

بررسی اثر توکوترينول افزوده شده به روغن کلزا بر وضعیت التهابی، استرس نیتروزاتیو و میکروآلبومین ادرار در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲: کارآزمایی بالینی تصادفی دو سوکور

ندا حقیقت^۱، محمدرضا وفا^۲، شهریار اقتصادی^۳، ایرج حیدری^۴، آغا فاطمه حسینی^۵

- ۱- کارشناس ارشد تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تغذیه، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات غدد (فیروزگر) انتستیتو غدد درون ریز و متابولیسم (پردیس همت)، دانشگاه علوم پزشکی تهران پست الکترونیکی: mrvafa@tums.ac.ir
- ۳- استاد گروه تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴- استادیار، مرکز تحقیقات غدد (فیروزگر)، انتستیتو غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۵- مریم گروه آمار، دانشکده مدیریت آمار زیستی، دانشکده مدیریت و اطلاع رسانی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۳

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۲

چکیده

سابقه و هدف: توکوترينول‌ها از طریق مکانیسم‌های ایمنولوژی و التهابی در پیشگیری از نفوropاتی دیابت موثر شناخته شده‌اند. این مطالعه با هدف تعیین اثرات مصرف روغن کلزا غنی شده با mg ۲۰۰ توکوترينول به مدت ۸ هفته بر وضعیت التهابی، استرس نیتروزاتیو و میکروآلبومین ادرار در بیماران دیابتی نوع ۲ انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این کارآزمایی بالینی ۵۰ بیمار دیابتی نوع ۲ (قد خون ناشتا بیشتر از mg/dl ۱۲۶) به طور تصادفی به دو گروه (مداخله و کنترل) تقسیم شدند. گروه مداخله روزانه ۱۵ گرم روغن کلزا غنی شده با mg ۲۰۰ توکوترينول (T3) و گروه کنترل همان میزان روغن کلزا را بدون توکوترينول دریافت کردند. نمونه‌ی خون و ادرار ۲۴ ساعته‌ی بیماران در ابتدا و بعد از ۸ هفته مداخله جمع‌آوری شد. سطوح NO و hs-CRP خون، میکروآلبومین، کراتینین و حجم ادرار اندازه‌گیری شد. در ابتدا و انتهای مطالعه وضعیت آنتروپومتری، سطوح فعالیت بدنی، دریافت مواد غذایی برآورد و بین دو گروه مقایسه شد.

یافته‌ها: در گروه مداخله، hs-CRP (p = ۰/۰۰۳) و میکروآلبومین ادرار (p = ۰/۰۰۴) به طور قابل توجهی کاهش یافتند و در پایان مطالعه، تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه مشاهده شد [۰/۲۵ (۱۵)، ۰/۱۱ (۲۲) در برابر ۰/۷۵ (۳۹)]. سطح NO در گروه مداخله کاهش یافت، اما معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: توکوترينول می‌تواند وضعیت التهابی را بهبود بخشد و از نفوropاتی دیابتی جلوگیری کند، اما اثر آن بر استرس نیتروزاتیو به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

واژگان کلیدی: توکوترينول، میکروآلبومینوریا، وضعیت التهابی، استرس نیتروزاتیو، دیابت نوع ۲

• مقدمه

درصد بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۱۵٪ بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ دچار نفوropاتی می‌شوند(۱).

برخی شواهد نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل α-لیپوئیک اسید (۲) و ویتامین C (۳) در نفوropاتی دیابتی نقش پیشگیری‌کننده دارند. اثر مکمل‌یاری با ویتامین E نیز در پیشگیری یا درمان نفوropاتی دیابتی در چندین مطالعه نشان داده شده است (۴-۶). ویتامین E یک

دیابت ملیتوس بیماری پیش‌رونده‌ای است که به آسیب‌های عروق ریز و درشت منجر می‌شود. با پیشگیری از عوارض دیابت، کیفیت زندگی بیماران دیابتی ارتقا می‌یابد و هزینه‌های مربوطه تا حدود زیادی پایین می‌آید. نفوropاتی یکی از عوامل مرگ و میر در بیماران دیابتی است که اغلب به بیماری‌های مزمن کلیه منجر می‌شود. تقریباً ۳۰ تا ۴۰

از سوی دیگر، جای خالی توکوترينول‌ها که اثرات مفید به مراتب بیشتری نسبت به α -توکوفرول دارند، در سبد غذایی کشور ما دیده می‌شود. زیرا اغلب روغن‌های آفتابگردان، کلزا و سویا و... مصرف می‌شود که فقط حاوی α -توکوفرول هستند. بنابراین، در پژوهش حاضر، اثر ویتامین E غنی از توکوترينول بر میکروآلبومین ادرار، استرس نیتروزاتیو (NO) و سطح hs-CRP در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ بررسی شد.

