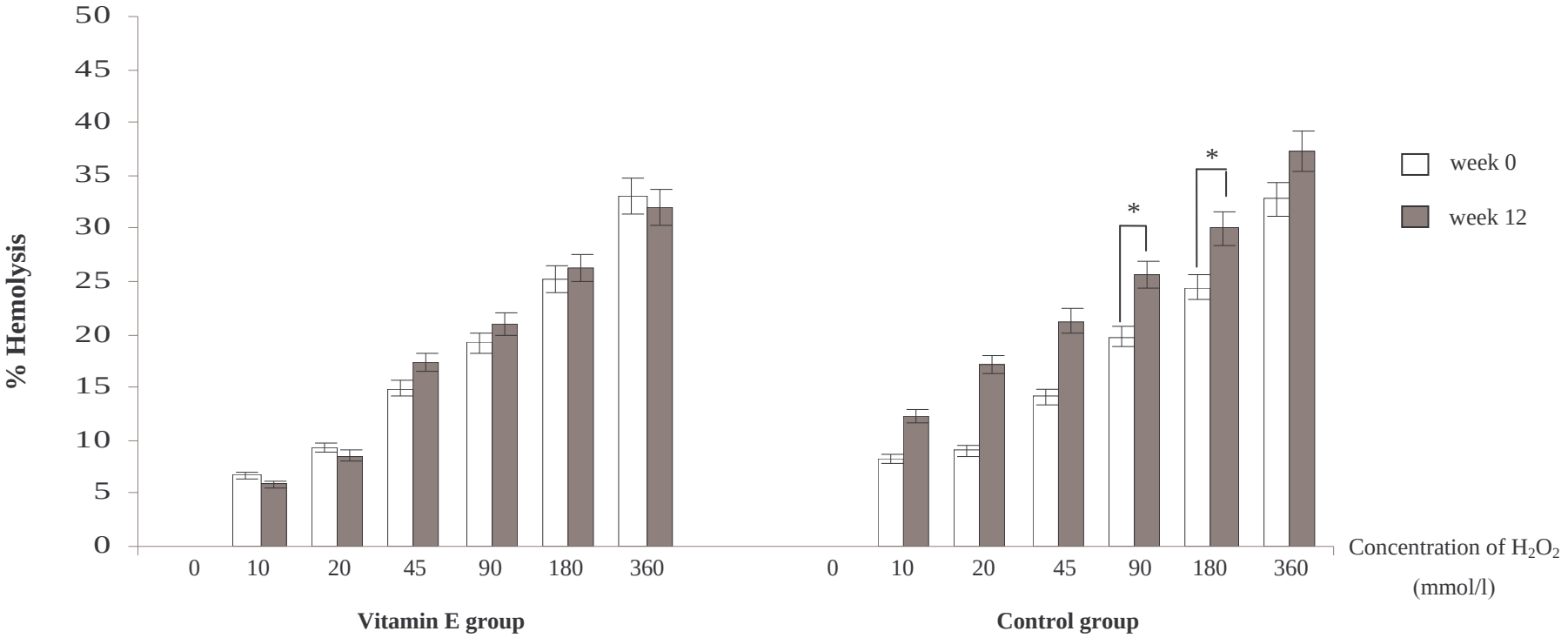


Figure 8 Percentage of hemolysis in thalassemic erythrocytes induced by H_2O_2

* Significant difference from baseline within group ($p < 0.05$)

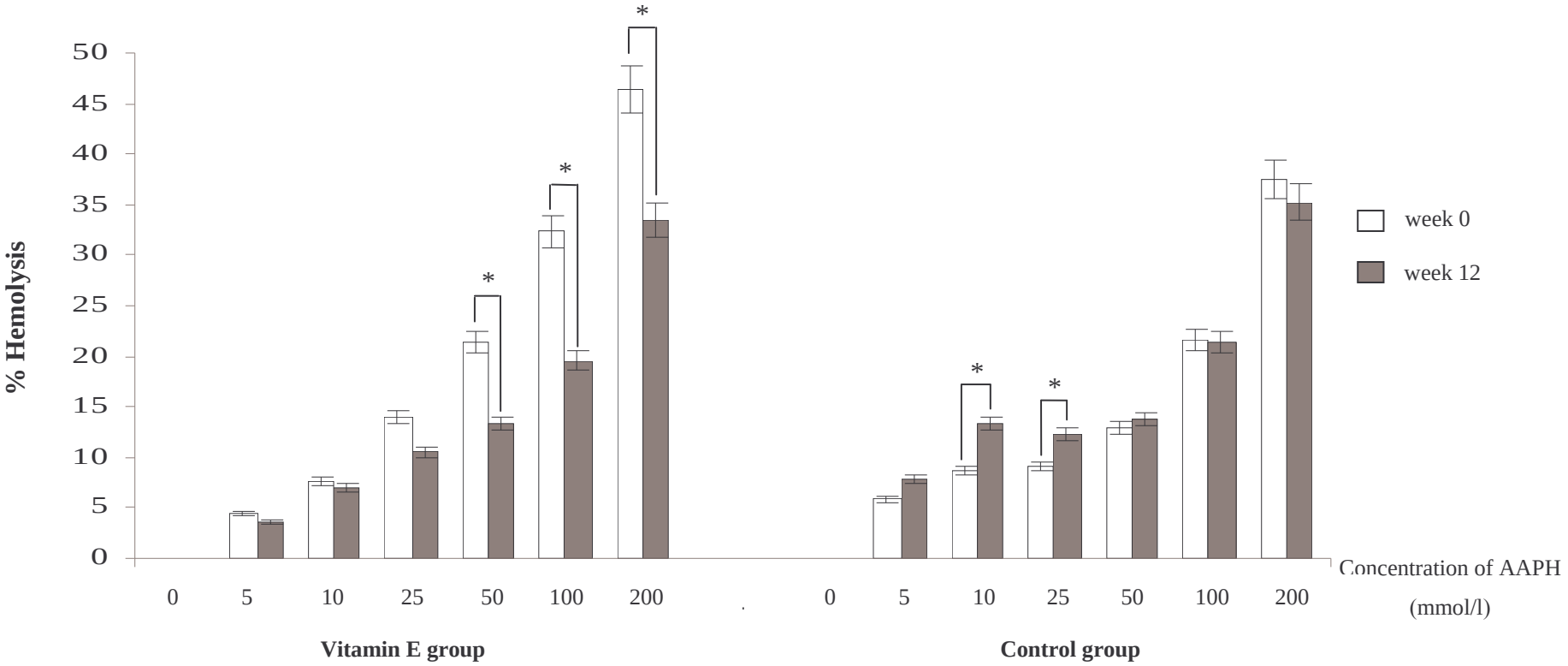


Figure 9 Percentage of hemolysis in thalassemic erythrocytes induced by AAPH

* Significant difference from baseline within group ($p < 0.05$)

compared to week 0 with 50 mM AAPH (p = 0.017), 100 mM AAPH (p = 0.001) and 200 mM. AAPH (p = 0.008) in the vitamin E group. However, the percentages of hemolysis in the control group at week 12 were significantly increased as compared to week 0 with 10 mM AAPH (p = 0.043) and 25 mM AAPH (p = 0.047).

4.7 Defense mechanism of vitamin E against ROS in RBC

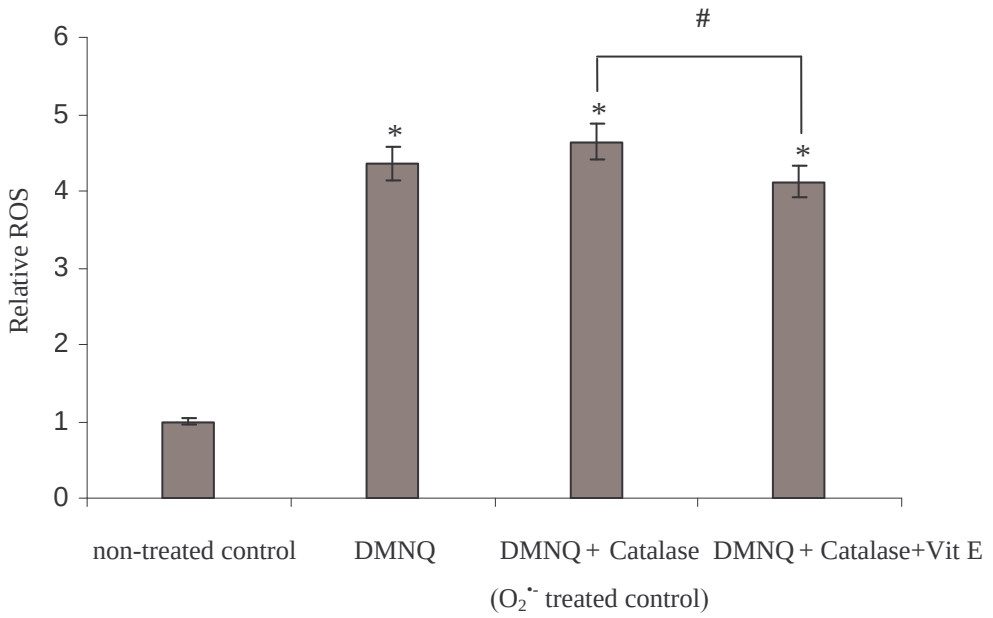
4.7.1 Analysis of radical scavenging activity of vitamin E against $O_2^{\bullet-}$

RBC was pre-treated with 200 µmol/l vitamin E and 1000 unit/ml catalase for 30 minutes, and the fluorescence probe DCFH-DA (20 µM) was added. Then, ROS generators, 10 µM DMNQ and 180 mM H_2O_2 were added to the pre-treated RBC and incubated for 2 hours. The result showed that DCF fluorescent intensity significantly increased in RBC treated with DMNQ and catalase when compared with non-treated control (p < 0.001) (Figure 10). The DCF fluorescent intensity after adding 200 µmol/l vitamin E was significantly decreased as compared to $O_2^{\bullet-}$ treated control (p = 0.032).

4.7.2 Analysis of radical scavenging activity of vitamin E against H_2O_2

RBC was pre-treated with 1 mmol/l desferoxamine (DFO) for 30 minutes followed by 180 mM H_2O_2 for 2 hours. The result showed that DCF fluorescent intensity significantly increased in RBC treated with DFO and and H_2O_2 when compared with non-treated control (p < 0.001) (Figure 11). The DCF fluorescent intensity after DFO exposure was significantly decreased in the presence of vitamin E (p = 0.023).

(A)



(B)

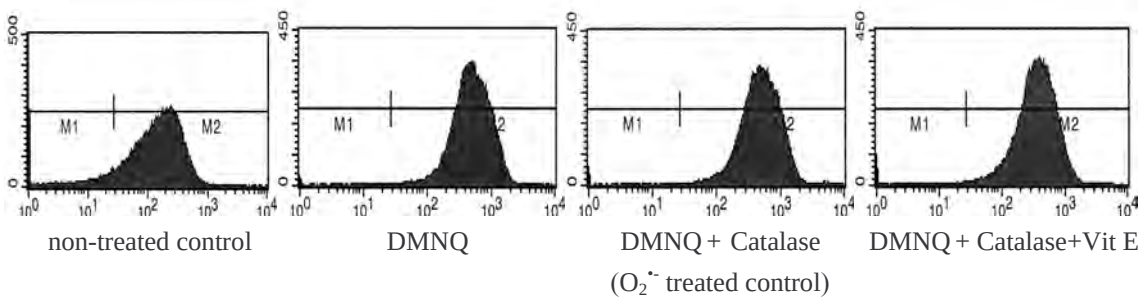
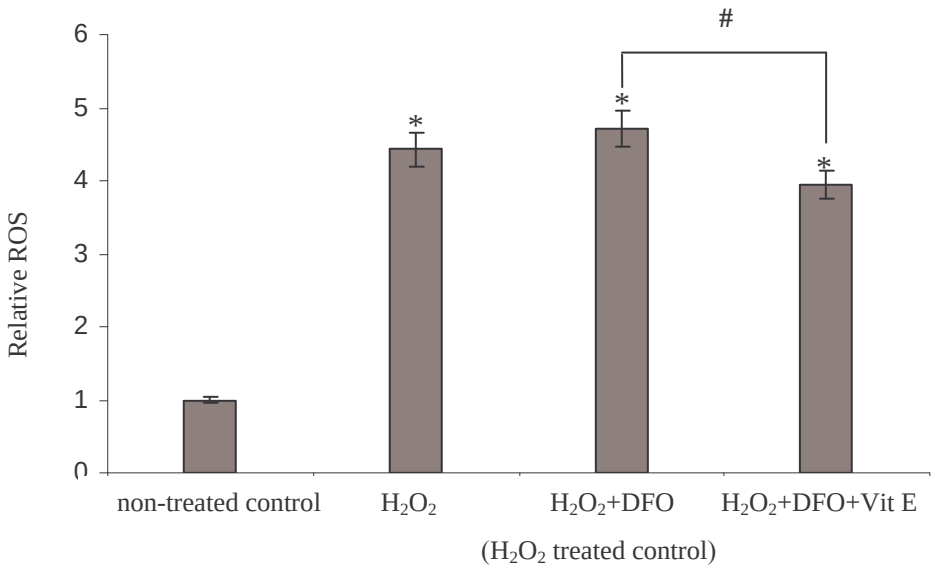


Figure 10 ROS scavenging activity of vitamin E against $O_2^{\bullet-}$ in RBC

RBC was pre-treated with 200 µmol/l vitamin E and 1000 unit/ml catalase for 30 min followed by 10 µmol/l DMNQ and 180 mM H_2O_2 at 37ºC for 2 hr. Controls was untreated RBC. RBC was examined using flow cytometry assay. (A) Bar graph, (B) Histogram chating the number of cells counted and the fluorescent intensity of DCFH-DA. Results are presented as mean ± SEM (n = 11).

* $p < 0.05$, compared to non-treated control; $^{\#}$ $p < 0.05$, compared to $O_2^{\bullet-}$ treated control

(A)



(B)

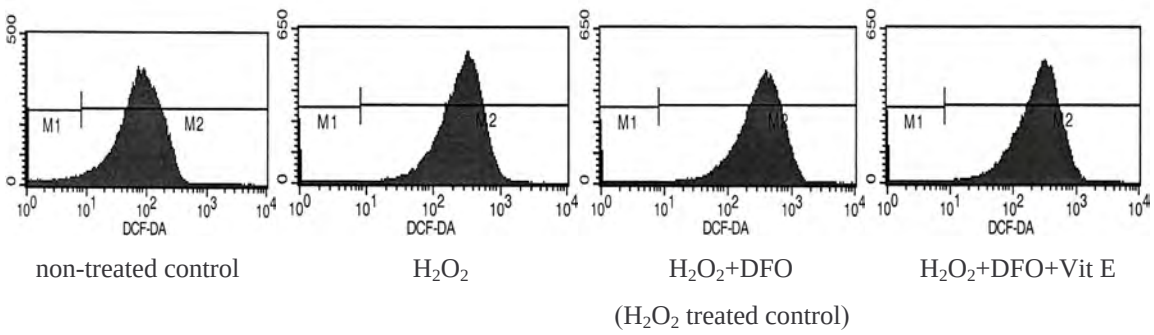


Figure 11 ROS scavenging activity of vitamin E against H_2O_2 in RBC

RBC was pre-treated with 200 µmol/l vitamin E and 1 mmol/l desferoxamine (DFO) for 30 min followed by 180 mM H_2O_2 at 37ºC for 2 hr. Controls were untreated RBC. RBC was examined using flow cytometry assay. (A) Bar graph, (B) Histogram chating the number of cells counted and the fluorescent intensity of DCFH-DA.Results are presented as mean ± SEM (n=11).

* $p < 0.05$, compared to non-treated control; # $p < 0.05$, compared to H_2O_2 treated control

4.7.3 Analysis of radical scavenging activity of vitamin E against $OH^{\bullet}$

RBC was pre-treated with 200 µmol/l vitamin E for 30 minutes followed by 50 mM AAPH for 2 hours. The result showed that DCF fluorescent intensity significantly increased in RBC treated with AAPH when compared with non-treated control ($p < 0.001$) (Figure 12). The DCF fluorescent intensity after AAPH exposure was significantly decreased in the presence of vitamin E ($p = 0.031$).

4.8 Compliance and adverse effects of vitamin E supplementation

In this study, two subjects had low compliance (consumed vitamin E less than 80%) and were dropped out from the study. The remaining subjects could complete the study without any problems. No adverse effect was found during the intervention period. Compliance of the treatment was evaluated by calculation the capsules of vitamin E supplement throughout the study. The average percentage of compliance was 88.89 ± 1.86.

