

APPENDIX A

EQUIPMENT

A. Physical fitness test

1. Electrically braked bicycle ergometer (Tunturi[®] E980, Finland) (See Figure 19)
2. Heart rate monitor (Electrode belt, E980, Finland)
3. Aurbatic oscillometric digital blood pressure monitor (Model HEM704C, Omron corporation, Tokyo, Japan)
4. Skinfold calipers (Cambridge Scientific Industries, England)
5. Weight balance (Hercules, China)

B. Blood analysis

1. Spectrophotometer (Sequoia Turner 340, USA)
2. UV- spectrophotometer (Shimadzu-160A, Japan)
3. Centrifuge (Kokusan H-103N, Japan)
4. Micro-Centaur centrifuge (England)
5. Electrical balance (AEG- 45SM, Japan)



Figure 19 Figure of electrically braked bicycle ergometer (Tunturi[®] E980)

APPENDIX B

DIETARY ASSESSMENT

Dietary data were collected from the food frequency questionnaires able to be analyzed quantitatively and qualitatively. The Thai five food groups can be estimated by a semiquantitative scoring system. It has been developed to evaluate consumption. Food frequency scoring systems are based on the basic Thai five food groups. Score are assigned according to the number of serving in each food group. This simple scoring method has been compared well with more detailed calculation of nutritional adequacy. A maximum score of 20 points each food group are given.

Dietary Score base on the Thai five food groups (88).

		Points	food group score
Group 1 Protein			20
Fish	1-3 pieces	5	
	4 pieces or more	10	
Chicken	1 pieces (small)	5	
	1 pieces (large)	10	
Meat	1-5 pieces	2	
	5-9 pieces	5	
	10 pieces or more	10	

(Cont.)

	Points	food group score
Egg	10	
Milk 1 cup	10	
Group 2 Carbohydrate		20
Rice (boil) 1 serve	1	
Noodle 1 serve	3	
Rice (cook/glutinous rice) 1 serve	10	
Bread 1 pieces		
Without jam	5	
With jam	10	
Biscuit / cracker 1-3 pieces	2	
4 pieces or more	5	
Tea, coffee, cocoa		
Without milk and sugar	0	
Without milk, with sugar	1	
With milk and sugar	3	
Dessert		
Without coconut cream	2	
With coconut cream	3	
Group 3 Vegetable		20
Vegetable		
white / cook	3	

(cont.)

	Points	food group score
Green / yellow / orange / cook	5	
White or green / fresh	10	
Group 4 Fruit		20
Fruit (fresh/juice) 1 serve	10	
Group 5 oil (lipid)		20
Food cooked with oil (vegetable / lard)	3	
Food cooked with coconut cream	2	
Total		100

APPENDIX C

REAGENTS PREPARATION

I Total antioxidant capacity

Reagents

1. Sodium chloride, NaCl, Merck, K23444004, GR
2. Potassium chloride, KCl, Merck, TA812236, GR
3. Sodium hydrogen phosphate, Na₂HPO₄, Merck, F541286, GR
4. Potassium dihydrogen phosphate, KH₂PO₄, Merck, A644971, GA
5. Myoglobin, Sigma[®], M-0630, from skeletal muscle: 95-100%
6. Hydrogen peroxide solution, 141584T, BDH[®] about 30% w/w H₂O₂
7. Sephadex G-15, Pharmacia Fine Chemical Lot IB30051 particle size 40-120 μl
8. Trolox (6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid), Sigma[®], A1888
9. Potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆], P8131, Sigma[®]

10. ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium], Sigma[®], 2503966
11. Sulfuric acid, H₂SO₄, Merck, 2504 934K12819831,GR
12. Potassium permanganate, KMnO₄, 51 7K4276182,GR

Preparation of reagents

1. Stock phosphate buffer saline (PBS) 0.15 M pH 7.4
Mix 8.00 g NaCl, 0.20 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄ and 900 ml distilled water, adjust to pH 7.4 and make up to 1000 ml with distilled water.
2. Working PBS 5 mmol/L
Dilute 0.15 M PBS 1:30 with distilled water.
3. Stock myoglobin solution 400 μmol/L
Dissolve 0.068 g myoglobin in 5 mmol/L PBS and make up to 10 ml.
4. Potassium ferricyanide 740 μmol/L
Dissolve 0.02407g potassium ferricyanide in distilled water and make up to 100 ml.
5. Metmyoglobin (MetMb)
Add the stock myoglobin solution to an equal volume of freshly prepared potassium ferricyanide. After mixing, the solution was passed through an equilibrated Sephadex G-15 column for elimination of excess iron and the metmyoglobin fraction was collected. Absorbances were measured at 490, 560 and 580 nm, and subtracting the reading at 700 nm for background correction. The purity of the metmyoglobin prepared was estimated by

applying the Whitburn equation. The accepted solution indicates by the methemoglobin fraction is more than 95% of the total hem protein.

