

EFFECT OF FOLIC ACID SUPPLEMENTATION
ON PLASMA HOMOCYSTEINE LEVEL IN OBESE CHILDREN:
A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL

Mrs. Orawan Iamopas

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Health Development
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ผลของการให้กรดโพลีคต่อระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือดในผู้ป่วยเด็กอ้วน

การวิจัยเชิงทดลองแบบสุ่มปกปิดและมีกลุ่มควบคุม

นางอรวรรณ เอี่ยมโอกาส

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการพัฒนาสุขภาพ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title EFFECT OF FOLIC ACID SUPPLEMENTATION ON
 PLASMA HOMOCYSTEINE LEVEL IN OBESE CHILDREN:
 A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-
 CONTROLLED TRIAL

By Mrs. Orawan Iamopas

Field of study Health Development

Thesis Advisor Assistant Professor Sirinuch Chomtho, MD, PhD

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements of the Master's Degree
.....Dean of the Faculty of Medicine
(Associate Professor Sophon Napathorn, MD)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Sungkom Jongpiputvanich, MD)

.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Sirinuch Chomtho, MD, PhD)

.....Examiner
(Associate Professor Somrat Lertmaharit)

.....External Examiner
(Associate Professor Umaporn Suthutvoravut, MD)

อรวรรณ เอี่ยมโอภาส: ผลของการให้กรดโฟลิกต่อระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือดในผู้ป่วยเด็กอ้วน การวิจัยเชิงทดลองแบบสุ่มปกปิดและมีกลุ่มควบคุม (EFFECT OF FOLIC ACID SUPPLEMENTATION ON PLASMA HOMOCYSTEINE LEVEL IN OBESE CHILDREN: A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร.พญ. ศิรินุช ชมโท, 67 หน้า

บทนำ: เด็กอ้วนมีแนวโน้มที่จะได้รับวิตามินโฟเลตจากอาหารไม่เพียงพอ ซึ่งโฟเลตเป็นปัจจัยร่วมที่สำคัญในการเปลี่ยนโฮโมซิสเตอีนเป็นเมทิลโฮโมซิสเตอีน การขาดวิตามินโฟเลต จะทำให้ระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือดสูงได้

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของการให้กรดโฟลิกต่อระดับโฮโมซิสเตอีนในเด็กอ้วน

วิธีการศึกษา: เป็นการวิจัยเชิงทดลองแบบสุ่มปกปิดและมีกลุ่มควบคุมในเด็กอายุ 9-15 ปี ซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคอ้วนและได้รับการสุ่มเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มศึกษาเป็นกลุ่มที่ได้รับกรดโฟลิกขนาดเม็ดละ 5 มิลลิกรัม ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับยาหลอกที่มีลักษณะภายนอกและรสชาติเหมือนกรดโฟลิก ผู้เข้าร่วมวิจัยได้รับยารวันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 2 เดือน การศึกษานี้มีการตรวจเลือดเมื่อก่อนเริ่มและสิ้นสุดการให้ยาเพื่อวัดระดับโฮโมซิสเตอีน วิตามินบี12 โฟเลต ไขมัน น้ำตาลอินซูลิน รวมทั้งมีการประเมินค่ากิจกรรมการเคลื่อนไหวทางร่างกาย ปริมาณวิตามินบี12 และโฟเลตที่ได้รับจากอาหาร

ผลการศึกษา: มีผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งหมด 50 ราย เป็นเด็กชาย 31 คน มีอายุเฉลี่ย 10.9 ปีและมีคะแนนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของดัชนีมวลกายเฉลี่ยเท่ากับ 3.41 เมื่อสิ้นสุดการได้รับยา กลุ่มทดลองมีการลดลงของระดับโฮโมซิสเตอีน ร้อยละ 15.75 ส่วนกลุ่มควบคุมลดลงร้อยละ 6.99 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากมีการควบคุมตัวแปรระดับโฮโมซิสเตอีนเมื่อเริ่มต้นและตัวแปรอื่นๆแล้ว นอกจากนี้ยังพบการลดลงของโฮโมซิสเตอีนในเด็กชายมากกว่าเด็กหญิงและยังพบการลดลงของโฮโมซิสเตอีนในกลุ่มที่มีระดับโฟเลตในเลือดต่ำได้มากกว่ากลุ่มที่มีระดับโฟเลตในเลือดสูง

สรุป: การให้กรดโฟลิกสามารถลดโฮโมซิสเตอีนได้ในเด็กอ้วนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กชายและกลุ่มที่มีโฟเลตต่ำ ในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมระยะยาวเพื่อประเมินผลของโฮโมซิสเตอีนที่ลดลงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในเด็กอ้วน

สาขาวิชา การพัฒนาสุขภาพ.....ลายมือชื่อนิติศ.....
ปีการศึกษา 2555.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

##547 49203 30: MAJOR HEALTH DEVELOPMENT

KEYWORDS: FOLIC ACID/ FOLATE/ HOMOCYSTEINE/ OBESE/ CHILDREN

ORAWAN IAMOPAS: EFFECT OF FOLIC ACID SUPPLEMENTATION ON PLASMA HOMOCYSTEINE LEVEL IN OBESE CHILDREN: A RANDOMIZED, DOUBLE BLINDED, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL. ADVISOR: ASST. PROF. SIRINUCH CHOMTHO, MD, PhD, 67 pp.

Background: Obese children tend to consume low dietary folate which is an important cofactor in remethylation of homocysteine to methionine, leading to hyperhomocysteinemia.

Objective: To determine whether folic acid supplementation could reduce plasma homocysteine in obese children.

Design: Obese children aged 9-15 years with body mass index > median plus 2 SD according to the WHO reference were randomly allocated into 2 groups: receiving either 5 mg folic acid or placebo for 2 months. Fasting homocysteine, creatinine, folate, vitamin B12, insulin, glucose and lipid profiles were taken at baseline and the end of study. Dietary folate intake and physical activity were assessed using validated questionnaires.

Results: A total of 50 obese children (31 boys) took part in the study. Their mean age was 10.9±1.6 years and mean BMI Z-score was 3.41±0.69. After the intervention, plasma homocysteine decreased by 15.75% and 6.99% in the folic acid and placebo group, respectively (mean difference 8.76%; 95%CI: 0.26%, 17.25%, $p= 0.044$). This divergence was more pronounced in boys and it remained significant after adjusting for baseline homocysteine and other confounders. Subgroup analysis showed a larger magnitude of plasma homocysteine reduction in the low folate group

Conclusions: The homocysteine lowering effect of folic acid supplementation was found in obese children especially in boys and those with low serum folate. The further long-term interventional study is needed to determine the effect of the lowered plasma homocysteine on the cardiovascular outcomes in obese children.

Field of study: Health Development.. Student's signature.....

Academic Year: 2012..... Advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express my heart-felt thank all staffs at Queen Sirikit National Institute of Child Health and at the Clinical Epidemiology Unit, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for helpful suggestions and supports. I also thank Assistant Professor Dr. Sirinuch Chomtho for excellent suggestions and comments, Associate Professor Suntaree Ratanachu-ek for helpful supports, Assistant Professor Dr. Chulaluk Komoltri for statistical analysis and valuable suggestions, Dr. Suchada Nilkumhang Wilkinh and Miss Raviwan Wittawassamrankul for placebo tablets production and packaging.

This study was supported by THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATION.....	xi
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Rationale and backgrounds.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	3
2.1 Review of Related Literatures.....	3
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY.....	7
3.1 Research Questions.....	7
3.2 Research Objectives.....	7
3.2.1 Primary Objective.....	7
3.2.2 Secondary Objective.....	7
3.3 Hypothesis.....	7
3.4 Conceptual Framework.....	8
3.5 Keywords.....	8
3.6 Operational Definitions.....	8
3.7 Research Design.....	9
3.8 Research Methodology.....	9
3.8.1 Population and Sample.....	9
3.8.2 Inclusion Criteria/Exclusion Criteria.....	10
3.8.3 Sample Size Estimation.....	10
3.8.4 Randomization and Allocation Concealment.....	11

	Page
3.8.5 Intervention.....	11
3.9 Research Administration.....	12
3.10 Data Collection.....	12
3.11 Data Analysis.....	14
3.12 Ethical Consideration.....	16
3.13 Limitation.....	16
3.14 Expected benefit of the study.....	16
CHAPTER IV RESULTS.....	17
4.1 Participants characteristics	17
4.2 Outcome of treatment.....	20
CHAPTER V DISCUSSION.....	29
CHAPTER VI CONCLUSION.....	34
REFERENCES.....	35
APPENDICES.....	43
APPENDIX A Case Record Form.....	44
APPENDIX B Information sheet.....	48
APPENDIX C Consent and assent form.....	52
APPENDIX D Semi quantitative food frequency questionnaire.....	56
APPENDIX E Three-day food record form.....	61
APPENDIX F Physical activity questionnaire.....	65
VITAE.....	67

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Demographic and baseline characteristics data.....	19
2. Comparison of changes in clinical characteristics after the intervention period.....	21
3. Comparison of mean change of homocysteine level in two study groups.....	22
4. Subgroup analysis in boys.....	23
5. Subgroup analysis in girls.....	23
6. Percent change of homocysteine level: multiple linear regression analysis....	25
7. Subgroup analysis in low folate level group.....	25
8. Subgroup analysis in high folate level group.....	26
9. Correlations of baseline homocysteine and other clinical parameters.....	28

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Conceptual framework.....	8
2. Research administration.....	12
3. Flow diagram of subject progress through the phase of randomized trial.....	18
4. Comparison of the percentage change in homocysteine levels by gender.....	24
5. Comparison of the percentage change in homocysteine levels by serum folate.....	26

LIST OF ABBREVIATIONS

CVD	Cardiovascular disease
BMI	Body mass index
Hcy	Homocysteine
SBP	Systolic blood pressure
DBP	Diastolic blood pressure
TC	Total cholesterol
TG	Triglyceride
HDL-C	High density lipoprotein- cholesterol
LDL-C	Low density lipoprotein- cholesterol
HOMA-IR	Homeostasis model for assessment of insulin resistance
FFQ	Food frequency questionnaire
PA	Physical activity
RCTs	Randomized controlled trials
CI	Confidence interval
SD	Standard deviation
Z score	Standard deviation score

CHAPTER I

INTRODUCTION

1.1 Rationale and backgrounds

Homocysteine (Hcy) is a sulfur-containing intermediate product in the normal metabolism of essential amino acid methionine. Hyperhomocysteinemia has been found to be an independent risk factor for atherosclerosis and cardiovascular disease (CVD); it is responsible for about 10% of total CVD risks [1-3]. Mechanisms of hyperhomocysteine associated with atherosclerosis are alteration of vascular morphology, inflammatory stimulation, blood clotting cascade, and inhibition of fibrinolysis [2, 4, 5]. Contributing factors for hyperhomocysteinemia are increasing age, male sex, gene mutation, drugs, smoking, excessive caffeine intake, physical inactivity, renal dysfunction, and vitamin deficiency [6-8]. Several studies in adults showed that reduction of elevated plasma homocysteine may prevent up to 25% of cardiovascular events [2, 3, 9, 10].

Many studies suggested that obesity induced atherosclerosis may start in childhood because they demonstrated an increase in intima-media thickness, impaired flow-mediated dilatation, endothelial dysfunction and vascular damage in obese children [11-14]. Early intervention to improve endothelial function in obese children, in addition to metabolic and weight control could potentially prevent atherosclerosis in their adult life. Besides, more recent studies revealed that plasma homocysteine levels in obese children were higher than their non-obese peers [15-17].

One of the modifiable causes of hyperhomocysteinemia is vitamin deficiency, especially folate because it is an important cofactor in the remethylation of homocysteine to methionine. Most common cause of folate deficiency is inadequate intake. Folate is sensitive to heat, storage, and light. Good dietary sources of folate are green leafy vegetables, fruits, and cereals. Recommendation for dietary folate intake is

5 servings of fruits and vegetables a day (600-700 g), approximately 400 µg of dietary folate equivalent (DEF). Previous report showed that daily intake in EU adult was approximately 250 -300 µg DEF [2, 18, 19]. Then it is difficult to meet dietary folate requirement in most population. Previous studies showed that obese children consumed less dietary folate than normal children [20] and demonstrated inadequate dietary folate intake according to the Dietary Reference Intake (DRI) [21]. We postulated that Thai obese children might be at risk of folate deficiency due to an unbalanced diet (low vegetables and high fat intake) as well as a high prevalence of thalassemia.