• مواد و روش‌ها

در این کارآزمایی بالینی تصادفی دوسوکور در مرکز تحقیقات غدد (فیروزگر) دانشگاه علوم پزشکی تهران ۵۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ (۱۲ مرد و ۳۳ زن) با میانگین سنی ۷۲ \pm ۵/۶۵ سال و طول مدت ابتلا به دیابت ۴/۷۵ \pm ۳/۴۴ سال که واجد شرایط شرکت در مطالعه بودند، با همکاری پژوهش فوق تخصص غدد وارد مطالعه شدند. حجم نمونه‌ی مورد نیاز پژوهش با استفاده از معیار میکروآلبومین ادرار، طبق مطالعه‌ی فروید و همکاران^(۶) بر اساس فرمول و با توجه به رابطه‌ی آماری فوق با میزان اطمینان ۹۵٪ توان آزمون ۹۰٪ و با پیش‌بینی ۲۰٪ افت نمونه، در مجموع دو گروه مداخله و شاهد ۵۰ نفر تخمین زده شد. افراد در محدوده سنی ۳۵ تا ۶۰ سال و با BMI کمتر از ۴۰ و قند خون ناشتا کمتر از ۱۲۶ و داشتن سابقه‌ی ابتلا به دیابت حداقل در یک سال گذشته، در صورت مبتلا نبودن به بیماری کبدی، تیروئیدی، سرطان، التهاب یا بیماری عفونی و بارداری و شیردهی وارد مطالعه شدند. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: استفاده از مکمل‌های مولتی ویتامین و مینرال و آنتی اکسیدان‌ها در یک ماه گذشته، داروهای وارفارین و سایر ضد انعقادهای خون و مهارکننده‌های ACE، تغییر دوز یا نوع دارو در طول مطالعه، تغییر میزان فعالیت فیزیکی در طول مطالعه یا ۲ ماه پیش از مطالعه، مصرف انسولین، سیگار، مواد مخدر و الکل.

هدف مطالعه برای شرکت‌کنندگان توضیح داده و رضایت‌نامه‌ی کتبی آگاهانه از آنان اخذ شد. این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران مورد تأیید قرار گرفت

آن‌تی‌اکسیدان و ضد التهاب قوی است که شامل هشت ایزومر مت Favat، چهار ایزومر توکوفرول (T) و چهار ایزومر توکوترينول (T3)، است (۷). مکمل‌یاری با α -توکوفرول در نمونه‌های انسانی و حیوانی با کاهش CRP و سیتوکین‌های پیش‌التهابی و نیتریک اکسید (NO) همراه بوده که نشان‌دهنده اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی α -توکوفرول است.

توکوترينول‌ها به نسبت توکوفرول‌ها بسیار کمتر مطالعه شده‌اند و مطالعات انسانی محدودی در این زمینه وجود دارد (۸). اغلب مطالعات پیشین در شرایط آزمایشگاهی و روی حیوانات انجام شده است. بنابراین، خواص عملکردی T3 هنوز به طور کامل شناخته نشده است. اخیراً در ارتباط با ایجاد و پیشرفت نفوپاتی دیابتی، نقش مکانیسم‌های ایمنولوژی و التهابی نشان داده شده است (۹). در سطح سلولی، T3 با مهار فعال‌سازی NF- κ B باعث کاهش التهاب در کلیه‌های موش‌های دیابتی می‌شود. در پژوهش Kuhad و همکاران، T3 با کاهش سیتوکین‌ها، استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز اثرات قابل توجهی در محافظت از کلیه‌ها نشان داد. سایر مکانیسم‌های محافظت‌کننده از کلیه‌ها هنوز مشخص نیست (۱۰). در مطالعه‌ی دیگری Siddiqui و همکاران مکمل‌های توکوترينول حاصل از پالم و سبوس برنج وضعیت قند خون و عملکرد کلیه‌ها را در موش‌های دیابتی نوع ۱ بهبود بخشیدند، اما در دز مشابه اثر توکوترينول پالم قوی تر از سبوس برنج بود (۱۱). در مطالعه‌ی Khan توکوترينول با بهبود پروتئین اوری، بازجذب پروگزیمال و گلومرول‌ها و وضعیت اکسیداسیون و احیای سلولی از آسیب‌های حاد کلیوی ناشی از k2Cr2O7 جلوگیری کرد. این شواهد نشان می‌دهد که عملکرد کلیه‌های نمونه‌های حیوانی با مصرف T3 می‌تواند بهبود یابد (۱۲).

تنها مطالعه‌ی انسانی که در ارتباط با اثر ویتامین E بر عملکرد کلیه‌ها انجام گرفت، مطالعه‌ای روی افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ بود که با مصرف مکمل ویتامین‌های E و C به طرز چشمگیری سطح میکروآلبومین ادرار در گروه مداخله پایین‌تر از گروه کنترل قرار گرفت (۶).

طرز تهیه روغن کانولا غنی از توکوترینول: محلول‌های توکوماس حاوی توکوترینول از شرکت مالزیایی ICOF (Inter-Continental Oils and Fats) توکوماس مورد استفاده طبق آنالیز آزمایشگاه حاوی $\frac{38}{4}$ % توکوترینول بود؛ شامل $\frac{16}{6}$ % گاما-توکوترینول و $\frac{13}{2}$ % آلفا-توکوترینول. بقیه‌ی ترکیبات توکوماس عبارت بودند از: $\frac{23}{5}$ % مونوگلیسرید، $\frac{8}{8}$ % دی‌گلیسرید، $\frac{7}{0}$ % تری‌گلیسرید، $\frac{4}{7}$ % اسکوالن، $\frac{9}{4}$ % فیتواسترول، کو Q10 و $\frac{10}{1}$ % اسیدهای چرب. طبق محاسبات انجام شده، در آزمایشگاه به صورت کاملاً استاندارد 29400 میلی‌گرم توکوماس به 810 گرم روغن کانولا افزوده شد. بنابراین، یک 525 قاشق غذا خوری روغن کانولا (15 mg) حاوی حدود 200 میلی‌گرم توکوماس (۰.۲۰۰ میلی‌گرم مجموع T3) بود. اضافه کردن توکوترینول به روغن کانولا در ظاهر (رنگ و بو) آن تغییری ایجاد نکرد و روغن غنی شده کاملاً همگن و هموژن بود. از طرفی جهت یکسان نمودن اندازه روغن در بطری روغن‌ها "در" همه‌ی بطری‌ها باز شد و به اندازه‌ی مورد نظر رسانده شد. سپس روغن‌ها توسط فرد دیگری کدگذاری شدند.

