

ارزیابی تأثیر مصرف روزانه دوغ غنی شده با ویتامین D و توأم ویتامین D و کلسیم بر غلظت‌های سرمی فراورده‌های نهایی گلیکاسیون و لیپوپروتئین کم‌چگال اکسیده در مبتلایان به دیابت نوع ۲: کارآزمایی بالینی شاهددار

نیما طیبی نژاد^۱، تیرنگ نیستانی^۲، بهرام رشیدخانی^۳، بهاره نیکویه^۴، علی کلایی^۵، نسترن شریعت زاده^۵، ملیحه زاهدی راد^۵

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تحقیقات تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. پست الکترونیکی: t.neyestani@nnftri.ac.ir

۳- استادیار گروه تغذیه جامعه، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- استادیار گروه تحقیقات تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵- کارشناس گروه تحقیقات تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲

تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۹

چکیده

سابقه و هدف: افزایش غلظت فراورده‌های نهایی گلیکاسیون (AGEs) و استرس اکسیداتیو نقش مهمی در عوارض دیررس دیابت دارد. به تازگی، اثرات سودمند بهبود وضعیت ویتامین D بر وضعیت گلیسمی مبتلایان به دیابت نوع ۲ نشان داده شده است. هدف این مطالعه، ارزیابی تأثیر مصرف دوغ غنی شده با ویتامین D و توأم ویتامین D و کلسیم بر سطوح سرمی AGEs و ox-LDL در بیماران دیابت نوع ۲ بود.

مواد و روش‌ها: ۶۰ بیمار دیابتی در محدوده سنی ۳۰ تا ۶۰ سال به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: ۱. دوغ ساده (۱۵۰ میلی‌گرم کلسیم بدون ویتامین D در ۲۵۰ میلی‌لیتر)، ۲. دوغ غنی شده با ویتامین D (۵۰۰ IU و ۱۵۰ میلی‌گرم کلسیم)، ۳. دوغ غنی شده با ویتامین D و کلسیم (۵۰۰ IU و ۲۵۰ میلی‌گرم کلسیم). بیماران ۱۲ هفته روزانه ۲ بطری دوغ مصرف کردند. ارزیابی‌های رژیمی، تن‌سنجی و آزمایشگاهی در آغاز و پایان مداخله انجام شد.

یافته‌ها: میانگین غلظت سرمی 25(OH)D در گروه دوم از ۴۰/۶±۳۰/۱ nmol/L به ۷۶/۸±۳۲/۶ nmol/L ($p<0/001$) و در گروه سوم از ۴۵/۱±۳۸/۷ nmol/L به ۷۲/۷±۳۵/۳ nmol/L ($p<0/001$) افزایش یافت. گلوکز ناشتا ($p=0/016$ و $p=0/040$)، انسولین ($p<0/001$) و HbA_{1c} (به ترتیب $p=0/001$ و $p=0/003$)، HOMA-IR ($p<0/001$ و $p=0/002$) و سطوح سرمی AGEs ($p=0/029$) و ox-LDL ($p=0/001$) در گروه‌های دوم و سوم نسبت به گروه اول کاهش معنی‌داری داشت. تغییر معنی‌دار درون گروهی و بین گروهی در ox-LDL مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: دریافت روزانه دوغ غنی شده با ویتامین D با یا بدون کلسیم موجب افزایش غلظت 25(OH)D، بهبود شاخص‌های گلیسمی و کاهش AGEs در بیماران دیابتی شد، اما بر ox-LDL تأثیری نداشت.

واژگان کلیدی: ۲۵- هیدروکسی ویتامین D، فراورده‌های نهایی گلیکاسیون، LDL اکسیده، غنی‌سازی، دیابت نوع ۲

• مقدمه

می‌دهد در تهران ۱۴/۵ تا ۲۲/۵ درصد افراد بالای ۳۰ سال دچار عدم تحمل گلوکز هستند که حدود یک چهارم آن‌ها در آینده به دیابت آشکار مبتلا خواهند شد (۳). تسریع آترواسکلروز و بیماری‌های عروق کوچک از مشکلات عمده بیماران دیابتی است. عامل معمول اولیه‌ای که باعث تغییرات پاتوفیزیولوژیک در عروق افراد دیابتی می‌شود، مواجهه مزمن رگ‌ها با سطوح بالای گلوکز خون

شیوع دیابت نوع ۲ به سرعت در جهان رو به افزایش است. این بیماری می‌تواند به مشکلات و عوارض درازمدت متعددی مانند کوری، بیماری‌های کلیوی، قلبی، قطع عضو و کاهش کیفیت زندگی در افراد مبتلا منجر شود (۱). بر پایه بررسی‌های صورت گرفته، شیوع دیابت در افراد ۲۵ تا ۶۴ ساله ایران ۸/۷ درصد است (۲). به علاوه، نتایج مطالعه قند و لیبید تهران که در سال ۲۰۰۲ منتشر شده است، نشان

کلسیم، احتمالاً این اثر با دریافت کلسیم اضافه تقویت خواهد شد.

• مواد و روش‌ها

این مطالعه روی زیرگروهی از جمعیت یک مطالعه بزرگ‌تر (۱۳) انجام پذیرفت. با در نظر گرفتن AGEs به عنوان متغیر اصلی و خطای نوع اول معادل $\alpha=0.05$ ، خطای نوع دوم $\beta=0.10$ ، انحراف معیار 0.7 unit/mL و میزان تغییرات معادل 0.9 unit/mL (۱۷) حجم نمونه برابر با ۱۳ نفر در هر گروه به دست آمد، با در نظر گرفتن ریزش نمونه معادل ۲۰٪ حجم نمونه ۱۶ نفر تخمین زده شد و برای افزایش دقت مطالعه حجم نمونه نهایی برابر ۲۰ نفر تعیین شد.

