

ผลของการเสริมสังกะสีต่อทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟา  
ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก

นางสาวอุไรรัตน์ เสริมศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2555  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

EFFECT OF ZINC SUPPLEMENTATION ON TUMOR NECROSIS  
FACTOR-ALPHA IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS WITH  
METABOLIC SYNDROME

Miss Urairat Sermsri

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy  
Program in Food Chemistry and Medical Nutrition  
Department of Food and Pharmaceutical Chemistry  
Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2012  
Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title                    EFFECT OF ZINC SUPPLEMENTATION ON TUMOR  
    NECROSIS FACTOR-ALPHA IN TYPE 2 DIABETIC  
    PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME

By                                    Miss Urairat Sermsri

Field of Study                    Food Chemistry and Medical Nutrition

Thesis Advisor                    Assistant Professor Kulwara Meksawan, Ph.D.

Thesis Co-Advisor                Assistant Professor Pithi Chanvorachote, Ph.D.

---

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn

University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of  
    Pharmaceutical Sciences  
(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

#### THESIS COMMITTEE

..... Chairman  
(Assistant Professor Linna Tongyonk, D.Sc.)

..... Thesis Advisor  
(Assistant Professor Kulwara Meksawan, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor  
(Assistant Professor Pithi Chanvorachote, Ph.D.)

..... Examiner  
(Assistant Professor Suyanee Pongthananikorn, Dr.P.H.)

..... External Examiner  
(Miss Chitralada Butrangamdee, M.D.)

อุไรรัตน์ เสริมศรี: ผลของการเสริมสังกะสีต่อทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาในผู้ป่วย  
โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก. (EFFECT OF ZINC  
SUPPLEMENTATION ON TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN TYPE 2  
DIABETIC PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
หลัก: ผศ. ญ. ดร.กุลวรา เมฆสุวรรณค์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ภก. ดร. ปิติ  
จันทร์วรโชติ, 136 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมสังกะสีต่อระดับสังกะสีในพลาสมา ระดับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาในพลาสมา ระดับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาในโมโนนิวเคลียร์เซลล์ในเลือด ระดับน้ำตาลในเลือด ระดับไกลโคซิเลทฮีโมโกลบิน ระดับไตรกลีเซอไรด์ ระดับคอเลสเตอรอลรวม ระดับเอชดีแอลคอเลสเตอรอล และระดับแอลดีแอลคอเลสเตอรอล ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิกตามเกณฑ์ของสหพันธ์เบาหวานนานาชาติ (International Diabetes Federation) ผู้ป่วยจำนวน 23 คน ได้รับการคัดเลือกเข้าในการศึกษานี้ โดยผู้ป่วยถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสังกะสีที่ได้รับซิงค์ซัลเฟตซึ่งเทียบเท่ากับแร่ธาตุสังกะสี 30 มิลลิกรัมต่อวัน (10 คน) และกลุ่มควบคุมได้รับยาหลอกซึ่งเทียบเท่ากับแป้งข้าวโพด 132 มิลลิกรัมต่อวัน (11 คน) เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ที่จุดเริ่มต้นและสัปดาห์ที่ 8 ของการศึกษา ผู้ป่วยได้รับการเจาะเลือดเพื่อวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในเลือด ทำการแยกโมโนนิวเคลียร์เซลล์จากเลือดเพื่อวิเคราะห์ระดับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟา และมีการวัดสัดส่วนร่างกาย และวัดความดันโลหิต นอกจากนี้ผู้ป่วยยังทำแบบสอบถามเกี่ยวกับรูปแบบการบริโภคอาหารในช่วงเวลา 1 เดือนที่ผ่านมาและการบริโภคอาหารย้อนหลัง 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ภายหลังจากการเสริมสังกะสีเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ระดับสังกะสีในพลาสมามีค่าเพิ่มขึ้นจากระดับเริ่มต้น ( $p < 0.001$ ) และมีค่ามากกว่ากลุ่มยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.001$ ) ระดับน้ำตาลในเลือดมีค่าลดลงจากระดับเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.007$ ) หลังจากได้รับการเสริมสังกะสี แต่ไม่แตกต่างจากระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่สัปดาห์ที่ 8 ระดับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาในพลาสมาและในโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ไกลโคซิเลทฮีโมโกลบิน ไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอลรวม เอชดีแอลคอเลสเตอรอล แอลดีแอลคอเลสเตอรอล เส้นรอบเอว น้ำหนักดัชนีมวลกาย และความดันโลหิตของทั้งสองกลุ่มไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากระดับเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพารามิเตอร์เหล่านี้ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่จุดเริ่มต้นการศึกษา และสัปดาห์ที่ 8 ไม่พบอาการข้างเคียงที่รุนแรงจากการเสริมสังกะสี การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมสังกะสี วันละ 30 มิลลิกรัม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ อาจนำมาใช้เป็นแนวทางในการรักษาระดับสังกะสีและควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิกได้

ภาควิชา ..... อาหารและเภสัชเคมี ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ..... อาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา ..... 2555 ..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5276608833 : MAJOR FOOD CHEMISTRY AND MEDICAL NUTRITION

KEYWORDS : ZINC/ TYPE 2 DIABETES MELLITUS/ METABOLIC SYNDROME/ TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$

URAIRAT SERMSRI: EFFECT OF ZINC SUPPLEMENTATION ON TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME. ADVISOR: ASST. PROF. KULWARA MEKSAWAN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. PITHI CHANVORACHOTE, Ph.D. 136 pp.