ارزیابی آزمایشگاهی: نمونه‌ی خون و ادرار 24 ساعته در شروع و پایان مطالعه جمع‌آوری گردید. نمونه‌ی خون بعد از 10 تا 12 ساعت ناشتا بودن و قبل از مصرف قرص‌های کاهنده‌ی قند خون گرفته شد. بلافاصله بعد از خون‌گیری، سرم توسط سانتریفیوژ (3000 تا 4000 دور) به مدت 10 دقیقه به دست آمد. در مورد جمع‌آوری ادرار 24 ساعته به افراد شرکت‌کننده آموزش لازم داده شد.

نیتریک اکسید (NO) با استفاده از روش کالری متري و کیت شرکت Calbiochem، میکروآلبومین ادرار با استفاده از روش ایمنوتوربیدومتری، کراتینین ادرار به روش توربیدومتری ایمنواسی توسط دستگاه Roshe آلمان اندازه‌گیری شد.

روش‌های آماری: در این مطالعه مقایسه متغیرهای کمی بین دو گروه با آزمون T مستقل (Man-Whitney) و مقایسه‌ی تغییرات در هر گروه در طول مطالعه با استفاده از آزمون t زوج (Wilcoxon) انجام شد. به منظور ارزیابی

(مجوز کمیته‌ی اخلاق به شماره ۱۴۲۱ در تاریخ ۸۹/۴/۲۷) و در مرکز ثبت کارآزمایی بالینی با شماره شناسه‌ی IRCT201008092365N2 ثبت شد.

شرکت‌کنندگان به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه روزانه 15 میلی‌گرم روغن کانولا غنی شده با 200 میلی‌گرم T3 و گروه دیگر همان مقدار روغن کانولا مشابه بدون T3 را به مدت 8 هفته دریافت کردند. شرکت‌کنندگان روزانه 15 میلی‌گرم (یک قاشق غذاخوری روغن کانولا) را همراه با یکی از وعده‌های غذایی مصرف می‌کردند؛ به طوری که این روغن جایگزین روغن مصرفی آن‌ها شد. قاشق مورد نظر که گنجایش 15 میلی‌گرم روغن را داشت، از نوع یک بار مصرف به همه‌ی بیماران داده شد و از آن‌ها خواسته شد که روغن را با این قاشق‌ها بردارند. چون ایزومرهای ویتامین E به حرارت و اکسیداسیون حساس هستند، از بیماران خواسته شد که از روغن در فرایند پخت و پز استفاده نکنند. همچنین، از آن‌ها خواسته شد رژیم غذایی و فعالیت بدنی معمول خود را در طول پژوهش حفظ کنند. جهت نظارت بر مصرف روغن‌ها، با تمامی شرکت‌کنندگان تماس تلفنی گرفته می‌شد. با اندازه‌گیری مقدار روغن باقی‌مانده روغن در بطری‌های بازگردانده شده مشخص شد که میزان پذیرش روغن‌ها بالای 95% بود.

مشخصات زمینه‌ای و تن‌سنجه‌ی شامل سن، وزن، قد، مدت ابتلا و دوز داروی مصرفی بیماران ثبت شد. قد با استفاده از قدسنج متصل به ترازو و با دقت 0.5 cm بدون کفش اندازه‌گیری شد، وزن نیز با ترازوی Seca و با دقت 0.5 kg در حالت ناشتا با حداقل لباس و بدون کفش در ابتداء 0.5 kg/m^2 BMI از تقسیم وزن بر پرسشنامه بین‌المللی فعالیت بدنی، پرسشنامه‌ی 24 ساعته یاد آمد خوارک سه روز ابتدایی مطالعه (یک روز تعطیل و دو روز عادی) و سه روز انتهایی مطالعه توسط هر دو گروه مداخله و شاهد تکمیل شد. پرسشنامه‌ی 24 ساعته یاد آمد خوارک با استفاده از نرم‌افزار (N4) Nut4 آنالیز و مقدار انرژی، کربوهیدرات، پروتئین، چربی، روی، ویتامین‌ها A، C، E و سلنیوم محاسبه شد.

به عنوان کاهنده قند خون استفاده می‌شد، متفورمین ($N=10$) یا گلیبنکلامید به تنهایی ($N=16$) یا ($N=19$) بود که در طول مطالعه بدون تغییر باقی ماند. از نظر کربوهیدرات، پروتئین، چربی، ویتامین‌های A، E، C و روی و سلنیوم هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو گروه قبل و بعد از مداخله مشاهده نشد(جدول ۲).

