

## بررسی اثر توکوترینول 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<sup>۱</sup>، محمدرضا وفا<sup>۲</sup>، شهریار اقتصادی<sup>۳</sup>، ایرج حیدری<sup>۴</sup>، آغا فاطمه حسینی<sup>۵</sup>

۱- کارشناس ارشد تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تغذیه، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات غدد (فیروزگر) انستیتو غدد درون ریز و متابولیسم (پرديس 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)، انستیتو غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- مربی 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:** توکوترینول‌ها از طریق مکانیسم‌های ایمنولوژی و التهابی در پیشگیری از نفروپاتی دیابت موثر شناخته شده‌اند. این مطالعه با هدف تعیین اثرات مصرف روغن کلزای غنی شده با ۲۰۰ mg توکوترینول 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 (قند خون ناشتا بیشتر از ۱۲۶ mg/dl) به طور تصادفی به دو گروه (مداخله و کنترل) تقسیم شدند. گروه مداخله روزانه ۱۵ گرم روغن کلزای غنی شده با ۲۰۰ mg توکوترینول (T3) و گروه کنترل همان میزان روغن کلزا را بدون توکوترینول 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 ( $p = 0/003$ ) و میکروآلبومین ادرار ( $p = 0/004$ ) به طور قابل توجهی کاهش یافتند و در پایان مطالعه، تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه مشاهده شد [۲۵، ۹) ۱۱ در برابر (۱۵، ۳۹/۷۵) ۲۲]. سطح NO در گروه مداخله کاهش یافت، اما معنی‌دار نبود.

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

**واژگان کلیدی:** توکوترینول، 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 نفروپاتی می‌شوند(۱).

برخی شواهد نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل  $\alpha$ -لیپوئیک اسید (۲) و ویتامین C (۳) در نفروپاتی دیابتی نقش پیشگیری‌کننده دارند. اثر مکمل‌یاری با ویتامین E نیز در پیشگیری یا درمان نفروپاتی دیابتی در چندین مطالعه نشان داده شده است(۴-۶، ۱). 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. نفروپاتی 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 توکوترینول‌ها که اثرات مفید به مراتب بیشتری نسبت به  $\alpha$ -توکوفرول دارند، در سبد غذایی کشور ما دیده می‌شود. زیرا اغلب روغن‌های آفتابگردان، کلزا و سویا و... مصرف می‌شود که فقط حاوی  $\alpha$ -توکوفرول هستند. بنابراین، در پژوهش حاضر، اثر ویتامین E غنی از توکوترینول بر میکروآلبومین ادرار، استرس نیتروژاتیو (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  $55/65 \pm 5/72$  سال و طول مدت ابتلا به دیابت  $4/75 \pm 3/44$  سال که واجد شرایط شرکت در مطالعه بودند، با همکاری پزشک 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 آنتی‌اکسیدان‌ها 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 دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران مورد تأیید قرار گرفت

آنتی‌اکسیدان و ضد التهاب قوی است که شامل هشت ایزومر متفاوت، چهار ایزومر توکووفرول (T) و چهار ایزومر توکوترینول (T3)، است (۷). مکمل‌یاری با  $\alpha$ -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  $\alpha$ -توکوفرول است.

توکوترینول‌ها به نسبت توکووفرول‌ها 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 نفروپاتی دیابتی، نقش مکانیسم‌های ایمنولوژی و التهابی نشان داده شده است (۹). در سطح سلولی، T3 با مهار فعال‌سازی NF- $\kappa$ 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 (۱). در مطالعه‌ی دیگری *Siddiqui* و همکاران مکمل‌های توکوترینول حاصل از پالم و سیبوس برنج وضعیت قند خون و عملکرد کلیه‌ها را در موش‌های دیابتی نوع ۱ بهبود بخشیدند، اما در دز مشابه اثر توکوترینول پالم قوی‌تر از سیبوس برنج بود (۱۰). در مطالعه‌ی *Khan* توکوترینول 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 (۱۱).