$$[\text{Met Mb}] = 146 A_{490} - 108 A_{560} + 2.1 A_{580}$$

$$[\text{Ferry Mb}] = -62 A_{490} + 424 A_{560} - 123 A_{580}$$

$$[\text{MbO}_2] = 2.8 A_{490} - 127 A_{560} + 153 A_{580}$$

where, Mb is myoglobin

6. ABTS 5 mmol/L

Dissolve 0.02743 g ABTS in 5 mmol/L PBS and make up to 10 ml.

The reagent should be stored light protected at 4 °C.

7. Hydrogen peroxide, 500 μmol/L

Hydrogen peroxide was titrated and adjusted to 500 μmol/L. The reagent is stable for 10 days at 4 °C.

8. Trolox 2.5 mmol/L

Dissolve 0.031286 g Trolox in PBS 1.5 mmol/L and make up to 50 ml, mix and sonicate for 0.5 -1 hour until solution was clear. Store at -20 °C in the dark.

II Malondialdehyde (MDA)

Preparation of reagents

1. Trichloroacetic acid reagent (TCA)

Dissolve 100 g TCA in 100 ml of 0.6 M HCl. Store the reagent at room temperature and kept light protected.

2. Thiobarbituric acid reagent (TBA), 0.12 M

Dissolve 17.298 g TBA in 100 ml of 0.26 M 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol. Store at room temperature.

3. Normal Saline Solution (NSS)

0.85g NaCl is dissolved in 100 ml of distilled water.

4. Tetraethoxypropane (TEP), 10 mM, JCN 9813, Wako Pure Chemical Industries. Ltd.

Add HCl 4-5 drops to 23.95 μ l TEP to hydrolyse to MDA and then make up to 10 ml with distilled water.

III Vitamin E

Preparation of reagents

1. Absolute ethanol
2. Xylene pure
3. Bipyridyl reagent, 0.12% (W/V)

Dissolve 0.12 g α, α' -bipyridyl in absolute ethanol and make up to 100 ml.

4. Ferric chloride reagent, 0.12% (W/V)

Dissolve 0.12 g ferric chloride in absolute ethanol and make up to 100 ml.

5. Stock standard α - tocopherol, 100 mg/dl

5.1 Dissolve 1.00 g of tocopherol in absolute ethanol and make up to 100 ml.

5.2 Dilute in 1 : 100 with absolute ethanol.

5.3 Read absorbance at 249 nm against distilled water.

5.4 Calculate purity of tocopherol at absorbance 249 nm. according to the extinction coefficient of α - tocopherol (1% in absolute ethanol) equals to 71 at 1 cm. light path.

5.5 Prepare vitamin E correct concentration to 100 mg/dl according to %purity of tocopherol

6. Working standard α - tocopherol, 2 mg/dl.

Dilute 1.0 ml of stock standard to 50 ml. with absolute ethanol.

7. β -carotene standard, 10 mg/dl.

Dissolve 10 mg β -carotene with 4-5 drops of chloroform and make up to 100 ml with xylene.

IV Blood lipid profile

A. Cholesterol

Preparing of reagents

1. Cholesterol enzyme mixture reagent. (dry powder) Class- I Laboratory Co., Ltd.

Cholesterol esterase	> 200 U/L.
Cholesterol oxidase	> 500 U/L.
Peroxidase	> 1500 U/L.

4-Aminoantipyrine 0.6 mM.

Phenol sulfonic acid (PSA) 0.7 mM.

Phosphate buffer (pH 6.5)

2. Cholesterol diluent
3. Cholesterol standard 200 mg/dl.

Reconstitute powdered reagent with cholesterol diluent, swirl to dissolve.

Store reagent at 2-8 °C. The reconstituted reagents are stable for 90 days.

B. Triglyceride

Preparation of reagents

1. Triglyceride enzyme mixture reagent. (Dry powder)

Lipase	150,000	U/L.
Glycerol kinase	400	U/L.
Glycerol-3-phosphate oxidase	2,500	U/L.
Peroxidase	500	U/L.
ATP	2.5	mM.
4-AAP	0.4	mM.
DHBS	1.0	mM.
Magnesium ion	5.0	mM

Phosphate buffer (pH7.5) and stabilizer.