The purpose of this study was to investigate the effects of zinc supplementation on the levels of plasma zinc, plasma TNF- $\alpha$ , transmembrane TNF- $\alpha$  (tmTNF- $\alpha$ ) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), fasting blood sugar (FBS), hemoglobin A1c (HbA1c), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome (MS). Twenty-three type 2 diabetic patients who had MS diagnosed by the International Diabetes Federation criteria were included in the study. They were divided into 2 groups, the zinc group (supplemented with zinc sulfate equivalent to elemental zinc 30 mg/d, n = 10) and the control group (supplemented with placebo equivalent to corn starch 132 mg/d, n = 11) for 8 weeks. At baseline and at week 8, fasting blood samples were collected to determine biochemical parameters. PBMC were isolated for tmTNF- $\alpha$  analysis. Anthropometric parameters and blood pressure were also measured. Furthermore, the patients completed questionnaires about the dietary pattern intake in the past 1 month and 24-hour dietary recall.

The results of the study showed that after zinc supplementation for 8 weeks, the plasma zinc levels were significantly increased from the baseline ( $p < 0.001$ ) and were significantly higher than those in the placebo group ( $p = 0.001$ ). The FBS levels were significantly reduced from the baseline ( $p = 0.007$ ) after zinc supplementation; however, there was no significant difference from those in the placebo group. At week 8, the levels of plasma TNF- $\alpha$ , tmTNF- $\alpha$  in PBMC, HbA1c, TG, TC, HDL-C, LDL-C, waist circumference, weight, BMI, and blood pressure in both groups were not significantly changed from baseline. The levels of these parameters were not significantly differences between groups at baseline and week 8. No severe adverse effect of zinc supplementation was found. This study showed that zinc supplementation at the dose of 30 mg/day for 8 weeks offered a therapeutic approach in maintaining plasma zinc and controlling blood sugar levels in type 2 diabetic patients with MS.

Department: ..... Food and Pharmaceutical Chemistry ..... Student's Signature.....

Field of Study: ..... Food Chemistry and Medical Nutrition ..... Advisor's Signature.....

Academic Year: ..... 2012 ..... Co-advisor's Signature.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I am sincerely and deeply grateful to my advisor, Assistant Professor Kulwara Meksawan and my co-advisor, Associate Professor Pithi Chanvorachote for their kindness, valuable advices, excellent discussion, continuous interest and encouragement throughout my thesis.

I am very grateful to Dr. Chitralada Butrangamdee, M.D., director of Public Health Center 66, Health Department, Bangkok Metropolitan Administration together with all patients in the study for their kind helpful and good cooperation.

I would like to express my grateful appreciation to the thesis committee, Assistant Professor Linna Tongyonk, Assistant Professor Suyanee Pongthananikorn and Dr. Chitralada Butrangamdee, M.D for their valuable comments and examination.

This study was partly supported by the CU graduate school thesis grant, Chulalongkorn University and Cell-based Drug and Health Product Development Research Unit, Chulalongkorn University, Thailand and the Department of Food and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University.

I am sincerely thankful to my lovely friends at the Department of Food and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University for helping and supporting in order to come across the problems in my life during the study.

Finally, my special thankful is expressed to my parents for everything in my life.

# CONTENTS

	Page
<b>ABSTRACT (THAI)</b> .....	iv
<b>ABSTRACT (ENGLISH)</b> .....	v
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	vi
<b>CONTENTS</b> .....	vii
<b>LIST OF TABLES</b> .....	x
<b>LIST OF FIGURES</b> .....	xi
<b>LIST OF ABBREVIATIONS</b> .....	xii
<b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b> .....	1
<b>II LITERATURE REVIEW</b> .....	5
2.1 Type II diabetes mellitus.....	5
2.2 Metabolic syndrome.....	7
2.3 Tumor necrosis factor-alpha.....	9
2.3.1 Role of TNF- $\alpha$ in type II diabetes and metabolic syndrome.....	10
2.3.1.1 Abdominal obesity.....	11
2.3.1.2 Insulin resistance.....	12
2.3.1.3 Lipid abnormality.....	15
2.3.1.4 Role of sTNF- $\alpha$ on cardiovascular disease .....	18
2.3.1.5 Role of tmTNF- $\alpha$ on immune functions.....	20