اثرات T3 بر میکروآلبومین ادرار، استرس نیتروزاتیو و hs-CRP در جدول ۳ ارائه شده است. سطح میکروآلبومین، کراتینین و حجم ادرار و NO و سرم در آغاز مطالعه بین دو گروه متفاوت نبود. در گروه T3 میزان میکروآلبومین ادرار به طرز چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود($p<0.001$) ولی غلظت کراتینین و حجم ادرار در مقایسه با شروع مطالعه و گروه کنترل تفاوت چشمگیری نداشتند. hs-CRP در گروه T3 به طرز معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل پایین‌تر بود ($p=0.048$). در مقایسه با ابتدای مطالعه نیز در گروه hs-CRP T3 میکروآلبومین ادرار ($p=0.003$) کاهش یافت. در میزان غلظت NO سرم در هر دو گروه T3 و کنترل نسبت به ابتدای مطالعه و بین دو گروه هیچ تفاوت معنی‌داری دیده نشد.

ارتباط بین متغیرهای کیفی از آزمون کای ۲ استفاده شد. همه‌ی مقادیر بر اساس (انحراف معیار \pm میانگین) جهت پارامترهای با توزیع نرمال یا میانه (IQR) جهت پارامترهای با توزیع غیر نرمال گزارش شده است. سطح ۰/۰۵ به عنوان مبنای معنی‌داری در نظر گرفته شد.

۰ یافته‌ها

در نهایت، پژوهش حاضر با ۴۵ بیمار به پایان رسید. از بین شرکت‌کنندگان در کارآزمایی از گروه دریافت‌کننده‌ی T3 دو نفر (یک نفر به علت مهاجرت و یک نفر به علت شروع تزریق انسولین)، سه نفر از گروه مکمل‌یاری کنترل (یک نفر به علت ناتوانایی در راه رفتن به دلیل شکستگی پا و یک نفر به علت عدم دسترسی به نمونه‌ی ادرار در مرحله‌ی پایانی مطالعه، یک نفر به علت عدم تمایل به همکاری) و در مجموع پنج نفر از مطالعه خارج شدند.

ویژگی‌های عمومی افراد شرکت‌کننده در مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. در ابتدای مطالعه از نظر سن، جنس، وزن، قد، BMI، طول مدت بیماری، نوع مصرف دارو و فعالیت بدنی هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مداخله و کنترل مشاهده نشد. به همین ترتیب هیچ تغییر قابل توجهی در وزن، BMI و سطح فعالیت بدنی در طول مطالعه و بین دو گروه مشاهده نشد. از ابتدای مطالعه داروهایی که

جدول ۱. مشخصات عمومی افراد در گروه‌های مورد مطالعه در ابتدای مطالعه

P value	گروه کنترل (n=۲۲)	گروه مداخله (n=۲۳)	گروه متغیر
۰/۴۴۵	۷ (۳۱/۸)	۵ (۲۱/۷)	جنس
	۱۵ (۶۸/۲)	۱۸ (۷۸/۳)	مرد، تعداد (%)
۰/۷۰۹	۵۵/۲۰ \pm ۵/۵۵	۵۵/۹ \pm ۵/۹۶	زن، تعداد (%)
۰/۹۲۳	۴/۷ \pm ۲/۹	۴/۸۷ \pm ۴/۱	سن (سال)
۰/۳۷۴	۶۸/۵ \pm ۱۲/۰	۶۴/۵ \pm ۱۷/۱۲	طول مدت ابتلا به دیابت (kg)
۰/۵۳۳	۲۶/۱ \pm ۳/۳	۲۵/۱ \pm ۶/۹۰	وزن (kg/m ²)
			نمایه توده بدن (kg/m ²)
			داروهای هیپوگلیسمیک، تعداد (%)
۰/۳۰۳	۳ (۱۳/۶)	۷ (۳۰/۴)	متغورمین
	۱۰ (۴۵/۵)	۶ (۲۶/۱)	گلیبن گلامید
	۹ (۴۰/۹)	۱۰ (۴۳/۵)	متغورمین + گلیبن گلامید

داده‌ها در جدول فوق به صورت (میانگین \pm انحراف معیار) یا تعداد(%) ارائه شده‌اند.
P-value مقایسه‌ی بین گروه‌ها (آزمون T-مستقل یا کای اسکوئر)