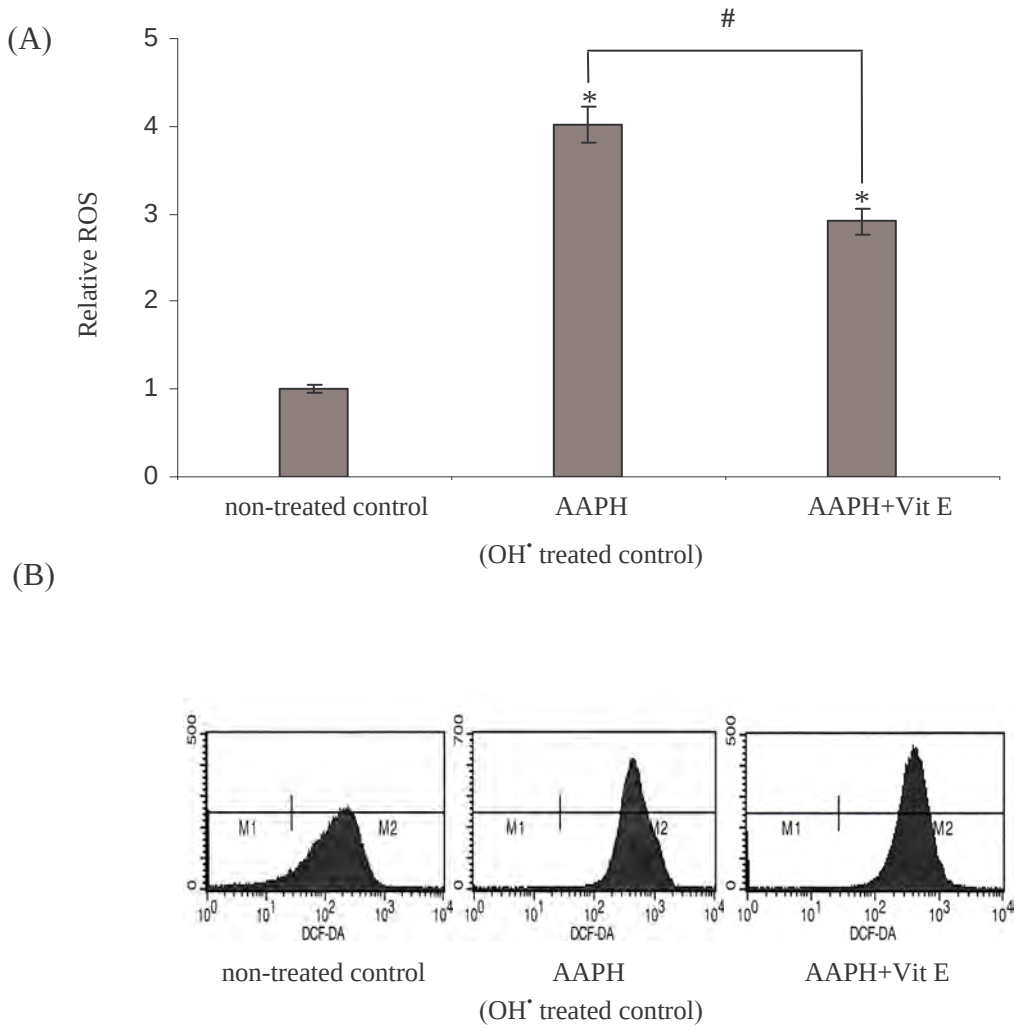


Figure 12 ROS scavenging activity of vitamin E against $OH^{\bullet}$ in RBC

RBC was pre-treated with 200 µmol/l vitamin E for 30 min followed by 50 mM AAPH at 37ºC for 2 hr. Controls were untreated RBC. RBC was examined using flow cytometry assay. (A) Bar graph, (B) Histogram chating the number of cells counted and the fluorescent intensity of DCFH-DA.Results are presented as mean ± SEM (n=11).

* $p < 0.05$, compared to non-treated control; $^{\#}$ $p < 0.05$, compared to $OH^{\bullet}$ treated control

CHAPTER V

DISCUSSION

The present study investigated the effects of vitamin E supplementation on anthropometry, CBC, serum vitamin E levels, lipid peroxidation, ROS production and hemolysis in patients with thalassemia intermedia, who were not required high transfusion at Pediatric Hematology Clinic, Siriraj Hospital. Furthermore, antioxidative mechanism of vitamin E in RBC was also observed in this study.

5.1 Energy Distribution and Nutrient Intakes

In this study, the amount of dietary intake prior to the study in thalassemia intermedia patients did not meet the Dietary Reference Intake for Thai (DRI). The results were similar to those found by Tanphaichitr et al. (1995) that children with thalassemia minor, intermedia and major had energy intake about 65% of amount recommended. Thalassemia patients are prone to malnutrition due to reduced nutrient absorption, increased nutrient losses, and increased nutrient turnover (Fung, 2010). These conditions lead the patients to have increased requirements for certain nutrients. However, Kooshki et al. (2010) found that energy and nutrient intake in thalassemia minor children were within the normal range. The different results could be because the severity of the disease in the patients in this study was higher than those in the study by Kooshki et al. (2010).

At week 12 of the study, the amount of dietary intake tended to increase in both groups. In the vitamin E group, the average amount of dietary intake achieved the range of DRI for Thai. The amount of carbohydrate consumption was significantly

increased in the vitamin E group after vitamin E supplementation. In this study, after vitamin E supplementation, although the percentage of energy from protein was significantly decreased, it was still in the recommended ranges. The decreased protein intake after vitamin E supplementation may be caused by increased proportion of carbohydrate intake, especially in children who like to eat snacks and sweets while the proportion of fat intake was constant.

5.2 Effect of vitamin E supplementation on anthropometric parameters

The results in the present study showed that the average values of weight, height and BMI-for-age in patients with thalassemia intermedia were within the normal ranges. Only 30% of subjects were underweight. It is known that thalassemia patients have problems of growth retardation, impaired immune function and reduced bone mineral acquisition (Fung, 2010). Previous study by Saxena (2003) found that thalassemia major patients had low rate of growth and BMI and had either delayed or absent pubertal spurt. Similarly, Karamifar, Shahriari, and Amirhakimi (2002) who studied the growth state in β-thalassemia patients found that 64% of the patients were below 2 standard deviation (SD) of the mean for normal height. Patients with β-thalassemia major, especially at the age of older than 10 years, are commonly underweight (Asadi-Pooya and Karamifar, 2004). However, most of the subjects in the present study appeared to have normal weight because they possibly were in less severe condition.

In the present study, the mean body weight was significantly increased after vitamin E supplementation for 12 weeks, but it showed no significantly difference from the control group. The results from this study agreed with previous study by Das et al. (2004) who investigated effect of vitamin E on the oxidative stress

status in transfusion-dependant thalassemia patients aged 4-16 years. They found that body weight of both Eβ- and β-thalassemic patients increased in the range of 3% to 20% after vitamin E treatment for 12 weeks.

5.3 Effect of vitamin E supplementation on hematological parameters

The hematological parameters in the present study included Hb, Hct, RBC, MCV, MCH, MCHC, RDW, MPV. The results of this study showed that there were no significant differences in hematological parameters at week 0 and week 12 in both groups. Vitamin E showed no effect on these parameters. Suthutvoravut et al. (1993) also indicated no significant change in Hct after 200 mg vitamin E supplementation for 4-8 weeks in thalassemia children. In addition, Dissayabutra et al. (2005) demonstrated that Hb did not change after 600 mg/d of vitamin E and 100 g/d of vitamin C supplementation for 3 months in thalassemia major. Similarly, Palasuwan et al. (2006) found that values for the Hb, Hct, MCV in hemoglobin E carriers were not changed after daily consumption of 200 IU vitamin E for 3 months. Pfeifer et al. (2008) showed that vitamin E treatment for 3 months in thalassemia intermedia patients did not modify levels of Hb and Hct. In contrast, Das et al. (2004) revealed that the Hb level in β-thalassemic patients was significantly improved (28.2% over untreated subjects) after 4 weeks of 10 mg/kg/d vitamin E treatment. Likewise, Tesoriere et al. (2000) found that the RBC count and Hct in thalassemia intermedia were increased after 600 mg/d vitamin E supplementation for 9 months. The results from this study indicated that vitamin E was not capable of reducing anemia in β-thalassemia intermidia. However, the findings still cannot be conclusive because the dose of vitamin E supplementation and the period of treatment among the studies were different.

5.4 Effect of vitamin E supplementation on serum vitamin E levels

This study showed that the levels of serum vitamin E at week 0 in thalassemia intermedia patients was lower than the normal range of healthy people (758–1952 µg/dL). This supported the results of the previous study by Kassab-Chekir et al. (2003) that vitamin E levels in serum of β-thalassemia patients decreased by 70%, compared to healthy children. Low level of vitamin E might be due to an excessive iron fraction that generated lipid peroxidation process resulting from oxidative stress (Nasr et al., 2002), and thus the body required higher amount of antioxidant to scavenge these generated radicals. The requirement of vitamin E was also increased for neutralization of free radicals on RBC membrane (Rachmilewitz et al., 1979). Vitamin E deficiency manifests as a shortened half-life of erythrocytes, which can progress to increased hemolysis.

This study showed that serum vitamin E was significantly increased after vitamin E supplementation for 12 weeks whereas no change in serum vitamin E was observed in the control group. The serum vitamin E levels after supplementation of vitamin E was within the normal range of healthy people (758–1952 µg/dl). The results were similar to those of previous studies. Rachmilewitz et al. (1979) found that the patients with β-thalassemia major supplemented with high dose of vitamin E (750-1000 IU/d) for 16 months showed a 4-fold increase in both serum and RBC vitamin E levels. Supplementation with 200 mg of vitamin E (200 IU/d) in thalassemia children who had vitamin E deficiency for 4-8 weeks showed increased plasma vitamin E levels to reach the normal ranges (Suthutvoravut et al., 1993). Tesoriere et al. (2000) also found that oral treatment with 600 mg/d vitamin E for 3 months tended to normalize serum vitamin E levels in β-thalassemia intermedia patients. Unchern et al. (2003) found that after supplementation of vitamin E (525 IU/d) for 32 months,

plasma α-tocopherol concentrations were significantly increased. In addition, Dissayabutra et al. (2005) found that after supplementation of vitamin C (100 g/d) and vitamin E (400-600 mg/d), plasma vitamin C and vitamin E levels were significantly increased even though they were still lower than the levels in normal population. Thus, vitamin E supplementation could increase serum vitamin E levels and this may help reduce the progression and complications of disease.

5.5 Effect of vitamin E supplementation on lipid peroxidation

Lipid peroxidation of erythrocytes is manifested by MDA production, which caused cross-linking of membrane components, leading to increased RBC membrane rigidity and decrease RBC deformability (Mahjoub et al., 2007). Lipid peroxidation of cell membrane induced by cellular oxidative stress has been shown to be a key event in damage of RBC in thalassemia patients (Kassab-Chekir et al., 2003). Several studies demonstrated that the MDA levels were significantly increased in thalassemia patients (Cappelliai et al., 2000; Chakraborty and Bhattacharyya, 2001; Kassab-Chekir et al., 2003; Unchern et al., 2003; Simsek et al., 2005; Widad, Al-Naama, and Hassan, 2006; Ghone et al., 2008). This study was thus investigated the preventing property of 12-week vitamin E supplementation on RBC lipid peroxidation.

The present study found that supplementation of 10 IU/kg/d of vitamin E in thalassemia patients for 12 weeks produced significant decrease in MDA levels. The result was consistent with previous study by Das et al. (2004) who found that treatment of the thalassemia major patients with vitamin E (10 IU/kg/d) for a period of 4 weeks remarkably reduced the level of lipid preoxidation in erythrocyte membranes. Mahjoub et al. (2007) also found that lipid peroxidation rate was

significantly reduced after treatment with 550 mg/d of vitamin E for 4 weeks. Likewise, Pfeifer et al. (2008) revealed that supplementation of 400 IU of vitamin E daily for 3 months in β-thalassemia intermedia patients presented a significant reduction in serum TBARs levels. Palasuwan et al. (2006) suggested that consumption of vitamin E could help reduce the rate of cell-wall-lipid peroxidation. However, vitamin E supplementation may not always affect lipid peroxidation. George et al. (1993) evaluated the effect of vitamin E supplementation in Hb H disease, and they found no change in MDA levels after supplementation with vitamin E in the amount of 400 IU/day for 2 months. The different results may be explained by the different duration and dose of vitamin E supplementation and severity of the diseases. The present study indicated that 12 weeks of vitamin E supplemention at the dose of 10 IU/kg/d was efficient in reducing MDA levels, and thereby protecting lipids from peroxidation by free radicals in thalassemia intermedia patients.

5.6 Effect of vitamin E supplementation on ROS production in RBC

ROS play important roles in a variety of normal biochemical functions and abnormal pathological processes. ROS contribute to the pathogenesis of several hereditary disorders of RBC, including thalassaemia (Amer et al., 2003). Previous study (Galanello and Origa, 2010) have demonstrated that excess hemoglobin chains and consequent release heme, enhanced by an iron overload due to ineffective erythropoiesis and RBC transfusion cause excessive levels of labile plasma iron, which penetrates into the cells leading to generate ROS in erythrocytes. High ROS are associated with severe thalassemia (Rachmilewitz et al., 2005; Ghone et al., 2008). It is widely accepted that supplementation of antioxidant agents in combination with conventional therapy would be beneficial to the reduce complication in thalassemia

patients (Rund and Rachmilewitz, 2000). This study showed that supplementation of vitamin E 10 IU/kg/d in patients with thalassemia intermedia for 12 weeks tended to suppressed ROS generation in RBC in response to H_2O_2 and AAPH. In contrast, ROS levels were up-regulated after treatment with H_2O_2 and AAPH in the control group. The result was consistent with previous study by Pfeifer et al. (2008) who found that after vitamin E administration (400 IU/d) for 3 months erythrocytic ROS were significantly reduced.

The present study found that vitamin E supplementation in patients with thalassemia intermedia for 12 weeks sustained RBC in response to oxidative stress while the results in the control group showed significantly increased sensitivity in response to H_2O_2 induced oxidative stress after 12 weeks of the study. This indicated that RBC tolerance to oxidative stress was reduced. At week 12 of the study, maximum ROS generation in the control group occurred at 10 mM H_2O_2 while in the vitamin E group, the maximum ROS generation occurred at 180 mM H_2O_2. The results demonstrated that vitamin E may delay the progression of thalassemia. These finding suggested that vitamin E treatment played a role in maintaining susceptibility of RBC in response to oxidative stress and enhancing antioxidant property in the body against oxidative stress, and may further prevent the decay of antioxidant property in RBC due to the progression of thalassemia.

5.7 Effect of vitamin E supplementation on hemolysis

The depletion of antioxidant status and the increase of oxidative marker (TBARs) create conditions of ROS in thalassemia patients, and consequent formation of hemichromes leads to hemolysis of RBC (Kassab-Chekir et al., 2003; Sugawara et

al., 2003). Lipid peroxidation as well as increase of cellular hydroxyl and related radicals have been long shown to induce hemolysis (Brownlee et al., 1977).

In this study, the percentages of hemolysis were significantly decreased when RBC were treated with 50, 100, 200 mM AAPH after vitamin E supplementation for 12 weeks. This result further supported the benefit of vitamin E supplementation that not only vitamin E was found to prolong RBC survival in the thalassemia major patients (42.8%) after administration of vitamin E (750 to 1000 IU/d) for 12 months (Rachmilewitze et al., 1979), but also prevented hemolysis caused by oxidative stress induced by AAPH radical in thalassemia intermedia patients. In addition, Suthutvoravut et al. (1993) found that patients with hemoglobin H disease had less degree of hemolysis after oral vitamin E supplementation in the daily dose of 6-14 mg/kg. In other hemolysis model using osmotic pressure, Palasuwan et al. (2006) evaluated the osmotic fragility of RBC in hemoglobin E carrier and found that the osmotic fragility of RBC significantly increased after vitamin E supplementation. The data revealed that the percentage of lysis of thalassemic red cells was approaching that of normal cells after 3-month administration of 200 IU of vitamin E. Vitamin E levels also showed positive correlation to red cell survival (George et al., 1993). These results indicated protective effect of vitamin E against oxidative damage to the RBC membrane and therefore prolonging RBC lifespan.

5.8 Defense mechanism of vitamin E against ROS in RBC

In physiology and pathology, ROS namely $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 and $OH^{\bullet}$ have garnered the most attention and have been recognized as a main types of ROS playing a role in variety of cellular behaviors. In normal physiologic condition, $O_2^{\bullet-}$ is

believed to first form during the process of mitochondrial electron transport chain. Then, $O_2^{\bullet-}$ will be detoxified by SOD to H_2O_2 (Vianello and Macri, 1991). The H_2O_2 can be converted to water by catalytic activity of catalase or gluthathione peroxidase (Weydert and Cullen, 2010); however, in the presence of reduced transition metals, this ROS will be transformed to highly toxic $OH^{\bullet}$ (Anipsitakis and Dionysiou, 2004).

In order to clarify underlying mechanism of vitamin E in the protection of RBC against oxidative stress, the specific ROS generation experiments using specific ROS modulators namely catalase, DMNQ, H_2O_2, AAPH were performed. In the first set of experiments, the effect of vitamin E in α-tocopherol form on $O_2^{\bullet-}$, generated by DMNQ (10 µM) together with 1000 U/ml catalase, was investigated. Pretreatment with α-tocopherol (200 µM) was able to inhibit ROS-inducing effect of ROS generator. This was similar to the previous studies (Lass and Sohal, 2000; Durant et al., 2004) that suggested that the protective mechanisms of α-tocopherol involved its ability to reduce $O_2^{\bullet-}$ levels and might constitute an important mechanism of protective action of α-tocopherol in RBC. Csallany and Ha (1992) found that α-tocopherol could react with $O_2^{\bullet-}$ generated by the electrochemical reduction of molecular oxygen. Likewise, Devaraj and Jialal (2000) found that α-tocopherol supplementation (1,200 IU/d) for 3 months resulted in a significant reduction in $O_2^{\bullet-}$ release in patient with type 2 diabetic with and without macrovascular complication.