2. Triglyceride diluent
3. Triglyceride standard 200 mg/dl

Reconstitute powdered reagent with triglyceride diluent, swirl to dissolve.

Store reagent at 2-8 °C. The reconstituted reagents are stable for 30 days.

C. HDL-C

Preparation of reagents

a. Phosphotungstic acid

Dissolve 2 gm Phosphotungstic acid in 30 ml distilled water. Adjust with 1M NaOH until pH of solution is 6.15. Make up to 50 ml with distilled water.

b. Magnesium chloride 2.5 mol/l

Dissolve 25.4 g MgCl_2 in distilled water and make up to 50 ml.

Mix solutions a and b in proportion of 5:1.

APPENDIX D

ข้อมูลสำหรับผู้ป่วย

ชื่อ โครงการศึกษา : ผลของการออกกำลังกาย และการเสริมด้วยวิตามินอี ต่อระดับของสาร
ต้านอนุมูลอิสระ และระดับ ไบโอมาร์คเกอร์ในเลือดของชายไทยสูงอายุ

ปัจจุบันได้มีจำนวนผู้สูงอายุมากขึ้นและการดูแลสุขภาพของตนเองเป็นสิ่งสำคัญ
ยิ่ง โดยเฉพาะการดูแลสุขภาพให้สุขภาพเพื่อลดความเสี่ยงของร่างกายเราจึงใคร่ขอเชิญท่านอาสา
เข้าร่วมโครงการฯ หากท่านมีข้อข้องใจใดๆ เกี่ยวกับการศึกษานี้กรุณาซักถามจากผู้ทำการวิจัย
ซึ่งจะเป็นผู้สามารถให้ความกระจ่างแก่ท่านได้ และหากท่านตัดสินใจเข้าร่วมการศึกษาท่านจะ
ได้รับสำเนาใบยินยอมที่ท่านเซ็นชื่อกำกับไว้ 1 ฉบับ

การศึกษานี้เกี่ยวกับเรื่องอะไร

การออกกำลังกายถือว่าเป็นพฤติกรรมสุขภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสามารถลด
ความเสี่ยงต่างๆ ของร่างกายได้ และในปัจจุบันได้มีการรับประทานวิตามินเสริมนอกเหนือจาก
การรับประทานอาหารตามปกติมากขึ้นซึ่งเชื่อว่าจะสามารถลดความเสี่ยงของร่างกายได้ ดัง
นั้นการศึกษาครั้งนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อ ศึกษาและเปรียบเทียบผลของการออกกำลังกายในช่วงระยะ
เวลาหนึ่ง และ/หรือการเสริมด้วยวิตามินอีต่อการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ และระดับไบโอมาร์คเกอร์ใน
เลือด เพื่อให้เป็นข้อมูลในการส่งเสริมการออกกำลังกายเพื่อลดความเสี่ยงของร่างกายในวัยสูง
อายุและทราบถึงแนวทางของการเสริมด้วยวิตามินเพื่อบำรุงสุขภาพในผู้สูงอายุ

ท่านจะได้ประโยชน์อะไรจากการศึกษานี้

ท่านจะไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใดๆ ในการตรวจสอบต่างๆ ตามการศึกษานี้ และได้รับการ
ตรวจร่างกายและตรวจเลือดอย่างละเอียดรวมถึงการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจขณะพักและออก
กำลังกายก่อนเข้าร่วมการศึกษา และผลสรุปจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้อื่นในอนาคต

ท่านจะต้องปฏิบัติตัวอย่างไร

ท่านจะถูกขอรับรองให้เซ็นชื่อลงในใบยินยอมบนแสดงว่าท่านตกลงโดยความสมัครใจที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ท่านจะต้องแจ้งให้ผู้วิจัยทราบว่าเป็นระยะเวลา 1 เดือนที่ผ่านมาท่านได้รับยาอะไรบ้าง หรือกำลังรับประทานยาอยู่ และบันทึกการรับประทานอาหารประจำวันของท่านจนสิ้นสุดโครงการฯ ก่อนการศึกษาท่านจะได้รับการตรวจร่างกายและเจาะเลือดค้ำบริเวณข้อพับแขน และวัดคลื่นไขมันใต้ผิวหนัง จากนั้นผู้วิจัยจะทำการสุ่ม โดยให้ท่านจับฉลากเพื่อแบ่งกลุ่มการศึกษาเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งท่านอาจได้อยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ท่านจะได้รับการฝึก ออกกำลังกายตาม โปรแกรมการศึกษา โดยการปั่นจักรยาน ณ ห้องวิจัย ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งใช้เวลาครั้งละ 30 นาที เป็นเวลา 3 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลารวมทั้งหมด 12 สัปดาห์ อย่างต่อเนื่อง