<b>CHAPTER</b>	<b>Page</b>
2.4 Zinc.....	21
2.4.1 Role of zinc in human.....	21
2.4.2 Role of zinc in diabetes mellitus and metabolic syndrome.....	23
2.4.2.1 Zinc deficiency.....	23
2.4.2.2 Zinc supplementation.....	24
<b>III MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>26</b>
3.1 Participants.....	26
3.2 Study design.....	27
3.3 Blood sample collection.....	28
3.4 PBMC isolation and measurement of TNF- $\alpha$ levels.....	29
3.5 Determination of plasma zinc levels.....	30
3.6 Compliance and adverse effects of supplementation .....	31
3.7 Statistical analysis.....	31
<b>IV RESULTS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Baseline characteristics of the patients.....	32
4.2 Demographic data and baseline clinical parameters of the patients....	36
4.3 Effects of zinc and placebo on plasma zinc, plasma TNF- $\alpha$ and blood cells at baseline and week 8.....	39
4.4 Effects of zinc and placebo on TmTNF- $\alpha$ levels in PBMC.....	41
4.5 Effects of zinc and placebo on glycemic control, lipid profiles and blood pressure .....	41
4.6 Effects of zinc and placebo on anthropometric parameters.....	44



<b>CHAPTER</b>	<b>Page</b>
4.7 Dietary intake of the patients.....	45
4.8 Compliance and adverse effects.....	49
<b>V DISCUSSION</b> .....	<b>50</b>
5.1 Zinc status and plasma TNF- $\alpha$ levels.....	50
5.2 Correlation between the study parameters.....	53
5.3 Effect of zinc on plasma zinc levels.....	55
5.4 Effect of zinc on sTNF- $\alpha$ and tmTNF- $\alpha$ levels.....	57
5.5 Effect of zinc on blood sugar.....	60
5.6 Effect of zinc on lipid profiles.....	62
5.7 Effect of zinc on anthropometric parameters.....	64
5.8 Adverse effects of zinc sulfate.....	65
<b>VI CONCLUSION</b> .....	<b>66</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>68</b>
<b>APPENDICES</b> .....	<b>92</b>
<b>Appendix A</b> Approval letter for human study.....	93
<b>Appendix B</b> Information sheet for patients and consent form.....	97
<b>Appendix C</b> Data record sheet and booklet for diabetic patient.....	104
<b>Appendix D</b> Analytical report of zinc capsule and placebo capsule.....	121
<b>Appendix E</b> Normality test of data and statistical analysis.....	124
<b>BIOGRAPHY</b> .....	<b>136</b>

## LIST OF TABLES

<b>TABLE</b>		<b>Page</b>
1	The metabolic syndrome diagnosed by the IDF and NCEP ATP III criteria.....	7
2	Baseline characteristics of the patients.....	33
3	The percentage of each component in the metabolic syndrome diagnosed by the International Diabetes Federation criteria.....	34
4	Correlation between the levels of plasma TNF- $\alpha$ , plasma zinc and other baseline parameters of the patients.....	35
5	Demographic data of the patients .....	37
6	Baseline clinical parameters of the patients.....	38
7	The levels of plasma zinc, plasma TNF- $\alpha$ and blood cells at baseline and week 8.....	40
8	Glycemic, lipid profiles and blood pressure in the patients at baseline and week 8.....	43
9	Anthropometric parameters of the patients at baseline and week 8.....	44
10	Dietary pattern of the patients.....	46
11	Average dietary energy intakes of the patients.....	48

## LIST OF FIGURES

<b>FIGURE</b>		<b>Page</b>
1	Molecular mechanisms of TNF- $\alpha$ in blocks biological of insulin signaling.....	14
2	Molecular mechanism of TNF- $\alpha$ on lipid metabolism.....	17
3	Molecular mechanism on sTNF- $\alpha$ on CAD complication.....	19
4	Signaling pathway of TNF- $\alpha$ production in monocytes.....	21
5	The percentage of tmTNF- $\alpha$ in PBMC at baseline and week 8 in the zinc group.....	42
6	The percentage of tmTNF- $\alpha$ in PBMC at baseline and at week 8 in the placebo group.....	42

**LIST OF ABBREVIATIONS**

sTNF- $\alpha$	soluble tumor necrosis factor-alpha (plasma TNF- $\alpha$ )
tmTNF- $\alpha$	transmembrane tumor necrosis factor-alpha
FBS	fasting blood sugar
HbA1c	hemoglobin A1c
HOMA-IR	homeostasis model assessment of insulin resistance
TC	total cholesterol
TG	triglycerides
LDL-C	low-density lipoprotein cholesterol
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
SBP	systolic blood pressure
DBP	diastolic blood pressure
BMI	body mass index
WC	waist circumference
CAD	coronary artery disease
CHD	coronary heart disease
et al.	et alia (and others)
mg/dL	milligram per deciliter
mL	milliliter
mmHg	millimeter of mercury
Kg/m <sup>2</sup>	kilogram per square meter
cm	centimeter
$\mu$ g	microgram

pg	picogram
CBC	complete blood count
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Hs-CRP	high sensitivity C reactive protein
DRI	dietary reference intake
% TE	percent of total energy intake
kcal	kilocalorie
g/day	gram per day
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- $\kappa$ B	nuclear transcription factor- $\kappa$ B
n	number
<i>p</i>	<i>p</i> -value
SEM	standard error of mean
IDF	international Diabetes Federation
MS	metabolic syndrome
DM	diabetes mellitus
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
RDI	recommended daily intake
UL	tolerable upper intake levels