The effect of vitamin E in α-tocopherol form on H_2O_2-induced oxidative stress was investigated. DFO was used to inhibit $OH^{\bullet}$ production via the Fenton reaction. ROS production significantly decreased after α-tocopherol treatment. The result suggested that vitamin E had scavenging effect against H_2O_2 in RBC. In contrast, Osakada et al. (2003) found that co-application of α-tocopherol (0.1-100 µM) with H_2O_2 for 24 h did not prevent H_2O_2-induced cytotoxicity.

Yamaguchi et al. (2000) found that α-tocopherol had little effect on H_2O_2. Importantly, this study reported herein for the first time that vitamin E may attenuate H_2O_2-mediated damages since the results indicated that vitamin E could reduce ROS formation in H_2O_2-treated erythrocytes.

Hydroxyl radical is a highly ROS and can readily attack biomolecules such as DNA, proteins, amino acids and lipids, leading to diseases (Yu et al., 2001). The effect of α-tocopherol on $OH^{\bullet}$ generated by AAPH was examined. AAPH is a water soluble free radical generator that was used to imitate the *in vivo* condition of oxidative stress (Lakshmi et al., 2005). When pretreated with α-tocopherol (200 μM), ROS production in RBC progressively decreased, compared with $OH^{\bullet}$ treated control. α-tocopherol showed protection on erythrocytes against $OH^{\bullet}$-induced oxidative stress. The result suggested that vitamin E had a scavenging effect against $OH^{\bullet}$ in RBC. The result supported the finding of Yu et al. (2001) that α-tocopherol was an excellent $OH^{\bullet}$ scavenger. This study showed that vitamin E in the form of α-tocopherol could inhibit ROS production including $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 and $OH^{\bullet}$ in erythrocytes of patients with thalassemia intermedia.

CHAPTER VI

CONCLUSION

This study investigated the effects of vitamin E supplementation on anthropometric parameters, CBC, serum vitamin E levels, lipid peroxidation, ROS production in RBC, hemolysis, and oxidative mechanism of vitamin E in RBC of patients with thalassemia intermedia who were not aquired high transfusion at Siriraj Hospital. There were 17 participants (8 males and 9 females) enrolled in this study. At baseline (week 0) the measured parameters in both groups were not significantly different. After supplementation of 10 IU/kg/d vitamin E for 12 weeks, the mean body weight and serum vitamin E were significantly increased in the vitamin E group. However, there were no significant changes in hematological parameters after vitamin E supplementation. After 12 weeks of vitamin E supplementation, significant reduction in lipid peroxidation and hemolysis were observed. ROS production tended to decrease after vitamin E supplementation. No adverse effect was found during the intervention period.

In conclusion, the present study provided solid information regarding activity of vitamin E in attenuated ROS stress in RBC. Vitamin E supplementation for 12-week period was sufficient to reduced lipid peroxidation, and subsequently suppressed hemolysis. Furthermore, the finding indicated the possible underlying mechanism that vitamin E could suppress $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 and $OH^{\bullet}$ in RBC. Together, these finding positively support the benefit of using vitamin E supplementation in patients with thalassemia.

Recommendations for further study

1. The sample size should be increased, and multicenter study should be conducted to increase the number of thalassemia intermedia patients.
2. The future research should extend the time of the study to confirm the present findings.
3. The control group may be supplemented with placebo to reduce bias of the study.

References

Aessopos, A., et al., 2005. Thalassemia Heart Disease: A comparative evaluation of thalassemia major and thalassemia intermedia. Chest 127:1523-1530.

Ahmad, S. 1995. Antioxidant mechanisms of secondary natural products. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology, pp.229-231. New York: International Thomson Publishing.

Al-Omar, M.A., Beedham, C., and Alsarra, I.A. 2004. Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. Saudi Pharm J 12:1-18.

Amer, J., Goldfarb, A., and Fibach, E. 2003. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. Eur J Haematol 70:84-90.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K, and Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci 90:7915-7922.

Anipsitakis, G.P., and Dionysiou, D.D. 2004. Radical generation by the interaction of transition metals with common oxidants. Environ Sci Technol 38(13):3705-3712.

Asadi-pooya, A.A., and Karamifar, H. 2004. Body mass index in children with beta-thalassemia major. Turk J Haematol 21(4):177-180.

Bagchi, D., et al. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology 148:187-197.

Bandt, M.D., Grossin, M., Driss, F., Pincemail, J., Babin-Chevaye, C., and Pasquier, C. 2002. Vitamin E uncouples joint destruction and clinical inflammation in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 46(2):522-532.

Basu, T.K., and Dickerson, J.W.T. 1996. Vitamin E. Vitamins in human health and disease, pp.214-227. United Kingdom: Biddles Ltd.

Brownlee, N.R., Huttner, J.J., Panganamala, R.V., and Cornwell, D.G. 1977. Role of vitamin E in glutathione-induced oxidant stress: methemoglobin, lipid peroxidation, and hemolysis. J Lipid Res 18:635-644.

Camaschella, C., and Cappellini, M.D. 1995. Thalassemia intermedia. Haematologica 80:58-68.

Cappellini, M.D., Tavazzi, D., Duca, L., Marelli, S., and Fiorelli, G. 2000. Non-transferrin bound iron, iron-related oxidative stress and lipid peroxidation in β–thalassemia intermedia. Transfus Sci 23:245-246.

Chakraborty, D., and Bhattacharyya, M. 2001. Antioxidant defense status of red blood cells of patients with β-thalassemia and Eβ-thalassemia. Clin Chim Acta 305:123-129.

Chamulitrat, W., and Mason, R.P. 1989. Lipid peroxyl radical intermediates in the peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase. Direct electron spin resonance investigations. J Biol Chem 264:20968-20973.

Cimen, M.Y.B. 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. Chinica Chimica Acta 390:1-11.

Combs, G.F. 2008. Vitamin E. The vitamins fundamental aspects in nutrition and health.2nd ed. pp.182-210. New York: International Thomson Publishing.

Corash, L., et al. 1980. Reduced chronic hemolysis during high-dose vitamin E administration in mediterranean-type glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. N Engl J Med 303:416-420.

Csallany, A.S., and Ha, Y.L. 1992. α-Tocopherol oxidation mediated by superoxide anion. Reactions in aprotic and protic conditions. Lipids 27:195-205.

Das, N., Chowdhury, T.D., Chattopadhyay, A., and Datta, A.G. 2004. Attenuation of oxidative stress-induced changes in thalassemic erythrocytes by vitamin E. Pol J Pharmacol Pharm 56:85-96.

Devaraj, S., and Jialal, I. 2000. Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications. Circulation 102:191-196.

Devaraj, S., et al. 2007. Effect of high dose α-tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease. Am J Clin Nutr 86:1392-1398.

Dhamcharee, V., Romyanan, O., and Ninlagarn, T. 2001. Genetic counseling for thalassemia in thailand: problems and solutions. Southeast Asian J Trop Med Public Health 32(2):413-418.

Dhawan, V., Kumar, K.R., Marwaha, R.K., and Ganguly, N.K. 2005. Antioxidant status in children with homozygous β-thalassemia. Indian Pediatr 42:1141-1145.

Dissayabutra, T., Tosukhowong, T., and Seksan, P. 2005. The benefits of vitamin C and vitamin E in children with β-thalassemia with high oxidative stress. J Med Assoc Thai 88(4):s317-320.

Durant, R., et al. 2004. Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin E and simvastatin. Shock 22(1):34-39.

Eitenmiller, R.R., and Landen, W.O. 1999. Vitamin E: tocopherols and tocotrienols. Vitamin analysis for the health and food sciences, pp.109-148. New York: International Thomson Publishing.

Fraga, C.G., and Oteiza, P.I. 2002. Iron toxicity and antioxidant nutrients. Toxicology 180(1):23-32.

Fung, E.B. 2010. Nutritional deficiencies in patients with thalassemia. Ann NY Acad Sci 1202:188-196.

Galanello, R., and Origa, R. 2010. Beta-thalassemia. OJRD 5(11):1-15.

Gallagher, M.L. 2008. The nutrients and their metabolism. In L.K. Mahan; S. Escott-Stump (eds), Krause's food & nutrition therapy. 12th ed. pp.78-80. Canada: Saunders Publication.

George, E., Wong, H.B., Jamaluddin, M., and Huisman, T.H.J. 1993. Peripheral haemolysis, lipid peroxidation, iron status, and vitamin E in haemoglobin H syndromes in west Malaysia. Singapore Med J 34:241-244.

Ghone, R.A. Kumbar, K.M., Suryakar, A.N., Katkam, R.V., and Joshi, N.J. 2008. Oxidative stress and disturbance in antioxidant balance in beta thalassemia major. Indian J Clin Biochem 23(4):337-340.

Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. 1988. The deoxyribose assay: an assay both for free hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. Biochem J 253:932-933.

Jones, H. 1983. Thalassemia. Lecture notes on haematology, pp.59-63. New York: Blackwell Scientific Publication.

Jordan, I., and Kaplan, J. 1994. The mammalian transferrin-independent iron transport system may involve a surface ferrireductase activity. Biochem J 302:875-879.

Karamifar, H., Shahriari, M., and Amirhakimi, G.H. 2002. Linear growth deficiency in β-thalassemia patients. IJMS 27(2):47-50.

Kassab-Chekir, A., et al. 2003. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. Clin Chim Acta 338:79-86.

Kneki, P., et al. 1991. Vitamin E and cancer. Am J Clin Nutr 53:283-286.

Kooshki, A., Towfighian, T., Rahsepar, F.R., and Akaberi, A. 2010. The relationship between the antioxidants intake and blood indices of the children with thalassemia in Sabzevar and Mashhad. Pakistan J Nutr 9(7):716-719.

Lakshmi, B., Tilak, J.C., Adhikari, S., Devasagayam, T.P.A., and Janardhanan, K.K. 2005. Inhibition of lipid peroxidation induced by γ-radiation and AAPH in rat liver and brain mitochondria by mushrooms. Curr. Sci. 88(3):484-488.

Lass, A., and Sohal, R.S. 2000. Effect of coenzyme Q10 and α-tocopherol content of mitochondria on the production of superoxide anion radicals. FASEB 14:87-94.

Lo, S.S., Frank, D., and Hitzig, W.H. 1973. Vitamin E and haemolytic anaemia in premature infants. Arch Dis Child 48(5):360–365.

Mahjoub, S., Tamaddoni, A., Nikoo, M.Z., and Moghadamnia, A.A. 2007. The effects of beta-carotene and vitamin E on erythrocytes lipid peroxidation in beta-thalassemia patients. JRMS 12(6):301-307.

Moyano, D., et al. 1997. Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. Clin Chim Acta 263:147-155.

Muncie, HL. Jr., and Campbell, J. 2009. Alpha and beta thalassemia. Am Fam Physician 80(4):339-344.

Nasr, M.R., Ali, S., Shaker, M., and Elgabry, E. 2002. Antioxidant micronutrients in children with thalassaemia in Egypt. East Mediterr Health J 8(4-5):490-495.

Neuzil, J., Weber, C., and Kontush, A. 2001. The role of vitamin E in atherogenesis: linking the chemical, biological and clinical aspects of the disease. Atherosclerosis 157(2):257-283.

Nordberg, J., and Arner, E.S.J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 31(11):1287-1312.

Osakada, F., Hashinoa, A., Kumea, T., Katsukia, H., Kanekob, S., and Akaikea, A. 2003. Neuroprotective effects of α-tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. Eur J Pharmacol 465:15– 22.

Palasuwan, A., Soogarun, S., Wiwanitkit, V., Luechapudiporn, R., Pradniwat, P., and Lertlum, T. 2006. Preliminary study of the effect of vitamin E supplementation on the antioxidant status of hemoglobin-E carriers. South Asian J Med Public Health 37 (3):184-189.

Pfeifer, W.P., Degasperi, G.R., Almeida, M.T., Vercesi, A.E., Costa, F.F., and Saad, S.T.O. 2008. Vitamin E supplementation reduces oxidative stress in beta thalassemia intermedia. Acta Haematol 120:225-231.

Phuapradit, W., Panburana, P., Jaovisidha, A., Chanrachakul, B., Bunyaratvej, A., and Puchiwatananon, O. 1999. Serum vitamin A and E in preganant women with hemoglobinopathies. J Obstet Gynaecol Res 25:173-176.

Rachmilewitz, E., Shifter, A., and Kahane, I. 1979. Vitamin E deficiency in β-thalassemia major: Changes in hematological and biochemical parameters after a therapeutic trail with α-tocopherol. AJCN 32:1850-1858.

Rachmilewitz, E., et al. 2005. Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia. Ann NY Acad Sci 1054:118–123.

Rucker, R.B., Suttie, J.W., McCormick, D.B., and Machlin, L.J. 2001. Vitamin E. Handbook of Vitamins, pp.165-197. New York: Marcel Dekker, Inc.

Rund, D., and Rachmilewitz, E. 2000. New trends in the treatment of β-thalassemia. Crit Rev Oncol Hematol 33:105-118.

Saldeen, K., and Saldeen, T. 2005. Importance of tocopherols beyond α-tocopherol: evidence from animal and human studies. Nutr Res 25:877-889.

Sano, M., et al. 1997. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for alzheimer's disease. N Engl J Med 336:1216-1222.

Saxena, A. 2003. Growth retardation in thalassemia major patients. Int J Hum Genet 3(4):237-246.

Scott, M.D., Repdka, T., Rouyer-Fessard, P., Beuzard, Y., and Lubin, B.H. 1993. Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. J Clin Invest 91:1706-1712.

Shimazu, T., et al. 2001. Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane on neutrophil superoxide anion radical production. Kidney Int 78:137-143.

Simsek, F., Ozturk, G., Kemahli, S., Erbas, D., and Hasanoglu, A. 2005. Oxidant and antioxidant status in beta thalassemia major patients. AU Tip Fakultesi 58:34-38.

Sizer, F., and Whitney, E. 2008. Essential nutrient. Nutrition concepts and controversies. 10th ed. pp. 124-136. New York: Lachina Publishing Services, Inc.

Skyrme-Jones, R.A.P., Brien, R.C.O., Berry, K.L., and Meredith, I.T. 2000. Vitamin E supplementation improves endothelial function in type I diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. J Am Coll Cardiol 36:94-102.

Sugawara, Y., et al. 2003. Hemichrome formation observed in human haemoglobin A under various buffer conditions. Acta Physiol Scand 179:49-59.

Suthutvoravut, U., Sirichakwal, P., Tassaneeyakul, A., Hathirat, P., Sasanakul, W., and Feungpean, B. 1993. Vitamin E status, glutathione peroxidase activity and the effect of vitamin E supplementaation in children with thalassemia. J Med Assoc Thai 76(2):146-152.

Taher, A.T., Musallam, K.M., and Cappellini, M.D. 2009. Thalassaemia intermedia. Medit J Hemat Infect Dis 1(1):1-10.

Tanphaichitr, V.S., Visuthi, B., and Tanphaichitr, V. 1995. Causes of inadequate protein-energy status in thalassemic children. Asia Pacific J Clin Nutr 4:133-135.

Tesoriere, L., et al. .2000. Oral supplements of vitamin E improve measures of oxidative stress in plasma and reduce oxidative damage to LDL and erythrocytes in β-thalassemia intermedia patients. Free Radic Res 34(5):529-540.

Tucker, J.M., and Townsend, D.M. 2005. Alpha-tocopherol: role in prevention and therapy of human disease. Biomed Pharmacother 59:380-387.

Unchern, S., et al. 2003. The effects of vitamin E on platelet activity in β-thalassemia patients. Br J Haematol 123:738-744.

Valgimigli, M., et al. 2004. Hydroxyl radical generation, levels of tumor necrosis factor-alpha, and progression to heart failure after acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 43:2000-2008.

Vianello, A.,and Macri, F. 1991. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at the surface of plant cells. J Bioenerg Biomembr 23(3):409-423.

Weydert, C.J., and Cullen, J.J. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. Nature Protocols 5:51-66.

Widad, N.M., Al-Naama, L.M., and Hassan, M.K. 2006. Lipid peroxidation in beta-thalassaemia. Haema 9(3):374-379.

Wlodek, L., and Kusior, D. 2006. Oxidative hemolysis of erythrocytes. BAMBED 34(6):438-443.

Yamaguchi, F., Saito, M., Ariga, T., Yoshimura, Y., and Nakazawa, H. 2000. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. J Agric Food Chem 48:2320-2325.

Yu, W., et al. 2001. Antioxidant activity of natural vitamin E extracted from soybean sludge as assessed by chemiluminescence. J Sci Food Agric 82:230-233.