معیارهای انتخاب افراد و روش مداخله قبلاً به تفصیل شرح داده شده است (۱۸). به طور خلاصه ۶۰ بیمار (۲۳ زن و ۳۷ مرد) مبتلا به دیابت نوع ۲ در محدوده سنی ۳۰ تا ۶۰ سال که عضو انجمن دیابت بودند، به صورت تصادفی انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه عبارت بودند از: مصرف نکردن داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی و هر گونه داروی مؤثر بر متابولیسم ویتامین D، مصرف نکردن مکمل کلسیم و ویتامین D، امگا-۳، ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان در ۳ ماه گذشته، دریافت نکردن انسولین، نداشتن علائم بالینی بیماری‌ها مؤثر بر متابولیسم ویتامین D (مانند بیماری‌های کلیوی، کبدی، دیگر مشکلات غدد داخلی و بدخیمی‌ها).

بعد از توضیح کامل روش کار و اهداف مطالعه تمام شرکت‌کنندگان رضایت‌نامه آگاهانه را امضا کردند. بعد از ۲ هفته یکسان‌سازی، بیماران به صورت تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: ۱. دوغ ساده (حاوی ۱۵۰ میلی گرم کلسیم بدون ویتامین D قابل تعیین در هر ۲۵۰ میلی‌لیتر)، ۲. دوغ غنی شده با ویتامین D (حاوی ۵۰۰ IU ویتامین D و ۱۵۰ میلی گرم کلسیم در هر ۲۵۰ میلی‌لیتر)، ۳. دوغ غنی شده با ویتامین D و کلسیم (حاوی ۵۰۰ IU ویتامین D و ۲۵۰ میلی گرم کلسیم). ویتامین D به شکل کوله کلسیفرول (Roch، سوئیس) و کلسیم به شکل سترات کلسیم (Roch، سوئیس) به دوغ‌ها اضافه شد. بیماران باید روزانه دو بطری از دوغ‌ها را همراه وعده‌های نهار و شام به مدت ۱۲ هفته (با توجه به پیشنهاد مطالعات گذشته (۱۵)) مصرف می‌کردند. از بیماران خواسته شد که در تمام دوره مطالعه تغییری در رژیم غذایی، دارویی و شیوه زندگی خود ندهند. ابتدا و انتهای مطالعه، رژیم غذایی بیماران با استفاده از پرسشنامه یادآمد ۲ روزه ارزیابی شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق

است. اگرچه اثرات افزایش گلوکز خون بر ویژگی‌های سلولی به واسطه مکانیسم‌های مختلفی حاصل می‌شود، اما مسیر بسیار مهمی که در تسریع آترواسکلروز در این بیماران دخالت دارد، افزایش در گلیکاسیون پروتئین‌ها و چربی‌ها و تشکیل فراورده‌های نهایی گلیکاسیون AGEs (Advanced Glycation End Products) است. AGEs از واکنش غیر آنزیمی قندهای احیاکننده با گروه‌های آمین آزاد پروتئین‌ها، چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک به وجود می‌آید. باز شیف، فراورده اولیه این واکنش است. این ماده ناپایدار به محصولات پایدار آمادوری تبدیل می‌شود و در نهایت، طی یک سری واکنش‌های بعدی، فراورده‌های نهایی گلیکاسیون را پدید می‌آورد (۴). بیماران دیابتی عموماً دارای غلظت‌های خونی بالایی از AGEs هستند. این ترکیبات اثرات پیش آماسی و پیش-اکسیداتیوی دارند و از این رو، نقش مهمی را در پیشرفت عوارض درازمدت دیابتی به ویژه بیماری قلبی عروقی بازی می‌کنند (۷-۵).

استرس اکسیداتیو، یکی دیگر از مکانیسم‌های بیماری‌زا در اختلالات عروقی بیماران دیابتی است. افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ دارای سطوح افزایش یافته پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب اکسیداتیو به DNA و تولید رادیکال‌های آزاد هستند (۸). مشاهده شده است که افزایش قند خون با اکسید شدن لیپوپروتئین کم چگال LDL (low-density lipoprotein) به عنوان یکی از عوامل زمینه‌ساز در تشکیل زخم‌های عروقی و بیماری‌های قلبی عروقی ارتباط قوی دارد (۹). LDL اکسیده (ox-LDL) در مراحل اولیه پیشرفت زخم‌های آترواسکلروتیک تشکیل می‌شود و تصور بر این است که تشکیل سلول‌های اسفنجی را القا می‌کند و سپس باعث شکل‌گیری زخم‌های عروقی می‌شود (۱۰).

کمبود شدید ویتامین D به عنوان یک عامل خطر در بیماری‌های قلبی عروقی مطرح است (۱۱) در افرادی که سطوح پایه سرمی ۲۵-هیدروکسی ویتامین D و ۲۵،۱-هیدروکسی ویتامین D پایین‌تری دارند، خطر مرگ ناشی از بیماری‌های قلبی عروقی بالاتر است (۱۲). به تازگی، تأثیر دریافت ویتامین D بر بهبود وضعیت قند خون و نماگرهای التهابی در برخی مطالعات گزارش شده است (۱۶-۱۳). فرضیه مطالعه حاضر این بود که بهبود وضعیت قند خون به دنبال دریافت ویتامین D موجب کاهش فراورده‌های نهایی گلیکاسیون و پراکسیداسیون لیپیدی در مبتلایان به دیابت نوع ۲ می‌شود و نظر به ارتباط تنگاتنگ ویتامین D و

انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور (کد ۰۳۷۳۸۱) تأیید شد.