Folic acid supplementation is safe, inexpensive and has been found to improve homocysteine levels in children with different types of diseases [22-27]. However, no data has been reported about the effect of folic acid supplementation on homocysteine level in obese children.

CHAPTER II
LITERATURE REVIEW

2.1 Review of Related Literatures

Homocysteine in children

Many studies reported on homocysteine levels in children. The level were approximately between 6-11 $\mu\text{mol/L}$, depended on country, study population, age, sex and serum folate level. Most studies concluded that homocysteine levels were increasing with age and boys were found to have higher level than girls and there were negative association with serum folate and vitamin B 12. Some studies reported that homocysteine levels were higher in obese children than in non- obese.

Authors	Country year	Population	Mean homocysteine level ($\mu\text{mol/L}$)
Chang JB[28]	Taiwan 2003	1,234 school children age 12-15 y	M: 10.50 \pm 4.13 F: 8.95 \pm 2.61
Huemer M[29]	Austria 2006	264 children Age 2-17 y	M: 6.5 \pm 1.1 F: 6.6 \pm 1.1
Narin F[15]	Turkey 2005	40 obese, 20 non-obese Age 7-17 y	Obese: 14.3 \pm 11.8 Non-ob: 8.7 \pm 5.9
Economou EV[30]	Greece 2005	72 obese, 42 non-obese Age 9-10 y	Obese: 8.4 \pm 0.5 Non-ob: 7 \pm 0.3
Papandreou D[31]	Greece 2007	524 school children Age 6-15 y	Median(range) Obese: 8.4(6.2-29) Non-ob: 7.8(3.4-12.2)
Zhu W[16]	China 2008	41 obese 27 non-obese Age \sim 11 y	Obese: 7.8 \pm 2.8 Non-ob: 5.5 \pm 2.1
Codoñer-Franch P[17]	Spain 2010	63 obese 44 non-obese Age 7-14 y	Obese: 7.92 \pm 3.31 Non-ob: 6.84 \pm 1.67

Dietary folate intake and serum folate in children

Gillis L[20] reviewed dietary information from the charts of 156 obese children and 90 non-obese children and reported that obese consume less dietary folate & vitamin B12 compare with non-obese. Moreover, prevalence of folate inadequacy in obese were higher than those in non obese peers (47% vs 38%).

Homocysteine lowering intervention

Homocysteine lowering trialists' collaboration [32] did meta-analysis of randomized controlled trials to determine the size of reduction in homocysteine concentration produced by folic acid supplementation and with the addition of vitamin B12 and vitamin B6. They found that reductions in homocysteine concentration produced by folic acid supplementation by 25% (95% CI 23% to 28%; $P < 0.001$) with similar effects in range of 0.5-5 mg folic acid daily. Vitamin B12 produced an additional 7% (3% to 10%) reduction in homocysteine level.

Solini A and team [33] investigated the effect of folic acid supplementation on insulin sensitivity and inflammatory markers in overweight adults (BMI 25-29 kg/m^2). The study was a randomized placebo controlled trial. Participants ($n=41$) were assigned to receive either placebo or folic acid 2.5 mg/day for 3 months. The results showed that serum folate levels increased and serum homocysteine decreased from baseline but no statistical significant difference.

Sheu WH et al [34] studied in obese woman ($n=74$) who were randomized to take either folic acid 5 mg/day or placebo for 12 weeks. In the folic acid group, serum folate concentrations increased and there was a trend of lower serum homocysteine concentrations (7.6 ± 0.2 vs 7.3 ± 0.3 $\mu\text{mol/L}$) but no statistical significant difference ($p=0.17$). However, they found that serum homocysteine concentrations decreased significantly in those with higher baseline homocysteine concentrations (8.7 ± 1.3 vs 7.8 ± 1.5 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.004$).

Gargari BP and team [35] performed a double blinded controlled trial to determine the effects of 5mg/day of folic acid supplementation on biochemical indices in overweight and obesity men with type 2 DM. A significant increment in serum folate and vitamin B12 level were observed (19% and 17.3%, $p < 0.001$, respectively). Plasma homocysteine level decreased significantly (21%, $p < 0.000$).

Papandreou D et al [22] examined the effects of folic acid on serum homocysteine, folate, vitamin B12 and blood pressure in healthy hyperhomocysteinemia children aged 6-15 years. The study compared the intervention group with 5 mg of oral folic acid twice per week for 2 months (n=20) and control group with folate-riched food (500 mcg/day) (n=6). Results shown that serum homocysteine as well as blood pressure were statistically significant decreased in the intervention group compared with the controls, while serum folate levels were statistically significant increased.

Peña AS et al [36] did the randomized, double-blinded, placebo-controlled crossover trial to evaluate effect of folic acid supplementation on endothelial function in children and adolescents with type 1 diabetes (n=36) using brachial artery response to flowed-mediated dilatation (FMD). Each subject received 5 mg per day of folic acid for 8 weeks and 8 weeks for placebo, with 8 weeks washout period. Results showed folic acid increased FMD whereas placebo did not change. Homocysteine was not changed by the intervention.

Peña AS et al [27] also did the other randomized, double-blinded, placebo-controlled trial to evaluate effect of folic acid supplementation on endothelial function in obese children (n=53). There were no significantly changes of FMD with the intervention. Folic acid supplementation increased serum folate and decreased homocysteine by 0.95 $\mu\text{mol/L}$ (95% CI, -1.45 to -0.45; $p = 0.008$).

Homocysteine and folate in Thailand

Leowattana W et al [37] investigated the association between serum homocysteine, vitamin B12 and folate levels with ischemic heart disease in 178 coronary artery disease patients and 178 healthy controls by age and sex matching. They concluded that serum homocysteine concentrations were significantly higher in CAD patients than in controls (23.83 ± 11.29 vs 19.69 ± 8.51 $\mu\text{mol/L}$; $p < 0.001$). Serum vitamin B12 and folate levels were not statistically significantly different between 2 groups.

Leowattana W et al [38] performed a survey in 3,345 healthy subjects. They found that prevalence of hyperhomocysteine ($\text{Hcy} > 12$ $\mu\text{mol/L}$) were 33.6% in males and 6.7% in females.

Tuntrongchitr R et al [39] did cross-sectional study in obese and normal-weight volunteers. Statistically significantly higher levels of homocysteine were found in the overweight adults. Serum folates in overweight and obese were found to be statistically significantly lower than in the control adults.

Kwanbunjan K et al [40] surveyed the health and nutritional status, especially folate, of school children and women of childbearing age in a remote area of Thailand. They found that the children had low dietary folate intake and low serum folate level (22%-47% depending on age).

Parinyapoonno S [21] studied in the students of the secondary school in Bangkok. She founded that overall had low dietary folate intake and low serum folate level (< 3 ng/mL) were detected in both obese group and normal-weight group (48% and 43% respectively).

CHAPTER III

RESEARCH METHODOLOGY

3.1 Research Questions

Primary research question

Is there any difference in the mean change of homocysteine level in folic acid supplementation group comparing with those of placebo group?

Secondary research question

Are there any factors correlating with baseline of homocysteine level?

3.2 Research Objectives

Primary objective

To determine whether folic acid supplementation could reduce plasma homocysteine in obese children

Secondary objective

To determine the correlation between factors and baseline of homocysteine level

3.3 Hypothesis

Research hypothesis

The mean change of homocysteine level in folic acid supplementation group comparing with those of placebo group should be similar.

Statistical hypothesis

Null hypothesis

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$$

Alternative hypothesis

$$H_a: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

μ_1 = the mean change of homocysteine level in folic acid supplementation group

μ_2 = the mean change of homocysteine level in placebo group

3.4 Conceptual framework

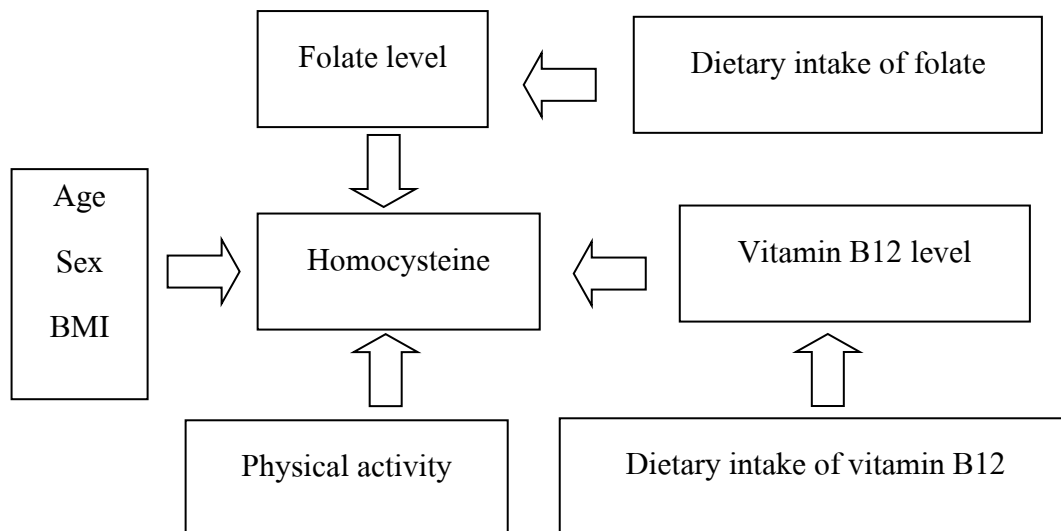


Figure 1 Illustration of conceptual framework

3.5 Keywords

Folic acid, Folate, Homocysteine, Obese, Children

3.6 Operational Definitions

Obesity is defined by body mass index more than median plus 2SD for age and sex according to WHO reference 2007 [41].

Secondary obesity: obesity from other causes eg. syndromic obesity (such as Prader-Willi syndrome, Laurence–Moon-Biedl syndrome, Bardet-Biedl syndrome), skeletal dysplasia, and Cushing syndrome.

Body mass index (BMI) is calculated by weight in kilograms divided by the square of height in meters.

Semi quantitative food frequency questionnaire composes of food lists, serving size and frequency of various food items [21]. The results were reported in $\mu\text{g/day}$ of dietary folate intake.

3 days dietary record: the 3 days dietary record technique is used to collect dietary intake information for a total of 3 days (2 weekdays and 1 weekend day).

Physical activity

International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) in short last 7 days format was used to assess physical activity (PA). This questionnaire was validated and tested for reliability by international collaboration on IPAQ in 2002 [42]. The IPAQ criteria by which PAs are classified as of vigorous or moderate intensity were underlined. The physical activity score for each vigorous, moderate and walking PA was calculated and expressed in MET-minutes per week. According to the IPAQ MET-scoring method, vigorous PA score is equal to vigorous weekly PA expenditure multiplied by 8 METs. Moderate weekly PA expenditure is multiplied by 4 METs and walking PA by 3.3 METs to calculate moderate and walking PA score, respectively. Total PA score is the sum of vigorous, moderate and walking PA scores.

3.7 Research Design

A randomized, double-blind, placebo-controlled trial

3.8 Research Methodology

3.8.1 Population and Sample

Target population: Obese children

Study population: Obese children at OPD nutrition, Queen Sirikit National Institute of Child Health

Sample: Obese children at OPD nutrition, Queen Sirikit National Institute of Child Health within approximately 1 year (May 2012- February 2013)

3.8.2 Inclusion Criteria/Exclusion Criteria

Inclusion criteria: all the followings.

1. Age between 9-15 years
2. Diagnosed obesity: BMI > median plus 2SD for age and sex according to WHO reference 2007 [41]

Exclusion criteria: one of the followings

1. Secondary obesity
2. Thalassemia disease
3. Renal and hepatic dysfunction
4. Medications that alter the level of blood pressure, homocysteine, glucose or lipid profiles such as anticonvulsant, estrogen, thiazides, metformin, cholestyramine, methotrexate, fibrates, and nicotinic acid
5. Previous vitamin supplementation 1 month before study

3.8.3 Sample Size Estimation

As primary objective of this study aimed to detect the difference in 2 independent means, therefore sample size was calculated from this formula

$$n / \text{group} = \frac{2 \sigma^2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Given the alpha error = 0.05 (2-sided), $Z_{\alpha/2} = 1.96$

The beta error = 0.1 (power is 90%), $Z_{\beta} = 1.28$

X_1 = the mean change of homocysteine level in control group

X_2 = the mean change of homocysteine level in intervention group

σ = standard deviation of change of homocysteine from control and intervention groups

From previous study [32], $\sigma^2 = 6.08$ and the difference of mean change of plasma homocysteine was 2.5 $\mu\text{mol/L}$ which would represent minimal clinically

significant difference, and then calculated n per group is approximately 20. We estimated drop out patients for 20%, then adjusted n is 25 patients per group and total sample size is 50.