# CHAPTER I

## INTRODUCTION

### 1.1 Background and Rationale

Type 2 diabetes mellitus (DM) is a chronic disease. It is triggered by insulin resistance and relative insulin deficiency which is associated with failure of beta ( $\beta$ )-cell function. According to the Ministry of Public Health, over 8 million Thai people will be diagnosed with diabetes in 2020. This number is expected to be doubled by 2026. Moreover, the incidence of type 2 DM is increased in metabolic syndrome (MS) patients (Laaksonen et al., 2002; Haffner, 2006). MS is a cluster of abnormalities including abdominal obesity, high blood glucose, dyslipidemia, and high blood pressure (Haffner et al., 2006). Normally, patients are diagnosed with MS according to International Diabetes Federation (IDF) criteria or National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel (NCEP ATP) III criteria. Nowadays, the risks of cardiovascular atherosclerotic diseases are increased in MS patients especially in type 2 diabetic patients with MS (Grundy, 2005; Haffner et al., 2006). The prevalence of coronary heart disease (CHD) has been highest in type 2 diabetic patients with MS when compared to diabetic patients, MS patients, and healthy volunteers (Alexander et al., 2003). Hence, type 2 DM accompanied with MS is a global public health that requires therapeutic strategies in order to treat the disease and prevent possible complications.

The pathogenesis of type 2 DM, MS and CHD complication are related with tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), which acts as a pro-inflammatory cytokine and an immune regulator (Sigal and Ron, 1993). It is mainly produced by the

monocytes/macrophages. Other cells are also produced TNF- $\alpha$ , such as adipocytes, fibroblasts and smooth muscle cells (Sigal et al, 1994; Zhang and Tracy, 1998). There are two forms of TNF- $\alpha$ , namely soluble TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ) and transmembrane TNF- $\alpha$  (tmTNF- $\alpha$ ) (Kriegler et al., 1988). sTNF- $\alpha$  is cleaved from tmTNF- $\alpha$  by metalloprotease TNF- $\alpha$  converting enzyme (Black et al., 1997).

It was found that sTNF- $\alpha$  secreted from the adipose tissue is associated with insulin resistance (IR), dyslipidemia, and abdominal obesity in type 2 diabetic patients with MS (Hotamisgil et al., 1993; Katsuki et al., 1998; Winkler et al., 1998; Tsigos et al., 1999). The influence of sTNF- $\alpha$  on pancreatic  $\beta$  cell function can lead to IR by impairing insulin secretion. sTNF- $\alpha$  acts on the liver to stimulate the production of cholesterols, triglycerides (TG), and very low-density lipoprotein (VLDL) which is changed in the bloodstream to low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) resulting in high blood LDL-C levels. sTNF- $\alpha$  also inhibits the biosynthesis of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in the liver. These are common features of dyslipidemia found in type 2 diabetic patients with MS (IDF, 2005). Moreover, sTNF- $\alpha$  stimulates release of cortisol hormone from the brain, and this hormone is related with abdominal obesity. sTNF- $\alpha$  also stimulates the production of the C-reactive protein (CRP) and the plasminogen in the liver. These proteins are considered as strong risk factors for CHD (Pickup and Crook, 1994; Pickup, Dphil and Frcpath, 2004).

tmTNF- $\alpha$ , which is produced by macrophages/monocytes, plays a role in potent antibacterial and antitumor activities (Sigal and Ron, 1993). Other biological activities of the tmTNF- $\alpha$  include cytotoxic activity, host defense against intracellular pathogens, T cell activation, and immunoglobulin production (Horiuchi et al., 2010).

Impaired immune function has been observed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of diabetic patients. It was found that tmTNF- $\alpha$  production from PBMC in response to phorbol-myristate acetate in type 1 and type 2 diabetic patients were lower than that in healthy control (Alexandraki et al., 2007). Secretion of tmTNF- $\alpha$  from monocytes/macrophages in response to lipopolysaccharides (LPS) has been also decreased in both diabetic mice and in diabetic human (Lapchak et al., 1992; Ptak et al., 1998; Zykova et al., 2000; Komura et al., 2010). Thus, immune dysfunction is important problem in diabetic patients as well.