ارزیابی نماگرهای تن سنجی: وزن بیماران با لباس سبک با ترازو با دقت ۱۰۰ گرم، قد با استادیومتر و دور کمر با متر نواری هر دو با دقت ۰/۱ سانتی متر اندازه‌گیری شد. نمایه توده بدنی (BMI) نیز از تقسیم وزن (کیلوگرم) بر مجذور قد (متر) محاسبه شد.

کاوش‌های آزمایشگاهی: ابتدا و انتهای مداخله از بیماران ۱۰ میلی لیتر نمونه خون سیاهرگی ناشتا گرفته شد. سرم نمونه‌های خون لخته بعد از سانتریفوژ جداسازی و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر -80°C نگهداری شد. گلوکز خون با روش آنزیمی و بر مبنای رنگ‌سنجی با استفاده از کیت‌های تجاری (پارس آزمون، ایران) با دستگاه خودکار (Select E, Vitalab، هلند) و انسولین ناشتا با روش IRMA (Biosource، بلژیک) اندازه‌گیری شد. درصد HbA1c پس از جداسازی با روش کروماتوگرافی تعویض یونی، به وسیله اسپکتروفتومتر (Biosystem S.A، اسپانیا) تعیین شد. برای اندازه‌گیری سطح سرمی ۲۵-هیدروکسی ویتامین D روش HPLC به کار رفت (۱۹). وضعیت ویتامین D بر اساس سطح سرمی ۲۵-هیدروکسی ویتامین D به سه دسته کمبود (کمتر از $27/5 \text{ nmol/L}$)، عدم کفایت ($27/5 - 50 \text{ nmol/L}$) و مطلوب (بالتر از 50 nmol/L) طبقه‌بندی شد (۲۰). غلظت‌های سرمی AGEs (USCN Life Science، چین) و ox-LDL (Mercodia، سوئد) با روش ELISA اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: متغیرهای کمی به صورت $\pm \text{SD}$ میانگین و متغیرهای کیفی به صورت فراوانی بیان شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد. برای آنالیز تغییرات بین گروهی از آزمون‌های آنالیز واریانس (توزیع نرمال) و کروسکال-والیس (توزیع غیرنرمال) استفاده شد. تغییرات میان گروهی با استفاده از آزمون‌های تی زوجی (توزیع نرمال) یا ویلکاکسون (توزیع غیرنرمال) آنالیز شد. همبستگی بین متغیرهای مورد بررسی به وسیله ضریب همبستگی پیرسون (توزیع نرمال) و اسپیرمن (توزیع غیرنرمال) تعیین شد. برای آنالیز داده‌ها نرم‌افزار SPSS 16 به کار رفت.

• یافته‌ها

میانگین سنی بیماران $51/1 \pm 6/2$ سال بود و توزیع جنسی ($p=0/139$) و سنی ($p=0/884$) بین سه گروه تفاوت

معنی‌داری نداشت. در زمان پایه توزیع وضعیت ویتامین D (کمبود، عدم کفایت، وضعیت مطلوب) بین سه گروه تفاوت معنی‌داری نداشت ($p=0/264$). مقایسه فراوانی درجات مختلف کمبود ویتامین D قبل و پس از مداخله در سه گروه با آزمون Fisher exact نشان داد که در گروه‌های دوم ($p=0/024$) و سوم ($p=0/008$) تفاوت معنی‌داری بین شیوع وضعیت مطلوب و نامطلوب قبل و بعد از مداخله وجود داشت (جدول ۱).

در این مطالعه وزن، BMI و دور کمر در گروه‌های دوم و سوم به صورت معنی‌داری نسبت به قبل از مداخله کاهش پیدا کرد.

در گروه‌های دوم و سوم، سطوح سرمی 25(OH)D افزایش معنی‌داری را نسبت به قبل از مطالعه نشان داد. سطوح سرمی 25(OH)D در گروه‌های دوم و سوم نسبت به گروه اول افزایش معنی‌داری داشت. این معنی‌داری بین گروه‌های دوم و سوم مشاهده نشد (جدول ۲).

تغییرات سطح گلوکز و انسولین ناشتا، HbA1c و شاخص مقاومت به انسولین HOMA-IR (Homeostasis model assessment of Insulin Resistance) در گروه‌های دوم و گروه سوم نسبت به گروه اول کاهش معنی‌داری نشان دادند، اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دوم و سوم مشاهده نشد. در گروه‌های دوم و سوم سطوح سرمی AGEs و oxLDL نسبت به پیش از مداخله کاهش یافت، اما این کاهش معنی‌دار نبود. میزان تغییرات سطح سرمی AGEs در گروه‌های دوم و سوم نسبت به گروه اول کاهش معنی‌داری نشان داد. تغییرات بین گروهی در مورد سطح سرمی oxLDL معنی‌دار نبود (جدول ۲).

ارزیابی داده‌های رژیمی نشان داد که انرژی و مواد مغذی دریافتی بیماران در زمان پایه و تغییرات آن‌ها بعد از مداخله تفاوت معنی‌داری درون و بین گروه‌ها نداشت (جدول ۳).