Appendices

Appendix A

Approval of Certificate from Ethics Committee
for Researches Involving Human Subjects,
Siriraj Hospital

2 PRANNOK Rd. BANGKOKNOI
BANGKOK 10700

Tel. (662) 4196405-6
FAX (662) 4196405

MAHIDOL UNIVERSITY
Since 1888

Siriraj Institutional Review Board

Certificate of Approval

COA no.Si 119/2010

Protocol Title : EFFECTS OF VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON OXIDATIVE STRESS IN RED BLOOD CELL OF PATIENTS WITH THALASSEMIA INTERMEDIA AT SIRIRAJ HOSPITAL

Protocol number : 013/2553(EC4)

Principal Investigator/Affiliation : Miss Duangkamon Ngarmpattarangkoon
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

Research site : Faculty of Medicine Siriraj Hospital

Approval includes :

1. SIRB Submission Form
2. Participant Information Sheet
3. Informed Consent Form
4. Participant Information Sheet and Informed Consent Form (for child)
5. Questionnaire
6. Case Record Form
7. Guideline for Participant
8. Principle Investigator's curriculum vitae

Approval date : February 24, 2010

Expired date : February 23, 2011

This is to certify that Siriraj Institutional Review Board is in full Compliance with International Guidelines For Human Research Protection such as the Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines and the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP).

.....

(Prof. Jariya Lertakyamanee, M.D.)
Chairperson

March 2, 2010
date

.....

(Clin. Prof. Teerawat Kulthanan, M.D.)
Dean of Faculty of Medicine Siriraj Hospital

Macrh 5,2010
date

หน่วยพิมพ์โรงพยาบาลศิริราช 2341 / 3,000 แผ่น / ก.ย 51 / Mat. 10023252

Appendix B

- Questionnaire
- A 3-day food record

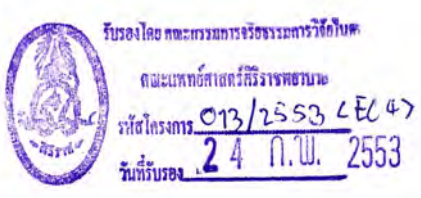
เลขที่บันทึก/แบบสอบถาม.....
วันที่บันทึก.....

โครงการวิจัยเรื่อง“ผลของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง ณ โรงพยาบาลศิริราช”

ข้อมูลส่วนตัวของผู้ป่วย

ชื่อ – สกุล..... HN.....
เพศ ☐หญิง ☐ชาย อายุ.....ปี น้ำหนัก.....กิโลกรัม ส่วนสูง.....เซนติเมตร
อยู่บ้านเลขที่ ..... ซอย ..... ถนน ..... แขวง/ ตำบล .....
เขต/ อำเภอ ..... จังหวัด ..... รหัสไปรษณีย์ .....
เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้.....
ผู้ที่สามารถติดต่อได้เมื่อมีเหตุฉุกเฉิน……เกี่ยวข้องเป็น…….....
เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้.....

หมายเหตุ: ส่วนนี้แยกเก็บจากส่วนอื่นๆ



(ส่วนที่ 1)

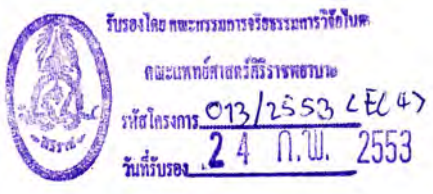
เลขที่บันทึก/แบบสอบถาม.....

วันที่บันทึก.....

สำหรับผู้วิจัย

แบบสอบถามข้อมูลทั่วไป

1. เพศ ☐ 1. ชาย ☐ 2. หญิง ☐☐
2. อายุ ☐☐
   ☐ 1. 5 -10 ปี ☐ 2. 11 – 15 ปี ☐ 3. 16 – 20 ปี
3. นับถือศาสนา ☐☐
   ☐ 1. พุทธ ☐ 2. คริสต์ ☐ 3. อิสลาม ☐ 4. อื่น ๆ (ระบุ).....
4. ปัจจุบันอาศัยอยู่กับ ☐☐
   ☐ 1. บิดา/ มารดา ☐ 2. ญาติ/ ผู้ปกครอง
   ☐ 3. หอพัก/ บ้านเช่า ☐ 4. อื่น ๆ(ระบุ).....
5. ระดับการศึกษาของบิดา ☐☐
   ☐ 1. ไม่ได้เรียนหนังสือ ☐ 2. ประถมศึกษา
   ☐ 3. มัธยมศึกษา ☐ 4. ปวช./ ปวส./ อนุปริญญา
   ☐ 5. ปริญญาตรี/ สูงกว่าปริญญาตรี
6. ระดับการศึกษาของมารดา ☐☐
   ☐ 1. ไม่ได้เรียนหนังสือ ☐ 2. ประถมศึกษา
   ☐ 3. มัธยมศึกษา ☐ 4. ปวช./ ปวส./ อนุปริญญา
   ☐ 5. ปริญญาตรี/ สูงกว่าปริญญาตรี
7. อาชีพของบิดา ☐☐
   ☐ 1. ไม่ได้ประกอบอาชีพ ☐ 2. รับราชการ
   ☐ 3. พนักงานรัฐวิสาหกิจ ☐ 4. ค้าขาย/ธุรกิจส่วนตัว
   ☐ 5. อื่นๆ โปรดระบุ.....
8. อาชีพของมารดา ☐☐
   ☐ 1. ไม่ได้ประกอบอาชีพ ☐ 2. รับราชการ
   ☐ 3. พนักงานรัฐวิสาหกิจ ☐ 4. ค้าขาย/ธุรกิจส่วนตัว
   ☐ 5. อื่นๆ โปรดระบุ.....
9. รายได้เฉลี่ยของครอบครัว ☐☐
   ☐ 1. ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5,000 บาท ☐ 2. 5,001 – 10,000 บาท
   ☐ 3. 10,001 – 20,000 บาท ☐ 4. 20,001 – 30,000 บาท
   ☐ 5. มากกว่า 30,000 บาท



สำหรับผู้วิจัย

10. สิทธิการรักษา ☐☐

☐ 1. ชำระเงินเอง ☐ 2. เบิกต้นสังกัด/ โครงการเบิกจ่ายตรง

☐ 3. ประกันสังคม ☐ 4. โครงการหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้า

☐ 5. อื่นๆ โปรดระบุ.....

11. ท่านเคยได้รับความรู้เกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียหรือไม่ ☐☐

☐ 1.เคย ☐ 2. ไม่เคย

12. ท่านเคยได้รับความรู้เกี่ยวกับคำแนะนำทางโภชนาการหรือไม่ ☐☐

☐ 1. เคย ☐ 2. ไม่เคย

13. ท่านรับประทานยา อาหารเสริม หรือวิตามินอะไรเป็นประจำหรือไม่ ☐☐

☐ 1. ไม่มี ☐ 2. มี (ระบุ).....

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC 4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

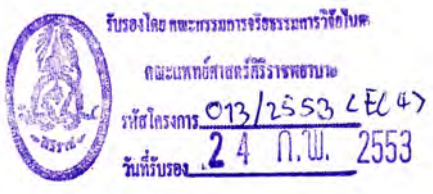
(ส่วนที่ 2) เลขที่บันทึก/แบบสอบถาม.....

วันที่บันทึก.....

แบบบันทึกประวัติผู้ป่วย

1. ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคธาลัสซีเมียเป็นระยะเวลา.....ปี
2. ประวัติการแพ้ยา ☐ไม่มี ☐มี.....อาการ.....
3. ประวัติการแพ้อาหาร ☐ไม่มี ☐มี.....อาการ.....
4. ประวัติการเจ็บป่วยหรือการผ่าตัด.....
5. โรคประจำตัวอื่นๆ.....
6. อาการเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นเป็นประจำ.....
7. ประวัติการรักษาโรคธาลัสซีเมีย (เก็บข้อมูลย้อนหลัง 3 ครั้งก่อนการวิจัยและระหว่างการวิจัย)

วัน เดือน ปี	ยาและขนาดยาที่ได้รับ	หมายเหตุ
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....



8. ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ข้อมูล	ช่วงก่อนการวิจัย			สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 12
วันนัดตรวจ (วัน/เดือน/ปี)					
RBC ($x10^6$/ul)					
Hb (g/dl)					
Hct (%)					
MCV (fl)					
MCH (pg)					
MCHC (g/dl)					
WBC (10^3/ul)					
Platelet ($x10^3$/ul)					
%Neutophil					
%Lymphocyte					
% Monocyte					
% Eosinophil					
% Basophil					

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

(ส่วนที่ 3) **เลขที่บันทึก/แบบสอบถาม.....**

วันที่บันทึก.....

แบบคัดกรองภาวะโภชนาการ

งานโภชนศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โทร. 02-419-7740-1

ข้อมูลผู้ป่วย โรค.....

วันที่ .....(ติดสติ๊กเกอร์)

ชื่อ-นามสกุล .....

HN ……..AN ……..อายุ ..... ปี

☐ หอผู้ป่วย ..... ☐ OPD ……

น้ำหนัก*ปัจจุบัน* .....กก. ส่วนสูง .....ซม.

น้ำหนัก*เดิม* ..... กก. เมื่อ .....☐ เดือน ☐ สัปดาห์ ที่ผ่านมา

ประเมิน**น้ำหนัก**โดย ☐ ชั่ง ☐ ซักถาม ☐ ประมาณ

ผู้ประเมิน ..... ☐ พยาบาล ☐ แพทย์ / วันที่ประเมิน .....

7 – point Subjective Global Assessment		**วันที่ประเมิน**		
1. ประวัติน้ำหนักตัวเปลี่ยนแปลง (2 สัปดาห์ ถึง 6 เดือนที่ผ่านมา)				
- น้ำหนักเพิ่ม คงที่ หรือลดเล็กน้อย (> 0.5 กก. แต่ < 1 กก.)	score 1-2			
- น้ำหนักลดปานกลาง (≥ 1 กก. แต่ < 5%)	score 3-5			
- น้ำหนักลดมาก (≥ 5%)	score 6-7			
2. การรับประทานอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ				
- ไม่เปลี่ยนแปลง หรือลดลงเล็กน้อยในช่วงสั้นๆ	score 1-2			
- ปริมาณการรับประทานก้ำกึ่ง และปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงหลัง	score 3-5			
- ปริมาณการรับประทานก้ำกึ่ง หรือปริมาณลดลงในช่วงหลังหรือกินน้อย	score 6-7			
3. อาการทางระบบทางเดินอาหารที่ผิดปกติ (คลื่นไส้, อาเจียน, ท้องเสีย, เบื่ออาหาร)				
- ไม่มีอาการ หรือมีอาการเล็กน้อย เป็นๆ หายๆ	score 1-2			
- มีอาการบ้าง มากกว่า 2 สัปดาห์ หรืออาการมากแต่เริ่มดีขึ้น	score 3-5			
- มีอาการทุกวันหรือบ่อยมานานมากกว่า 2 สัปดาห์	score 6-7			
4. ความสามารถในการประกอบกิจวัตรประจำวัน				
- ปกติ หรือลดลงเล็กน้อย แต่เริ่มดีขึ้น	score 1-2			
- กิจวัตรประจำวันลดลงเล็กน้อย หรือลดลงมากแต่เริ่มดีขึ้น	score 3-5			
- กิจวัตรประจำวันลดลงมากหรือต้องนอนบนเตียงตลอด	score 6-7			
5. Wasting of subcutaneous fat (ผอมซูบ ดูจากไขมันบริเวณแขน/ขา หน้าอก)				
- ไม่มีหรือมีเพียงเล็กน้อย	score 1-2			
- ปานกลางทั่วๆ ทุกบริเวณ	score 3-5			
- มากหรือรุนแรงในบางบริเวณหรือส่วนใหญ่	score 6-7			
6. Wasting of muscle (กล้ามเนื้อลีบเล็กลง)				
- ไม่มีหรือมีเพียงเล็กน้อย	score 1-2			
- ปานกลางทั่วๆ ทุกบริเวณ	score 3-5			
- มากหรือรุนแรงในบางบริเวณหรือส่วนใหญ่	score 6-7			
7. Edema (บวมบริเวณขา เท้า ก้นกบ)				
- ไม่มีหรือมีเพียงเล็กน้อย	score 1-2			
- ปานกลาง	score 3-5			
- มากหรือรุนแรง	score 6-7			
รวมคะแนน				

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC 4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

ผลการประเมิน: 1-14 คะแนน ปกติ, ติดตามประเมินสัปดาห์ละครั้ง
15-35 คะแนน ขาดอาหารเล็กน้อยถึงปานกลาง, ติดตามประเมินภายใน 3 วัน
36-49 คะแนน ขาดอาหารรุนแรง, ให้โภชนบำบัดทันที

Weight loss score

น้ำหนัก**ก่อน**ที่ลดลง (กก.)	น้ำหนักที่ลดลง (กก.) น้ำหนักลดลง < 5%	น้ำหนักที่ลดลง (กก.) น้ำหนักลดลง 5-10 %	น้ำหนักที่ลดลง (กก.) น้ำหนักลดลง >10 %
34 kg	<1.70	1.70-3.40	>3.40
36 kg	<1.80	1.80-3.60	>3.60
38 kg	<1.90	1.90-3.80	>3.80
40 kg	<2.00	2.00-4.00	>4.00
42 kg	<2.10	2.10-4.20	>4.20
44 kg	<2.20	2.20-4.40	>4.40
46 kg	<2.30	2.30-4.60	>4.60
48 kg	<2.40	2.40-4.80	>4.80
50 kg	<2.50	2.50-5.00	>5.00
52 kg	<2.60	2.60-5.20	>5.20
54 kg	<2.70	2.70-5.40	>5.40
56 kg	<2.80	2.80-5.60	>5.60
58 kg	<2.90	2.90-5.80	>5.80
60 kg	<3.00	3.00-6.00	>6.00
62 kg	<3.10	3.10-6.20	>6.20
64 kg	<3.20	3.20-6.40	>6.40
66 kg	<3.30	3.30-6.60	>6.60
68 kg	<3.40	3.40-6.80	>6.80
70 kg	<3.50	3.50-7.00	>7.00
72 kg	<3.60	3.60-7.20	>7.20
74 kg	<3.70	3.70-7.40	>7.40
76 kg	<3.80	3.80-7.60	>7.60
78 kg	<3.90	3.90-7.80	>7.80
80 kg	<4.00	4.00-8.00	>8.00

น้ำหนัก**ก่อน**ที่ลดลง (กก.)	น้ำหนักที่ลดลง (กก.) น้ำหนักลดลง < 5%	น้ำหนักที่ลดลง (กก.) น้ำหนักลดลง 5-10 %	น้ำหนักที่ลดลง (กก.) น้ำหนักลดลง >10 %
82 kg	<4.10	4.10-8.20	>8.20
84 kg	<4.20	4.20-8.40	>8.40
86 kg	<4.30	4.30-8.60	>8.60
88 kg	<4.40	4.40-8.80	>8.80
90 kg	<4.50	4.50-9.00	>9.00
92 kg	<4.60	4.60-9.20	>9.20
94 kg	<4.70	4.70-9.40	>9.40
96 kg	<4.80	4.80-9.60	>9.60
98 kg	<4.90	4.90-9.80	>9.80
100 kg	<5.00	5.00-10.00	>10.00
102 kg	<5.10	5.10-10.20	>10.20
104 kg	<5.20	5.20-10.40	>10.40
106 kg	<5.30	5.30-10.60	>10.60
108 kg	<5.40	5.40-10.80	>10.80
110 kg	<5.50	5.50-11.00	>11.00
112 kg	<5.60	5.60-11.20	>11.20
114 kg	<5.70	5.70-11.40	>11.40
116 kg	<5.80	5.80-11.60	>11.60
118 kg	<5.90	5.90-11.80	>11.80
120 kg	<6.00	6.00-12.00	>12.00
122 kg	<6.10	6.10-12.20	>12.20
124 kg	<6.20	6.20-12.40	>12.40
126 kg	<6.30	6.30-12.60	>12.60

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

(ส่วนที่ 4)

เลขที่บันทึก/แบบสอบถาม.....

วันที่บันทึก.....

แบบประเมินภาวะโภชนาการโดยการวัดสัดส่วนของร่างกาย

ค่าที่วัด	ค่าที่วัดได้	
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 12
1. ค่าดัชนีมวลกาย (body mass index; BMI) [น้ำหนัก (กก.)/ความสูง (ม.^{2})]		
น้ำหนัก (กก.)	.....	.....
ความสูง (ม.)	.....	.....
ค่าดัชนีมวลกาย	.....	.....
2. การประเมินไขมันเก็บสะสม (fat reserve)		
ความหนาที่ชั้นไขมันต้นแขนด้านหลัง (triceps skin fold) (mm.)	.....	.....
3. การประเมิน somatic protein		
Mid- arm circumference; MAC (cm.)	.....	.....
Arm muscle circumference (MAMC) (cm.) = (MAC) – (0.314 x triceps skin fold)	.....	.....