تنها مطالعه‌ی انسانی که در ارتباط با اثر ویتامین E بر عملکرد کلیه‌ها انجام گرفت، مطالعه‌ی 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) خریداری شد. توکوماس مورد استفاده طبق آنالیز آزمایشگاه حاوی ۳۸/۴٪ توکوترینول بود؛ شامل ۱۶/۶٪ گاما-توکوترینول و ۱۳/۲٪ آلفا-توکوترینول. بقیه‌ی ترکیبات توکوماس عبارت بودند از: ۲۳/۵٪ مونوگلیسرید، ۸/۸٪ دی‌گلیسرید، ۰/۷٪ تری‌گلیسرید، ۴/۷٪ اسکوالن، ۹/۴٪ فیتواسترول، کو Q10 و ۱/۰٪ اسیدهای چرب. طبق محاسبات انجام شده، در آزمایشگاه به صورت کاملاً استاندارد ۲۹۴۰۰ میلی‌گرم توکوماس به ۸۱۰ گرم روغن کانولا افزوده شد. بنابراین، یک قاشق غذا خوری روغن کانولا (۱۵ mg) حاوی حدود ۵۲۵ میلی‌گرم توکوماس (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 هموزن 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 ۲۴ ساعته در شروع و پایان مطالعه جمع‌آوری گردید. نمونه‌ی خون بعد از ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتا بودن و قبل از مصرف قرص‌های کاهنده‌ی قند خون گرفته شد. بلافاصله بعد از خون‌گیری، سرم توسط سانتریفیوژ (۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ دور) به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمد. در مورد جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته به افراد شرکت‌کننده آموزش لازم داده شد.

نیتریک اکسید (NO) با استفاده از روش کالری متری و کیت شرکت Calbiochem، میکروآلبومین ادرار با استفاده از روش ایمنوتوربیدومتری، کراتینین ادرار به روش Reaction jeff، غلظت سرمی hs-CRP با استفاده از روش توربیدومتری ایمنواسی توسط دستگاه Roshe آلمان اندازه‌گیری شد.

**روش‌های آماری:** در این مطالعه‌ی مقایسه‌ی 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 ۱۵ میلی‌گرم روغن کانولای غنی شده با ۲۰۰ میلی‌گرم T3 و گروه دیگر همان مقدار روغن کانولا مشابه بدون T3 را به مدت ۸ هفته دریافت کردند. شرکت‌کنندگان روزانه ۱۵ 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 ۱۵ میلی‌گرم روغن را داشت، از نوع یک بار مصرف به همگی 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 ۹۵٪ بود.

مشخصات زمینه‌ای و تن‌سنجی شامل سن، وزن، قد، مدت ابتلا و دوز داروی مصرفی بیماران ثبت شد. قد با استفاده از قدسنج متصل به ترازو و با دقت ۰/۵cm بدون کفش اندازه‌گیری شد، وزن نیز با ترازوی Seca و با دقت ۰/۵kg در حالت ناشتا با حداقل لباس و بدون کفش در ابتدا و انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد. BMI از تقسیم وزن بر مجذور قد ( $\text{kg/m}^2$ ) محاسبه شد. در شروع و پایان مطالعه پرسشنامه بین‌المللی فعالیت بدنی، پرسشنامه‌ی ۲۴ ساعته یاد آمد خوراک 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 ۲۴ ساعته یاد آمد خوراک با استفاده از نرم‌افزار Nut4 (N4) 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، C و E، روی و سلنیوم هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو گروه قبل و بعد از مداخله مشاهده نشد (جدول ۲).

اثرات T3 بر میکروآلبومین ادرار، استرس نیتروژاتیو و hs-CRP در جدول ۳ ارائه شده است.

سطح میکروآلبومین، کراتینین و حجم ادرار و NO و hs-CRP 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 T3 میکروآلبومین ادرار ( $p = 0.003$ ) و hs-CRP ( $p = 0.004$ ) 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.