تغییرات سطوح سرمی 25(OH)D با وزن ($p<0/001$)، BMI ($r=-0/448$)، گلوکز ناشتا ($r=-0/390$)، انسولین ($r=-0/253$)، AGEs ($r_s=-0/294$) و HOMA-IR ($p=0/003$)، ارتباط معکوس داشت. تغییرات سطح سرمی AGEs با وزن ($r_s=0/401$)، BMI ($p=0/002$)، گلوکز ناشتا ($r_s=0/392$)، گلوکز ناشتا ($p=0/029$)، انسولین ($r_s=0/522$)، HOMA-IR ($p<0/001$) و ارتباط مستقیم داشت. ($r_s=$

جدول ۱. توزیع فراوانی مطلق و نسبی وضعیت ویتامین D در سه گروه مورد مطالعه (n (%))

گروه	وضعیت ویتامین D			پیش از مداخله			پس از مداخله		
	کمبود	عدم کفایت	مطلوب	کمبود	عدم کفایت	مطلوب	کمبود	عدم کفایت	مطلوب
دوغ ساده (n=۲۰)	۷(۳۵٪)	۸(۴۰٪)	۵(۲۵٪)	۱۱(۵۵٪)	۰	۴(۴۰٪)	۵(۲۵٪)	۰	۱۱(۵۵٪)
دوغ غنی شده با ویتامین D (n=۲۰)	۵(۲۵٪)	۱۱(۵۵٪)	۴(۲۰٪)	۰	۳(۱۵٪)	۱۷(۸۵٪)	۰	۳(۱۵٪)	۱۷(۸۵٪)
دوغ غنی شده با ویتامین D و کلسیم (n=۲۰)	۹(۴۵٪)	۴(۲۰٪)	۷(۳۵٪)	۱(۵٪)	۳(۱۵٪)	۱۶(۸۰٪)	۱(۵٪)	۳(۱۵٪)	۱۶(۸۰٪)

کمبود: کمتر از ۲۷/۵ nmol/L، عدم کفایت: ۲۷/۵-۵۰ nmol/L، مطلوب: بالاتر از ۵۰ nmol/L

• بحث

در این مطالعه ۷۳/۳٪ افراد در ابتدای مطالعه به درجاتی از کمبود ویتامین D دچار بودند که در انتهای مطالعه در دو گروهی که دوغ غنی شده دریافت می‌کردند، این میزان به ۱۷/۵٪ کاهش یافت. مصرف روزانه ۱۰۰۰ IU ویتامین D به صورت دوغ غنی شده با ویتامین D یا غنی شده با ویتامین D و کلسیم، سطوح سرمی 25(OH)D را به طور معنی‌داری نسبت به حالت پایه افزایش داد و آن را به حدود ۸۰ nmol/L رساند؛ همان غلظتی که برای حداکثر جذب کلسیم (۲۱) و مهار هورمون پاراتیروئید (۲۲) مورد نیاز است. اما در گروه اول، میانگین سطوح سرمی 25(OH)D در پایان دوره مداخله حدود ۵۵ nmol/L کاهش یافت که از نظر آماری معنی‌دار نبود. دلیل این کاهش انجام مطالعه در فصول سرد سال به نظر می‌رسد (۲۳).

شواهدی وجود دارد که کلسیم و ویتامین D و غذاهای غنی شده با این مواد مغذی ممکن است نقش مؤثری در کنترل وزن داشته باشند (۲۴). Sabherwal در مطالعه‌ای که روی بیماران دیابتی مبتلا به کمبود یا عدم کفایت ویتامین D انجام داد، مشاهده کرد که مکمل‌یاری با ویتامین D و کلسیم موجب کاهش معنی‌دار وزن، البته فقط در گروه با کمبود ویتامین D ($<12/5$ nmol/L) شد (۲۵). یافته‌های حاصل از این مطالعات با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه حاضر در گروه‌های دوم و سوم کاهش معنی‌داری در وزن و BMI پس از مداخله مشاهده شد. همچنین، کاهش وزن و BMI در گروه‌های دوم و سوم نسبت به گروه اول معنی‌دار بود. کوله کلسیفرل ممکن است با کاهش سطح PTH سرمی موجب کاهش وزن شود. در سلول‌های چربی جدا شده (isolated fat cells) ملاحظه شده

است که افزایش میزان PTH با افزایش سطح کلسیم سیتوزولی مانع لیپولیز القایی به وسیله کاتکولامین‌ها و همچنین تسریع در بیان اسید چرب سنتتاز می‌شود که همه این عوامل سبب تجمع چربی می‌شوند (۲۶).

در این مطالعه، مصرف روزانه دوغ غنی شده با ویتامین D و دوغ غنی شده با ویتامین D و کلسیم پس از ۱۲ هفته موجب کاهش گلوکز ناشتا، HbA_{1c}، انسولین و HOMA-IR در گروه‌های دوم و سوم نسبت به گروه اول شد. مطالعات مداخله‌ای مختلفی نیز در خصوص تأثیر ویتامین D و کلسیم روی نماگرهای گلیسمیک انجام شده‌اند که نتایج برخی با مطالعه کنونی مطابقت دارد (۲۸، ۲۷، ۲۵) و نتایج برخی دیگر نیز متفاوت است (۳۰، ۲۹). شواهدی وجود دارد که ویتامین D از طریق اثر بر مکانیسم‌های مختلف مؤثر در پیشرفت عدم تحمل گلوکز و بیماری دیابت نوع ۲ (نقص در عملکرد سلول‌های β پانکراس، مقاومت به انسولین و التهاب سیستمیک) بر بروز و کنترل دیابت نوع ۲ نقش دارد (۱۶، ۱۵، ۱۳).