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

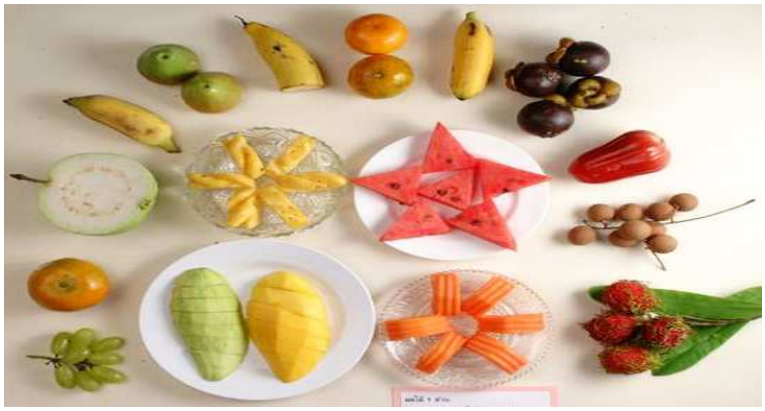
ภาพตัวอย่างเพื่อใช้กะประมาณปริมาณอาหารที่รับประทาน

สำหรับบันทึกการบริโภคอาหารอาหาร 3 วัน

(ระบุเป็นหน่วยที่ใช้ในครัวเรือน เช่น ถ้วย ทัพพี ช้อนโต๊ะ ช้อนชา ถ้วย แก้ว มิลลิลิตร ชิ้น ผล ฯลฯ)

กลุ่มข้าว-แป้ง เช่น ข้าวสวย 1 ทัพพี = 5 ช้อนกินข้าว

กลุ่มเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อสัตว์ 1 ช้อนกินข้าว = ปลาทู ½ ตัว = ไข่ ½ ฟอง = ตับ 1 ช้อนกินข้าว = ลูกชิ้น 2 ลูก เป็นต้น



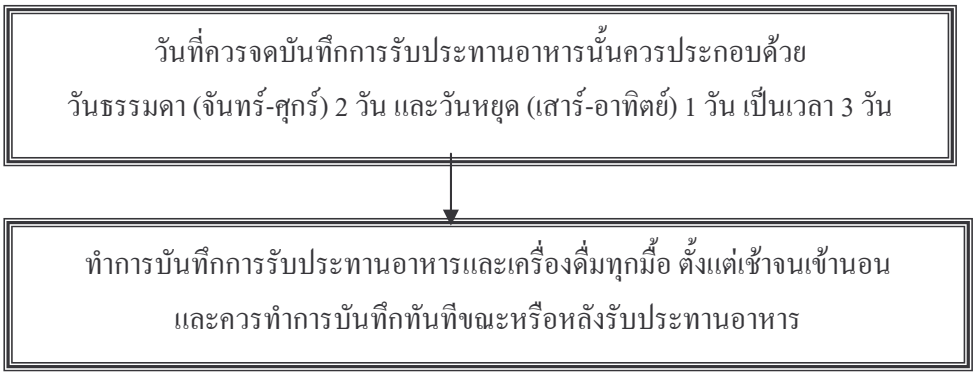
กลุ่มผัก เช่น ผัก 1 ทัพพี

กลุ่มผลไม้ ผลไม้ 1 ส่วน = ผลไม้ขนาดเล็ก 6-8 ผล (เช่น ลำไย องุ่น) = ผลไม้ขนาดกลาง 1-2 ผล (เช่น ชมพู่ ส้ม) = ผลไม้ขนาดใหญ่ 6-8 ชิ้น (เช่น มะม่วง มะละกอ แตงโม สับปะรด)

กลุ่มนม เช่น นม 1 กล่อง **กลุ่มเครื่องดื่ม** เช่น เบียร์ 1 แก้ว **กลุ่มขนมกินเล่น** เช่น ปาท่องโก๋ 1 ตัว

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

(ส่วนที่ 5) **วิธีการบันทึกการบริโภคอาหาร 3 วัน**



คำชี้แจง ผู้วิจัยขอความร่วมมือจากท่าน กรุณาบันทึกข้อมูลตามความเป็นจริง

ข้อมูลที่สำคัญของการจดบันทึกการบริโภคอาหาร 3 วัน ประกอบด้วย

1. **ชนิดของมื้ออาหาร:** ทำการบันทึกมื้ออาหารที่รับประทานพร้อมทั้งระบุเวลาที่รับประทานโดยประมาณ เช่น เช้า-กลางวัน-เย็น- อาหารว่าง เป็นต้น
2. **รายการอาหารและเครื่องดื่ม:** ทำการบันทึกรายการอาหาร รวมทั้งเครื่องดื่มทุกชนิดที่รับประทานตั้งแต่ตื่นนอนจนกระทั่งเข้านอน ต่อเนื่องกัน 3 วัน เช่น ก๋วยเตี๋ยวเส้นเล็กลูกชิ้นปลา น้ำมะตูม เป็นต้น
3. **ส่วนประกอบ:** ทำการบันทึกส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารและเครื่องดื่มที่รับประทาน เช่น ข้าวต้มปลา มีส่วนประกอบด้วย ข้าวสวย เนื้อปลาสด ผักชี หัวหอม กระเทียม เป็นต้น
4. **ปริมาณที่รับประทาน:** ระบุปริมาณอาหารและเครื่องดื่มที่รับประทานโดยประมาณ เช่น ข้าวต้มปลา ประกอบด้วย ข้าวสวย 1 ถ้วยตวง เนื้อปลาสด 2 ช้อนโต๊ะ โดยกำหนดปริมาณอาหารและเครื่องดื่ม เช่น

   1 ถ้วยตวง = 240 มิลลิลิตร 1 ช้อนชา = 5 มิลลิลิตร
   2 ช้อนโต๊ะ = 30 กรัม 1 ช้อนโต๊ะ = 15 มิลลิลิตร
   3 ช้อนชา = 1 ช้อนโต๊ะ 16 ช้อนชา = 1 ถ้วยตวง
5. **วิธีการเตรียมหรือวิธีการปรุงอาหารและเครื่องดื่ม:** ระบุวิธีการประกอบอาหารและเครื่องดื่มที่รับประทานตัวอย่างเช่น ต้ม ตุ๋น ผัด ทอด ลวก ปิ้ง ย่าง แกง แช่แข็ง รับประทานสด อาหารกระป๋อง เป็นต้น
6. **สถานที่รับประทานอาหารและเครื่องดื่ม:** ระบุสถานที่รับประทานอาหารและเครื่องดื่ม เช่น บ้าน ที่ทำงาน ร้านอาหาร เป็นต้น
7. **ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร:** ระบุผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่รับประทาน เช่น วิตามิน แร่ธาตุ พร้อมทั้งระบุจำนวน เวลา และวิธีการรับประทาน

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

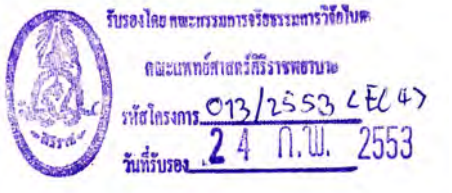
ตัวอย่างการจดบันทึกรายการอาหารและเครื่องดื่ม

<u>บันทึกวันที่ 1</u>

รายการอาหารที่รับประทาน วันที่.....**9**.....เดือน.....**มกราคม**.....ปี.....**2553**.....

มื้ออาหาร/เวลา	รายการอาหาร/เครื่องดื่ม	ส่วนประกอบ (คร่าวๆ)	ปริมาณที่รับประทาน	วิธีการเตรียม/ปรุงอาหาร	สถานที่รับประทาน
เช้า/ 8.00 น.	- ข้าวต้มไก่ - นมพร่องมันเนย	- ข้าวสวย - เนื้อไก่ไม่มีหนังติด - นมพร่องมันเนย	- 2 ทัพพี - 2 ช้อนโต๊ะ - 240 มล. (1 กล่อง)	ต้ม กล่อง/กระป๋อง	บ้าน บ้าน
กลางวัน/ 12.00 น.	- มักกะโรนีน้ำหมูสับ - ส้มเขียวหวาน - น้ำเปล่า	- เส้นมักกะโรนี - เนื้อหมูสับไม่ติดมัน - น้ำซุบ - ส้มเขียวหวาน - น้ำเปล่า	- 2 ก้อน - 2 ช้อนโต๊ะ - 1 ถ้วยตวง - 1 ผลกลาง - 240 มล. (1 แก้วน้ำ)	ต้ม สด -	บ้าน บ้าน บ้าน
อาหารว่าง/ 15.00 น.	- ขนมปังขาว - น้ำสับปะรดปั่น	- ขนมปังขาวไม่ใส่แยม - น้ำสับปะรดปั่นสดไม่ใส่เกลือ	- 2 แผ่น - 120 มล. (1/2 แก้วน้ำ)	ซื้อ (ยี่ห้อ: ฟาร์มเฮ้าส์) ปั่น	บ้าน บ้าน
เย็น/ 18.00 น.	- ข้าวสวย - ผัดผักกาดขาวใส่หมูสับ - แอปเปิ้ล	- ข้าวสวย - ผักกาดขาว - เนื้อหมูสับไม่ติดมัน - น้ำมันถั่วเหลือง - ซีอิ๊วขาวถั่วเหลือง - แอปเปิ้ล	- 2 ทัพพี - 1/2 ถ้วยตวง - 2 ช้อนโต๊ะ - 1 ช้อนโต๊ะ - 1 ช้อนชา - 1 ผล	หุง ผัด สด	บ้าน บ้าน บ้าน

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร.....ไม่มี.....



แบบบันทึกการบริโภคอาหาร 3 วัน

<u>บันทึกวันที่ 1</u>

รายการอาหารที่รับประทาน วันที่.....เดือน.....ปี.....

มื้ออาหาร/เวลา	รายการอาหาร/เครื่องดื่ม	ส่วนประกอบ (คร่าวๆ)	ปริมาณที่รับประทาน	วิธีการเตรียม/ปรุงอาหาร	สถานที่รับประทานอาหาร

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร.....

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

แบบบันทึกการบริโภคอาหาร 3 วัน

<u>บันทึกวันที่ 2</u>

รายการอาหารที่รับประทาน วันที่.....เดือน.....ปี.....

มื้ออาหาร/เวลา	รายการอาหาร/เครื่องดื่ม	ส่วนประกอบ (คร่าวๆ)	ปริมาณที่รับประทาน	วิธีการเตรียม/ปรุงอาหาร	สถานที่รับประทานอาหาร

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร……..

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์สิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

แบบบันทึกการบริโภคอาหาร 3 วัน

<u>บันทึกวันที่ 3</u>

รายการอาหารที่รับประทาน วันที่.....เดือน.....ปี.....

มื้ออาหาร/เวลา	รายการอาหาร/เครื่องดื่ม	ส่วนประกอบ (คร่าวๆ)	ปริมาณที่รับประทาน	วิธีการเตรียม/ปรุงอาหาร	สถานที่รับประทานอาหาร

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร……..

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์สิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

Appendix C

- Information Sheet for Participants
- Consent Form

เอกสารหมายเลข 3ก

เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย

(Participant Information Sheet)

ในเอกสารนี้อาจมีข้อความที่ท่านอ่านแล้วยังไม่เข้าใจ โปรดสอบถามหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้แทนให้ช่วยอธิบายจนกว่าจะเข้าใจดี ท่านอาจจะขอเอกสารนี้กลับไปอ่านที่บ้านเพื่อปรึกษาหารือกับญาติพี่น้อง เพื่อนสนิท แพทย์ประจำตัวของท่าน หรือแพทย์ท่านอื่น เพื่อช่วยในการตัดสินใจเข้าร่วมการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย ผลของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง ณ โรงพยาบาลศิริราช

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย เภสัชกรหญิงดวงกมล งามภัทรางกูร นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ 2 สาขาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แพทย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย อ.นพ. บุญชู พงศ์ธนากุล แพทย์ประจำสาขาวิชาโรคโลหิตวิทยาและอองโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โทร. 0-2419-5688

สถานที่วิจัย หน่วยตรวจรักษาผู้ป่วยนอก สาขาวิชาโรคโลหิตวิทยาและอองโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

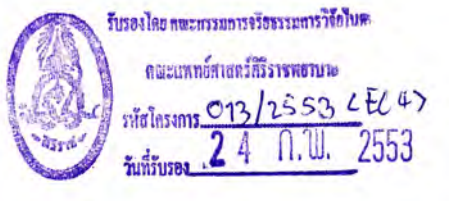
สถานที่ทำงานและหมายเลขโทรศัพท์ของหัวหน้าโครงการวิจัยที่ต่อได้ทั้งในและนอกเวลาราชการ ฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลศิริราช โทรศัพท์ติดต่อ 08-5120-3188

ผู้สนับสนุนทุนวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระยะเวลาในการวิจัย **1 กุมภาพันธ์ 2553 ถึง 1 ธันวาคม 2553**

โครงการวิจัยนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษา

1. ผลของการเสริมวิตามินอีต่อระดับวิตามินอีในพลาสมา การเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง และการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง
2. ผลข้างเคียงของการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง
3. กลไกของวิตามินอีในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้ข้อมูลผลของการเสริมวิตามินอีในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง ซึ่งอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการลดความรุนแรงของภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้

เด็กในปกครองของท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมการวิจัยนี้เพราะ

1. ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง
2. เป็นเพศชายหรือเพศหญิง อายุระหว่าง 5-20 ปี ที่สามารถรับประทานยาเม็ดได้
3. ไม่ได้รับยาขับเหล็กก่อนเริ่มการศึกษา 3 เดือนและในช่วงเวลาการศึกษา
4. ไม่ได้รับประทานวิตามินอีก่อนเข้าร่วมการศึกษาอย่างน้อย 3 เดือน
5. ไม่ได้รับเลือดแบบมากพอที่จะระงับการสร้างเม็ดเลือดแดงก่อนเริ่มการศึกษา 3 เดือน
6. มีระดับฮีโมโกลบินระหว่าง 7-9 กรัมต่อเดซิลิตร
7. ไม่มีภาวะติดเชื้อทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง หรือได้รับการผ่าตัดในช่วง 1 เดือนก่อนเข้าร่วมวิจัยหรือระหว่างทำการวิจัย
8. ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ ได้รับความยินยอมจากผู้ปกครอง และลงนามเป็นลายลักษณ์อักษรในหนังสือยินยอม

จะมีผู้เข้าร่วมการวิจัยนี้ทั้งสิ้นประมาณ 48 คน เมื่อเด็กในปกครองของท่านผ่านการคัดเลือกตามเกณฑ์คัดเลือกตัวอย่างที่กำหนดไว้ เด็กในปกครองของท่านจะถูกแบ่งโดยวิธีสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบออกเป็น 2 กลุ่ม โดยใส่เลขที่ให้กับเด็กเรียงจากเลขที่ 1 ถึง 48 ให้เด็กที่มีเลขที่เป็นคู่เป็นกลุ่มควบคุม คือไม่ได้รับวิตามินอีเสริม และให้เด็กที่มีเลขที่เป็นคี่เป็นกลุ่มทดลอง คือได้รับวิตามินอีเสริมเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

หากเด็กในปกครองของท่านตัดสินใจเข้าร่วมการวิจัยแล้ว จะมีขั้นตอนการวิจัยดังต่อไปนี้คือ

1. ได้รับการชี้แจงข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัย ได้รับความยินยอมจากผู้ปกครอง และลงนามเป็นลายลักษณ์อักษรในหนังสือยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย
2. ได้รับการชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง และประเมินภาวะโภชนาการโดยรวม
3. ได้รับการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำประมาณ 2 ช้อนชา โดยห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลศิริราช เพื่อตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา ระดับวิตามินอีในพลาสมา การเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง และการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง ตลอดการวิจัยเด็กในปกครองของท่านจะได้รับการเจาะเลือดทั้งหมด 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 12 สัปดาห์

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC 4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

4. ได้รับคำแนะนำในการบันทึกการบริโภคอาหาร 3 วัน และการบริโภคอาหารย้อนหลัง 24 ชั่วโมง
5. ได้รับคำแนะนำเกี่ยวกับโภชนบำบัด พร้อมทั้งได้รับคู่มือดูแลตัวเองสำหรับผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย
6. ได้รับการสัมภาษณ์เพื่อบันทึกในแบบสอบถามต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย
7. ในขณะที่เข้าร่วมการวิจัยเด็กในปกครองของท่านจะได้รับการรักษาตามปกติ โดยในกลุ่มทดลองจะได้รับวิตามินอี 10 ยูนิตสากล/กิโลกรัม/วัน รับประทานยาทุกวันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ส่วนในกลุ่มควบคุมจะได้รับการรักษาตามปกติโดยไม่ได้รับวิตามินอี รวมระยะเวลาที่เด็กในปกครองของท่านต้องร่วมอยู่ในโครงการวิจัยทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ นัดหมาย 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 12 สัปดาห์

ความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นเมื่อเข้าร่วมการวิจัย

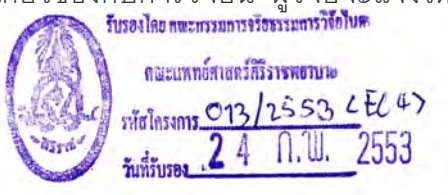
ไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายใดๆ จากการเข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้ หรือหากเกิดอาการผิดปกติขึ้นกับเด็กในปกครองของท่านดังที่มีรายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นจากการรับประทานวิตามินอี เช่น เมื่อยล้า อ่อนเพลีย มองเห็นภาพไม่ชัดเจน ปวดหัว ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น ซึ่งพบได้น้อยกว่าร้อยละ 1 เด็กในปกครองของท่านจะได้รับการดูแลเบื้องต้นจากผู้วิจัย โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้ให้ความช่วยเหลือในการติดต่อประสานงานเพื่อให้เด็กในปกครองของท่านได้เข้ารับการตรวจรักษาจากแพทย์เจ้าของไข้ สำหรับค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด

หากเด็กในปกครองของท่านไม่เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ เด็กในปกครองของท่านก็จะได้รับการตรวจเพื่อการวินิจฉัยและรักษาโรคของเด็กในปกครองของท่านตามวิธีการที่เป็นมาตรฐานคือ เจาะเลือดเพื่อตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา และพบแพทย์เพื่อรับการรักษา

หากมีข้อข้องใจที่จะสอบถามเกี่ยวข้องกับการวิจัย หรือหากเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากการวิจัย ท่านสามารถติดต่อ เภสัชกรหญิงดวงกมล งามภัทรางกูร โทรศัพท์ที่ติดต่อได้สะดวกคือ 08-5120-3188

เด็กในปกครองของท่านจะได้รับวิตามินอีและการตรวจวัดระดับสารต่างๆ โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายใดๆ และค่าใช้จ่ายที่ผู้เข้าร่วมการวิจัยจะต้องรับผิดชอบเอง คือ ค่าตรวจวิเคราะห์หาค่าทางโลหิตวิทยา และค่ายาที่ท่านได้รับตามปกติที่เป็นไปตามสิทธิปกติที่ท่านมี

หากมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ทราบโดยรวดเร็วและไม่ปิดบัง



ข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัย จะถูกเก็บรักษาไว้โดยไม่เปิดเผยต่อสาธารณะเป็นรายบุคคล แต่จะรายงานผลการวิจัยเป็นข้อมูลส่วนรวมโดยไม่สามารถระบุข้อมูลรายบุคคลได้ ข้อมูลของผู้เข้าร่วมการวิจัยเป็นรายบุคคลอาจมีคณะบุคคลบางกลุ่มเข้ามาตรวจสอบได้ เช่น ผู้ให้ทุนวิจัย สถาบัน หรือองค์กรของรัฐที่มีหน้าที่ตรวจสอบ รวมถึงคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน เป็นต้น

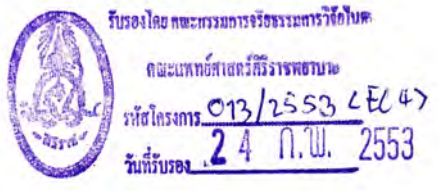
ผู้เข้าร่วมการวิจัยมีสิทธิ์ถอนตัวออกจากโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่ต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้า และการไม่เข้าร่วมการวิจัยหรือถอนตัวออกจากโครงการวิจัยนี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการบริการและการรักษาที่สมควรจะได้รับตามมาตรฐานแต่ประการใด

หากเด็กในปกครองของท่านได้รับการปฏิบัติที่ไม่ตรงตามที่ได้ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงนี้ ท่านสามารถแจ้งให้ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนทราบได้ที่ สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ตึกอดุลยเดชวิกรม ชั้น 6 ร.พ.ศิริราช โทร. (02) 419-6405-6 โทรสาร (02) 419-6405

ข้าพเจ้าได้อ่านรายละเอียดในเอกสารนี้ครบถ้วนแล้ว

ลงชื่อ..... ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย / วันที่.....

(.....)



เอกสารหมายเลข 3ข

หนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย

(Informed Consent Form)

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

ข้าพเจ้า..... อายุ.....ปี อาศัยอยู่บ้านเลขที่.....ถนน..... แขวง/ตำบล..... เขต/อำเภอ.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์..... โทรศัพท์ .....

ขอแสดงเจตนายินยอมให้เด็กในปกครองของข้าพเจ้า ชื่อ ..... เข้าร่วมโครงการวิจัยเรื่อง ผลของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง ณ โรงพยาบาลศิริราช

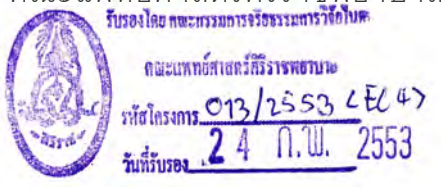
โดยข้าพเจ้าและเด็กในปกครองของข้าพเจ้าได้รับทราบรายละเอียดเกี่ยวกับที่มาและจุดมุ่งหมายในการทำวิจัย รายละเอียดขั้นตอนต่างๆ ที่จะต้องปฏิบัติหรือได้รับการปฏิบัติ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของการวิจัย และความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมการวิจัย รวมทั้งแนวทางป้องกันและแก้ไขหากเกิดอันตรายขึ้น ค่าใช้จ่ายที่เด็กในปกครองของข้าพเจ้าจะต้องรับผิดชอบจ่ายเอง โดยได้อ่านข้อความที่มีรายละเอียดอยู่ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัยโดยตลอด อีกทั้งยังได้รับคำอธิบายและตอบข้อสงสัยจากหัวหน้าโครงการวิจัยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว

เด็กในปกครองของข้าพเจ้าจึงสมัครใจเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้

หากข้าพเจ้าและเด็กในปกครองของข้าพเจ้า มีข้อข้องใจเกี่ยวกับขั้นตอนของการวิจัย หรือหากเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากการวิจัยขึ้นกับเด็กในปกครองของข้าพเจ้า ข้าพเจ้าจะสามารถติดต่อกับ

หัวหน้าโครงการวิจัย เภสัชกรหญิงดวงกมล งามภัทรางกูร นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ 2 สาขาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อยู่ 733 ถนนเทอดไท แขวงบางหว้า เขตภาษีเจริญ กรุงเทพฯ 10160 โทรศัพท์ติดต่อ 08-5120-3188 สถานที่ทำงาน ฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลศิริราช โทรศัพท์ติดต่อ 02-419-6841

แพทย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย อ.นพ. บุญชู พงศ์ธนากุล แพทย์ประจำสาขาวิชาโรคโลหิตวิทยาและออนโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โทร. 0-2419-5688



หากเด็กในปกครองของข้าพเจ้า ได้รับการปฏิบัติไม่ตรงตามที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย ข้าพเจ้าสามารถติดต่อกับประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนได้ที่สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ตึกอดุลยเดชวิกรม ชั้น 6 ร.พ.ศิริราช โทร. (02) 419-6405-6 โทรสาร (02) 419-6405

ข้าพเจ้าได้ทราบถึงสิทธิ์ที่เด็กในปกครองของข้าพเจ้า จะได้รับข้อมูลเพิ่มเติมทั้งทางด้านประโยชน์และโทษจากการเข้าร่วมการวิจัย และสามารถถอนตัวหรืองดเข้าร่วมการวิจัยได้ทุกเมื่อโดยไม่ต้องแจ้งล่วงหน้าหรือระบุเหตุผล โดยจะไม่มีผลกระทบต่อการบริการและการรักษาพยาบาลที่เด็กในปกครองของข้าพเจ้าจะได้รับต่อไปในอนาคต และยินยอมให้ผู้วิจัยใช้ข้อมูลส่วนตัวของเด็กในปกครองของข้าพเจ้าที่ได้รับจากการวิจัย แต่จะไม่เผยแพร่ต่อสาธารณะเป็นรายบุคคล โดยจะนำเสนอเป็นข้อมูลโดยรวมจากการวิจัยเท่านั้น

ข้าพเจ้าได้เข้าใจข้อความในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย และหนังสือแสดงเจตนายินยอมนี้โดยตลอดแล้ว จึงลงลายมือชื่อไว้

ลงชื่อ.....ผู้ปกครอง/ผู้แทนโดยชอบธรรม/วันที่.....

(.....)

ลงชื่อ.....ผู้ให้ข้อมูลและขอความยินยอม/หัวหน้าโครงการวิจัย/วันที่.....

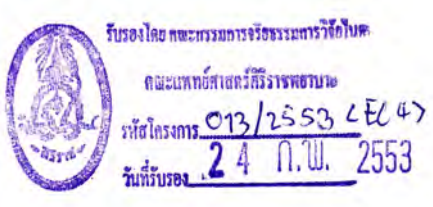
(.....)

ในกรณีผู้เข้าร่วมการวิจัยอ่านหนังสือไม่ออก ผู้ที่อ่านข้อความทั้งหมดแทนผู้เข้าร่วมการวิจัยคือ.....

จึงได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นพยาน

ลงชื่อ..... พยาน/วันที่.....

(.....)



เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย
และหนังสือแสดงเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย
(สำหรับเด็ก)

ชื่อโครงการ ผลของการเสริมวิตามินอีต่อภาวะเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง ณ โรงพยาบาลศิริราช

การศึกษาวิจัย คือ โครงการที่วางแผนอย่างละเอียด เพื่อตอบคำถามเกี่ยวกับสุขภาพเพื่อช่วยเหลือผู้อื่นต่อไป

สารอนุมูลอิสระ คือ สารพิษที่เกิดขึ้นภายในร่างกายตามธรรมชาติจากขบวนการต่างๆ ในร่างกาย และสารพิษที่มาจากภายนอกร่างกายแล้วเข้าสู่ร่างกาย อนุมูลอิสระจะเข้าไปทำให้เซลล์เกิดการทำงานที่ผิดปกติ และทำให้เกิดความเสื่อมต่างๆ ขึ้น

ภาวะเครียดออกซิเดชัน คือ ภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระในร่างกายสูงเกินกว่าปกติ ทำให้ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระลดต่ำลง และมีผลให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์และอวัยวะในร่างกาย

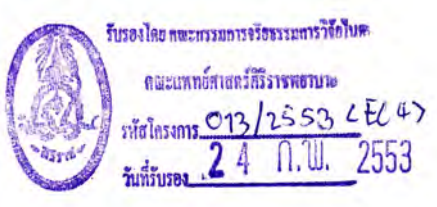
หนูได้รับเชิญเข้าร่วมโครงการนี้ เนื่องจากพบภาวะเหล่านี้ได้ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง และในเด็กที่มีอายุตั้งแต่ 5 ปีขึ้นไปที่ป่วยเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง ที่ไม่ได้รับเลือดแบบมากพอที่จะระงับการสร้างเม็ดเลือดแดงยังไม่เคยมีการศึกษา ซึ่งหนูอยู่ในช่วงอายุนี้พอดี

สิ่งที่ผู้วิจัยจะทำกับหนูคือ การให้คำแนะนำในการบันทึกการบริโภคอาหาร 3 วัน และคำแนะนำในการบันทึกการบริโภคอาหารย้อนหลัง 24 ชั่วโมง การวัดสัดส่วนของร่างกาย การให้โภชนบำบัดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และการเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยา โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

<u>ประโยชน์ที่หนูจะได้รับจากโครงการนี้คือ</u>

1. หนูจะได้รู้ว่าตัวหนูขาดวิตามินอี เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันสูงหรือไม่
2. ถ้าหนูมีภาวะบกพร่องในการขาดวิตามินอีหนูจะได้รับคำแนะนำเกี่ยวกับอาหารที่เหมาะสม
3. โครงการนี้จะเป็นประโยชน์กับเด็กอื่นๆ ที่ไม่แน่ใจว่ามีภาวะเครียดออกซิเดชัน จะได้รับการวินิจฉัยที่แน่นอน

โปรดอ่านข้อมูลนี้อย่างละเอียดหรือขอให้ผู้อื่นอ่านข้อมูลนี้ให้หนูฟัง และขอให้หนูใช้เวลาทบทวนข้อมูลเหล่านี้กับคุณพ่อคุณแม่ ถ้ามีข้อสงสัยเกี่ยวกับโครงการนี้ หนูสามารถโทรติดต่อ เภสัชกรหญิงดวงกมล งามภัทรางกูร ได้ที่เบอร์ 085-1203188 หรือ 02-4196841



หนูไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการถ้าหนูไม่ต้องการ จะไม่มีใครบังคับหนู-ขึ้นอยู่กับหนูโดยสิ้นเชิง หนูจะมีเวลาอย่างเหลือเฟือในการถามคำถาม การที่หนูสามารถเข้าใจคำตอบได้เป็นสิ่งสำคัญ ถ้าหนูตกลงเข้าร่วมโครงการ เราจะขอให้หนูลงลายมือชื่อใน**หนังสือแสดงความสมัครใจ**ฉบับนี้ จะมีการขอให้บิดามารดา ผู้ปกครอง หรือผู้แทนตามกฎหมายของหนูลงลายมือชื่อในแบบฟอร์มเพื่อให้อนุญาตด้วย เฉพาะในกรณีที่หนูสบายใจเกี่ยวกับโครงการวิจัยนี้เท่านั้น

หนูสามารถหยุดการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ได้**ทุกเมื่อ** ก่อนหรือหลังจากที่โครงการวิจัยนี้ได้เริ่มขึ้นแล้ว หนูไม่จำเป็นต้องให้เหตุผล และถ้าหนูตอบปฏิเสธจะไม่มีใครโกรธ ผลการตรวจของหนูจะถูกเก็บเป็นความลับ และจะแจ้งผลให้หนูกับคุณพ่อคุณแม่ทราบเท่านั้น

งานวิจัยนี้มีผู้ตรวจสอบว่างานวิจัยดีพอที่จะทำได้คือ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ตรวจสอบการศึกษาวิจัยอย่างละเอียดแล้ว พวกเขาได้อ่านทุกอย่างที่เกี่ยวกับการศึกษาวิจัย และได้อนุญาตให้ดำเนินโครงการวิจัยได้

โครงการวิจัยนี้จะมีเด็กจำนวนประมาณ 48 คน เข้าร่วมโครงการวิจัย ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 5-20 ปี

หนู ชื่อ .....อายุ .....

อยู่บ้านเลขที่ .....

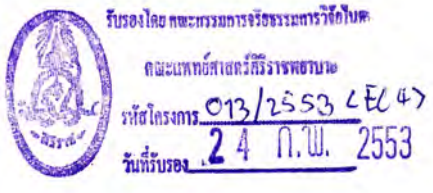
ผู้วิจัยได้อธิบายข้อมูลและขั้นตอนต่างๆ ในการตรวจข้างต้นให้ฟังแล้ว และหนูทราบว่าจะยินดีเข้าร่วมโครงการหรือไม่ก็ได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อการดูแลรักษาพยาบาลของหนู

หนูเข้าใจโครงการนี้ และโดยความเห็นชอบของผู้ปกครองของหนู จึงได้ตกลงเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้

.....	.....
(.....)	(.....)
เด็กที่เข้าร่วมโครงการวิจัย	เภสัชกรหญิงดวงกมล งามภัทรางกูร
วันที่	ผู้ชี้แจงและเชิญให้เข้าร่วมโครงการวิจัย
	วันที่ .....
	.....
	(.....)
	พยาน

หมายเหตุ 1.พยานจะต้องมีเฉพาะในกรณีที่มีผู้อ่านเอกสารชี้แจงนี้ให้เด็กฟังเท่านั้น

2.บิดาหรือมารดาหรือผู้ปกครองของเด็กต้องลงนามยินยอมใน Consent form ต่างหาก



Appendix D

Booklet for Thalassemic Patient

รับรองโดย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
รหัสโครงการ 013/2553 (EC 4)
วันที่รับรอง 24 ก.พ. 2553

คู่มือแนะนำโภชนาการสำหรับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

จัดทำโดย

ภญ. ภูธิตา ทองกิจปรีชา และ ภญ. ดวงกมล งามภัทรางกูร
นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์
ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาวะโภชนาการที่ดี จะทำให้ร่างกายมีความแข็งแรง มีการเจริญเติบโต และพัฒนาการที่เหมาะสมตามวัย เด็กที่เป็นโรคธาลัสซีเมียจะมีน้ำหนักและส่วนสูงที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานเมื่อเปรียบเทียบกับเด็กในวัยเดียวกัน มีรูปร่างผอม แขนขาลีบ และเจริญเติบโตไม่สมวัย ดังนั้นผู้ป่วยควรรับประทานอาหารอย่างเพียงพอ และมีสารอาหาร วิตามิน และแร่ธาตุครบถ้วน

ผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะมีระดับวิตามินและแร่ธาตุ เช่น โฟเลต วิตามินบี 12 วิตามินดี แคลเซียม ทองแดง สังกะสี ซีลีเนียม รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิตามินอี และวิตามินซี ในปริมาณน้อยกว่าปกติ แต่สำหรับผู้ที่ได้รับเลือดเป็นประจำจะมีธาตุเหล็กในร่างกายเกิน ภาวะการขาดและเกินที่เกิดขึ้นจึงส่งผลกระทบต่อภาวะโภชนาการของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ดังนั้นการได้รับสารอาหารที่จำเป็น เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามินและแร่ธาตุอย่างครบถ้วนและเหมาะสม จะช่วยให้ผู้ป่วยมีภาวะโภชนาการที่ดี มีการเจริญเติบโตและพัฒนาการที่ดีขึ้น อาหารที่รับประทานจะมีมากมายหลายชนิด ดังนั้นผู้ป่วยควรเลือกรับประทานอาหารหลักให้ครบ 5 หมู่