กลุ่มที่ 2 ท่านจะได้รับการฝึก ออกกำลังกายเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 พร้อมกันนี้ท่านจะได้รับวิตามินอีสำหรับรับประทานขนาด 400 มิลลิกรัมซึ่งท่านจะต้องรับประทานวิตามินอีอย่างน้อยครั้งชั่วโมงก่อนอาหารเช้า 1 แคปซูล และก่อนอาหารเย็น 1 แคปซูล

เมื่อครบ 6 และ 12 สัปดาห์ ท่านจะได้รับการเจาะเลือดค้ำบริเวณข้อพับและวัดคลื่นไขมันใต้ผิวหนัง ซึ่งตลอดระยะเวลาการศึกษาท่านจะถูกเจาะเลือดเพื่อส่งตรวจรวมทั้งสิ้น 4 ครั้ง คิดเป็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร และในระยะเวลา 12 สัปดาห์ระหว่างการศึกษาที่ท่านไม่ควรรับประทานวิตามินหรือยาบำรุงเสริมใดๆนอกเหนือจากการรับประทานอาหารตามปกติเพราะอาจรบกวนต่อผลการศึกษาและหากท่านมีความผิดปกติของสุขภาพ หรือจำเป็นต้องรับประทานยาอื่น กรุณาแจ้งให้ผู้วิจัยทราบ

อาการไม่พึงประสงค์

วิตามินอีที่ท่านได้รับ ได้ผ่านการรับรองจากสำนักงานอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 1A 1724/29 และขนาดของวิตามินอีที่ท่านได้รับ 800 มิลลิกรัมต่อวัน จะไม่ส่งผลข้างเคียงใดๆ ต่อภาวะสุขภาพของท่าน

ท่านจะทำอย่างไรหากไม่ต้องการเข้าร่วมการศึกษา หรือหากท่านเปลี่ยนใจระหว่างเข้าร่วมการศึกษา

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการนี้หากท่านไม่สมัครใจ และหลังจากท่านตัดสินใจเข้าร่วมการศึกษาแล้วท่านสามารถจะถอนตัวได้ตลอดเวลา

การปกป้องรักษาข้อมูล

ข้อมูลของท่านจะถูกบันทึกไว้ระหว่างการศึกษานี้ ซึ่งจะเก็บไว้เป็นความลับตลอดเวลา และนำข้อมูลมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ทางการวิจัยทางการแพทย์เท่านั้น

ใครจะเป็นผู้ให้ความคิดเห็นว่าควรจะทำการศึกษา

ก่อนเริ่มต้นการศึกษานี้จะต้องผ่านการพิจารณาและอนุมัติโดยคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในมนุษย์ก่อน

หากท่านมีคำถามเกี่ยวกับการศึกษานี้ท่านสามารถติดต่อใครได้บ้าง

ท่านสามารถติดต่อบุคคลดังต่อไปนี้ หากท่านมีคำถามหรือความวิตกกังวล

นางสาวชนกพร สุคนธฉายา

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โทร. 945362 (ในเวลาราชการ)



No. 48/1999

**Documentary Proof of Ethics Clearance
Research Ethics Committee
Faculty of Medicine, Chiang Mai University
Chiang Mai, Thailand**

Title of Project : effect of exercise and vitamin E supplement on antioxidants capacity and lipid profile in Thai elderly men

Principal Investigator : Miss Busyamas Chewaskulyong, M.D.

Name of Institution : Department of Physiology,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Approved by Research Ethics Committee on : December 14, 1999

Signature of Chairman of the Committee : *Pien Chiowanich*

(Pien Chiowanich, M.D.)

Signature of Head of the Institution : *P. Netrawichien*

(Piya Netrawichien, M.D.)

Date of Approval : December 14, 1999

VITA

NAME	Miss Chanokporn Sukontachaya
DATE OF BIRTH	10 April 1972
PLACE OF BIRTH	Chiang Mai, Thailand
INSTITUTION ATTENDED	Payap University, 1990-1994
	Bachelor of Science (Nursing)