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار دریافت مواد غذایی در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه	شروع مطالعه	پایان مطالعه	میانگین تغییرات
		$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
انرژی (Kcal)	مدخله	۳۱۹۱±۱۱۳۶/۶۸	۱۴۵۵/۶۷±۳۵۴.	۳۴۹/۳۲±۱۸۳۵/۳
کربوهیدرات (g)	کنترل	۲۹۲۸±۱۰۵۱/۰۴	۲۸۶۷±۱۷۳۴	-۶۰/۷۰±۱۵۵۹/۰
پروتئین (g)	مدخله	۴۱۵/۶۶±۱۰۹/۳۷	۵۰/۷۳۹±۱۴۸/۶۹	۹۱/۲۷±۲۰/۸۹
روی (mg)	کنترل	۴۰۰/۳۹±۱۷۳/۴۵	۴۱۰/۳۵±۲۱۶/۵۴	۹/۹۶±۲۸۷/۳۶
سلنیوم (mg)	مدخله	۸۷/۹۵±۳۲/۴۰	۱۰/۶۲±۵۳/۸۴	۱۴/۶۶±۴۰/۷۱
ویتامین A (μg)	کنترل	۸۸/۲۸±۳۲/۵۲	۹۴/۷۴±۳۲/۵۵	۶/۱۸±۴۲/۹۸
چربی (g)	مدخله	۱۳۹/۵۴±۵۹/۲۲	۱۱۸/۶۱±۴۱/۸۸	-۲۰/۹۲±۵۵/۲۵
ویتامین C (mg)	کنترل	۱۱۴/۷۱±۵۵/۷۲	۱۱۰/۹۸±۳۷/۶۲	-۷/۰۹±۵۶/۳۱
ویتامین E (mg)	مدخله	۱۰/۲۴±۳/۶۴	۱۰/۸۲±۴/۸۲	۰/۵۹۸±۴/۵۳
کربوهیدرات (g)	کنترل	۹/۶۳±۳/۳۰	۹/۰۰±۲/۸۱	-۰/۶۲۲±۴/۶۵
انرژی (Kcal)	مدخله	۱۲۰۴/۶±۵۹۰/۲۷	۱۶۹۷/۵±۱۲۲۶/۶۵	۴۹۲/۸۵±۱۲۲۴/۳
ویتامین A (μg)	کنترل	۱۳۲۱/۴±۱۴۱۸/۲۸	۱۷۵۵/۵۶±۱۹۲۴/۶۰	۴۳۴/۱۹±۲۵۴۹/۲
ویتامین C (mg)	مدخله	۱۹۹/۵۹±۸۵/۵۵	۱۹۲/۱۶±۱۴۲/۵۳	-۷/۴۳±۷۶۴/۸۴
ویتامین E (mg)	کنترل	۱۵۶/۷۷±۵۶/۳۳	۱۷۴/۲۶±۹۵/۶۸	۱۷/۴۹±۱۲۳/۶۶
کربوهیدرات (g)	مدخله	۱۷/۲۷±۱۷/۰۴	۲۰/۳۵±۴۱/۱۸	۳/۰۷±۴/۲۵
ویتامین E (mg)	کنترل	۹/۴۶±۹/۰۱	۱۹/۴۶±۳۷/۶۳	۹/۷۴±۴۰/۴۸
سلنیوم (mg)	مدخله	۰/۱۱±۰/۰۳۵	۰/۱۱±۰/۰۳۷	۰/۰۰۲±۰/۰۴۴
ویتامین C (mg)	کنترل	۰/۱۰±۰/۰۵۳	۰/۱۰±۰/۰۵۲	۰/۰۰۲±۰/۰۸۴۰

نتایج آزمون t مستقل نشان داد که در ابتداء و انتهای مطالعه اختلاف آماری معنی داری بین دو گروه از نظر دریافت این مواد مغذی وجود ندارد.

نتایج آزمون t زوج نشان داد که در هر دو گروه بین قبل و بعد از مداخله، تغییر معنی داری در دریافت این مواد مغذی وجود نداشته است.

جدول ۳. میانگین و انحراف معیار متغیرها در گروه‌های مورد مطالعه در شروع و پایان مطالعه

متغیرها	T3 (n=۲۳)	گروه روغن کانولا غنی شده با (n=۲۲)	P ₁ *	P ₂ **
میکروآلومین ادرار (nmol/dl)	۲۰ (۱۳، ۳۷)	۲۰ (۱۵، ۳۲)	۰/۰۰۰	۰/۸۴۷
ابتدای مطالعه	۱۱ (۹، ۲۵)	۲۲ (۱۵، ۳۹/۷۵)	-۰/۰۰۱	۰/۰۰۳
انتهای مطالعه	-۸(-۲۹، -۲)	۰/۵(-۱/۲۵، ۱۰/۰۵)		
تغییرات				
حجم ادرار (dL)	۷۱۰/۴۲±۲۰۵۵/۲	۴۶۲۰/۰۹±۱۷۷۱/۱	۰/۱۲۲	۰/۱۴۱
ابتدای مطالعه	۵۵۵/۴۱±۱۸۴۶/۵	۵۴۹/۴۹±۱۷۸۰/۰	-۰/۹۷۹	۰/۸۹۲
انتهای مطالعه	۶۲۱/۶۰±۲۰۸/۶۸	۴۸۱/۸۲±۲/۸۵		۰/۲۱۷
تغییرات				
کراتینین ادرار (mg/dl)	۰/۳۳±۱/۰۶	۰/۴۳±۱/۲۱	۰/۰۵۶۰	۰/۱۰۷
ابتدای مطالعه	۰/۳۲±۱/۰۸	۰/۳۹±۱/۲۷	-۰/۰۲۳۰	۰/۱۸۶
انتهای مطالعه	۰/۲۱۱±-۰/۲۶۱	۰/۲۷±۰/۰۵		۰/۹۷۸
تغییرات				
Hs-CRP(Pg/mL)	۲۰/۹۳±۲۵/۰۲	۳۲/۸۷±۲۶/۵۰	۰/۰۰۴	۰/۷۱۰
ابتدای مطالعه	۱۱/۳۶±۱۴/۱۱	۱۸/۲۴±۱۵/۸۵	-۰/۱۲۵	۰/۸۶۰
انتهای مطالعه	۱۵/۵±-۱۰/۹۱	۲۷/۵±-۹/۸۸		۰/۰۴۸
تغییرات				
NO(pmol/ml)	۵۸/۰۲±۱۴۷/۳۰	۵۵/۸۴±۱۶۲/۸۴	۰/۰۴۶	۰/۰۷۸
ابتدای مطالعه	۵۹/۵۸±۱۴۲/۸۴	۶۸/۱۱±۱۷۹/۷۰	-۰/۲۱۹	۰/۲۹۱
انتهای مطالعه	۶۶/۲±۳/۰۰	۶۰/۰۸±۱۶/۸۵		۰/۲۰۴
تغییرات				

داده‌ها در جدول فوق به صورت میانگین \pm انحراف معیار یا میانه (IQR) ارائه شده‌اند.