3.8.4 Randomization and Allocation Concealment

Since homocysteine level maybe influenced by sex, the participants were stratified by sex to make a balance between two study groups before randomly allocated. The two separate randomization lists was performed by using computer generated mixed-size block randomization (1:1 ratio), strata one for male and strata two for female. The participants were stratified into these strata and assigned a treatment code. Each treatment code was concealed in opaque envelop. The investigators, participants and personnel involved in the study were blinded to the treatment assignment. Only one pharmacist, who was unrelated to the study, knew the codes of treatment and placebo which were revealed after data analysis.

3.8.5 Interventions

All participants were randomly allocated into two groups receiving either 5 mg folic acid or placebo orally for two months. Both folic acid and placebo tablets were produced by the Government Pharmaceutical Organization, Ministry of Public Health, Thailand; they were similar in characteristic and taste. All participants were advised to follow a standard weight management program which was based on current dietary recommendations for obese children [43] and followed up every month. In order to control co-intervention, other vitamins supplementations were not allowed during the study. Moreover, both participants and investigators were blinded to equalize unknown co-intervention.

3.9 Research Administration

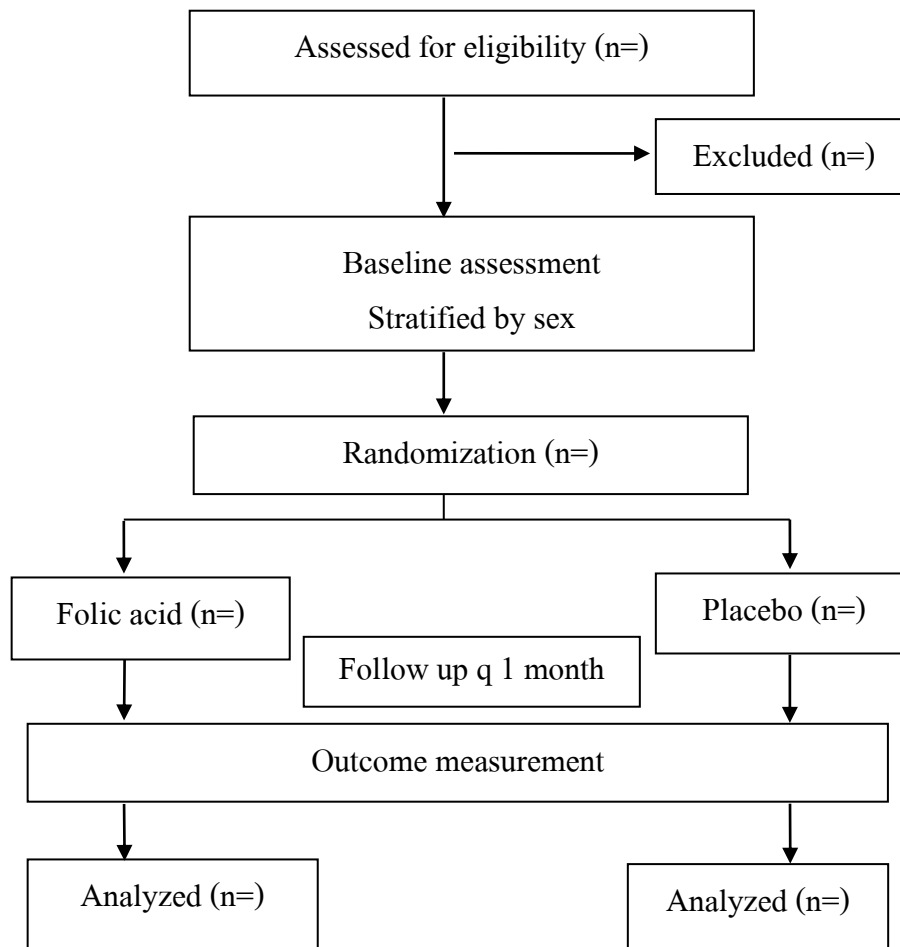


Figure 2 Illustration of research administration

3.10 Data Collection

1. Demographic data: age, gender
2. Baseline characteristics and anthropometric assessment

Weight and height were measured without shoes and with light clothing using stadiometer to the nearest 0.1 cm and electronic digital scale to the nearest 0.1 kg, respectively. BMI and BMI Z score were calculated based on WHO 2007 growth reference using WHO AnthroPlus program [41]. Waist circumference was measured with participants in a standing position at the midpoint between the lower edge of the

ribs and the top of the iliac crest after normal exhalation. Blood pressure was measured after 10 minutes rest in sitting position using sphygmomanometer and the appropriate cuff according to the size of the upper arm. Anthropometric assessment and blood pressure measurement were done every visit.

3. Biochemical analysis

Venous blood samples were collected after 12-hour overnight fasting by trained nurses at baseline and the end of the study. The tubes were immediately centrifuged to obtain either plasma or serums which were stored at -20 °c until analysis. Routine enzymatic methods were used to analyze for hemoglobin, creatinine, lipid profiles, glucose, and insulin levels. Plasma homocysteine was determined using fluorescence polarization immunoassay method (ABBOT IMx Analyzer, Axis-shield, Dundee, UK). Serum folate and vitamin B12 were measured using electrochemiluminescence immunoassay method (Roche Diagnostics, Mannheim. Germany). The homeostasis model for assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the following equation: $[\text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{IU/mL})] / 22.5$ [44].

4. Dietary and physical activity assessment

Dietary intakes of folate and vitamin B12 were assessed at every visit with a 3-day dietary record and a validated semi-quantitative food frequency questionnaire for dietary folate intake [21]. Physical activity was assessed at every visit by using The International Physical Activity Questionnaire in the short last 7 days format [42].

5. Compliance

All participants were called once a week to ensure their compliance with the dosing regimen. During the follow-up visit, they were also asked to return the remained tablets which were counted and calculated for the percentage of compliance. Eighty percent of compliance was considered acceptable.

Data	M0	M1	M2
height, weight, waist circumference, BP	X	X	X
Hb, creatinine	X		
lipid profile, fasting blood sugar, vitamin B12, homocysteine, folate	X		X
Semi quantitative food frequency questionnaire	X	X	X
3 days dietary record	X	X	X
Physical activity questionnaire	X	X	X

3.11 Data Analysis

1. Demographic data and baseline variables

Demographic data and health characteristics were analyzed by descriptive statistics and presented according to type of data; categorical data were presented with number and percentage and continuous data were presented with mean \pm SD or median (range), where appropriate. One-sample Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate if data were normally distributed.

2. Primary and secondary outcome variables

Primary outcome

Change of homocysteine levels from baseline to completion of treatment were calculated from homocysteine level at the end of the study minus baseline homocysteine level. Change of homocysteine levels of both study groups were presented with mean \pm SD or median (interquartile range), where appropriate. Independent samples t-test was used to compare the difference in mean change of homocysteine level between groups if the data appeared in normal distribution. If the data were not normal distribution the Mann-Whitney U test will be applied. Subgroup analyses were performed by baseline serum folate levels (below or above median).

Multiple linear regression analysis was applied to adjust the effects of baseline homocysteine and vitamin B12 on the change in homocysteine level between treatment groups.

Characteristics	Types of variables	Statistics
Age (yrs)	Continuous	Mean, SD
Male/female	Categorical	N (%)
Weight (kg)	Continuous	Mean, SD
Height (cm)	Continuous	Mean, SD
BMI (kg/ m ²)	Continuous	Mean, SD
Hb (g/dl)	Continuous	Mean, SD
Creatinine (mg/dL)	Continuous	Mean, SD
Total cholesterol (mg/dL)	Continuous	Mean, SD
HDL-C (mg/dL)	Continuous	Mean, SD
LDL-C (mg/dL)	Continuous	Mean, SD
Triglyceride (mg/dL)	Continuous	Mean, SD
FBS (mg/dL)	Continuous	Mean, SD
Insulin (μIU/mL)	Continuous	Mean, SD
HOMA-IR	Continuous	Mean, SD
Homocysteine(μmol/L)	Continuous	Mean, SD
Serum folate (ng/ml)	Continuous	Mean, SD
Serum vitamin B12(pg/ml)	Continuous	Mean, SD
Average dietary folate (μg/day)	Continuous	Mean, SD
Average dietary vitamin B12 (μg/day)	Continuous	Mean, SD
Average physical activity score (Met-minutes /week)	Continuous	Mean, SD
Compliance (%)	Continuous	Mean, SD

Secondary outcome

Pearson's correlation analysis was used to determine the associations between baseline homocysteine and independent variables including insulin, lipid profiles, folate, vitamin B12 levels and dietary factors.

3.12 Ethical Consideration

The research proposal must be approved by the ethics committee before starting the study. Consent form and/or assent form should be informed.

About the folic acid, there is few side effect of folic acid. This drug is safe and we can use it even in pregnant woman. However, excessive folic acid supplements (> 1 mg/day) may obscure and potentially delay diagnosis of vitamin B12 deficiency. Therefore we check baseline B12 level before start treatment.

There were a lot of personal data, so all the data was kept in personal computer belonging to the investigator and accessing the data need specific code. Results of the study would be presented in general, not in individual data.

3.13 Limitation

Homocysteine is a surrogate marker for atherosclerosis risk. End results of atherosclerosis such as stroke, ischemic heart disease, and cardiovascular death cannot be identified in the study of children.

3.14 Expected benefit of the study

If folic acid supplementation can decrease plasma homocysteine, this intervention could initiate further study on early intervention for obese children to reduce CVD risk. In addition, we will have data to convince physician to give an advice and encourage obese children and their parents about the benefit of folate-rich food.

CHAPTER IV

RESULTS

4.1 Participants characteristics

Eighty-nine participants were assessed for eligibility. There were 9 participants who were excluded due to usage of vitamins, metformin as well as anticonvulsants and 30 participants declined to participate in the study. A total of 50 participants were recruited and randomly allocated into 2 groups: 26 for folic acid group and 24 for control group. Three participants in the folic acid group and one in the control group withdrew their consent during the follow up due to lack of time to participate (Figure 3). The demographic data and baseline characteristics of both groups were compared and presented in Table 1. The mean age of the participants was 10.9 ± 1.6 years (range 9- 14.5 years) and 62 %were boys. Their mean BMI Z score was 3.41 ± 0.69 . The hemoglobin and creatinine were within normal range. According to the International Diabetes Federation criteria[45], metabolic syndrome risk factors were determined as follows: hypertension,12%; hypercholesterolemia,32%; high LDL cholesterol, 32%; low HDL cholesterol, 30%; hypertriglyceridemia, 22%; impaired fasting glucose, 8%. There were no significant differences in the baseline anthropometry and clinical characteristics except for systolic blood pressure (SBP), high density lipoprotein cholesterol (HDL- C) and serum vitamin B12 which were higher in the placebo group. Baseline homocysteine were comparable in both groups (8.02 ± 2.12 and 8.18 ± 1.39 , range 4.47-13.31 $\mu\text{mol/L}$). There was no significant difference of baseline homocysteine between boys and girls (8.08 ± 1.69 and $8.14 \pm 2.01 \mu\text{mol/L}$). Prevalence of hyperhomocysteinemia was found to be 10% according to the age specific reference cut-off values that were more than 95th percentiles [46]. None of the participants had low serum folate or vitamin B12 according to the reference range at $> 3 \text{ ng/ml}$ and 130-785 pg/ml, respectively [47]. The average dietary folate intakes were similar in the two

groups (78.46 ± 24.96 and 91.27 ± 42.24 μg per day in folic acid group and control group, respectively) but much lower than the recommended intake at 300-400 μg per day of Thai DRI. On the contrary, average dietary vitamin B12 intakes were above the Thai DRI at 1.8-2.4 μg per day [48]. There were no differences in their physical activity levels between the two groups. The compliance rate was similar at around 84% which was acceptable. No adverse side effects were reported.