Zinc deficiency is one of the factors contributing to immune dysfunction in human (Ibs and Rink, 2003). Zinc deficiency and high urinary zinc excretion in diabetic patients have been observed (Al-Timimi and Mahmoud, 2001). Poor zinc status could lead to increased oxidative stress and inflammation (Prasad et al., 2004; Bao et al., 2010), which are associated with the development and progression of atherosclerosis in diabetic and MS patients (Hansson, 2005). Zinc is an essential micronutrient that plays a role in numerous aspects of body function. Zinc supplementation may help maintain the plasma zinc within the optimal level, and thus preserve optimal zinc functions in human (Ibs and Rink, 2003). It was found that zinc supplementation could reduce the levels of fasting blood sugar (FBS), hemoglobin A1C (HbA1c), homeostasis assessment model of insulin resistance (HOMA-IR), total cholesterol (TC), LDL-C and TG in type 2 diabetic and MS patients (Oh and Yoon, 2008; Kelishadi et al., 2010). It also reduced inflammation markers such as CRP and TNF- $\alpha$  in healthy subjects (Bao et al., 2010; Kelishadi et al., 2010).

Studies have shown several beneficial effects of zinc supplementation in patients with DM and MS (Niewoehner et al., 1996; Al-Marouf and Al-Shabatti,



2006; Oh and Yoon, 2008; Kelishadi et al., 2010). Nevertheless, there are still limited informations on effects of zinc sulfate supplementation on plasma zinc, TNF- $\alpha$ , FBS and serum lipid profiles in type 2 diabetic patients with MS. Hence, the present study was conducted to investigate the effects of zinc sulfate supplementation on the levels of plasma zinc, TNF- $\alpha$  in plasma and PBMC, FBS, HbA1c, serum lipid profiles in type 2 diabetic patients with MS.

### **1.2 Objectives of the Study**

To study the effects of zinc supplementation on the levels of plasma zinc, plasma TNF- $\alpha$ , tmTNF- $\alpha$  in PBMC, FBS, HbA1c, and serum lipid profiles (TG, TC, HDL-C and LDL-C) in type 2 diabetic patients with MS.

### **1.3 Benefits of the Study**

This study provides information on the roles of zinc sulfate supplementation in type 2 diabetic patients with MS. Results of the study could offer a therapeutic approach in controlling blood sugar and serum lipid levels, and thus preventing the risk of CHD complication.

### **1.4 Scope of the Study**

The study was conducted in type 2 diabetic patients with MS at the Public Health Center 66, Health Department, Bangkok Metropolitan Administration.

## CHAPTER II

### LITERATURE REVIEW

#### 2.1 Type 2 diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) is a chronic hyperglycemia condition. There are 2 types of DM including type 1 DM and type 2 DM. The prevalence of type 2 DM (about 80 % of the cases of DM) is higher than type 1 DM (about 5-10 % of the cases of DM) (Quarishi et al., 2005). According to the Ministry of Public Health, over 8 million Thai people will be diagnosed with diabetes in 2020. This number is expected to be doubled by 2026. In addition, according to the World Health Organization, over 180 billion people now have diabetes worldwide, and this number is expected to be doubled by the year 2030 (Pradhan, 2007). This epidemiologic data suggest that type 2 DM is one of global public health problem.

Type 2 DM is a chronic hyperglycemic condition that is the consequence of impaired insulin secretion and increased insulin resistance (IR). Insulin is a hormone that stimulates the uptake of glucose into skeletal muscle cells and adipocytes. In addition, insulin inhibits gluconeogenesis but stimulates glycogenesis, lipogenesis and protein synthesis in the liver (Wassink, Olijhoek and Visseren, 2007). Insulin binds to insulin receptor and activates signaling transduction pathway resulting in phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) protein in controlling the balance of plasma glucose in body (Wassink et al., 2007). The development of the deterioration of pancreatic beta ( $\beta$ ) cell function leads to chronic elevation of blood glucose. Insulin resistance can be identified as an inadequate response of target

organs, such as liver and peripheral tissues (skeletal muscle and adipose tissue), to physiological plasma insulin levels. In an IR state, glucose uptake in adipocytes and skeletal muscle cells is reduced while hepatic glucose production is elevated. A compensatory in the pancreatic  $\beta$  cell is subsequently elevated production of insulin in order to maintain normal plasma glucose. Hyperinsulinemia is the consequent in IR state (Wassink et al., 2007). Clinical tests to assess the extent of insulin resistance include homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR), insulin sensitivity test (loading test), and steady-state plasma glucose (Kaku, 2010).

The molecular mechanism of IR is related to genetic factors including insulin receptor and IRS-1 gene polymorphisms that directly affect insulin signals. In addition, environmental factors such as hyperglycemia, free fatty acids and inflammatory cytokines are also related with IR. In particular, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  is one of the important factors that causes impaired insulin secretion and impaired insulin signaling. There are various diabetic complications including diabetic neuropathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy and coronary artery disease (CAD) (Jansen, Karges and Rink, 2009). It was reported that CAD complication is a major cause of hospitalization in diabetic patients, and more than 75 % of all hospitalization for diabetic complications are related to CAD (Aronson and Rayfield, 2002). Hyperglycemia could promote atherosclerosis by several molecular mechanisms such as nonenzymatic glycosylation of lipids and proteins, protein kinase C activation, and oxidative stress (Aronson and Rayfield, 2002). Currently, the incidence of type 2 DM and CAD complication are increased in metabolic syndrome (MS) patients (Haffner, 2006).