* مقایسه شروع مطالعه با شروع مطالعه در داخل هر گروه (آزمون T-زوج یا وبلکاکسون)

** مقایسه شروع مطالعه با شروع مطالعه در داخل هر گروه (آزمون T-زوج یا وبلکاکسون)

• بحث

گاما_توکوتربینول از مهارکننده‌های طبیعی پروتئوزوم شناخته شده است که می‌تواند تولید NO، TNF- α و سایر سیتوکین‌های التهابی را کاهش دهد (۱۵). *Tan* و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر مهارکنندگی توکوتربینول‌های α ، β ، γ را بر تولید NO ناشی از LPS در سلول‌های میکروگلی بررسی کردند. میکروگلی از سلول‌های ایمنی است که در سیستم عصبی مرکزی مستقر است. میکروگلی‌ها با ذرات مختلف توکوتربینول (100 nM ، $250\text{ }\mu\text{M}$ ، $2/5\text{ }\mu\text{M}$ و $10\text{ }\mu\text{M}$) به مدت ۲۴ ساعت درمان شدند و سپس با $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ لیپوپلی‌ساکارید تحریک شدند. تمام ایزوفرم‌های توکوتربینول، NO را کاهش دادند، ولی $50\text{ }\mu\text{g}$ از سایر ذرات موثرتر بود. δ -توکوتربینول NO را در عرض ۴۸ ساعت پس از تزریق LPS تقریباً 50% پایین آورد. این ایزوفرم از سایر ایزوفرم‌ها قوی‌تر عمل کرد (۱۶). در پژوهش حاضر نیز سطوح سرمی NO متمایل به کاهش بوده است، ولی این کاهش معنی‌دار نیست که شاید به دلیل غلظت پایین تر δ -توکوتربینول (۰.۸/۶٪ کل ویتامین E دریافتی) در مقایسه با سایر ایزوفرم‌های موجود در توکوماس باشد. همچنین، در یک سری از مطالعات *Kuhad* و *Tiwari* در سال ۲۰۰۹ مصرف ۱۰۰ mg/day توکوتربینول به مدت ۸ هفته باعث کاهش نیتریت در بافت‌های کلیوی و مغزی موش‌های wistar شد (۱۷-۱۹). در این مطالعات میزان NO در بافت اندازه‌گیری شده بود، در حالی که در پژوهش حاضر NO سرمی ارزیابی شد. تنها پژوهشی که اثر توکوتربینول را بر سطوح سرمی NO بررسی کرد، مطالعه‌ی *Qureshi* بود که اثر $50\text{ }\mu\text{g}$ - δ PPM توکوتربینول و کورسیتین را بر شاخص‌های پیش التهابی (NO، TNF- α) در جوجه‌های نر مورد بررسی قرار داد. δ -توکوتربینول باعث کاهش 45% درصدی NO سرمی شد (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر با وجود کاهش میزان NO سرم، این کاهش معنی‌دار نبود، در مطالعه‌ی *Qureshi*، δ توکوتربینول که مؤثرترین ایزوفرم توکوتربینول در کاهش NO است، ارزیابی شد که باعث کاهش نیتریک اکسید سرم شد، در حالی که در پژوهش حاضر، ترکیب ایزوفرم‌های توکوتربینول بررسی شدند. از طرفی ممکن است میزان δ -توکوتربینول موجود در توکوماس (۰.۸/۶٪) توکوتربینول دریافتی معادل mg در انسان‌ها برای کاهش NO کفایت لازم را سرم نداشته باشد.

پروتئینوری که اغلب در نتیجه‌ی دیابت ایجاد می‌شود، به علت افزایش دفع یک سری پروتئین‌های با وزن ملکولی کم است به طوری که آلبومین سهم اندکی (۵ تا ۲۰درصد) از کل پروتئین ادرار را تشکیل می‌دهد. علت افزایش دفع ادراری پروتئین‌های با وزن ملکولی کم عمدتاً کاهش بازجذب توبولی پروتئین‌های پلاسمایی فیلتر شده است (۱۳). در انسان‌ها میکروآلبومینوری یک شاخص پیش‌بینی کننده‌ی قوی نفوropاتی است (۱۴). همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر، مطالعه‌ای نشان داد که مصرف توکوتربینول‌ها به مدت ۲۱ روز (در $dz\text{ mg/kg}$ ۲۰۰) دفع پروتئین ادرار را در موش‌های wistar مبتلا به آسیب حاد کلیوی ناشی از دی کرومات پتابسیم کاهش داد (۱۱). همچنین، در مطالعه‌ی *Kuhad* در موش‌های wistar نر، توکوتربینول بعد از ۸ هفته مکمل‌یاری با ذرات مختلف در $dz\text{ mg/kg}$ ۱۰۰ بیشترین اثر را در کاهش دفع آلبومین ادراری، دفع ادرار، کراتینین سرم، نیتروژن اوره‌ی خون، کلیرانس کراتینین و اوره و فشار خون در مقایسه با گروه درمان نشده دیابتی داشت (۱). در مطالعه‌ی دیگری مصرف توکوتربینول حاصل از پالم و سبوس برنج در $dz\text{ mg/kg}$ ۲۰۰ به مدت ۸ هفته بر شاخص‌های کلیوی موش‌های wistar بررسی شد. توکوتربینول روغن پالم به طرز قابل ملاحظه‌ای پروتئین ادرار را در مقایسه با گروه بدون درمان و گروه درمان شده با توکوتربینول سبوس برنج کاهش داد (۱۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز توکوتربینول حاصل از پالم (توکوماس ۰.۵٪) بررسی شده است. بر اساس جستجوی ما، مطالعه‌ی کنونی اولین مطالعه‌ای است که اثر توکوتربینول‌ها را بر شاخص ارزیابی کلیوی و میکروآلبومینوری در انسان‌ها بررسی کرده است. در این مطالعه، اثرات توکوتربینول در گروهی که به دلیل ابتلا به دیابت نوع ۲ کنترل نشده ($126\text{ mg/dl} < \text{FBS}$) در معرض پروتئینوری هستند، میکروآلبومین ادرار را به طرز چشمگیری کاهش داد.