در این مطالعه، سطوح سرمی AGEs در گروه‌های دوم و سوم نسبت به پیش از مطالعه کاهشی غیرمعنی‌دار یافت. اما میزان تغییرات در این دو گروه نسبت به گروه اول اختلاف معنی‌داری نشان داد. به علاوه، یک ارتباط منفی و معنی‌دار بین تغییرات سطوح سرمی 25(OH)D و AGEs ملاحظه شد. AGEs به عنوان یکی از عوامل مهم در پاتوژنز اختلالات عروقی در سن بالا، اختلالات کلیوی و T2DM به شمار می‌آیند (۳۱). تولید و تجمع بیش از حد این ترکیبات با

جدول ۲. داده‌های پایه و مقایسه تغییرات درون و بین گروهی بعد از مطالعه*

P4	P3	P2	دوغ غنی شده با ویتامین D و کلسیم		دوغ غنی شده با ویتامین D		دوغ غنی شده با ویتامین D		دوغ ساده	
			P1	پیش از مداخله	P1	پیش از مداخله	P1	پیش از مداخله	P1	پیش از مداخله
۰/۱۹۴	۰/۰۰۴	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۷۴۳±۱۲/۵	<۰/۰۰۱	۷۴۴±۱۳/۷	۷۶/۹±۱۴/۳	۰/۱۶۵	۷۷/۱±۱۶/۵	وزن (کیلوگرم)
۰/۱۹۸	۰/۰۰۴	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۲۸۷±۵/۵	<۰/۰۰۱	۲۹۵±۶/۴	۳۰/۴±۶/۵	۰/۱۳۶	۳۰/۳±۴/۷	BMI (kg/m ²)
۰/۹۵۰	۰/۰۶۷	۰/۰۳۳	<۰/۰۰۱	۹۵۳±۱۰/۹	<۰/۰۰۱	۹۷۵±۱۲/۱	۹۶/۱±۱۱/۵	۰/۳۲۵	۹۷/۶±۱۰/۶	دور کمر (سانتیمتر)
۰/۷۷۱	۰/۰۴۰	۰/۰۱۶	۰/۴۴۲	۱۶۶/۱±۶۸/۸	۰/۱۷۷	۱۵۷/۸±۵۱/۸	۱۶۹/۹±۶۴/۲	۰/۰۰۶	۱۹۷/۶±۶۹/۰	FBG (mg/dL)
۰/۴۲۶	۰/۰۰۹	<۰/۰۰۱	۰/۷۳۸	۶/۷±۳/۳	۰/۰۶۴	۶/۷±۳/۰	۷/۸±۵/۱	۰/۰۰۱	۱۰/۸±۵/۲	انسولین ناشتا سرم (mIU/L)
۰/۰۰۲	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۸۵۲	۲/۷±۱/۴	۰/۰۲۸	۲/۴±۱/۴	۳/۱±۲/۰	۰/۰۰۱	۵/۴±۳/۹	HOMA-IR
۰/۸۸۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۱۸۸	۷/۲±۱/۳	۰/۱۷۵	۶/۶±۲/۳	۷/۰±۱/۷	۰/۰۰۱	۸/۵±۱/۵	(%) HbA _{1c}
۰/۳۶۰	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۷۲/۷±۳۵/۳	<۰/۰۰۱	۷۶/۸±۳۲/۶	۴۰/۶±۳۰/۱	۰/۱۵۰	۴۶/۳±۵۰/۷	25(OH)D (nmol/L)
۰/۵۸۳	۰/۰۰۱	۰/۰۲۹	۰/۰۸۲	۴۶۶/۴±۳۴۰/۱	۰/۰۹۴	۲۷۸/۲±۱۵۰/۴	۳۲۶/۴±۲۱۱/۴	۰/۰۱۳	۵۱۵/۴±۴۵۵/۴	AGEs (U/mL)
۰/۰۹۶	۰/۹۲۵	۰/۳۴۱	۰/۱۲۹	۱۴/۲±۵/۸	۰/۷۸۲	۱۳/۰±۴/۶	۱۳/۶±۹/۷	۰/۰۹۹	۱۳/۹±۲/۶	LDL (U/L)
										LDL (U/L)

*تمام داده‌ها به صورت $\pm$ SD میانی گزارش شده اند. BMI: نمایه توده بدنی، FBG: گلوکز ناشای خون، HOMA-IR: نماگر مقاومت به انسولین، HbA_{1c}: هموگلوبین گلیکوزیله، 25(OH)D: ویتامین D، فرآورده‌های نهایی گلیکاسیون، LDL: اکسید شده

P₁ سطح معنی داری تغییرات درون گروهی (تی زوجی)، P₂ سطح معنی داری بین گروه‌های ساده و غنی شده با ویتامین D (آنالیز واریانس)، P₃ سطح معنی داری بین گروه‌های ساده و غنی شده با ویتامین D و کلسیم، P₄ سطح معنی داری بین گروه‌های غنی شده با ویتامین D و توام ویتامین D و کلسیم