**Table 1** The metabolic syndrome diagnosed by the IDF and NCEP ATP III criteria.

Parameters	IDF	NCEP-ATP III
	Abdominal obesity and two of the following four factors are diagnosed as MS.	Three or more of the following criteria are diagnosed as MS.
WC (cm)		
Male	≥ 90 cm	≥ 90 cm
Female	≥ 80 cm	≥ 80 cm
FBS (mg/dL)	≥ 100 mg/dL	≥ 100 mg/dL
	previously-diagnosed type II DM	
TG (mg/dL)	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL
	specific treatment for this lipid abnormality	
HDL-C (mg/dL)		
Male	< 40 mg/dL	< 40 mg/dL
Female	< 50 mg/dL	< 50 mg/dL
	specific treatment for this lipid abnormality	
SBP/DBP (mmHg)	≥ 130/85	≥ 130/85
	treatment of previously-diagnosed hypertension	

WC = waist circumference; FBS = fasting blood sugar; TG = triglycerides; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol

## 2.2 Metabolic syndrome

MS is a cluster of abnormalities including abdominal obesity, high blood glucose, dyslipidemia, and high blood pressure. It can be diagnosed by either International Diabetes Federation (IDF) and National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel criteria (NCEP ATP) III criteria (**Table 1**). MS is related with increased risks of diabetes and CAD complications (Koehler et al., 2007; Won et al., 2013). About 65–85% of the cases of diabetes are found with MS (Koehler et al., 2007). In addition, the prevalence of coronary heart disease (CHD) is

increased according to the increasing number of risk factors, such as DM and MS (Prahan et al., 2007). The incidences of CAD complications have been found to be increased in type 2 diabetic and MS patients (Pradhan et al., 2003; Hense et al., 2011). According to the American Heart Association (2007), the cause of death in 65 % of diabetic patients was CAD. This problem should be concerned especially in type 2 diabetic patients with MS. The percentage of CHD prevalence was found to be highest in diabetic patients with MS when compared to those in healthy volunteers, MS patients, and diabetic patients without MS (Alexander et al., 2003).

Abdominal obesity in MS patients is closely related with IR in diabetic patients. In addition, it is involved in independent risk factors for cardiovascular disease. Accumulation of visceral fat results in elevation of free fatty acid (FFA) in adipocytes and skeletal muscle cells that is an important factor in the development of abdominal obesity, dyslipidemia and IR (Wassink et al., 2007). The elevation of FFA in skeletal muscle cells and adipocytes lead to IR by stimulating tyrosine phosphorylation of IRS-1 and inhibiting serine phosphorylation of IRS-1 (Wassink et al., 2007). These effects result in inhibition phosphorylation of phosphatidyl inositol (PI)-3 and subsequently reduce translocation of insulin sensitive glucose transporter (GLUT-4) to the plasma membrane, and then glucose uptake is decreased (Wassink et al., 2007). Increased of FFA in adipocytes is closely associated with TNF- $\alpha$  which play a key role in the pathogenesis of type 2 DM and MS (William et al., 2007).

### 2.3 Tumor necrosis factor-alpha

TNF- $\alpha$  is a primary mediator of immune regulation and inflammatory responses. There are two forms of TNF- $\alpha$ , namely soluble TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ) and transmembrane tumor necrosis factor- $\alpha$  (tmTNF- $\alpha$ ). For sTNF- $\alpha$ , the important function involves chronic wasting. It can induce the catabolic state by suppressing activity of key lipogenic enzymes, including lipoprotein lipase, acetyl-CoA, carboxylase, and fatty acid synthetase (Signal, Ron and Hill, 1993). sTNF- $\alpha$  also causes marked stimulation of glycogenolysis which can later cause depletion in glycogen storage and increase in lactate production (Signal et al., 1993). sTNF- $\alpha$  can precipitate fibroblast proliferation and release of lymphokines which lead to a fever and other systemic symptoms. Additionally, it also induces osteoclast-mediated bone resorption (Signal et al., 1993). As it plays a major role in localization of leukocytes to inflammatory sites, it can cause increased release of neutrophils. sTNF- $\alpha$  directly affects endothelial cells, increasing production of vasodilating prostaglandins (PGI<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub>) and chemotactic factors for inflammatory cells. It also increases the pro-coagulant activity on the endothelial cell surface. TNF- $\alpha$  is associated with pathogenesis of many diseases such as septic shock, infectious disease, and autoimmune disease (Zhang and Tracy, 1998). Moreover, TNF- $\alpha$  is found to involve in metabolic abnormalities in type 2 diabetic and MS patients as well (Hotamisgil et al., 1993; Winkler et al., 1998; Katsuki et al., 1998; Tsigos et al., 1999).