### • 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

| گروه                               | گروه مداخله<br>(n=23) | گروه کنترل<br>(n=22) | P value |
|------------------------------------|-----------------------|----------------------|---------|
| جنس                                | ۵ (۲۱/۷)              | ۷ (۳۱/۸)             | ۰/۴۴۵   |
| مرد، تعداد (%)                     | ۱۸ (۷۸/۳)             | ۱۵ (۶۸/۲)            |         |
| زن، تعداد (%)                      | ۵۵/۹ $\pm$ ۵/۹۶       | ۵۵/۲۰ $\pm$ ۵/۵۵     | ۰/۷۰۹   |
| سن (سال)                           | ۴/۸۷ $\pm$ ۴/۱        | ۴/۷ $\pm$ ۲/۹        | ۰/۹۲۳   |
| طول مدت ابتلا به دیابت             | ۶۴/۵ $\pm$ ۱۷/۱۲      | ۶۸/۵ $\pm$ ۱۲/۰      | ۰/۳۷۴   |
| وزن (kg)                           | ۲۵/۱ $\pm$ ۶/۹۰       | ۲۶/۱ $\pm$ ۳/۳       | ۰/۵۳۳   |
| نمایه توده بدن ( $\text{kg/m}^2$ ) |                       |                      |         |
| داروهای هیپوگلیسمیک، تعداد (%)     | ۷ (۳۰/۴)              | ۳ (۱۳/۶)             | ۰/۳۰۳   |
| متفورمین                           | ۶ (۲۶/۱)              | ۱۰ (۴۵/۵)            |         |
| گلیبن گلامید                       | ۱۰ (۴۳/۵)             | ۹ (۴۰/۹)             |         |
| متفورمین + 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<br>$\bar{X} \pm SD$ | پایان مطالعه<br>$\bar{X} \pm SD$ | میانگین تغییرات<br>$\bar{X} \pm SD$ |
|----------------|--------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| انرژی (Kcal)   | مداخله | ۳۱۹۱±۱۱۳۶/۶۸                    | ۱۴۵۵/۶۷±۳۵۴۰                     | ۳۴۹/۳۲±۱۸۳۵/۳                       |
|                | کنترل  | ۲۹۲۸±۱۰۵۱/۰۴                    | ۲۸۶۷±۱۷۳۴                        | -۶۰/۷۰±۱۵۵۹/۰                       |
| کربوهیدرات (g) | مداخله | ۴۱۵/۶۶±۱۵۹/۳۷                   | ۵۰۷/۳۹±۱۴۸/۶۹                    | ۹۱/۲۷±۲۰۸/۹                         |
|                | کنترل  | ۴۰۰/۳۹±۱۷۳/۴۵                   | ۴۱۰/۳۵±۲۱۶/۵۴                    | ۹/۹۶±۲۸۷/۳۶                         |
| پروتئین (g)    | مداخله | ۸۷/۹۵±۳۲/۴۰                     | ۱۰۲/۶۲±۵۳/۸۴                     | ۱۴/۶۶±۴۰/۷۱                         |
|                | کنترل  | ۸۸/۲۸±۳۲/۵۲                     | ۹۴/۷۴±۳۲/۵۵                      | ۶/۱۸±۴۳/۹۸                          |
| چربی (g)       | مداخله | ۱۳۹/۵۴±۵۹/۲۲                    | ۱۱۸/۶۱±۴۱/۸۸                     | -۲۰/۹۲±۵/۲۵                         |
|                | کنترل  | ۱۱۴/۷۱±۵۵/۷۲                    | ۱۱۰/۹۸±۳۷/۶۲                     | -۷/۰۹±۵۶/۳۱                         |
| روی (mg)       | مداخله | ۱۰/۲۴±۳/۶۴                      | ۱۰/۸۳±۳/۸۲                       | ۰/۵۹۸±۴/۵۳                          |
|                | کنترل  | ۹/۶۳±۳/۳۰                       | ۹/۰۰±۲/۸۱                        | -۰/۶۲۲±۴/۶۵                         |
| ویتامین A (µg) | مداخله | ۱۲۰۴/۶±۵۹۰/۲۷                   | ۱۶۹۷/۵±۱۲۲۶/۶۵                   | ۴۹۲/۸۵±۱۲۲۴/۳                       |
|                | کنترل  | ۱۳۲۱/۴±۱۴۱۸/۲۸                  | ۱۷۵۵/۵۶±۱۹۲۴/۶۰                  | ۴۳۴/۱۹±۲۵۴۹/۲                       |
| ویتامین C (mg) | مداخله | ۱۹۹/۵۹±۸۵/۵۵                    | ۱۹۲/۱۶±۱۴۲/۵۳                    | -۷/۴۳±۷۶۴/۸۴                        |
|                | کنترل  | ۱۵۶/۷۷±۵۶/۳۳                    | ۱۷۴/۲۶±۹۵/۶۸                     | ۱۷/۴۹±۱۲۳/۶۶                        |
| ویتامین E (mg) | مداخله | ۱۷/۲۷±۱۷/۰۴                     | ۲۰/۳۵±۴۱/۱۸                      | ۳/۰۷±۴/۲۵                           |
|                | کنترل  | ۹/۴۶±۹/۰۱                       | ۱۹/۴۶±۳۷/۶۳                      | ۹/۷۴±۴۰/۴۸                          |
| سلنیوم (mg)    | مداخله | ۰/۱۱±۰/۰۳۵                      | ۰/۱۱±۰/۰۳۷                       | ۰/۰۰۲±۰/۰۴۴                         |
|                | کنترل  | ۰/۱۰±۰/۰۵۳                      | ۰/۱۰±۰/۰۵۲                       | ۰/۰۰۲±۰/۰۸۴۰                        |