جدول ۳. میانگین و مقایسه دریافت انرژی و برخی اجزای رژیمی

دوغ غنی شده با ویتامین D و کلسیم									
دوغ غنی شده با ویتامین D					دوغ ساده				
P1	بعد از مداخله	پیش از مداخله	P1	بعد از مداخله	پیش از مداخله	P1	بعد از مداخله	پیش از مداخله	
۰/۰۷۸	۱۹۱۶/۰±۴۲۹/۲	۲۳۴۴/۰±۱۲۳۹/۱	۰/۰۵۳	۲۷۸۶/۶±۹۰۷/۹	۲۳۸۹/۴±۷۰۳/۶	۰/۵۸۸	۲۵۰۵/۴±۱۰۲۹/۴	۲۵۰۶/۰±۱۰۸۱/۵	انرژی (kcal/d)
۰/۴۶۹	۴۰/۳±۷۱/۷	۳۰/۹±۳۳/۸	۰/۸۲۰	۲۵/۴±۱۶/۸	۳۳/۶±۲۴/۹	۰/۱۳۲	۲۰/۰±۱۱/۴	۴۶/۵±۵۹/۴	ویتامین D (IU/d)
۰/۴۴۷	۸۶۷/۴±۳۶۹/۳	۱۰۸۶/۷±۷۵۸/۶	۰/۶۸۱	۱۰۴۹/۳±۴۴۴/۳	۱۱۰۱/۲±۴۷۵/۵	۰/۷۸۳	۱۰۶۷/۱±۴۳۰/۹	۱۰۵۲/۶±۴۹۱/۳	کلسیم (mg/d)
۰/۶۶۹	۱۱۱/۱±۵/۶	۱۴/۸±۱۱/۳	۰/۱۳۲	۱۸/۳±۱۴/۳	۹/۹±۵/۶	۰/۱۳۲	۱۴/۰±۱۱/۵	۱۱/۹±۸/۳	ویتامین E (mg/d)
۰/۵۰۸	۱۴۵/۱±۱۰۱/۷	۲۰۲/۱±۲۵۳/۶	۰/۳۵۵	۲۲۷/۱±۱۳۹/۷	۱۸۱/۳±۱۱۸/۴	۰/۴۵۱	۱۷۶/۴±۹۵/۱	۱۴۶/۷±۸۷/۸	ویتامین C (mg/d)
۰/۳۹۳	۵۵۹/۸±۴۲۲/۱	۷۳۵/۶±۹۰۸/۱	۰/۰۹۰۵	۵۹۴/۷±۴۳۶/۱	۶۱۶/۰±۵۶۷/۸	۰/۱۹۹	۵۵۷/۲±۲۴۸/۰	۶۹۱/۹±۵۰۰/۸	ویتامین A (mg/d)
۰/۲۸۷	۱۰۵±۵/۳۷	۱۱۵±۸/۴	۰/۲۹۳	۱۳/۸±۵/۸	۱۲/۲±۴/۷	۰/۳۷۶	۱۳/۳±۶/۰	۱۳/۵±۹/۰	روی (mg/d)

اسفنجی را به وسیله کاهش برداشت LDL کلسترول استیله و اکسیده در بیماران دیابتی مهار کرد. (۳۵).

مطالعات نشان داده‌اند که AGEs می‌توانند موجب بیان ژن گیرنده‌های رفتگر (Scavenger) در ماکروفاژها شود که این عمل با افزایش برداشت ox-LDL و تولید یافته‌های اسفنجی و به دنبال آن تسریع شکل‌گیری پلاک‌های آترواسکلروزی همراه است (۳۶). در مطالعه حاضر، سطوح سرمی AGEs در هر دو گروه دوغ غنی شده کاهش پیدا کرد. بنابراین، می‌توان احتمال داد که با کاهش AGEs برداشت ox-LDL توسط ماکروفاژها کاسته شده است و به همین علت در میزان ox-LDL سرمی کاهش چشمگیری مشاهده نشد. در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان داد که مصرف روزانه دوغ‌های غنی شده پس از ۱۲ هفته تأثیری بر سطوح سرمی ox-LDL نداشت.

مطالعه حاضر نشان داد که دوغ غنی شده با ویتامین D یا توأم ویتامین D و کلسیم می‌تواند سبب افزایش سطوح سرمی 25(OH)D و کاهش شاخص‌های تن‌سنجی فریبی، گلیسمیک و AGEs شود، اما تأثیری بر روی LDL اکسیده ندارد. افزایش دریافت کلسیم، اثر مضاعفی بر روندهای ذکر شده نداشت و احتمالاً اثرات ویتامین D در زمینه‌های بررسی شده مستقل از کلسیم است. بنابراین، بهبود وضعیت ویتامین D در بیماران دیابتی ممکن است در پیشگیری از عوارض دیررس این بیماری به ویژه بیماری‌های قلبی و عروقی تأثیر داشته باشد.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت معاونت پژوهشی/انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور صورت گرفت. تولید دوغ غنی شده در صنایع لبنیات/ایران (پگاه) انجام شد که به این وسیله از زحمات کلیه مسئولان و همکاران سپاسگزاری می‌شود. از همکاران محترم خانم‌ها سودابه هروی فرد و شبنم سالک زمانی که تلاش‌های زیادی در انجام این طرح داشتند، قدردانی می‌شود. از آقای دکتر رجب رئیس محترم انجمن دیابت/ایران و تمام بیمارانی که بدون همکاری آن‌ها انجام این طرح امکان پذیر نبود، کمال تشکر را داریم.