อาหารหลัก 5 หมู่

หมู่ที่ 1 นม ไข่ เนื้อสัตว์ต่าง ๆ ถั่วเมล็ดแห้งและงา อาหารหมู่นี้เป็นแหล่งโปรตีนซึ่งช่วยให้ร่างกายเจริญเติบโต แข็งแรง และช่วยซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ

หมู่ที่ 2 ข้าว แป้ง เผือกมัน น้ำตาล อาหารหมู่นี้จะให้พลังงานแก่ร่างกาย

หมู่ที่ 3 น้ำมัน และไขมันจากพืชและสัตว์ เป็นอาหารที่ให้พลังงานและกรดไขมันจำเป็นแก่ร่างกาย

หมู่ที่ 4 พืชผักต่างๆ จะให้วิตามินและเกลือแร่ ทำให้ร่างกายแข็งแรง ต้านทานเชื้อโรค และทำให้อวัยวะต่างๆ ทำงานได้อย่างเป็นปกติ

หมู่ที่ 5 ผลไม้ต่างๆ จะให้วิตามินและเกลือแร่ และมีกากอาหารช่วยทำให้การขับถ่ายของลำไส้เป็นปกติ

การบริโภคใน 1 วัน ควรรับประทานอาหารให้มีความหลากหลาย ได้สัดส่วนในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อให้ได้พลังงานและสารอาหารเพียงพอสำหรับร่างกาย โดยรับประทานตามหลัก **ธงโภชนาการ** ของกองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข

โภชนาการและธาลัสซีเมีย

อาหารในหมู่ต่าง ๆ จะให้สารอาหารที่จำเป็นต่อการทำงานตามปกติของร่างกาย อาหารเหล่านี้ประกอบด้วยสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในเด็กที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย

โปรตีน

โปรตีนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อร่างกาย แหล่งของโปรตีนจากอาหารได้มาจากทั้งสัตว์และพืช ได้แก่ อาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไข่ นม และธัญพืช ปริมาณโปรตีนที่แนะนำให้บริโภคต่อวันสำหรับเด็กอายุ 6 – 8 ปี คือประมาณวันละ 28 กรัมต่อวัน และเด็กอายุ 9 – 15 ปี ประมาณวันละ 40 – 63 กรัมต่อวัน สำหรับผู้ใหญ่ คือ 1 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งอาหารสำคัญที่ให้พลังงาน สำหรับผู้ที่มีอายุมากกว่า 6 ปีขึ้นไป ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่แนะนำให้บริโภคต่อวันคิดเป็นร้อยละ 60 ของพลังงานทั้งหมดที่ได้รับต่อวัน (2,000 กิโลแคลอรี) หรือประมาณ 300 กรัมต่อวัน

ไขมัน

ไขมันให้พลังงาน ช่วยในการดูดซึมและขนส่งวิตามินที่ละลายในไขมันไปยังอวัยวะต่างๆ และให้กรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย แหล่งที่พบได้แก่ น้ำมันจากพืชและสัตว์ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง กะทิ น้ำมันปลา เนย และไข่แดง เป็นต้น ปริมาณไขมันที่แนะนำต่อวันคิดเป็นร้อยละ 30 ของพลังงานทั้งหมดที่ได้รับต่อวัน (2,000 กิโลแคลอรี)

วิตามินและแร่ธาตุเหล็ก

ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่ได้รับเลือดเป็นประจำจะมีธาตุเหล็กในร่างกายเกิน ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงอาหารที่มีธาตุเหล็กสูงในกลุ่มเนื้อสัตว์ และไม่รับประทานอาหารที่มีธาตุเหล็กสูงในพืชผักร่วมกับอาหารที่เพิ่มการดูดซึมธาตุเหล็ก แต่สามารถกินแยกกันได้และควรรับประทานอาหารที่ลดการดูดซึมธาตุเหล็ก

ความต้องการธาตุเหล็กใน 1 วัน (กองโภชนาการ กรมอนามัย)

อายุ (ปี)	เพศ	ความต้องการธาตุเหล็กใน 1 วัน
4-9	ชายและหญิง	วันละ 10 มิลลิกรัม
10-15	ชาย	วันละ 12 มิลลิกรัม
10-15	หญิง	วันละ 15 มิลลิกรัม

อาหารที่มีธาตุเหล็กสูง	ตัวอย่างอาหาร
กลุ่มเนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์	เครื่องในสัตว์ เช่น หัวใจ ตับ ไส้ ปอด เลือดสัตว์ต่างๆ ไข่กุ้ง ปลากระบอก ปลิงทะเล หอย นางรม หอยแครง หอยกะพง หอยขม หอยตลับ หอยแมลงภู่ หอยลาย หอยเสียบ หอยหลอด ไข่แดง ลูกชิ้นเนื้อวัว หมูหยอง กุ้งแห้ง กะปิ
กลุ่มข้าวและธัญพืช	กลอย งา ฟองเต้าหู้ ถั่วแดงหลวง ถั่วดำ เมล็ดฟักทอง เมล็ดบัว (แห้ง) มันเทศ เผือก
กลุ่มพืชผัก	ใบชะพลู หน่อไม้ฝรั่ง ผักกาดเขียว ผักกาดดอง ผักกูด ผักชีฝรั่ง มะเขือพวง เห็ดหูหนู สาหร่ายทะเล ดอกโสน ต้นหอม
กลุ่มผลิตภัณฑ์ผลไม้แปรรูป	สมอจีน (แห้ง) เปลือกส้มจีน (แห้ง)

อาหารที่เพิ่มการดูดซึมธาตุเหล็ก	เชอร์รี่ แคนตาลูป สตรอเบอรี่ มะปราง มะไฟ มะม่วงหิมพานต์ บร็อคโคลี่ มะเขือเทศ พริกไทย ไวน์ขาว

อาหารที่ลดการดูดซึมของธาตุเหล็ก	ไวน์แดง ชา กาแฟ มันฝรั่ง ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง เช่น น้ำนมถั่วเหลือง เต้าหู้

ตัวอย่างรายการอาหารที่มีธาตุเหล็กสูง

- แกงจืดเลือดหมู
- ผัดถั่วงอกกับเลือดหมูและตับหมู
- ผัดเปรี้ยวหวานตับ
- ก๋วยจั๊บเครื่องใน
- แกงคั่วสับปะรดกับหอยแมลงภู่แห้ง
- ต้มซี่โครงหมู
- ตับหวาน
- ก๋วยเตี๋ยวน้ำตก
- ก๋วยเตี๋ยวใส่เครื่องใน
- ผัดเผ็ดหอยลาย
- ผัดกะเพราะเครื่องใน
- ปลิงทะเลน้ำแดง
- ผัดหน่อไม้ฝรั่ง
- ยำผักกาดดอง
- ยำกุ้งแห้ง
- แกงจืดสาหร่ายทะเล
- กลอยทอด

โฟเลต

ผู้ที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย เม็ดเลือดแดงจะมีอายุสั้นกว่าปกติ ทำให้ต้องการใช้โฟเลตในการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ปริมาณโฟเลตอ้างอิงที่ควรได้รับประจำวันสำหรับเด็กอายุ 1-8 ปีคือ 150-200 ไมโครกรัมต่อวัน อายุ 9-12 ปี เท่ากับ 300 ไมโครกรัมต่อวัน อายุ 13 ปีขึ้นไปเท่ากับ 400 ไมโครกรัมต่อวัน

หากขาดจะทำให้เกิดความผิดปกติ ได้แก่ การเจริญเติบโตของเซลล์สร้างเม็ดเลือดแดงในไขกระดูกหยุดชะงัก การสร้างเม็ดเลือดแดงผิดปกติ เบื่ออาหาร ติดเชื้อง่าย

อาหารที่อุดมไปด้วยโฟเลต ได้แก่ ผักใบเขียว หน่อไม้ฝรั่ง ข้าว ถั่วเขียว อย่างไรก็ตามอาหารที่มีโฟเลตสูงบางชนิดมีเหล็กในปริมาณที่สูงด้วย จึงต้องระมัดระวังในการเลือกชนิดของอาหารให้เหมาะสม

วิตามินบี 12

เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ กระบวนการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนและกรดไขมัน ถ้าขาดจะทำให้เกิดความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง และระบบประสาท แหล่งอาหาร ได้แก่ เนื้อสัตว์ ไข่ นม ไม่พบในพืช ปริมาณที่แนะนำแต่ละวันในเด็กอายุ 4-8 ปี ได้แก่ 1.2 ไมโครกรัม เด็กอายุ 9-18 ปี เท่ากับ 2.4 ไมโครกรัม

วิตามินซี

วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของกระดูก และฟัน

เด็กอายุ 1-8 ปีต้องการวิตามินซีวันละ 40 มิลลิกรัม อายุ 9-12 ปี ต้องการวันละ 45 มิลลิกรัม วัยรุ่นชายอายุ 13-15 ปี ต้องการวันละ 75 มิลลิกรัม ขณะที่วัยรุ่นหญิงต้องการวันละ 65 มิลลิกรัม เมื่อมีอายุ 16 ปีขึ้นไป ผู้ชายต้องการวันละ 90 มิลลิกรัม และผู้หญิงต้องการวันละ 75 มิลลิกรัม

อาหารที่มีวิตามินซีเป็นจำนวนมาก ได้แก่ มะขามป้อม มะนาว ส้ม ฝรั่ง มะเขือเทศ สตรอเบอรี่ บร็อคโคลี่ การขาดวิตามินซีจะทำให้เป็นโรคลักปิดลักเปิด

วิตามินอี

วิตามินอีมีบทบาทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ถ้าร่างกายขาดจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ง่าย เกิดภาวะโลหิตจาง ระบบประสาทผิดปกติ ร่างกายมีความต้องการ 15 มิลลิกรัมต่อวัน อาหารที่อุดมด้วยวิตามินอี ได้แก่ น้ำมันจากพืชและสัตว์ อัลมอนด์ เมล็ดดอกทานตะวัน เนยถั่ว

แร่ธาตุสำหรับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

แร่ธาตุ	ประโยชน์	อาการขาด	แหล่งอาหาร
แคลเซียม	มีบทบาทต่อกระดูก ฟัน และระบบอื่นๆ	โรคกระดูกอ่อน หงุดหงิดง่าย มือเท้าชา เป็นตะคริวบ่อย	นม โยเกิร์ต ปลากรอบที่กินได้ทั้งกระดูก ปูม้า ปูทะเล ใบยอ ผักโขม สะระแหน่ ผักหวานตำลึง ผักกวางตุ้ง
สังกะสี	สารต้านอนุมูลอิสระ เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร	การเจริญเติบโตช้า ผิวหนัง อักเสบ ภูมิต้านทานต่ำ แผลหายช้า	หอยนางรม เนื้อแดง อาหารทะเล ธัญพืช และถั่วต่างๆ
แมกนีเซียม	การทำงานของเส้นประสาท การยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ	ชัก กล้ามเนื้ออ่อนแรง ความดันโลหิตต่ำ และหมดสติ	ถั่ว ธัญพืชไม่ขัดสี ผักใบเขียว ผลไม้
ซีลีเนียม	สารต่อต้านอนุมูลอิสระ	กล้ามเนื้อหัวใจผิดปกติ กล้ามเนื้ออ่อนแรง	ธัญพืชไม่ขัดสี อาหารทะเล ปลาทูน่า

สรุปข้อควรปฏิบัติ

- รับประทานอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการครบถ้วนในปริมาณที่เหมาะสม เช่น เนื้อสัตว์ ไข่ นม ผักสด และผลไม้ต่างๆ
- หลีกเลี่ยงอาหารที่มีธาตุเหล็กสูง เช่น เลือดสัตว์ต่างๆ และเครื่องในสัตว์ เป็นต้น
- เครื่องดื่มประเภท ชา นมถั่วเหลือง สามารถช่วยลดการดูดซึมธาตุเหล็กได้

- ห้ามรับประทานยาบำรุงเลือดที่มีธาตุเหล็กทุกชนิด เพราะจะทำให้มีธาตุเหล็กสะสมในร่างกายมากและเร็วกว่าที่ควร
- รักษาสุขภาพอนามัยในช่องปาก โดยทำความสะอาดปากและฟันหลังอาหารทุกมื้อ และควรตรวจฟันทุก 6 เดือน เนื่องจากฟันจะผุง่าย
- หลีกเลี่ยงการทำงานหนัก หรือการเล่นกีฬาที่รุนแรง
- ไม่ควรซื้อผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร วิตามินและแร่ธาตุมารับประทานเอง โดยไม่ปรึกษาแพทย์หรือเภสัชกร เพราะอาจมีส่วนประกอบของเหล็กประกอบอยู่

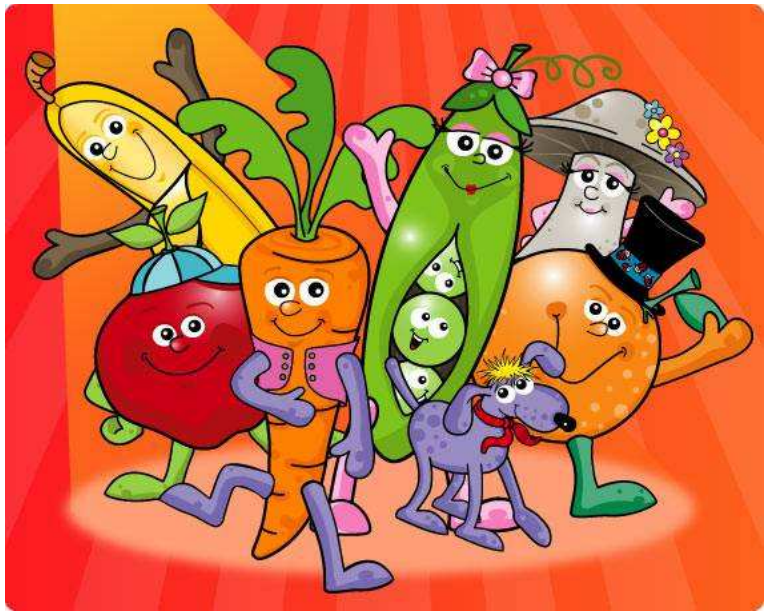
ตัวอย่างอาหาร

มื้อเช้า	มื้อกลางวัน	มื้อเย็น
วันที่ 1 ข้าวต้มข้าวกล้อง ผัดผักบุ้งไฟแดง ปลานึ่งซีอิ้วเห็ดหอม ชมพู่	ก๋วยเตี๋ยวราดหน้าปลาฝรั่ง	ข้าวกล้อง ผัดผักรวมใส่ไก่ (กะหล่ำปลี แครอท เห็ดหอม) แคนตาลูป
วันที่ 2 นมไขมันต่ำ โจ๊กหมูสับ แก้วมังกร	ข้าวผัดสามสีใส่กุ้ง (แครอท ถั่วลันเตา สับปะรด) ชมพู่	ข้าวกล้อง แกงส้มมะละกอ ไข่เจียวหอมใหญ่ แตงโม
วันที่ 3 ข้าวต้มปลากะพง โอวัลติน แคนตาลูป	ก๋วยเตี๋ยวเส้นหมี่ น้ำส้ม	ข้าวกล้อง ต้มจืดผักกาดขาวเต้าหู้ไข่ ปลานิลทอด สับปะรด