نتایج آزمون t مستقل نشان داد که در ابتدا و انتهای مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری 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 معنی‌داری در دریافت این مواد مغذی وجود نداشته است.

جدول ۳. میانه (IQR) یا میانگین و انحراف معیار متغیرها در گروه‌های مورد مطالعه در شروع و پایان مطالعه

| متغیرها                      | T3 گروه روغن کانولای غنی شده با<br>(n=۲۳) | P1*   | گروه روغن کانولا<br>(n=۲۲) | P1*   | P2**   |
|------------------------------|---|-------|----------------------------|-------|--------|
| میکروآلبومین ادرار (nmol/dl) |   |       |                            |       |        |
| ابتدای مطالعه                | ۲۰ (۱۳، ۳۷)                               | ۰/۰۰۰ | ۲۰ (۱۵، ۳۲)                | ۰/۰۶۷ | ۰/۸۴۷  |
| انتهای مطالعه                | ۱۱ (۹، ۲۵)                                |       | ۲۲ (۱۵، ۳۹/۷۵)             |       | ۰/۰۰۳  |
| تغییرات                      | -۸(-۲۹، ۰-۲)                              |       | ۰/۵(-۱/۳۵، ۰/۱۰/۵)         |       | <۰/۰۰۱ |
| حجم ادرار (dL)               |   |       |                            |       |        |
| ابتدای مطالعه                | ۷۱۰/۴۲±۲۰۵۵/۲                             | ۰/۱۲۲ | ۴۶۲/۰۹±۱۷۷۱/۱              | ۰/۹۷۹ | ۰/۱۴۱  |
| انتهای مطالعه                | ۵۵۵/۴۱±۱۸۴۶/۵                             |       | ۵۴۹/۴۹±۱۷۸۰/۰              |       | ۰/۶۹۲  |
| تغییرات                      | ۶۲۱/۶۰±۲۰۸/۶۸                             |       | ۴۸۱/۸۲±۲/۸۵                |       | ۰/۲۱۷  |
| کراتینین ادرار (mg/dl)       |   |       |                            |       |        |
| ابتدای مطالعه                | ۰/۳۳±۱/۰۶                                 | ۰/۵۶۰ | ۰/۴۳±۱/۲۱                  | ۰/۲۳۰ | ۰/۱۰۷  |
| انتهای مطالعه                | ۰/۳۲±۱/۰۸                                 |       | ۰/۳۹±۱/۲۷                  |       | ۰/۱۸۶  |
| تغییرات                      | ۰/۲۱۱±۰/۲۶۱                               |       | ۰/۲۷±۰/۰۵                  |       | ۰/۶۷۸  |
| Hs-CRP(Pg/mL)                |   |       |                            |       |        |
| ابتدای مطالعه                | ۲۰/۹۳±۲۵/۰۲                               | ۰/۰۰۴ | ۳۲/۸۷±۲۶/۵۰                | ۰/۱۲۵ | ۰/۷۱۰  |
| انتهای مطالعه                | ۱۱/۳۶±۱۴/۱۱                               |       | ۱۸/۳۴±۱۵/۸۵                |       | ۰/۸۶۰  |
| تغییرات                      | ۱۵/۵±۱۰/۹۱                                |       | ۲۷/۵±۹/۸۸                  |       | ۰/۰۴۸  |
| NO(pmole/ml)                 |   |       |                            |       |        |
| ابتدای مطالعه                | ۵۸/۰۲±۱۴۷/۳۰                              | ۰/۸۴۶ | ۵۵/۸۴±۱۶۲/۸۴               | ۰/۲۱۹ | ۰/۰۷۸  |
| انتهای مطالعه                | ۵۹/۵۸±۱۴۲/۸۴                              |       | ۶۸/۱۱±۱۷۹/۷۰               |       | ۰/۲۹۱  |
| تغییرات                      | ۶۶/۲±۳/۰۰                                 |       | ۶/۰۸±۱۶/۸۵                 |       | ۰/۲۰۴  |