تغییراتی در اجزای بستر سلولی و افزایش تجمع پلاکتی، کموناکسی سلول‌های التهابی و استرس اکسیداتیو همراه است که همگی این موارد می‌توانند فرایندهای پیش‌رونده قلبی عروقی را تسریع کنند (۳۲). گزارش‌های اخیر اثرات سودمند کلسی‌تریول را روی کارکرد عروقی به خصوص در شرایط بالینی که با تجمع AGEs ارتباط دارند (بیماران دیالیزی و دیابتی) نشان داده‌اند (۳۳، ۳۴). تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه اثر مستقیم ویتامین D یا کلسیم روی AGEs گزارش نشده است. تنها در مطالعه Talmor اثر کلسی‌تریول در دو غلظت فیزیولوژیک (10^{-10} mol/L) و فوق فیزیولوژیک (10^{-9} mol/L) در سطح سلولی روی گیرنده‌های AGEs ارزیابی شده است. در آن مطالعه، کلسی‌تریول، افزایش بیان mRNA و پروتئین RAGE در اندوتلیال را که بر اثر افزودن AGE-HSA دچار تنظیم مثبت شده بود، کاهش داد. این کاهش بعد از افزودن کلسی‌تریول حتی از میزان پایه بیان mRNA نیز کمتر بود. یافته‌های حاصل از آن مطالعه نشان می‌دهد که کلسی‌تریول احتمالاً می‌تواند از طریق تنظیم منفی بیان گیرنده‌های AGEs موجب کاهش AGEs در داخل سلول‌ها شود (۴).

در مطالعه کنونی، سطوح سرمی ox-LDL نسبت به پیش از دوره مداخله در هر سه گروه کاهش یافت، اما این کاهش، معنی‌دار نبود. تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بین سه گروه مورد مداخله مشاهده نشد. به علاوه، آنالیز واریانس تغییر معنی‌داری را بین گروه‌های مختلف نشان نداد. تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تأثیر مستقیم ویتامین D و کلسیم بر روی ox-LDL در بیماران دیابتی انجام نشده است. فقط Oh و همکاران اثر شکل فعال ویتامین D را روی مهار تشکیل سلول‌های اسفنجی و مهار برداشت کلسترول توسط یاخته‌های درشت‌خوار (ماکروفاژ) در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ بررسی کردند. در مطالعه Oh ماکروفاژهای بیماران در تمام گروه‌ها در حالت کمبود ویتامین D و تیمار با ویتامین D در بافت قرار داده شد و با LDL-کلسترول تغییر یافته، مواجهه داده شدند. شکل فعال ویتامین D تشکیل سلول‌های

• References

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27(5):1047-53.
2. Esteghamati A, Ashraf H, Khalilzadeh O, Rashidi A, Mohammad K, Asgari F, et al. Trends of diabetes according to body mass index levels in Iran: results of the National Surveys of Risk Factors of Non-Communicable Diseases (1999-2007). *Diabet Med* 2010;27(11):1233-40.
3. Ainy E, Mirmiran P, Zahedi Asl S, Azizi F. Prevalence of metabolic syndrome during menopausal transition Tehranian women: Tehran Lipid and Glucose Study (TLGS). *Maturitas* 2007;58(2):150-5.
4. Talmor Y, Golan E, Benchetrit S, Bernheim J, Klein O, Green J, et al. Calcitriol blunts the deleterious impact of advanced glycation end products on endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294(5):F1059-64.
5. Goh SY, Cooper ME. Clinical review: the role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(4):1143-52.
6. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 2004;63(4):582-92.
7. Negrean M, Stirban A, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Gotting C, et al. Effects of low- and high-advanced glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2007;85(5):1236-43.
8. Rytter E, Vessby B, Asgard R, Johansson C, Sjodin A, Abramsson-Zetterberg L, et al. Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well-controlled type 2 diabetes subjects. *Br J Nutr* 2009;101(10):1423-6.
9. Malaguarnera M, Vacante M, Avitabile T, Cammalleri L, Motta M. L-Carnitine supplementation reduces oxidized LDL cholesterol in patients with diabetes. *Am J Clin Nutr* 2009;89(1):71-6.
10. Itabe H. Oxidized Low-density Lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* 2003;26(1):1-9.
11. El-Menyar A, Rahil A, Dousa K, Ibrahim W, Ibrahim T, Khalifa R. Low vitamin d and cardiovascular risk factors in males and females from a sunny, rich country. *Open Cardiovasc Med J* 2012;6:76-80.
12. Petchey W G HIJ, Duncan E, Prins J B, Hawley CM, Johnson DW, Barraclough K et al. The role of 25-hydroxyvitamin D deficiency in promoting insulin resistance and inflammation in patients with Chronic kidney disease: a randomised controlled trial. *BMC Nephrology*. 2009;10:41-60.
13. Nikooyeh B, Neyestani TR, Farvid MS, Alavi-Majd H, Houshiarrad A, Kalayi A, et al. Daily consumption of vitamin D- or vitamin D + calcium-fortified yogurt drink improved glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2011;93:764-71.
14. Wu CC, Chang JH, Chen CC, Su SB, Yang LK, Ma WY, et al. Calcitriol treatment attenuates inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Tohoku J Exp Med* 2011;223(3):153-9.
15. Pittas AG LJ, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2017-29.
16. Neyestani TR, Nikooyeh B, Alavi-Majd H, Shariatzadeh N, Kalayi A, Tayebinejad N, et al. Improvement of vitamin D status via daily intake of fortified yogurt drink either with or without extra calcium ameliorates systemic inflammatory biomarkers, including adipokines, in the subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(6):2005-11.
17. Tan K CW, Ai V, Metz C, Bucala R, Lam K. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1055-59.
18. Nikooyeh B, Neyestani TR, Farvid MS, Alavi-Majd H, Kalayi A, Shariatzadeh N, et al. The effects of daily intake of vitamin D-fortified yogurt drink (Doogh) with or without extra calcium on anthropometric and glycemic status in patients with type 2 diabetes. *Iranian J Nutr Sci Food Tech* 2011;6(3):21-9 [in persian].
19. Neyestani TR, Gharavi A, Kalayi A. Determination of serum 25-hydroxy cholecalciferol using high-performance liquid chromatography: a reliable tool for assessment of vitamin D status. *Int J Vitam Nutr Res* 2007;77(5):341-6.
20. Saintonge S, Bang H, Gerber LM. Implications of a new definition of vitamin D deficiency in a multiracial US adolescent population: the National Health and Nutrition Examination Survey III. *Pediatrics* 2009;123:797-803.
21. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference

- range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(2):142-6.
22. Aggarwal N, Reis J, Michos E. Vitamin D deficiency and its implications on cardiovascular disease. *Curr Cardiovasc Risk Rep*. 2010;4(1):68-75.
23. Agborsangaya C, Toriola AT, Grankvist K, Surcel HM, Holl K, Parkkila S, et al. The effects of storage time and sampling season on the stability of serum 25-hydroxy vitamin D and androstenedione. *Nutr Cancer* 2010;62(1):51-7.
24. Caan B, Neuhouser M, Aragaki A, Lewis CB, Jackson R, Leboff MS, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of postmenopausal weight gain. *Arch Intern Med* 2007;167:893-902.
25. Sabherwal S, Bravis V, Devendra D. Effect of oral vitamin D and calcium replacement on glycaemic control in South Asian patients with type 2 diabetes. *Int J Clin Pract*. 2010;64(8):1084-9.
26. Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, Zemel MB. Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *Faseb J* 2001;15(13):2527-9.
27. Nagpal J PJN, Bhartia A. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of the short-term effect of vitamin D 3 supplementation on insulin sensitivity in apparently healthy, middle-aged, centrally obese men. *Diabet Med* 2009;26:19-27.
28. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000; 321(7258):405-12.
29. Tai K NAG, Horowitz M, Chapman M. Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity. *Nutr*. 2008;24:279-85.
30. Jorde R, Figenschau Y. Supplementation with cholecalciferol does not improve glycaemic control in diabetic subjects with normal serum 25-hydroxyvitamin D levels. *Eu J Nutr* 2009;48:349-54.
31. Peppia M, Uribarri J, Vlassara H. The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis. *Curr Diab Rep* 2004;4(1):31-6.
32. Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, Cybulsky M. Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med* 1995;1(4):447-56.
33. Mathieu C, Badenhoop K. Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16(6):261-6.
34. Park CW, Oh YS, Shin YS, Kim CM, Kim YS, Kim SY, et al. Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 1999;33(1):73-81.
35. Oh J, Weng S, Felton SK, Bhandare S, Riek A, Butler B, et al. 1,25(OH) $_2$ vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2009;120(8):687-98.
36. Tesch GH. Role of macrophages in complications of type 2 diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(10):1016-9.

The effect of daily consumption of Iranian yogurt drink *doogh* fortified with vitamin D or vitamin D plus calcium on the serum advanced glycation end products (AGEs) and oxidized LDL concentrations in type 2 diabetes patients: a randomized clinical trial

Tayebinejad N¹, Neyestani TR^{*2}, Rashidkhani B³, Nikooyeh B⁴, Kalayi A⁵, Shariatzadeh N⁵, Zahedirad M⁵

1. M.Sc. in nutrition science, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. *Corresponding author: Associate prof, Dept. of Nutrition Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. neytr@yahoo.com

3. Assistant Prof, Dept. of Community Nutrition, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Assistant Prof, Dept. of Nutrition Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5. Dept. of Nutrition Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received 21 Apr, 2012

Accepted 30 Jul, 2012

Background and Objective: High levels of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress play a key role in development of complications in type 2 diabetes (T2D). It has been reported that glycemic optimizing affects vitamin D in patients with T2D. The purpose of this study was to compare the efficacy of daily consumption of vitamin D and vitamin D-calcium-fortified yogurt drink on serum levels of AGEs and ox-LDL in T2D patients.

Materials and Methods: Sixty diabetic subjects aged 30-60 years were assigned randomly to one of the three groups: 1- plain yogurt drink; 2-yogurt drink fortified with 500IU cholecalciferol per 250 mL bottle; and 3- yogurt drink fortified with 500IU cholecalciferol and 250 mg calcium per 250 mL bottle. Participants were instructed to consume 2 bottles of the yogurt drink daily for 12 weeks. The anthropometric, dietary and laboratory assessments were done at baseline and at the end of intervention.

Results: Mean serum 25-hydroxyvitamin D increased significantly from 40.6±30.1 to 76.8±32.6 nmol/L ($p<0.001$) in group 2 and from 45.1±38.7 to 72.7±35.3nmol/L in group 3. Fasting glucose ($p=0.016$ and $p=0.040$, respectively), insulin ($p<0.001$ and $p=0.009$, respectively), HbA1c ($p=0.001$ and $p=0.003$, respectively), HOMA-IR ($p<0.001$ and $p=0.002$, respectively) and serum level of AGEs ($p=0.029$ and $p=0.001$, respectively) decreased significantly. There was no significant within and between group changes in ox-LDL serum levels.

Conclusion: Our results showed that daily intake of 1000 IU vitamin D with or without calcium significantly increased serum levels of 25(OH) D, improved glycemic control and decreased serum levels of AGEs but had no effect on ox-LDL levels in diabetic patients.

Keywords: 25(OH) D, Advanced glycation end products, Ox-LDL, Fortification, Type 2 diabetes