เอกสารอ้างอิง

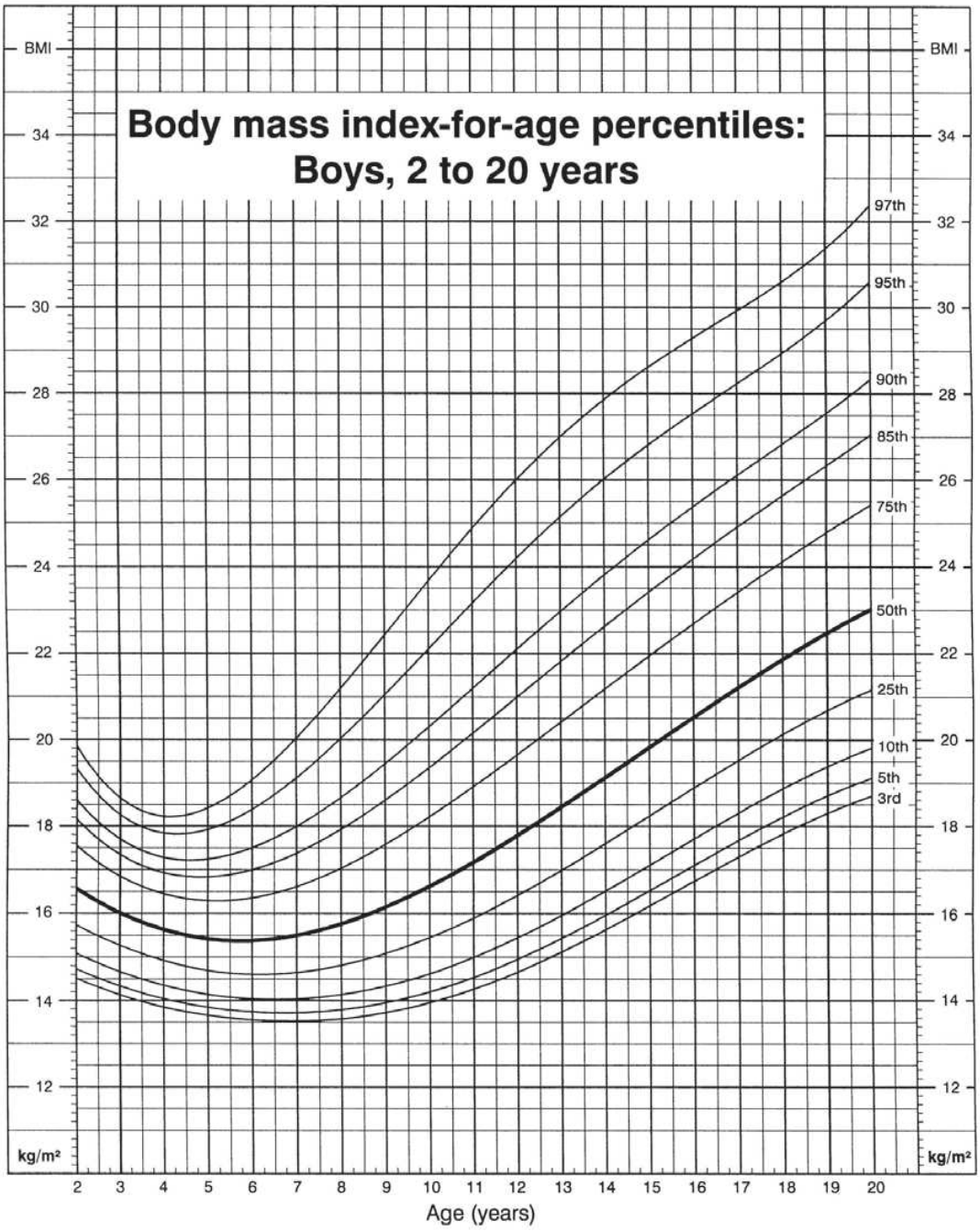
1. บุญชู พงศ์ธนากุล, กุลวรา เมฆสวรรค์. โภชนาการในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย. กรุงเทพฯ: หจก. มีเดียแมท.
2. ประสงค์ เทียนบุญ. 2549. การเสริมวิตามิน - แร่ธาตุ และ CRN ในปิรามิด. วารสารโภชนบำบัด 17 (2): 73-85.
3. คณะกรรมการจัดทำข้อกำหนดสารอาหารที่ควรได้รับประจำวันสำหรับคนไทย กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2546. ปริมาณสารอาหารอ้างอิงที่ควรได้รับประจำวันสำหรับคนไทย พ.ศ. 2546 ปรับปรุงครั้งที่ 3. [Online]. Available from : http://nutrition.anamai.moph.go.th/dri/1.pdf [2009, October 31]
4. สุพิสชา ธีรศาสวัต, กนกนันท์ ศรีจันทร์ และธันยชัย สุระ. 2005. กินอย่างไร ...เมื่อท่านเป็นธาลัสซีเมีย. จุลสารชมรมโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย 14(1): 11 – 12.
5. อุมาพร สุทัศน์วรวุฒิ. 2542. วิตามินและแร่ธาตุ : บทบาทในร่างกายและแนวทางการเลือกใช้. ในโภชนบำบัด 2000. อรอนงค์ กังสดาลอำไพ (บรรณาธิการ). หน้า 121-130. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดมาฉลองคุณ.

โรคธาลัสซีเมียนั้นเป็นโรคเรื้อรัง การเลือกรับประทานที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ผู้ป่วยอยู่กับโรคนี้อย่างมีความสุข

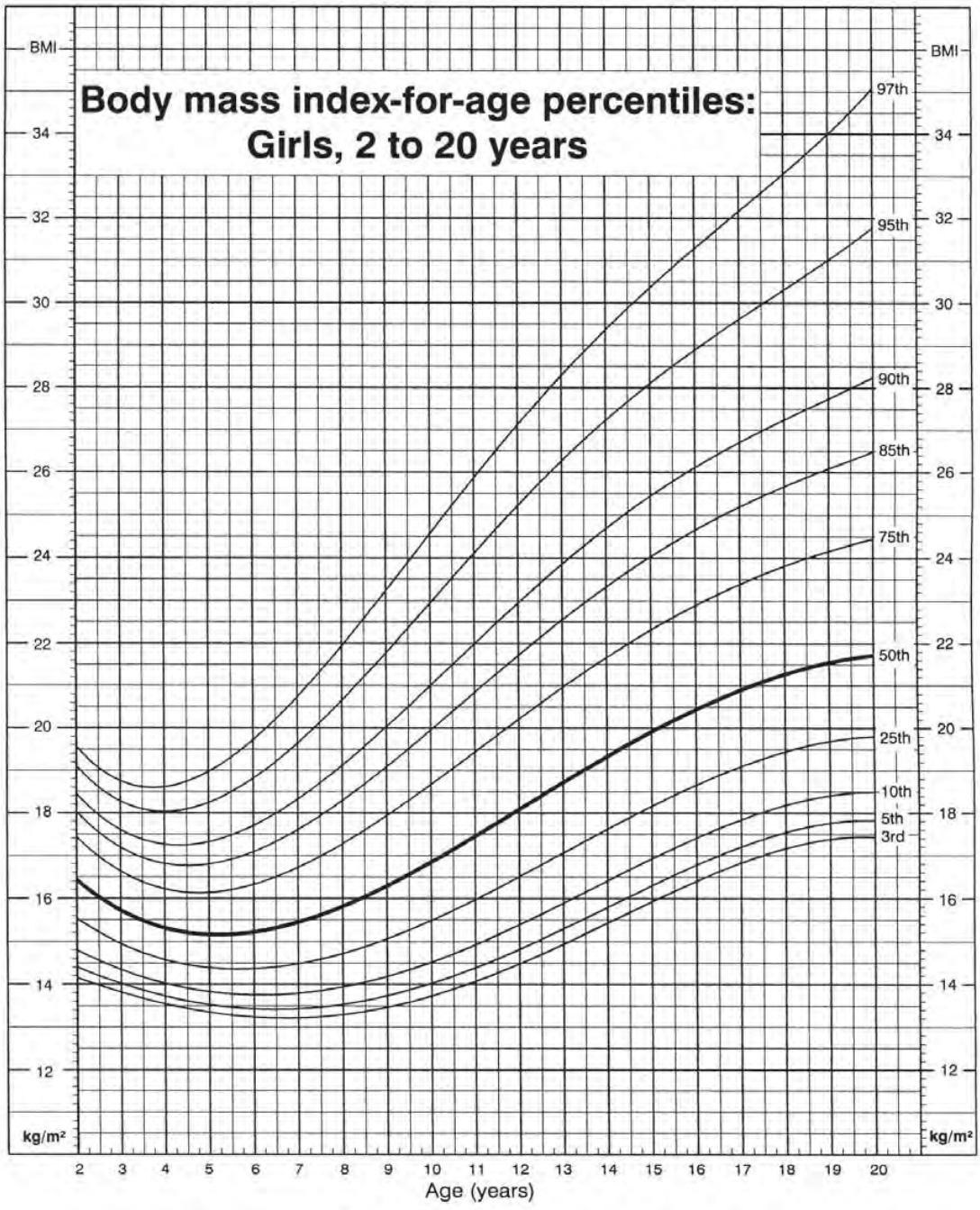


Appendix E

Graph BMI-for-age and gender



Body mass index for age (BMI-for-age) of boys 2-20 years



Body mass index for age (BMI-for-age) of girls 2-20 years

Appendix F

Statistical analysis

Statistical analysis

The statistics used in this study included Kolmogorov-Smirnov test for normal distribution data. Significant difference of values between groups at week 0 was tested by independent *t*-test and at week 12 was tested by analysis of covariance (ANCOVA). Paired *t*-test was used to test for significant difference between the values at week 0 and week 12 within group, Chi-Square test for comparing frequency of two groups and in each group.

The variables of this study included serum vitamin E, plasma MDA, CBC, total energy, intakes of protein, carbohydrate fat and anthropometry. The level of statistical significance was set at $p<0.05$.

Normal distribution test

One-sample Kolmogorov-Smirnov test was used to investigate whether the variables were normally distributed. The data showed that *p*-value of some tested variables were more than 0.05 (Table F-1). It suggested that parametric statistics could be used to compare mean of variables in this study.

Table F-1 The normal distribution test of variables by Kolmogorov-Smirnov test

Variables	groups	KS-value	df	*p*-value
Weight (kg)	Vitamin E (before)	0.802	9	0.541
	Vitamin E (after)	0.809	9	0.529
	Control (before)	0.514	8	0.954
	Control (after)	0.423	8	0.994
Height (m)	Vitamin E (before)	0.702	9	0.708
	Vitamin E (after)	0.608	9	0.854
	Control (before)	0.566	8	0.905
	Control (after)	0.579	8	0.890
BMI (kg/m^2)	Vitamin E (before)	0.813	9	0.523
	Vitamin E (after)	1.036	9	0.233
	Control (before)	1.240	8	0.092
	Control (after)	0.980	8	0.292
TSF (mm)	Vitamin E (before)	0.652	9	0.788
	Vitamin E (after)	0.579	9	0.891
	Control (before)	0.591	8	0.876
	Control (after)	0.395	8	0.998
MAC (cm)	Vitamin E (before)	0.737	9	0.650
	Vitamin E (after)	0.721	9	0.677
	Control (before)	0.646	8	0.799
	Control (after)	0.704	8	0.704
MAMC (cm)	Vitamin E (before)	0.439	9	0.990
	Vitamin E (after)	0.860	9	0.451
	Control (before)	0.529	8	0.943
	Control (after)	0.481	8	0.975

KS-value = Kolmogorov-Smirnov value; BMI= body mass index; TSF= triceps skinfold; MAC= mid-arm circumference; MAMC= mid-arm muscle circumference; kg= kilogram; m = meter; kg/m^2 = kilogram per metre square; mm= millimeter; cm= centimeter

*data were not normally distributed ($p<0.05$)

Table F-1 The normal distribution test of variables by Kolmogorov-Smirnov test

(continued)

Variables	groups	KS-value	df	*p*-value
Hb (g/dL)	Vitamin E (before)	0.509	9	0.958
	Vitamin E (after)	0.445	9	0.989
	Control (before)	0.481	8	0.975
	Control (after)	0.917	8	0.370
Hct (%)	Vitamin E (before)	0.572	9	0.899
	Vitamin E (after)	0.514	9	0.954
	Control (before)	0.655	8	0.784
	Control (after)	0.886	8	0.413
RBC (10^6/mL^3)	Vitamin E (before)	0.436	9	0.991
	Vitamin E (after)	0.802	9	0.541
	Control (before)	0.381	8	0.999
	Control (after)	0.597	8	0.868
MCV (fl)	Vitamin E (before)	0.484	9	0.973
	Vitamin E (after)	0.533	9	0.939
	Control (before)	0.696	8	0.717
	Control (after)	0.601	8	0.864
MCH (pg)	Vitamin E (before)	0.637	9	0.812
	Vitamin E (after)	0.527	9	0.944
	Control (before)	0.537	8	0.935
	Control (after)	0.707	8	0.699
MCHC (g/dL)	Vitamin E (before)	0.497	9	0.966
	Vitamin E (after)	0.487	9	0.972
	Control (before)	0.675	8	0.753
	Control (after)	0.673	8	0.756

KS-value = Kolmogorov-Smirnov value; Hb= hemoglobin; Hct= hematocrit; RBC= red blood cell indicies; MCV= mean corpuscular volume; MCH= mean corpuscular haemoglobin; MCHC= mean corpuscular haemoglobin concentration; 10^6/mL^3= 1,000,000 per cubic meter; g/dL= gram/deciliter; fl= femtoliters; pg= pictogram

*data were not normally distributed ($p<0.05$)

Table F-1 The normal distribution test of variables by Kolmogorov-Smirnov test

(continued)

Variables	groups	KS-value	df	*p*-value
RDW (%)	Vitamin E (before)	1.167	9	0.131
	Vitamin E (after)	0.631	9	0.821
	Control (before)	0.811	8	0.527
	Control (after)	0.921	8	0.364
MPV (fl)	Vitamin E (before)	0.596	9	0.870
	Vitamin E (after)	0.446	9	0.989
	Control (before)	0.856	8	0.456
	Control (after)	0.486	8	0.972
Serum vitamin E (µg/dL)	Vitamin E (before)	0.871	9	0.434
	Vitamin E (after)	0.553	9	0.920
	Control (before)	0.708	8	0.698
	Control (after)	0.728	8	0.664
Plasma MDA (µM)	Vitamin E (before)	0.715	9	0.687
	Vitamin E (after)	0.630	9	0.822
	Control (before)	0.751	8	0.626
	Control (after)	0.519	8	0.951
Total energy intake (kcal/day)	Vitamin E (before)	0.540	9	0.932
	Vitamin E (after)	0.475	9	0.978
	Control (before)	0.762	8	0.607
	Control (after)	0.567	8	0.905
Total protein (g/day)	Vitamin E (before)	0.664	9	0.770
	Vitamin E (after)	0.512	9	0.955
	Control (before)	0.516	8	0.953
	Control (after)	0.492	8	0.969

KS-value = Kolmogorov-Smirnov value; RDW= Red blood cell distribution width; MPV= Mean platelet volume; fl= femtoliters; µg/dL= microgram/ deciliter; µM= micromole/liter; kcal/day= kilocalories per day; g/day= gram per day

*data were not normally distributed ($p<0.05$)

Table F-1 The normal distribution test of variables by Kolmogorov-Smirnov test

(continued)

Variables	groups	KS-value	df	*p*-value
Total carbohydrate (g/day)	Vitamin E (before)	0.565	9	0.907
	Vitamin E (after)	0.968	9	0.306
	Control (before)	0.587	8	0.881
	Control (after)	0.443	8	0.990
Total fat (g/day)	Vitamin E (before)	0.600	9	0.864
	Vitamin E (after)	0.552	9	0.921
	Control (before)	0.341	8	1.000
	Control (after)	0.722	8	0.674
Total protein (kcal/day)	Vitamin E (before)	0.664	9	0.770
	Vitamin E (after)	0.512	9	0.955
	Control (before)	0.516	8	0.953
	Control (after)	0.492	8	0.969
Total protein (g/kg/day)	Vitamin E (before)	0.669	9	0.763
	Vitamin E (after)	0.533	9	0.939
	Control (before)	0.499	8	0.965
	Control (after)	0.488	8	0.971
% protein of total energy	Vitamin E (before)	0.665	9	0.769
	Vitamin E (after)	0.512	9	0.956
	Control (before)	0.516	8	0.953
	Control (after)	0.492	8	0.969
Total carbohydrate (kcal/day)	Vitamin E (before)	0.565	9	0.907
	Vitamin E (after)	0.968	9	0.306
	Control (before)	0.587	8	0.881
	Control (after)	0.443	8	0.990

KS-value = Kolmogorov-Smirnov value; µg/dL= microgram/ deciliter; µM= micromole/liter; kcal/day= kilocalories per day; g/day= gram per day; g/kg/day= gram per kilogram per day

*data were not normally distributed ($p<0.05$)

Table F-1 The normal distribution test of variables by Kolmogorov-Smirnov test

(continued)

Variables	groups	KS-value	df	*p*-value
%carbohydrate of total energy	Vitamin E (before)	0.565	9	0.907
	Vitamin E (after)	0.968	9	0.306
	Control (before)	0.587	8	0.881
	Control (after)	0.443	8	0.989
Total fat (kcal/day)	Vitamin E (before)	0.600	9	0.864
	Vitamin E (after)	0.552	9	0.921
	Control (before)	0.341	8	1.000
	Control (after)	0.722	8	0.674
% fat of total energy	Vitamin E (before)	0.600	9	0.864
	Vitamin E (after)	0.552	9	0.921
	Control (before)	0.341	8	1.000
	Control (after)	0.722	8	0.674

KS-value = Kolmogorov-Smirnov value; kcal/day= kilocalories per day

*data were not normally distributed ($p<0.05$)

BIOGRAPHY

NAME	Miss Duangkamon Ngarmpattarangkoon
DATE OF BIRTH	December 10, 1979
PLACE OF BIRTH	Bangkok, Thailand
INSTITUTIONS ATTENDED	Silpakorn University, 1998-2003; Bachelor of Science in Pharmacy Chulalongkorn University, 2008-2010; Master of Science in Pharmacy (Food Chemistry and Medical Nutrition)
OCCUPATIONS	Pharmacist at Siriraj Hospital, 2003-present
ADDRESS	733 Thoet Thai Rd Bangwa Pasrijareon Bangkok, Thailand 10160