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

\* P-values تفاوت در مقایسه با شروع مطالعه در داخل هر گروه (آزمون T زوج یا ویلکاکسون)

\*\* P-values تفاوت بین گروه‌های مورد مطالعه (آزمون T مستقل یا من ویتنی)

## • بحث

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 ۲۰ درصد) از کل پروتئین ادرار را تشکیل می‌دهد. علت افزایش دفع ادراری پروتئین‌های با وزن ملکولی کم عمدتاً کاهش بازجذب توپولی پروتئین‌های پلاسمايي فیلتر شده است (۱۳). در انسان‌ها میکروآلبومینوریا یک شاخص پیش‌بینی کننده‌ی قوی نفروپاتی است (۱۴). همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر، مطالعه‌ی نشان داد که مصرف توکوترینول‌ها به مدت ۲۱ روز (در دز ۲۰۰ mg/kg) دفع پروتئین ادرار را در موش‌های wistar مبتلا به آسیب حاد کلیوی ناشی از دی‌کرومات پتاسیم کاهش داد (۱۱). هم‌چنین، در مطالعه‌ی *Kuhad* در موش‌های wistar نر، توکوترینول بعد از ۸ هفته مکمل‌یاری با دزهای مختلف در دز ۱۰۰ mg/kg بیشترین اثر را در کاهش دفع آلبومین ادراری، دفع ادرار، کراتینین سرم، نیتروژن اوره‌ی خون، کلیانس کراتینین و اوره و فشار خون در مقایسه با گروه درمان نشده‌ی دیابتی داشت (۱). در مطالعه‌ی دیگری مصرف توکوترینول حاصل از پالم و سبوس برنج در دوز ۲۰۰ mg/kg به مدت ۸ هفته بر شاخص‌های کلیوی موش‌های wistar بررسی شد. توکوترینول روغن پالم به طرز قابل ملاحظه‌ای پروتئین ادرار را در مقایسه با گروه بدون درمان و گروه درمان شده با توکوترینول سبوس برنج کاهش داد (۱۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز توکوترینول حاصل از پالم (توکوماس ۵۰٪) بررسی شده است. بر اساس جستجوی ما، مطالعه‌ی کنونی اولین مطالعه‌ی است که اثر توکوترینول‌ها را بر شاخص ارزیابی کلیوی و میکروآلبومینوری در انسان‌ها بررسی کرده است. در این مطالعه، اثرات توکوترینول در گروهی که به دلیل ابتلا به دیابت نوع ۲ کنترل نشده ( $FBS < 126 \text{ mg/dl}$ ) 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  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1$ ،  $IL-6$  و  $NO$  را در پاسخ به بسیاری تحریکات القا می‌کند. مهارکننده‌های پروتئوزوم می‌توانند از طریق ماکروفازها تولید  $NO$  را سرکوب کنند.