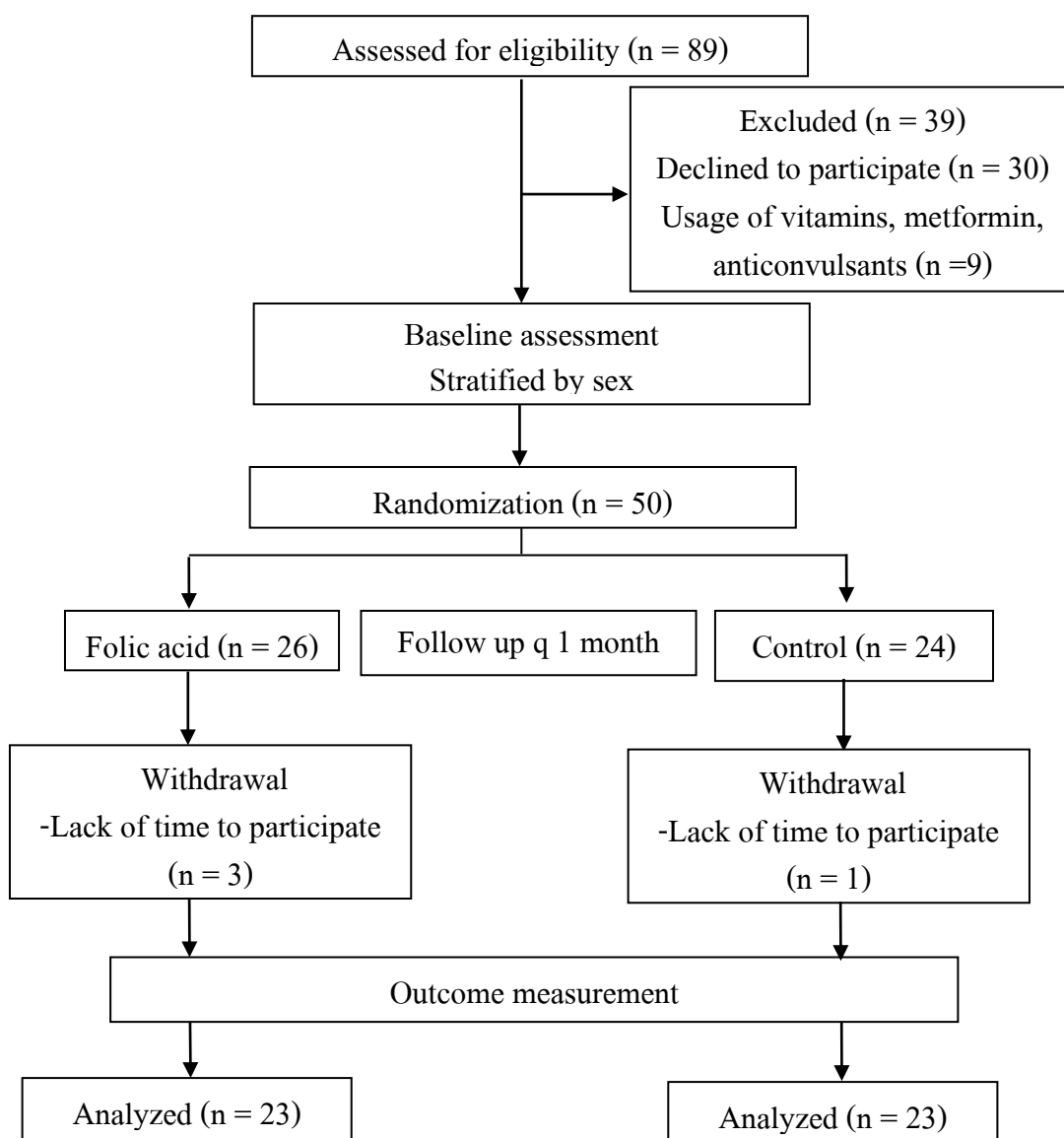


Figure 3 Illustration of flow diagram of subject progress through the phase of randomized trial

Table 1 Demographic and baseline characteristics data¹

	Folic acid (n=26)	Placebo (n=24)
Age (years)	11.08 ± 1.57	10.73 ± 1.64
Sex (male)	16 (61.5%)	15 (62.5%)
Weight (kg)	74.99 ± 17.06	72.98 ± 18.86
Height (cm)	152.29 ± 10.91	148.79 ± 9.66
BMI (kg/ m ²)	31.96 ± 4.15	32.57 ± 5.62
BMIZ score	3.32 ± 0.61	3.52 ± 0.77
Waist circumference (cm)	96.47 ± 10.18	96.06 ± 10.38
SBP (mmHg)*	112.12 ± 8.10	118.46 ± 9.10
DBP (mmHg)	67.69 ± 11.40	67.38 ± 7.65
Hb (g/dl)	12.94 ± 1.23	13.0 ± 0.80
Creatinine (mg/dL)	0.48 ± 0.93	0.47 ± 0.78
Total cholesterol (mg/dL)	161.58 ± 40.44	181.25 ± 37.54
HDL-C (mg/dL)**	42.08 ± 10.72	49.12 ± 10.58
LDL-C (mg/dL)	104.45 ± 31.80	116.40 ± 31.55
Triglyceride (mg/dL)	116.04 ± 62.68	128.13 ± 68.83
FBS (mg/dL)	88.96 ± 8.59	87.63 ± 7.02
Insulin (μIU/mL)	26.80 ± 16.56	21.44 ± 9.48
HOMA-IR	6.02 ± 4.37	4.67 ± 2.12
Homocysteine (μmol/L)	8.02 ± 2.12	8.18 ± 1.39
Serum folate (ng/ml)	8.06 ± 2.92	9.03 ± 3.44
Serum vitamin B12 (pg/ml)**	594.82 ± 168.49	719.23 ± 186.18
Average dietary folate (μg/day)	78.46 ± 24.96	91.27 ± 42.24
Average dietary vitamin B12 (μg/day)	3.40 ± 1.10	3.56 ± 1.00

¹Data were presented in mean ± SD or number (%)

*Significantly different at $p = 0.01$ ** significantly different at $p = 0.02$

Table 1 Demographic and baseline characteristics data (continued)

	Folic acid (n=26)	Placebo (n=24)
Average physical activity score (Met-minutes /week)	920.29 ± 543.76	1,417.39 ± 1,646.13
Compliance (%)	84.30 ± 12.94	83.85 ± 16.90

Data were presented in mean ± SD

4.2 Outcome of treatment

Primary outcome analysis: Changes in plasma homocysteine

Mean changes for both groups appeared in normal distribution according to analysis using one-sample Kolmogorov-Smirnov test. Thus, independent t-test was used to compare the difference in change of homocysteine. After completion of the intervention, there were no significant changes in the clinical characteristics between the two groups except for plasma homocysteine and serum folate, data shown in Table 2. As expected, serum folate significantly increased in the folic acid group while there was no change observed in the placebo group. In the folic acid group, the mean change of homocysteine was $-1.35 \pm 1.32 \mu\text{mol/L}$ or decreased by 15.75% which was significantly different from the magnitude of change in the control group (decreased by 6.99%, mean difference 8.76; 95%CI: 0.26%, 17.25%, $p= 0.044$). As a result, plasma homocysteine after the intervention was significantly lower in the folic acid group ($6.37 \pm 1.37 \mu\text{mol/L}$) compared to the placebo group ($7.50 \pm 1.17 \mu\text{mol/L}$, $p=0.004$; data shown in Table 3). Interestingly, this divergence was more pronounced in boys where plasma homocysteine significantly decreased more in the folic acid than in the placebo group as shown in Table 4 (19.46% vs. 5.52%, mean difference 13.93%; 95% CI: 3.48%, 24.03%, $p = 0.009$). Whereas, there was no statistically significant difference between the folic acid and the placebo group in girls as shown in Table 5 (mean difference 0.23%; 95% CI:-15.78%, 16.24%, $p = 0.98$). (Figure 4)

Table 2 Comparison of changes in clinical characteristics after the intervention period¹

	Folic acid (n=23)	Placebo (n=23)	Mean difference (95%CI)	<i>p</i> -value
BMIZ score	-0.22 ± 0.20	-0.17 ± 0.20	0.05 (-0.07, 0.17)	0.43
Waist circumference (cm)	-1.40 ± 2.66	-1.33 ± 2.52	0.70 (-1.47, 1.60)	0.93
SBP (mmHg)	-1.52 ± 9.76	-3.52 ± 9.83	-2.00 (-7.68, 3.68)	0.48
DBP (mmHg)	-4.78 ± 14.64	-0.26 ± 9.96	4.48 (-2.96, 11.92)	0.23
Total cholesterol (mg/dL)	5.26 ± 16.47	-0.39 ± 21.37	-5.65 (-16.99, 5.96)	0.32
HDL-C (mg/dL)	1.23 ± 4.79	-1.60 ± 7.29	-2.83 (-6.51, 0.85)	0.12
LDL-C (mg/dL)	1.89 ± 13.89	0.03 ± 16.34	-1.81 (-10.87, 7.15)	0.68
Triglyceride (mg/dL)	1.30 ± 44.69	-15.13 ± 47.11	-16.43 (-43.72, 10.85)	0.23
Insulin (μIU/mL)	-2.90 ± 10.78	-1.13 ± 8.71	1.77 (-4.05, 7.59)	0.54
HOMA-IR	-0.83 ± 2.81	-0.22 ± 1.96	0.61 (-0.83, 2.04)	0.40
Homocysteine (μmol/L)	-1.35 ± 1.32	-0.68 ± 1.25	0.68 (-0.09, 1.44)	0.08
Homocysteine (%)	-15.75 ± 14.46	-6.99 ± 14.12	8.76 (0.26, 17.25)	0.044

¹ Change in parameter = parameter at the end of the study- baseline parameter

Data were presented in mean ± SD

Table 2 Comparison of changes in clinical characteristics after the intervention period

(continued)¹

	Folic acid (n=23)	Placebo (n=23)	Mean difference (95%CI)	<i>p</i> -value
Serum folate (ng/ml)	38.52 ± 28.78	0.12 ± 2.92	-38.39 (-50.89, -25.89)	<0.001
Serum vitamin B12 (pg/ml)	-11.59 ± 101.58	-11.19 ± 142.90	0.40 (-73.29, 74.10)	0.99
Dietary folate (µg/day)	-28.99 ± 68.83	-33.14 ± 53.94	-4.43 (-39.55, 30.69)	0.80
Dietary vitamin B12 (µg/day)	-0.13 ± 1.81	-0.17 ± 3.03	-0.04 (-1.61, 1.52)	0.96
Physical activity score (Met-minutes)	9.74 ± 1020.59	-54.13 ± 1129.65	-63.87 (-703.6, 575.9)	0.84

¹Change in parameter = parameter at the end of the study- baseline parameter

Data were presented in mean ± SD

Table 3 Comparison of the mean change in homocysteine level in two study groups

	Folic acid (n=23)	Placebo (n=23)	Mean difference (95%CI)	<i>p</i> -value
Baseline Hcy	8.02 ± 2.12	8.18 ± 1.40	0.16 (-0.86, 1.18)	0.75
Hcy at 8 wk	6.37 ± 1.37	7.50 ± 1.17	1.13 (0.37,1.89)	0.004
Absolute change of Hcy (µmol/L)	-1.35 ± 1.32	-0.68 ± 1.25	0.68 (-0.09,1.44)	0.08
% Change of Hcy	-15.75 ± 14.46	-6.99 ± 14.12	8.76 (0.26,17.25)	0.044

Data were presented in mean ± SD

Table 4 Subgroup analysis in boys

	Folic acid (n=14)	Placebo (n=15)	Mean difference (95%CI)	<i>p</i> -value
Baseline Hcy	8.26 ± 1.77	7.88 ± 1.63	-0.37 (-1.63, 0.88)	0.55
Hcy at 8 wk	6.45 ± 0.99	7.33 ± 1.33	0.88 (-0.02, 1.78)	0.05
Absolute change of Hcy (µmol/L)	-1.73 ± 1.26	-0.55 ± 1.28	1.18 (0.21, 2.15)	0.02
% Change of Hcy	-19.46 ± 11.76	-5.52 ± 14.48	13.93 (3.84, 24.03)	0.009

Data were presented in mean ± SD

Table 5 Subgroup analysis in girls

	Folic acid (n=9)	Placebo (n=8)	Mean difference (95%CI)	<i>p</i> -value
Baseline Hcy	7.65 ± 2.66	8.69 ± 0.71	1.04 (-0.90, 2.97)	0.26
Hcy at 8 wk	6.24 ± 1.87	7.81 ± 0.80	1.57 (0.06, 3.07)	0.04
Absolute change of Hcy (µmol/L)	-0.78 ± 1.25	-0.92 ± 1.24	-0.14 (-1.43, 1.16)	0.83
% Change of Hcy	-9.98 ± 17.00	-9.75 ± 13.92	0.23 (-15.78, 16.24)	0.98