التهاب در بسیاری از بیماری‌های مرتبط با سن نظیر سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و بیماری‌های اعصاب نقش دارد. اخیراً نشان داده شده است که پروتئوزوم یک تنظیم‌کننده‌ی اساسی التهاب است که تولید سازنده‌های التهاب مانند IL-1، TNF- α ، IL-6 و NO را در پاسخ به بسیاری تحريكات القا می‌کند. مهارکننده‌های پروتئوزوم می‌توانند از طریق ماکروفازها تولید NO را سرکوب کنند.

تجویز ۵۲۵ میلی گرم TRF (توکوماس) یا ۲۰۰ میلی گرم T3 افزوده شده به روغن کانولا به مدت ۸ هفته می‌تواند میکروآلبومین ادرار و hs-CRP را در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ بهبود بخشد. این مطالعه نشان می‌دهد که T3 می‌تواند در کنترل التهاب و جلوگیری از نفروپاتی مفید باشد. بررسی اثرات T3 به صورت خالص و همچنین به صورت ایزومرها متفاوت آن به تفکیک بر عملکرد کلیوی جهت جستجوی مکانیسم عمل T3 ضروری است. بررسی اثرات درمانی توکوترينول بر سایر شاخص‌های کلیوی در افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتی در دزهای متفاوت توکوترينول به مطالعات بیشتر نیاز دارد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان "بررسی اثر توکوترينول افزوده شده به روغن کلزا بر وضعیت التهابی، استرس نیتروزاتیو و میکروآلبومین ادرار در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲" در سال ۱۳۹۰-۱۳۸۹ است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و با همکاری انستیتو غدد درون ریز و متابولیسم این دانشگاه اجرا شده است. همچنین از همکاری مسئولان محترم انجمن دیابت گابریک کمال تشکر را داریم.

در مطالعات پیشین نشان داده شده که توکوترينول‌ها در تنظیم فاکتور رونویسی NF-κB، تنظیم‌کننده‌ی ژن‌های التهابی و ایمنی نقش دارند. مهار NF-κB که ژن‌های مرتبط با عوامل پیش التهابی نظری سیتوکین‌ها را تنظیم می‌کند، به کاهش سیتوکین‌ها و تولید hs-CRP منجر می‌شود(۱۷). بر اساس جستجوی ما مطالعه‌ی حاضر اولین پژوهشی است که اثر توکوترينول‌ها را در کاهش سطوح hs-CRP نشان می‌دهد.

در پژوهش حاضر، ترکیب ویتامین E حاوی دز پایینی از α-توکوفرول است. در نتیجه، احتمالاً اثرات مفید مشاهده شده به α-توکوفرول مربوط نمی‌شود و T3 ترکیب فعال بوده است. مطالعه‌ای نشان داد که T3 همراه با ۲۰٪ توکوفرول یا بیشتر، اثرات کاهنده‌ی کلسترول T3-۷ را افزایش می‌دهد(۲۱). اثرات ایزومرها مختلف توکوترينول در تقویت یا مهار کنترل قند خون و خواص آنتی‌اکسیدانی نیازمند مطالعات بیشتری است. در این مطالعه برای بهبود پذیرش و جذب، T3 به روغن کانولا افزوده شد. به علت میزان کم در منابع طبیعی، مواد غذایی به تنها یکی نمی‌توانند T3 مورد نیاز را تأمین کنند(۲۲). بنابراین، جهت افزایش دریافت، مکمل‌یاری یا غنی‌سازی روغن با این ویتامین به خصوص در بیماران دیابتی مفید خواهد بود.

• References

- Kuhad A, Chopra K. Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NFkB signaling pathway. *Life Sci* 2009;84(9-10):296-301.
- Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J. Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 2003;34(2):186-95.
- Iino K, Iwase M, Sonoki K, Yoshinari M, Iida M. Combination treatment of vitamin C and desferrioxamine suppresses glomerular superoxide and prostaglandin eproduction in diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 2005;7(1):106-9.
- Koya D, Hayashi K, Kitada M, Kashiwagi A, Kikkawa R, Haneda M. Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. *J Am SocNephrol* 2003;14(8 suppl 3):S250-3.
- Haidara MA, Mikhailidis DP, Rateb MA, Ahmed ZA, Yassin HZ, Ibrahim IM, et al. Evaluation of the effect of oxidative stress and vitamin E supplementation on renal function in rats with streptozotocin-induced Type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 2009;23(2):130-6.
- Farvid MS, Jalali M, Siassi F, Hosseini M. Comparison of the effects of vitamins and/or mineral supplementation on glomerular and tubular dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28(10):2458-64.
- Serbinova EA, Packer L. Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Methods Enzymol* 1994;234:354-66.
- Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family. *Mol Aspects Med* 2007;28(5-6):692-728.
- Tuttle KR. Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(6):1537-8.
- Siddiqui S, Rashid Khan M, Siddiqui WA. Comparative hypoglycemic and nephroprotective effects of tocotrienol rich fraction (TRF) from palm oil and rice bran oil against hyperglycemia induced