tmTNF- $\alpha$  is produced as a type II transmembrane protein. It consists of 233 amino acid residues, which are arranged in stable homotrimers on activated macrophages, lymphocytes, and other cells (Kriegler et al., 1988; Tang, Hung and

Klostergard, 1996; Horiuchi et al., 2010). Soluble TNF- $\alpha$  consists of 157 amino acid residues (Horiuchi et al., 2010). It is cleaved from tmTNF- $\alpha$  by the function of metalloprotease TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) (Black et al., 1997). TNF- $\alpha$  is mainly produced by the monocytes/macrophages. It was also found to be produced by other cells including adipose tissue, smooth muscle cells, astrocytes, endothelial cells, fibroblasts, and osteoblasts (Zhang and Tracy, 1998). TNF- $\alpha$  interacts with two types of receptors, TNF- $\alpha$  receptor type I (TNF-RI; p55) and TNF- $\alpha$  receptor type II (TNF-R II; p75), which are found in all cell types except erythrocytes (Hohmann et al., 1989). TNF-RI is the major receptor which is related to inhibition of insulin action (Peraldi et al., 1996), while TNF-RII is responsible for biological activities of tmTNF- $\alpha$ . tmTNF- $\alpha$  acts as both ligand and receptor. By acting as a ligand, tmTNF- $\alpha$  performs several activities such as cytotoxic activity, host defense against intracellular pathogens, T cell activation, and immunoglobulin production. When it acts as a receptor, it can increase cytotoxic activity by up-regulating the function of perforin and granzyme B in NK-cells (Horiuchi et al., 2010).

### **2.3.1 Role of TNF- $\alpha$ in diabetes mellitus and metabolic syndrome**

The pathogenesis of type 2 DM, MS are related with secreted sTNF- $\alpha$  from the adipose tissue. sTNF- $\alpha$  is associated with abdominal obesity, insulin resistance (IR) and dyslipidemia in type 2 diabetic patients with MS (Hotamisgil et al., 1993; Winkler et al., 1998; Katsuki et al., 1998; Tsigos et al., 1999). Moreover, sTNF- $\alpha$  is related with CAD complication in patients with DM and MS (Guha et al., 2000).

### 2.3.1.1 Abdominal obesity

Studies have indicated that TNF- $\alpha$  is related to abdominal obesity in type 2 diabetic and MS patients (Katsuki et al., 1998; Winkler et al., 1998; Tsigos et al., 1999). Tsigos et al. (1999) conducted a study in obese women with body mass indexes (BMI) of more than 30 kg/m<sup>2</sup> compared with age-matched non-obese controls with BMI of less than 26 kg/m<sup>2</sup>. The waist to hip ratio (WHR) was employed in the classification of former patterns of fat distribution. The participants with the WHR over 0.9 were considered to have abdominal fat distribution, while those with the WHR below 0.9 were considered to have peripheral fat distribution. The researchers found that the plasma TNF- $\alpha$  levels were increased significantly, compared to those with peripheral obesity. In addition, they found a significant positive relationship between plasma TNF- $\alpha$  levels and WHR, while no significant association was found between plasma TNF- $\alpha$  levels and BMI. They also discovered significant positive relationships between plasma TNF- $\alpha$  levels and FBS levels, and between plasma TNF- $\alpha$  levels and insulin levels. The investigators thus concluded that TNF- $\alpha$  was associated with important components causing MS, including abdominal obesity and insulin resistance (; Katsuki et al., 1997; Winkler et al.,1998; Nilsson et al.,1998).

Winkler et al. (1998) conducted research in type 2 diabetic patients with abdominal obesity (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>, WHR > 0.9) compared with healthy lean controls. The plasma TNF- $\alpha$  levels in type 2 diabetic patients with android type obesity were significantly higher than those of controls. In addition, Katsuki et al. (1997) studied in type 2 diabetic patients with obesity (BMI > 26 kg/m<sup>2</sup>) compared with type 2 diabetic patients without obesity and normal healthy controls. They found