Data were presented in mean ± SD

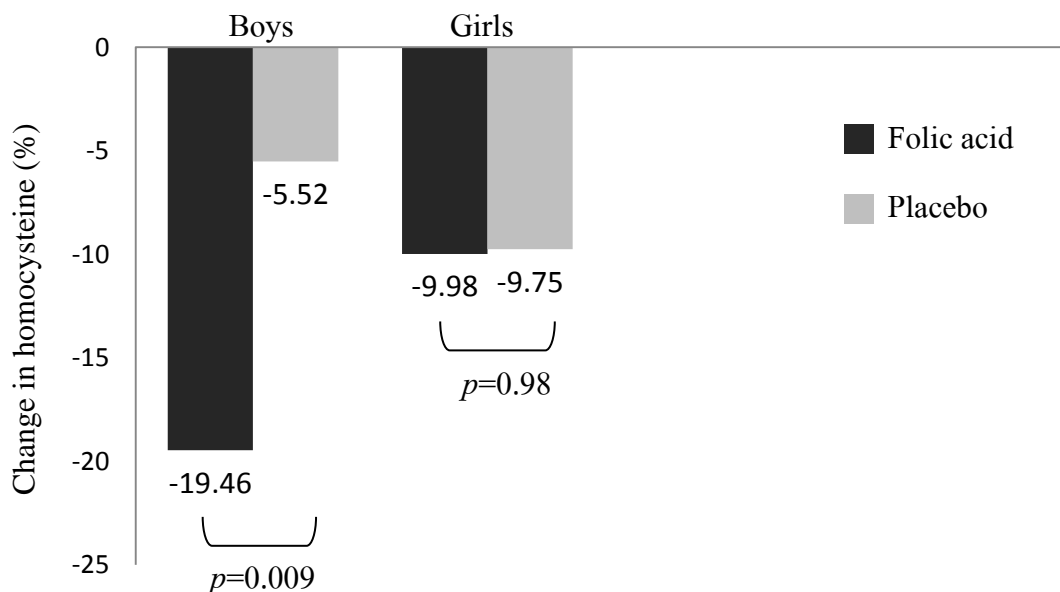


Figure 4 Comparison of the percentage change in homocysteine levels by gender

Since there were the differences of baseline SBP, HDL- C and serum vitamin B12 between the two groups, multiple linear regression analysis was applied to assess the effect of treatment groups after adjusting for these covariates. The results showed that the change of homocysteine levels depended on treatment groups after adjusting for baseline homocysteine, SBP, HDL- C and vitamin B12. The reduction of homocysteine at 11.04% was observed in folic acid group ($p = 0.012$). An elevation of $1 \mu\text{mol/L}$ in baseline plasma homocysteine decreased plasma homocysteine levels by 4.35% ($p = 0.001$), as shown in Table 6. The R^2 of this model was 0.42.

Table 6 Percent change of homocysteine level: multiple linear regression analysis

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	p-value
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	29.199	32.280		0.905	0.371
Treatment group	-11.038	4.188	-0.377	-2.636	0.012
Serum vitamin B12	0.012	0.011	0.153	1.112	0.273
HDL-C	-0.317	0.176	-0.234	-1.801	0.079
SBP	0.142	0.238	0.082	0.598	0.553
Baseline homocysteine	-4.347	1.261	-0.483	-3.448	0.001

The subgroup analyses were performed by baseline serum folate levels using the median folate level at 7.89 ng/ml as the cut-off value (Figure 5). In the low folate group, the homocysteine levels were reduced more in the folic acid than in the placebo group (21.2% vs. 9%, mean difference 12.24%; 95% CI: 1.39%, 23.09%, $p = 0.029$) as shown in Table 7. On the contrary, there was no statistically significant difference in the high folate group (mean difference 5.27%; 95% CI:-7.66%, 18.19%, $p = 0.40$) (Table 8).

Table 7 Subgroup analysis in low folate level group*

	Folic acid (n=11)	Placebo (n=10)	Mean difference (95%CI)	p-value
Baseline Hcy	9.09 ± 2.10	8.66 ± 1.19	-0.43 (-1.90, 1.04)	0.55
Hcy at 8 wk	6.82 ± 1.38	7.81 ± 0.79	0.98 (-0.56, 2.03)	0.06
Absolute change of Hcy (µmol/L)	-1.93 ± 1.27	-0.88 ± 1.19	1.06 (-0.07, 2.18)	0.06
% Change of Hcy	-21.25 ± 11.14	-9.01 ± 12.62	12.24 (1.39, 23.09)	0.029

Data were presented in mean ± SD * folate level ≤ 7.89 ng/ml

Table 8 Subgroup analysis in high folate level group*

	Folic acid (n=12)	Placebo (n=13)	Mean difference (95%CI)	<i>p</i> -value
Baseline Hcy	6.78 ± 1.37	7.78 ± 1.48	1.00 (-0.18, 2.19)	0.09
Hcy at 8 wk	5.95 ± 1.27	7.26 ± 1.38	1.31 (0.21, 2.40)	0.02
Absolute change of Hcy (µmol/L)	-0.82 ± 1.17	-0.52 ± 1.32	-0.30 (-0.73, 1.34)	0.55
% Change of Hcy	-10.70 ± 15.74	-5.44 ± 15.49	5.27 (-7.66, 18.19)	0.40

Data were presented in mean ± SD * folate level > 7.89 ng/ml

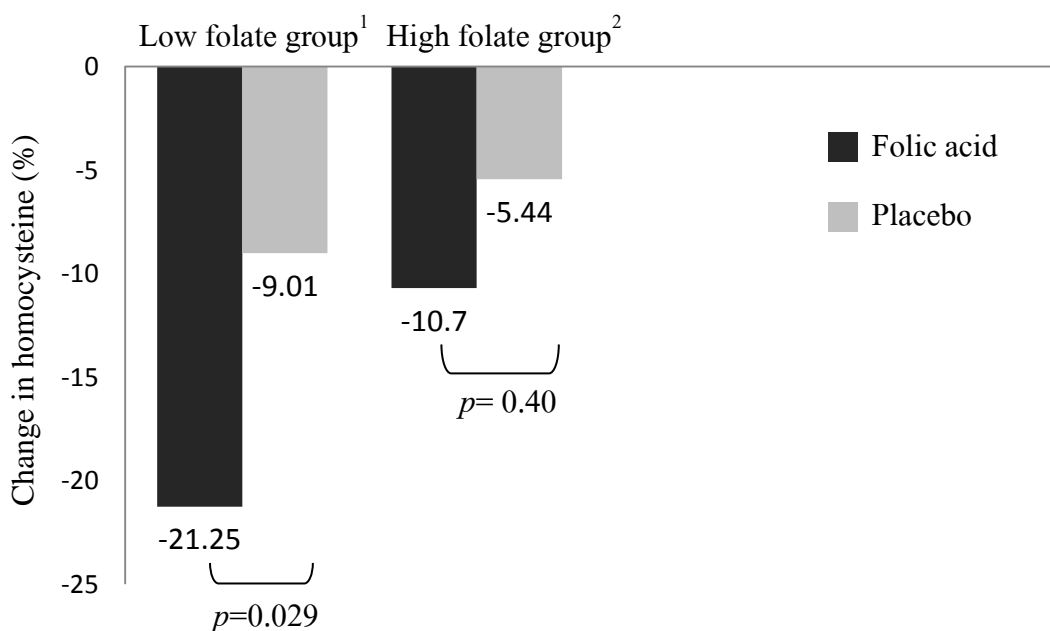


Figure 5 Comparison of the percentage change in homocysteine levels by serum folate

¹Low folate group, serum folate level ≤ 7.89 ng/ml

²High folate group, serum folate level > 7.89 ng/ml

Secondary outcome analysis: Correlations of baseline homocysteine and other clinical parameters

The correlation between plasma homocysteine and other clinical parameters were shown in Table 9. The plasma homocysteine was positively correlated with age ($r = 0.284, p = 0.046$) and negatively correlated with serum folate ($r = -0.397, p = 0.004$), serum vitamin B12 ($r = -0.392, p = 0.005$). There was no linear correlation between plasma homocysteine and BMI Z score, waist circumference as well as diet and physical activity, although there was a trend towards a positive association with serum creatinine, systolic blood pressure, and fasting insulin.

Table 9 Correlations of baseline homocysteine and other clinical parameters

	Pearson's correlation (r)	<i>p</i> -value*
Age (years)	0.284	0.046
BMIZ score	0.08	0.578
WC (cm)	0.225	0.117
Creatinine (mg/dL)	0.261	0.067
SBP (mmHg)	0.242	0.091
DBP (mmHg)	0.166	0.248
Total cholesterol(mg/dL)	0.117	0.417
HDL-C (mg/dL)	0.111	0.444
LDL-C (mg/dL)	0.103	0.476
Triglyceride (mg/dL)	0.005	0.973
FPG (mg/dL)	0.052	0.719
Insulin (μ IU/mL)	0.265	0.063
HOMA-IR	0.244	0.088
Serum folate (ng/ml)	-0.397	0.004
Serum vitamin B12 (pg/ml)	-0.392	0.005
Dietary folate intake (μ g/day)	0.001	0.999
Dietary vitamin B12 intake (μ g/day)	0.153	0.310
Physical activity score	0.148	0.328

**p*-value from Pearson's correlation analysis

CHAPTER V

DISCUSSION

Hyperhomocysteinemia is one of the potential risk factors for CVD. Treatment of hyperhomocysteinemia by folic acid supplementation with or without vitamin B12 or vitamin B 6 is generally accepted in populations at risk for CVD. In the context of obese children, they are also at high risk for developing CVD in later life. In addition, we presumed that they were susceptible for folate deficiency because of inadequate dietary folate intake. Thus folic acid supplementation may be beneficial to these children in order to reduce plasma homocysteine.

From our study, the mean plasma homocysteine at $8.10 \pm 1.79 \mu\text{mol/L}$ was in a normal range and comparable with that of obese children in the previous studies [16, 17]. The prevalence of hyperhomocysteinemia in our study (10%) was higher than those in previous study (5%) [23]. Larger studies in Thai pediatric population are needed to explain whether the prevalence rate should be concerned or not.

The obese children in this study had much lower dietary folate intakes ($84.87 \pm 34.91 \mu\text{g}$ per day) than the recommended level (approximately only one-fourth of the Thai DRI around 300-400 μg per day). Our finding was consistent with the results of Gillis L and Gillis A that obese youth consumed significantly lower folate than their non-obese peers (122 vs. 146 μg of dietary folate/1000 kcal) [20]. According to this information, the folate-rich foods such as green leafy vegetables, fruits and cereals should be recommended in obese children. Nevertheless, their serum folate was remained within normal limit (range 4.47-18.19 ng/ml) which was different from results of previous studies [21, 40]. This might be due to the fact that serum folate is not an ideal indicator for long-term body storage of folate compared to RBC folate. The

additional explanation could be due to the small sample size leading to insufficient power to detect serum folate deficiency in our study.

The socioeconomic status of the participants which might influence to their dietary folate and vitamin B12 intakes as well as physical activities did not be evaluated in this study. However, our participants were recruited from the same nutrition clinic which was considered similar in terms of socioeconomic status between 2 study groups. Moreover, the investigators directly measured both dietary intakes and physical activity level which are the main factors affecting to homocysteine level.

Changes in plasma homocysteine

After two months of folic acid supplementation, serum folate considerably increased and plasma homocysteine decreased in the treatment group. Despite a significant association of decrement of plasma homocysteine with baseline level which was consistent with the previous studies in adults that the reduction of plasma homocysteine levels was more obvious in those with higher pretreatment levels [32, 49, 50]. After adjusting for baseline homocysteine and other different baseline parameters (SBP, HDL-C and vitamin B12), even using the non ideal sample size for 5 independent variables in multiple linear regression, we can still confirm that plasma homocysteine levels were reduced significantly in the folic acid group compared to placebo regardless of baseline homocysteine levels. Nevertheless, a slight decrease of homocysteine level in the placebo group might be partly due to the routine dietary and physical activity counseling in our weight management program. In addition, there were no differences in the changes in other potential confounding factors such as dietary intake and physical activity during the intervention period between the two study groups. Therefore, homocysteine lowering effect in our study should be more likely the consequences from the folic acid supplementation than from these potential confounders.