گاما-توکوترینول از مهارکننده‌های طبیعی پروتئوزوم شناخته شده است که می‌تواند تولید  $NO$ ،  $TNF-\alpha$  و سایر سیتوکین‌های التهابی را کاهش دهد (۱۵). *Tan* و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر مهارکنندگی توکوترینول‌های  $\alpha$ ،  $\gamma$ ،  $\delta$  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 دزهای مختلف توکوترینول (۱۰۰ nM، ۲۵۰ nM، ۵۰۰ nM و ۱۰ M $\mu$ ) به مدت ۲۴ ساعت درمان شدند و سپس با ۱  $\mu\text{g/ml}$  لیپولی‌ساکراید تحریک شدند. تمام ایزوفرم‌های توکوترینول،  $NO$  را کاهش دادند؛ ولی ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  از سایر دزها موثرتر بود.  $\delta$ -توکوترینول  $NO$  را در عرض ۴۸ ساعت پس از تزریق LPS تقریباً ۵۰٪ 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  $\delta$ -توکوترینول (۸/۶٪ کل ویتامین E دریافتی) در مقایسه با سایر ایزوفرم‌های موجود در توکوماس باشد. هم‌چنین، در یک سری از مطالعات *Tiwari* و *Kuhad* در سال ۲۰۰۹ مصرف ۱۰۰ mg/day توکوترینول به مدت ۸ هفته باعث کاهش نیتريت 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 توکوترینول را بر سطوح سرمی  $NO$  بررسی کرد، مطالعه‌ی *Qureshi* بود که اثر ۵۰  $\delta$ -PPM توکوترینول و کورسیتین را بر شاخص‌های پیش التهابی ( $TNF-\alpha$ ،  $NO$ ) در جوجه‌های نر مورد بررسی قرار داد.  $\delta$ -توکوترینول باعث کاهش ۴۵ درصدی  $NO$  سرمی شد (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر با وجود کاهش میزان  $NO$  سرم، این کاهش معنی‌دار نبود، در مطالعه‌ی *Qureshi*،  $\delta$  توکوترینول که مؤثرترین ایزوفرم توکوترینول در کاهش  $NO$  است، ارزیابی شد که باعث کاهش نیتريك اکسید سرم شد، در حالی که در پژوهش حاضر، ترکیب ایزوفرم‌های توکوترینول بررسی شدند. از طرفی ممکن است میزان  $\delta$ -توکوترینول موجود در توکوماس (۸/۶٪ توکوترینول دریافتی معادل ۱۷ mg) در انسان‌ها برای کاهش  $NO$  کفایت لازم را سرم نداشته باشد.

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

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان " بررسی اثر توکوترینول 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. هم چنین از همکاری مسئولان محترم انجمن دیابت گابریک کمال تشکر را داریم.

در مطالعات پیشین نشان داده شده که توکوترینول ها در تنظیم فاکتور رونویسی NF-κB، تنظیم کننده ی ژن های التهابی و ایمنی نقش دارند. مهار NF-κB که ژن های مرتبط با عوامل پیش التهابی نظیر سیتوکین ها را تنظیم می کند، به کاهش سیتوکین ها و تولید hs-CRP منجر می شود (۱۷). بر اساس جستجوی ما مطالعه ی حاضر اولین پژوهشی است که اثر توکوترینول ها را در کاهش سطوح hs-CRP نشان می دهد.

در پژوهش حاضر، ترکیب ویتامین E حاوی دز پایینی از α-توکوفرول است. در نتیجه، احتمالاً اثرات مفید مشاهده شده به α-توکوفرول مربوط نمی شود و T3 ترکیب فعال بوده است. مطالعه ای نشان داد که T3 همراه با ۲۰٪ توکوفرول یا بیشتر، اثرات کاهندگی کلسترول T3-γ را افزایش می دهد (۲۱). اثرات ایزومرهای مختلف توکوترینول در تقویت یا مهار کنترل قند خون و خواص آنتی اکسیدانی نیازمند مطالعات بیشتری است. در این مطالعه برای بهبود پذیرش و جذب، T3 به روغن کانولا افزوده شد. به علت میزان کم T3 در منابع طبیعی، مواد غذایی به تنهایی نمی توانند T3 مورد نیاز را تأمین کنند (۲۲). بنابراین، جهت افزایش دریافت، مکمل یاری یا غنی سازی 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 NFκB 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 Soc Nephrol* 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<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)-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, Vidyadaran 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

Haghighat N<sup>1</sup>, Vafa MR<sup>\*2</sup>, Eghtesadi Sh<sup>3</sup>, Heidari I<sup>4</sup>, Hoseini AF<sup>5</sup>

1- MS.c 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, (HemmatCampus), 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