- nephropathy in type 1 diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2010;188(3):651-8.
11. Khan MR, Siddiqui S, Parveen K, Javed S, Diwakar S, Siddiqui WA. Nephroprotective action of tocotrienol-rich fraction (TRF) from palm oil against potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)-induced acute renal injury in rats. *Chem Biol Interact* 2010;186(2):228-38.
 12. Baliarsingh S, Beg ZH, Ahmad J. The therapeutic impacts of tocotrienols in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2005;182(2):367-74.
 13. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(3):433-42.
 14. Navarro JF, Mora C. Diabetes, inflammation, proinflammatory cytokines, and diabetic nephropathy. *tswj* 2006;6:908-17.
 15. Qureshi AA, Tan X, Reis JC, Badr MZ, Papasian CJ, Morrison DC, et al. Inhibition of nitric oxide in LPS-stimulated macrophages of young and senescent mice by delta-tocotrienol and quercetin. *Lipids Health Dis* 2011;10(1):239.
 16. Tan SW, Ramasamy R, Abdullah M, Vidyadarshan S. Inhibitory effects of palm alpha-, gamma- and delta-tocotrienol on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia. *Cellular immunology* 2011; 9(2): 205-71.
 17. Kuhad A, Bishnoi M, Tiwari V, Chopra K. Suppression of NF-kappabeta signaling pathway by tocotrienol can prevent diabetes associated cognitive deficits. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;92(2):251-9.
 18. Kuhad A, Chopra K. Tocotrienol attenuates oxidative-nitrosative stress and inflammatory cascade in experimental model of diabetic neuropathy. *Neuropharmacology* 2009;57(4):456-62.
 19. Tiwari V, Kuhad A, Bishnoi M, Chopra K. Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative-nitrosative stress in rats. *Pharmacol biochem behav* 2009;93(2):183-9.
 20. Qureshi AA, Reis JC, Qureshi N, Papasian CJ, Morrison DC, Schaefer DM. delta-Tocotrienol and quercetin reduce serum levels of nitric oxide and lipid parameters in female chickens. *Lipids Health Dis* 2011;10:39.
 21. Qureshi AA, Pearce BC, Nor RM, Gapor A, Peterson DM, Elson CE. Dietary alpha-tocopherol attenuates the impact of gamma-tocotrienol on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in chickens. *J Nutr* 1996;126(2):389-94.
 22. Sookwong P, Nakagawa K, Yamaguchi Y, Miyazawa T, Kato S, Kimura F, et al. Tocotrienol distribution in foods: estimation of daily tocotrienol intake of Japanese population. *J Agric Food Chem* 2010;58(6):3350-5

The effects of tocotrienol-enriched canola oil on inflammation, nitrosative stress and urinary microalbumin in patients with type-2 diabetes: A randomized double-blind clinical trial

Haghishat N¹, Vafa MR^{*2}, Eghtesadi Sh³, Heidari I⁴, Hoseini AF⁵

1- MS.c in in Nutrition, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2-*Corresponding author: Associate Prof, Dept. of Nutrition, Faculty of Public Health, Endocrine Research Center, (Firouzgar), Institute of Endocrinology and Metabolism, (HematCampous), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: mrvafa@tums.ac.ir

3- Prof, Dept. of Nutrition, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Associate Prof, Endocrine Research Center (Firouzgar), Institute of Endocrinology and Metabolism, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5- Lecturer, Dept. of Biostatistics, Faculty of Management and Medical Information Science, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received 12 Nov, 2012

Accepted 22 Jan, 2013

Background and Objective: Tocotrienols have been demonstrated to play a significant role in preventing diabetic nephropathy due to their immunologic and inflammatory properties. The objective of this study was to determine the effects of a daily intake of canola oil enriched with 200 mg tocotrienol (T3) for 8 weeks on nitrosative stress, inflammation and urinary microalbumin in type-2 diabetic patients.

Materials and Methods: This clinical trial was conducted on 50 patients with type-2 diabetes mellitus (fasting blood sugar > 126 mg/dl) randomly divided into 2 groups of 25 each to receive, daily for 8 weeks, either 15 ml T3-enriched canola oil (200mg T3; experimental group) or 15 ml pure canola oil (control group). Initial and final blood samples were collected to measure serum hs-CRP and nitric oxide (NO) levels, and 24-hr urine samples to measure urinary volume and microalbumin and creatinine levels. Physical activity levels, anthropometric parameters and nutrients intakes were determined before and after intervention and compared between the 2 groups.

Results: T3-enriched canola oil brought about statistically significant reductions in urinary microalbumin ($p=0.004$) and hs-CRP ($p=0.003$). Also, at the end of the study, the intervention group had significantly lower serum hs-CRP and urinary microalbumin than the control group. A nonsignificant decrease was observed in the serum NO level in the T3 group.

Conclusion: Based on the findings it may be concluded that tocotrienols can improve the inflammatory status and prevent diabetic nephropathy. However, its effect on nitrosative stress needs further investigation.

Keywords: Tocotrienols, Nitrosative Stress, Microalbuminuria, Inflammation, type-2 Diabetes mellitus