There were several studies that assessed homocysteine lowering effect of folic acid supplementation in children with hyperhomocysteinemia [22], type 1 diabetes [26], chronic renal failure [25], and more recently, obese children with endothelial dysfunction [27]. The magnitude of homocysteine reduction in our study was 15.75% which was close to 17% reduction in obese children with endothelial dysfunction [27] but lower than a 41.2% reduction in hyperhomocysteinemia children [22]. In conclusion, the meta-analysis from the Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration found that 0.5-5 mg of folic acid supplementation would be estimated to reduce plasma homocysteine level by about 25-33% [32, 49]. This might be explained by the normal initial homocysteine level of our obese children. From subgroup analysis, the effect of folic acid supplementation was more apparent in children with lower baseline serum folate which agreed with the Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration [32] which showed that homocysteine lowering effect of folic acid was greater at lower pretreatment serum folate (p for trend < 0.001). However, even in the low folate group, serum folate levels were still in normal reference range. Therefore, we concluded that folic acid administration could reduce plasma homocysteine level in obese children with normal baseline folate and homocysteine levels. Moreover, we found that a daily dose of 5 mg could demonstrate the same homocysteine lowering effect compared with 0.5 mg of folic acid [32]. Additionally, Wald DS *et al.* and Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration also showed evidence that only 0.8 mg of folic acid daily appears to achieve the maximum reduction in plasma homocysteine [49, 51].

Intriguingly, despite no gender difference between baseline homocysteine found in our study, we demonstrated the homocysteine lowering effect of folic acid supplementation in obese boys but not in girls. Contrary to a meta-analysis of randomized control trial which showed evidence that folic acid supplementation was associated with greater proportional reduction in homocysteine concentrations in

women than men. However, that was the study in elderly with various diseases [49]. To our knowledge, there has been no study that explores the difference in homocysteine lowering effects between genders in obese children. The possible explanation of our findings might be that boys had more muscle mass than girls which is related to larger amount of homocysteine formation in connection with the creatine-creatinine synthesis[52, 53]. The authors were unable to demonstrate the gender differences of homocysteine concentrations in this study. Some [28, 53-56] but not all [57, 58] studies observed higher homocysteine in normal weight boys during and after puberty. Therefore gender differences of homocysteine concentration in obese children are still controversy.

In the context of the metabolic syndrome risk factors, we were unable to demonstrate any significant changes in BMI Z score, waist circumference, blood pressure, insulin resistance and lipid profiles between the two treatment groups after completion of folic acid supplementation. On the other hand, the studies in hyperhomocysteinemia children demonstrated that folic acid supplementation did not only reduce homocysteine level but also reduced blood pressure and total cholesterol level [23, 24]. Besides, folic acid supplementation improved glycemic control and insulin resistance both in the overweight and type 2 diabetes adults [33, 35]. The possible explanation was that most of our participants were obese children who still had normal homocysteine and other metabolic syndrome parameters. Thus, they were quite different from adults or children with various diseases in the former studies who had higher homocysteine level and abnormal metabolic syndrome parameters. The alternative explanation was the short duration of our intervention. So, the longer duration of supplementation might be able to demonstrate a beneficial effect on these metabolic syndrome risk factors in these obese children.

Factors affecting plasma homocysteine in obese children

Our small cross-sectional analysis from the baseline parameters showed a positive association between plasma homocysteine levels with age and a negative association with serum folate and serum vitamin B12. These findings agree with the results of other studies [22, 56, 57]. However, we could not demonstrate the association with dietary folate and dietary vitamin B12 intakes which were found in a previous study [22]. Moreover, in context of obese children, we cannot find any significant relationship between plasma homocysteine with the determinants for obesity such as BMI Z score or waist circumference, or with obesity related co-morbidities, for instance, glucose and lipid profiles. Although there is a trend toward a positive association with serum creatinine, systolic blood pressure, and fasting insulin. The explanation could be due to the small sample size leading to insufficient power to detect these associations. Further and larger studies are needed to evaluate the clinical significance of plasma homocysteine level and its association with these co-morbidities in the obese children.

CHAPTER VI

CONCLUSION

The homocysteine lowering effect of folic acid supplementation was found in obese children especially in boys and those with low baseline serum folate. However, beneficial effects on the metabolic syndrome risk factors cannot be demonstrated. Further long-term and larger interventional studies are needed to determine the effects of the lowered plasma homocysteine on the cardiovascular outcomes in obese children. In the meantime, due to their low dietary folate intake, folate-rich food should be encouraged and folic acid supplementation may be considered in obese children.

REFERENCES

- [1] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA 274, 13(1995):1049-57.
- [2] O. Stanger, W. Herrmann, K. Pietrzik, B. Fowler, J. Geisel, J. Dierkes. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. Z Kardiol 93, 6 (2004):439-53.
- [3] Olaf Stanger, Wolfgang Herrmann, Klaus Pietrzik, Brian Fowler, Jürgen Geisel, Jutta Dierkes. DACH-LIGA Homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): Consensus Paper on the Rational Clinical Use of Homocysteine, Folic Acid and B-Vitamins in Cardiovascular and Thrombotic Diseases: Guidelines and Recommendations. Clin Chem Lab Med 41, 11(2003):1392-1403.
- [4] Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. N Engl J Med 338, 15 (1998):1042-50.
- [5] Wolfgang Herrmann, Markus Herrmann, Rima Obeid. Hyperhomocysteinemia: A Critical Review of Old and New Aspects. Current Drug Metabolism 8, 1(2007):17-31.
- [6] Keebler ME, De Souza C, Fonseca V. Diagnosis and treatment of hyperhomocysteinemia. Curr Atheroscler Rep 3, 1(2001): 54-63.
- [7] Ciaccio M, Bivona G, Bellia C. Therapeutic approach to plasma homocysteine and cardiovascular risk reduction. Ther Clin Risk Manag 4, 1(2008): 219-24.
- [8] Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. Diab Vasc Dis Res 4, 2(2007):143-50.
- [9] Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. BMJ 325, 7374(2002):1202-8.

- [10] Nallamothu BK, Fendrick AM, Omenn GS. Homocyst(e)ine and coronary heart disease: pharmacoeconomic support for interventions to lower hyperhomocyst(e)inaemia. Pharmacoeconomics 20, 7(2002): 429-42.
- [11] Wunsch R, de Sousa G, Toschke AM, Reinehr T. Intima-media thickness in obese children before and after weight loss. Pediatrics 118, 6(2006): 2334-40.
- [12] Tounian P, Aggoun Y, Dubern B, Varille V, Guy-Grand B, Sidi D, Girardet JP, Bonnet D. Presence of increased stiffness of the common carotid artery and endothelial dysfunction in severely obese children: a prospective study. Lancet 358, 9291(2001):1400-4.
- [13] Peña AS, Wiltshire E, MacKenzie K, Gent R, Piotto L, Hirte C, Couper J. Vascular endothelial and smooth muscle function relates to body mass index and glucose in obese and nonobese children. J Clin Endocrinol Metab 91, 11 (2006): 4467-71.
- [14] Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, Lam CW, Metreweli C, Celermajer DS. Overweight in children is associated with arterial endothelial dysfunction and intima-media thickening. Int J Obes Relat Metab Disord 28, 7(2004): 852-7.
- [15] Narin F, Atabek ME, Karakukcu M, Narin N, Kurtoglu S, Gumus H, Coksevim B, Erez R. The association of plasma homocysteine levels with serum leptin and apolipoprotein B levels in childhood obesity. Ann Saudi Med 25, 3(2005):209-14.
- [16] Zhu W, Huang X, Li M, Neubauer H. Elevated plasma homocysteine in obese schoolchildren with early atherosclerosis. Eur J Pediatr 165, 5 (2006): 326-31.

- [17] Codoñer-Franch P, Murria-Estal R, Tortajada-Girbés M, del Castillo-Villaescusa C, Valls-Bellés V, et al. New factors of cardiometabolic risk in severely obese children: influence of pubertal status. Nutr Hosp 25, 5(2010): 845-51.
- [18] de Bree A, van Dusseldorp M, Brouwer IA, van het Hof KH, Steegers-Theunissen RP. Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. Eur J Clin Nutr 51, 10(1997): 643-60.
- [19] Beitz R, Mensink GB, Fischer B, Thamm M. Vitamins--dietary intake and intake from dietary supplements in Germany. Eur J Clin Nutr 56, 6(2002):539-45.
- [20] Gillis L, Gillis A. Nutrient inadequacy in obese and non-obese youth. Can J Diet Pract Res 66, 4(2005):237-42.
- [21] Parinyapoonno S. Relationship between dietary folate intake, folate status and nutritional status of mattayom 2 students in Samsen wittayalai school, Bangkok. Master's Thesis, Faculty of Pharmaceutical, Chulalongkorn University, 2004.
- [22] Papandreou D, Malindretos P, Arvanitidou M, Makedou A, Rousso I. Oral supplementation of folic acid for two months reduces total serum homocysteine levels in hyperhomocysteinemic Greek children. Hippokratia 14, 2(2010):105-8.
- [23] Papandreou D, Malindretos P, Arvanitidou M, Makedou A, Rousso I. Homocysteine lowering with folic acid supplements in children: effects on blood pressure. Int J Food Sci Nutr 61, 1(2010):11-7.
- [24] Papandreou D, Rousso I, Malindretos P, Makedou A, Arvanitidou M. Effects of oral folate supplementation on serum total homocysteine and cholesterol levels in hyperhomocysteinemic children. Nutr Clin Pract 25, 4(2010): 390-3.

- [25] Bennett-Richards K, Kattenhorn M, Donald A, Oakley G, Varghese Z, Rees L, Deanfield JE. Does oral folic acid lower total homocysteine levels and improve endothelial function in children with chronic renal failure? Circulation 105, 15(2002):1810-5.
- [26] MacKenzie KE, Wiltshire EJ, Gent R, Hirte C, Piotto L, Couper JJ. Folate and vitamin B6 rapidly normalize endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes mellitus. Pediatrics 118, 1(2006):242-53.
- [27] Peña AS, Wiltshire E, Gent R, Piotto L, Hirte C, Couper J. Folic acid does not improve endothelial function in obese children and adolescents. Diabetes Care 30, 8(2007):2122-7.
- [28] Chang JB, Chu NF, Shen MH, Wu DM, Liang YH, Shieh SM. Determinants and distributions of plasma total homocysteine concentrations among school children in Taiwan. Eur J Epidemiol 18, 1(2003):33- 8.
- [29] Huemer M, Vonblon K, Födinger M, Krumpholz R, Hubmann M, Ulmer H, et al. Total homocysteine, folate, and cobalamin, and their relation to genetic polymorphisms, lifestyle and body mass index in healthy children and adolescents. Pediatr Res 60, 6(2006):764-9.
- [30] Economou EV, Malamitsi-Puchner AV, Pitsavos CP, Kouskouni EE, Magaziotou-Elefsinioti I, Creatsas G. Low-grade systemic inflammation profile, unrelated to homocysteinemia, in obese children. Mediators Inflamm 2005, 6(2005): 337-42.
- [31] Papandreou D, Rousso I, Makedou A, Arvanitidou M, Mavromichalis I. Association of blood pressure, obesity and serum homocysteine levels in healthy children. Acta Paediatr 96, 12(2007): 1819-23.

- [32] Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. BMJ 316, 7135(1998): 894-8.
- [33] Solini A, Santini E, Ferrannini E. Effect of short-term folic acid supplementation on insulin sensitivity and inflammatory markers in overweight subjects. Int J Obes (Lond) 30, 8(2006):1197-202.
- [34] Sheu WH, Chin HM, Lee WJ, Wan CJ, Su HY, Lang HF. Prospective evaluation of folic acid supplementation on plasma homocysteine concentrations during weight reduction: a randomized, double-blinded placebo controlled study in obese women. Life Sci 76, 18(2005):2137-45.
- [35] Gargari BP, Aghamohammadi V, Aliasgharzadeh A. Effect of folic acid supplementation on biochemical indices in overweight and obese men with type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 94, 1(2011): 33-8.
- [36] Peña AS, Wiltshire E, Gent R, Hirte C, Couper J. Folic acid improves endothelial function in children and adolescents with type 1 diabetes. J Pediatr 144,4 (2004): 500-4.
- [37] Leowattana W, Bhuripanyo K, Mahanonda N, Pokum S. Prevalence of hyperhomocysteinemia in normal healthy Thai subjects. J Med Assoc Thai 84, Suppl 3(2001):S722-9.
- [38] Leowattana W, Mahanonda N, Bhuripanyo K, Pokum S. Association between serum homocysteine, vitamin B12, folate and Thai coronary artery disease patients. J Med Assoc Thai 83, 5(2000):536-4218.
- [39] Tungtrongchitr R, Pongpaew P, Tongboonchoo C, Vudhivai N, Changbumrung S, Tungtrongchitr A, et al. Serum homocysteine, B12 and folic acid concentration in Thai overweight and obese subjects. Int J Vitam Nutr Res 73, 1(2003):8-14.

- [40] Kwanbunjan K, Thepouyporn A, Songmuaeng K, Nakosiri W, Cheeramakara C, Chusongsang Y, et al. Food behavior and folate status of hill-tribe schoolchildren and women of childbearing age on the northern border of Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 39, 2(2008): 353-61.
- [41] World Health Organization. *WHO Child Growth Standards* [Online]. 2007.
Available from: http://www.who.int/childgrowth/standards/bmi_for_age/en/index.html (2013, February1).
- [42] IPAQ committee. *Guidelines for data processing and analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)* [Online]. November 2005.
Available from: <http://www.ipaq.ki.se/scoring.htm> (2013, February1).
- [43]Spear BA, Barlow SE, Ervin C, Ludwig DS, Saelens BE, Schetzina KE, et al. Recommendations for treatment of child and adolescent overweight and obesity. *Pediatrics* 120, Suppl 4(2007): S254-88.
- [44] Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 115, 4(2005): e500-3.
- [45] Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet* 369, 9579(2007): 2059-61.
- [46] Papandreou D, Mavromichalis I, Makedou A, Rousso I, Arvanitidou M. Reference range of total serum homocysteine level and dietary indexes in healthy Greek schoolchildren aged 6-15 years. *Br J Nutr* 96, 4(2006):719-24.

- [47] Baker RD, Baker SS, Davis AM. Normal laboratory values for selected chemistries. In: pediatric parenteral nutrition, pp. 425-9. New York: Chapman & Hall publishing, 1997.
- [48] Kwanbunjan K and Tungtrongchitr R. Vitamin B and folate. In: Dietary reference intake for Thais 2003, pp.116-131. Bangkok, 2003.
- [49] Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. Am J Clin Nutr 82, 4(2005): 806-12.
- [50] Sheu WH, Chin HM, Lee WJ, Wan CJ, Su HY, Lang HF. Prospective evaluation of folic acid supplementation on plasma homocysteine concentrations during weight reduction: a randomized, double-blinded placebo-controlled study in obese women. Life Sci 76, 18(2005):2137-45.
- [51] Wald DS, Bishop L, Wald NJ, Law M, Hennessy E, Weir D, McPartlin J, Scott J. Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels. Arch Intern Med 161, 5(2001):695-700.
- [52] Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 49(1998): 31-62.
- [53] De Laet C, Wautrecht JC, Brasseur D, Dramaix M, Boeynaems JM, Decuyper J, Kahn A. Plasma homocysteine concentration in a Belgian school-age population. Am J Clin Nutr 69, 5(1999): 968-72.
- [54] Kerr MA, Livingstone B, Bates CJ, Bradbury I, Scott JM, Ward M, Pentieva K, Mansoor MA, McNulty H. Folate, related B vitamins, and homocysteine in childhood and adolescence: potential implications for disease risk in later life. Pediatrics 123, 2(2009): 627-35.

- [55] Must A, Jacques PF, Rogers G, Rosenberg IH, Selhub J. Serum total homocysteine concentrations in children and adolescents: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). J Nutr 133, 8(2003): 2643-9.
- [56] van Beynum IM, den Heijer M, Thomas CM, Afman L, Oppenraay-van Emmerzaal D, Blom HJ. Total homocysteine and its predictors in Dutch children. Am J Clin Nutr 81, 5(2005): 1110-6.
- [57] Huemer M, Vonblon K, Födinger M, Krumpholz R, Hubmann M, Ulmer H, et al. Total homocysteine, folate, and cobalamin, and their relation to genetic polymorphisms, lifestyle and body mass index in healthy children and adolescents. Pediatr Res 60, 6(2006):764-9.
- [58] Greenlund KJ, Srinivasan SR, Xu JH, Dalferes E Jr, Myers L, Pickoff A, Berenson GS. Plasma homocysteine distribution and its association with parental history of coronary artery disease in black and white children: the Bogalusa Heart Study. Circulation 99, 16(1999): 2144-9.

APPENDICES

APPENDIX A
Case Record Form

Case record form

Effect of folic acid supplementation on plasma homocysteine concentration in obese children

Case number

Baseline	Date	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Date of birth		<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Sex	<input type="checkbox"/> male	<input type="checkbox"/> female		
Weight (kg)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	.	<input type="text"/>	WC (cm) <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
				.
Height (cm)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
SBP/ DBP (mmHg)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Smoking	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Yes		
Coffee	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Yes		
CBC	Hct	___ %	Hb	___ g/dl
			MCV	_____ fl
	WBC	_____/mm ³	N	___L ___M ___E ___
			Plt	_____
Creatinine	_____	mg/dL		
Total cholesterol	_____	mg/dL	Triglyceride	_____ mg/dL
HDL- C	_____	mg/dL	LDL- C	_____ mg/dL
FBS	_____	mg/dL	Insulin	_____ μ IU/mL
Homocysteine	_____	μ mol/L		
Serum folate	_____	ng/ml	Serum vitamin B12	_____ pg/ml
Dietary folate	_____			(μ g/day)
Dietary vitamin B12	_____			(μ g/day)
Physical activity	_____			MET-minutes /week

Case number Follow up 1st moDate

Weight (kg)

 .

WC (cm)

 .

Height (cm)

SBP/ DBP (mmHg)

Drug left

_____ tablet

Dietary folate

(μg/day)

Dietary vitamin B12

(μg/day)

Physical activity

MET-minutes /week

Case number

Follow up 2 nd mo	Date	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Weight (kg)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	.	<input type="text"/>	WC (cm) <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Height (cm)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
SBP/ DBP (mmHg)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Drug left	_____ tablet			
Total cholesterol	_____	mg/dL	Triglyceride	_____ mg/dL
HDL- C	_____	mg/dL	LDL- C	_____ mg/dL
FBS	_____	mg/dL	Insulin	_____ μ IU/mL
Homocysteine	_____	μ mol/L		
Serum folate	_____	ng/ml	Serum vitamin B12	_____ pg/ml
Dietary folate	_____			(μ g/day)
Dietary vitamin B12	_____			(μ g/day)
Physical activity	_____			MET-minutes /week

APPENDIX B
Information sheet

เอกสารชี้แจงข้อมูลผู้เข้าร่วมการวิจัย

(Participant Information Sheet)

ในเอกสารนี้อาจมีข้อความที่ท่านอ่านแล้วยังไม่เข้าใจ โปรดสอบถามหัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้แทนให้ช่วยอธิบายจนกว่าจะเข้าใจดี ท่านจะได้รับเอกสารนี้ 1 ฉบับ นำกลับไปอ่านที่บ้าน เพื่อปรึกษาหารือกับญาติพี่น้อง เพื่อนสนิท แพทย์ประจำตัวของท่าน หรือผู้อื่นที่ท่านต้องการปรึกษา เพื่อช่วยในการตัดสินใจเข้าร่วมการวิจัย

ชื่อโครงการ วิจัยเรื่อง ผลของการให้กรดโฟลิกต่อระดับโฮโมซิสเตอีนในผู้ป่วยเด็กอ้วน

ชื่อผู้วิจัย แพทย์หญิง อรรพรรณ เอี่ยมโอภาส

สถานที่ปฏิบัติงาน กลุ่มงานกุมารเวชศาสตร์ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี

หมายเลขโทรศัพท์ที่ติดต่อได้ทั้งในและนอกเวลาราชการตลอด 24 ชั่วโมง 081-810-8893

โครงการวิจัยนี้จัดทำขึ้น เพื่อเปรียบเทียบระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือดภายหลังการให้ยากรดโฟลิกกับยาหลอกในเด็กที่มีน้ำหนักตัวเกิน ณ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ซึ่งมีประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับคือการวิจัยนี้สามารถนำไปพัฒนาแนวทางในการป้องกันโรคหลอดเลือดแดงตีบแข็งในผู้ป่วยเด็กอ้วนได้ นอกจากนี้อาจช่วยให้สนับสนุนให้แพทย์ช่วยแนะนำให้เด็กอ้วนรับประทานอาหารที่มีโฟลิกสูงเพิ่มขึ้น ในส่วนบุตรหลานของท่านเองจะได้รับการตรวจรักษาจากแพทย์พร้อมได้รับคำแนะนำในการควบคุมน้ำหนักอย่างใกล้ชิด

บุตรหลานของท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในการวิจัยเนื่องจากบุตรหลานของท่านมีน้ำหนักตัวที่เกินเกณฑ์มาตรฐานและได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะอ้วน ซึ่งโรคอ้วนนี้จะก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนตามมาได้หลายประการ เช่น เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจนำไปสู่โรคหลอดเลือดหัวใจตีบเมื่อเติบโตเป็นผู้ใหญ่ได้ ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบสารเคมีที่ช่วยบ่งบอกถึงการมีหลอดเลือดแดงตีบแข็งที่มีชื่อเรียกว่าโฮโมซิสเตอีนและพบว่ากรดโฟลิกอาจมีส่วนช่วยในการลดระดับสารนี้ อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาถึงผลของการให้ยากรดโฟลิกต่อระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือดในผู้ป่วยเด็กอ้วน ไม่มากนัก โดยปกติเราได้รับสารโฟลิกจากการรับประทานผักใบเขียวและผลไม้สด ซึ่งในกลุ่มเด็กอ้วนมักจะไม่ชอบรับประทานอาหารกลุ่มนี้ ทำให้พบว่าการขาดโฟลิกในเด็กอ้วนได้มากซึ่งอาจเป็นภาวะเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดแดงตีบแข็งใน

อนาคตได้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีขึ้นเพื่อให้ทราบว่า การกินยากรดโพลีสามารถลดระดับสารโฮโมซิสเตอีนในเลือดได้หรือไม่

จะมีผู้เข้าร่วมการวิจัยครั้งนี้ประมาณ 50 คน มีระยะเวลาที่จะทำการวิจัยทั้งสิ้น 2 เดือน

หากท่านตัดสินใจให้บุตรหลานของท่านเข้าร่วมการวิจัยแล้ว จะมีขั้นตอนการวิจัยดังต่อไปนี้

1. ในวันแรกที่เข้าโครงการ บุตรหลานของท่านจะได้รับการบันทึกข้อมูลทั่วไป ได้แก่ อายุ เพศ ชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูงและความดันโลหิต และได้รับการเจาะเลือด ทั้งนี้ต้องงดน้ำงดอาหารมาแล้วอย่างน้อย 12 ชั่วโมง
2. ต่อจากนั้นบุตรหลานของท่านจะได้รับการแบ่งกลุ่มแบบสุ่มเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละเท่าๆกัน (25 คน) เพื่อรับยากรดโพลีหรือยาหลอกอย่างใดอย่างหนึ่ง โดยจะได้รับการยกกลับไปรับประทานที่บ้านทุกวัน วันละ 1 เม็ด เป็นเวลา 2 เดือน โดยยากรดโพลีนี้เป็นยาที่มีใช้มานานแล้วอย่างปลอดภัย นิยมใช้ในหญิงตั้งครรภ์และผู้ป่วยทาลัสซีเมียเพื่อป้องกันหรือรักษาภาวะโลหิตจาง
3. โครงการวิจัยนี้จะใช้ระยะเวลาในการวิจัยนาน 2 เดือน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะต้องมา 1 ครั้งต่อเดือน ในวันอังคาร พุธหรือพฤหัสบดีที่คลินิก โภชนาการสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี เพื่อรับคำแนะนำ และสอนสาธิตการจัดอาหาร และการออกกำลังกายที่ถูกต้อง ซึ่งจะมีการเก็บข้อมูลโดยใช้แบบสอบถามเกี่ยวกับการทำกิจกรรมทั่วไปในชีวิตประจำวัน อาหารที่รับประทาน ซักประวัติ ตรวจร่างกาย ทุกครั้งที่นัดมาตรวจติดตาม และได้รับการเจาะเลือดส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับโรคทางเมตาบอลิซึมในเด็กที่มีภาวะอ้วนทั้งหมด 2 ครั้ง คือครั้งแรกที่เข้าร่วมทำการวิจัย และเจาะเลือดอีกครั้งเมื่อครบ 2 เดือน
4. ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจจะถูกเก็บแช่แข็งไว้เป็นระยะเวลาประมาณ 10 ปีเพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฮอร์โมนที่เป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคอ้วนในอนาคต ทั้งนี้โครงการวิจัยในอนาคตจะต้องได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย

บุตรหลานของท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือด ทั้งนี้ทางทีมผู้วิจัยได้จัดเตรียมแพทย์และพยาบาลที่มีประสบการณ์ในการเจาะเก็บเลือดในลักษณะนี้เพื่อให้บุตรหลานของท่านได้รับความสะดวกสูงสุด ซึ่งการเจาะเลือดส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการส่วนมากเป็นการเจาะเลือดที่เป็นมาตรฐานสำหรับเด็กที่มีภาวะอ้วนทุกคนของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี

หากท่านไม่เข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ก็จะไม่มีผลต่อการได้รับการรักษาพยาบาล ท่านก็จะได้รับการตรวจเพื่อการวินิจฉัยและการรักษาโรคของท่านตามวิธีการที่เป็นมาตรฐาน

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การเข้าร่วมในโครงการนี้ผู้เข้าร่วมโครงการไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆทั้งสิ้น และทางผู้วิจัยได้จัดเตรียมค่าเดินทางมาพบแพทย์ทุก 1 เดือนให้กับผู้เข้าร่วมโครงการครั้งละ 250 บาท

หากมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ทราบโดยรวดเร็วไม่ปิดบัง

ข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัยจะถูกเก็บรักษาไว้ ไม่เปิดเผยต่อสาธารณะเป็นรายบุคคล แต่จะรายงานผลการวิจัยเป็นข้อมูลส่วนรวม ข้อมูลของผู้เข้าร่วมการวิจัยเป็นรายบุคคลอาจมีคณะกรรมการบางกลุ่มเข้ามาตรวจสอบได้ เช่นผู้ให้ทุนวิจัย, สถาบัน หรือองค์กรของรัฐที่มีหน้าที่ตรวจสอบ, คณะกรรมการจริยธรรมฯ เป็นต้น

ผู้เข้าร่วมการวิจัยมีสิทธิ์ถอนตัวออกจากโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่ต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้า และการไม่เข้าร่วมการวิจัยหรือถอนตัวออกจากโครงการวิจัยนี้ จะไม่มีผลกระทบต่อการรักษาที่สมควรจะได้รับแต่ประการใด

โครงการนี้ได้รับการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ศูนย์วิจัยและพัฒนา ชั้น 12 อาคารสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี เบอร์โทร/โทรสาร 02- 6448943 เบอร์โทรศัพท์ภายใน 02-3548333 ถึง 43 ต่อ 5210, 5211

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

APPENDIX C
Consent and assent Form

หนังสือแสดงเจตนายินยอมด้วยความสมัครใจเข้าร่วมการวิจัย

(Informed Consent Form)

การวิจัยเรื่อง ผลของการให้กรดโพลีลิกต่อระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือดในผู้ป่วยเด็กอ้วน

ข้าพเจ้าอายุ.....ปี อยู่บ้านเลขที่.....

หมู่ที่.....ถนน.....แขวง/ตำบล.....เขต/อำเภอ.....

จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์..... โทรศัพท์.....เป็น

บิดา/มารดา/ผู้ปกครองของค.ช./ค.ญ.....อายุ.....ปี

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการศึกษาวิจัยนี้ ข้าพเจ้าและบุตรหรือเด็กในปกครองของข้าพเจ้าได้รับคำอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆที่ข้าพเจ้าและบุตรหรือเด็กในปกครองของข้าพเจ้าสงสัย ด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้าและบุตรหรือเด็กในปกครองของข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้โดยสมัครใจ และสามารถบอกเลิก ยุติ หรือถอนตัว จากการศึกษาเมื่อใดก็ได้ และไม่ว่าข้าพเจ้าจะเข้าร่วมในการศึกษาหรือไม่ก็ตาม หรือถอนตัวจากการศึกษานี้ในภายหลัง จะไม่มีผลต่อการเข้ารับบริการป้องกัน และรักษาโรคที่ข้าพเจ้าพึงจะได้รับตามสิทธิต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าและบุตรหรือเด็กในปกครองของข้าพเจ้าเป็นความลับ จะเปิดเผยข้อมูลได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย หรือเป็นการเปิดเผยข้อมูลต่อผู้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุน และ/หรือกำกับดูแลการวิจัยเท่านั้น

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าอาจมีข้อแทรกซ้อนที่อาจเกิดกับผู้เข้าร่วมวิจัยจากการถูกเจาะเลือด ซึ่งจะทำให้เกิดความเจ็บปวดและเสียเลือดเล็กน้อย ซึ่งหนทางการแก้ไขคือทางทีมผู้วิจัยได้จัดเตรียมแพทย์และพยาบาลที่มีประสบการณ์ในการเจาะเก็บเลือดในลักษณะนี้เพื่อให้บุตรหลานของท่านได้รับความสะดวกสูงสุด รวมทั้งจะอธิบายให้ผู้เข้าร่วมวิจัยเข้าใจด้วยถ้อยคำที่แสดงความเห็นใจและอ่อนโยนว่าอาจมีอาการเจ็บเล็กน้อยขณะเจาะเลือดและจะเป็นช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น ส่วนปริมาณเลือดที่นำไปตรวจจำนวน 12 ซีซี จะไม่ก่อให้เกิดข้อแทรกซ้อนที่อันตรายรุนแรงใดๆ

หากข้าพเจ้าและบุตรหรือเด็กในปกครองของข้าพเจ้าได้รับการปฏิบัติไม่ตรงตามที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงเข้าร่วมการวิจัย ข้าพเจ้าจะสามารถติดต่อกับเลขานุการคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ศูนย์วิจัยและพัฒนา ชั้น 12 อาคารสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี เบอร์โทร/โทรสาร 02-6448943 เบอร์โทรศัพท์ภายใน 02-3548333 ถึง 43 ต่อ 5210, 5211

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและข้อความในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย และมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว หากต้องการเข้าร่วมข้าพเจ้าจะลงชื่อข้างล่างนี้ และข้าพเจ้าจะได้รับสำเนาที่ลงชื่อของเอกสารนี้เพื่อเก็บรักษาไว้ 1 ฉบับ

พร้อมทั้ง อนุญาตให้เก็บตัวอย่างเลือดที่เหลือ ไม่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างเลือดที่เหลือ

ลายมือชื่อ/ลายพิมพ์นิ้วหัวแม่มือ.....ผู้ยินยอม (ผู้ป่วย) วัน/เดือน/ปี.....

ลายมือชื่อผู้ยินยอม (ผู้ปกครอง)วัน/เดือน/ปี.....

ลายมือชื่อแพทย์ผู้วิจัย วัน/เดือน/ปี.....

ลายมือชื่อพยาน วัน/เดือน/ปี.....

ลายมือชื่อพยาน วัน/เดือน/ปี.....

ในกรณีที่ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยอ่านใบยินยอมนี้ให้ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลายมือชื่อ/ลายพิมพ์นิ้วหัวแม่มือ.....ผู้ยินยอม (ผู้ป่วย) วัน/เดือน/ปี.....

ลายมือชื่อผู้ยินยอม (ผู้ปกครอง)วัน/เดือน/ปี.....

ลายมือชื่อแพทย์ผู้วิจัย วัน/เดือน/ปี.....

ลายมือชื่อพยาน วัน/เดือน/ปี.....

ลายมือชื่อพยาน วัน/เดือน/ปี.....

ใบยินยอมให้ทำการวิจัยโดยได้รับการบอกกล่าวและเต็มใจสำหรับอาสาสมัคร(เด็ก)

(Assent form)

วันที่.....

ชื่อ-นามสกุล.....อายุ.....ปี อยู่บ้านเลขที่..... ซอย.....
แขวง/ตำบล.....เขต/อำเภอ.....จังหวัด.....

ข้าพเจ้าได้รับทราบข้อมูลเกี่ยวกับการวิจัยเรื่องผลของการให้กรดโฟลิกต่อระดับโฮโมซิสเตอีนในเลือดในผู้ป่วยเด็กอ้วน ตลอดจนวิธีและขั้นตอนในการศึกษา

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่เข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจหรือจะปฏิเสธไม่เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ แม้ว่าผู้ปกครองหรือพ่อแม่จะให้เข้าร่วมโครงการนี้ก็ตามและหากเข้าร่วมโครงการนี้ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ ซึ่งการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้จะไม่ผลต่อการรักษาพยาบาลที่ข้าพเจ้าจะได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองกับข้าพเจ้าว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้ในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัยหรือเป็นการเปิดเผยข้อมูลต่อผู้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสนับสนุนและกำกับดูแลการวิจัย และหากเกิดอันตรายใดๆจากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่าและรายละเอียดที่เกี่ยวกับการรักษาพยาบาลหรือเงินชดเชยดังกล่าว ข้าพเจ้าสามารถติดต่อได้ที่ แพทย์หญิงอรวรรณ เอี่ยมโอภาส กลุ่มงานกุมารเวชศาสตร์ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี เบอร์โทรศัพท์มือถือ 081-810-8893 และเลขานุการคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินีศูนย์วิจัยและพัฒนา ชั้น 12 อาคารสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี เบอร์โทร/โทรสาร 02-6448943 เบอร์โทรศัพท์ภายใน 02-3548333 ถึง 43 ต่อ 5210, 5211

ข้าพเจ้าทราบและเข้าใจหนังสือยินยอมนี้โดยตลอดแล้วโดยความเห็นชอบของผู้ปกครองของข้าพเจ้า จึงได้



- พร้อมทั้ง
- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> ตกลงเข้าร่วมในการวิจัยนี้ | <input type="checkbox"/> ไม่ตกลงเข้าร่วมในการวิจัยนี้ |
| <input type="checkbox"/> อนุญาตให้เก็บตัวอย่างเลือดที่เหลือ | <input type="checkbox"/> ไม่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างเลือดที่เหลือ |

APPENDIX D

Semi quantitative food frequency questionnaire

APPENDIX E

Three-day food record form

APPENDIX F**Physical activity questionnaire**

International Physical Activity Questionnaire

Case Number

--	--	--

1a. During the last 7 days, on how many days did you do **vigorous** physical activities like heavy lifting, digging, aerobics, or fast bicycling,?

Think about *only* those physical activities that you did for at least 10 minutes at a time.

_____ days per week →

or

none

1b. How much time in total did you usually spend on one of those days doing vigorous physical activities?

_____ hours _____ minutes

2a. Again, think *only* about those physical activities that you did for at least 10 minutes at a time. During the last 7 days, on how many days did you do **moderate** physical activities like carrying light loads, bicycling at a regular pace, or doubles tennis? Do not include walking.

_____ days per week →

or

none

2b. How much time in total did you usually spend on one of those days doing moderate physical activities?

_____ hours _____ minutes

3a. During the last 7 days, on how many days did you **walk** for at least 10 minutes at a time? This includes walking at work and at home, walking to travel from place to place, and any other walking that you did solely for recreation, sport, exercise or leisure.

_____ days per week →

or

none

3b. How much time in total did you usually spend walking on one of those days?

_____ hours _____ minutes

The last question is about the time you spent **sitting** on weekdays while at work, at home, while doing course work and during leisure time. This includes time spent sitting at a desk, visiting friends, reading traveling on a bus or sitting or lying down to watch television.

4. During the last 7 days, how much time in total did you usually spend *sitting* on a week day?

_____ hours _____ minutes

VITAE

Name Orawan Iamopas
Date and place of birth April 28th, 1975, Bangkok, Thailand
Address 468 Vibhavadirangsit Road, Ladyoa, Jatujak, Bangkok

Educational degree

1993-1999	MD, Doctor of Medicine, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University
2002-2005	Thai Board of Pediatrics Queen Sirikit National Institute of Child Health
2005-2007	Certificate of Clinical Training in Pediatric Nutrition Department of Pediatrics, Ramathibodi Hospital

Work experiences

1999-2000	Medical Physician at Lopburi Hospital
2001-2002	Medical Physician at Chumpuang Hospital, Nakhonratchasima
2007-PRESENT	Pediatrician at Queen Sirikit National Institute of Child Health

Current work position and office

Pediatrician at Gastroenterology and Nutrition Division,
 Department of Pediatrics,
 Queen Sirikit National Institute of Child Health
 420/8 Rajvithi Road, Rajthevi, Bangkok, 10400