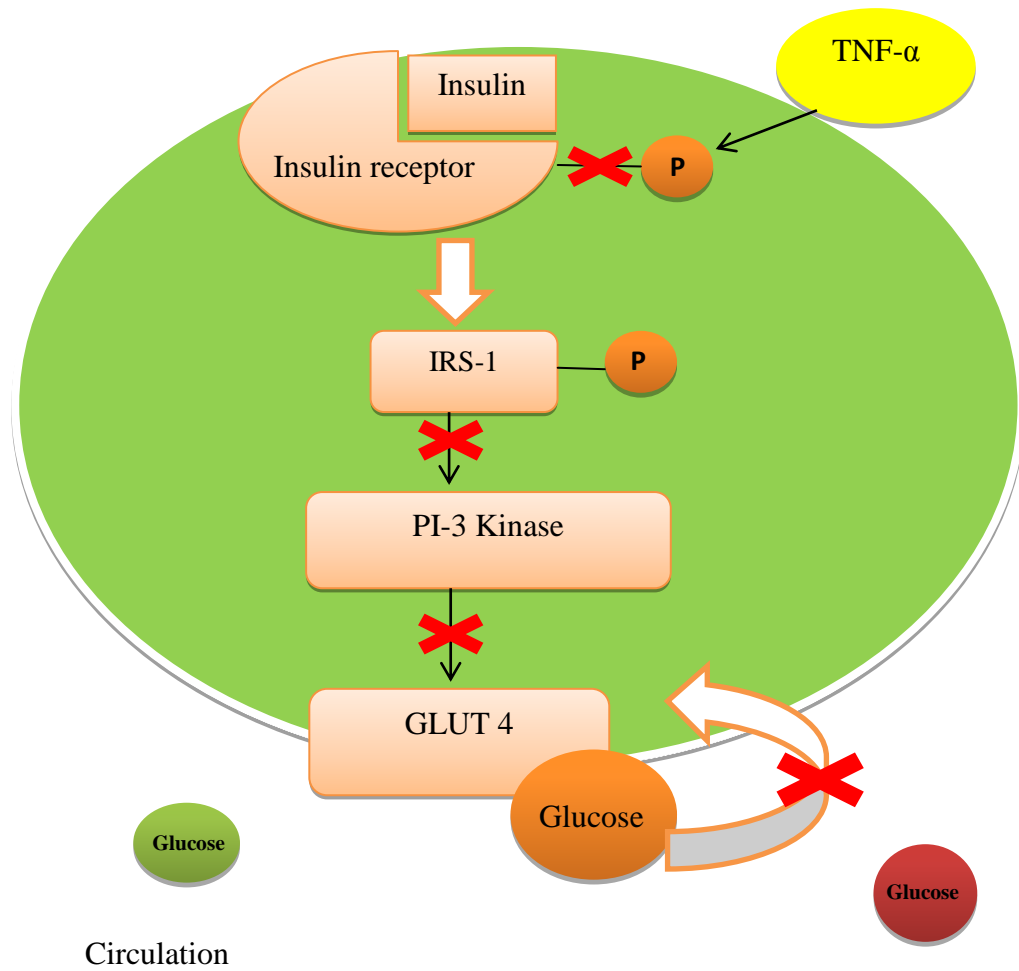
that serum TNF- $\alpha$  levels in type 2 diabetic with obese patients were significantly higher than those of type 2 diabetic patients without obesity and those of normal healthy controls ( $p < 0.01$ ). Another study by Nilsson et al. (1998) in elderly men with type 2 DM demonstrated a significant positive correlation between plasma TNF- $\alpha$  levels and BMI. Based on these previous studies, it can be concluded that TNF- $\alpha$  is closely related with abdominal obesity in type 2 diabetic patients and MS patients. Moreover, TNF- $\alpha$  is also associated with insulin resistance in both type 2 diabetic and MS patients (Hotamisgil et al., 1993; Winkler et al., 1998; Tsigos et al., 1999).

#### **2.3.1.2 Insulin resistance**

According to the IDF, 246 million people worldwide experience type 2 DM which accounting for 90 % to 95 % of all diagnosed cases associated with obesity (American Diabetes Association, 2006). Insulin resistance is commonly found in type 2 diabetic and MS patients. Several studies have indicated that TNF- $\alpha$  is associated with insulin resistance (Hotamisgil et al., 1993; Tsigos et al., 1999; Winkler et al., 1998; Katsuki et al., 1998). Hivert et al. (2008) studied in volunteers with MS according to the NCEP ATP III criteria in 2005. The HOMA-IR was used to quantify insulin resistance and  $\beta$ -cell function. They found that the levels of TNF- $\alpha$  and HOMA-IR were significantly higher in the MS group than in the healthy control group. Various studies have also indicated that high TNF- $\alpha$  is associated with high blood sugar levels in type 2 diabetic and MS patients (Hotamisgil et al., 1995; Nilsson et al., 1998; Saiem Al-Dahr and Essam, 2010). Saiem Al-Dahr and Essam (2010) studied in type 2 diabetic patients with obesity compared with type 2 diabetic patients without obesity.

The researchers also demonstrated that plasma TNF- $\alpha$  levels were increased in patients with MS, obesity and diabetes (Hotamisgil et al., 1995; Nilsson et al., 1998; Al-Dahr and Essam, 2010). Nilsson et al. (1998) found that TNF- $\alpha$  concentrations were significantly correlated with FBS concentrations in elderly men with type 2 DM. Hotamisgil et al. (1995) revealed that body weight reduction in obese participants resulted in improve insulin sensitivity, and there was also a significant decrease in TNF- $\alpha$  messenger ribonucleic acid (TNF- $\alpha$  mRNA) expression in adipose tissues. The evidence, therefore, has indicated that TNF- $\alpha$  is associated with abdominal obesity and insulin resistance in type 2 diabetic patients and MS patients. TNF- $\alpha$  can induce insulin resistance and consequently leads to hyperglycemia via several molecular mechanisms. The influence of TNF- $\alpha$  on pancreatic  $\beta$  cell function can lead to IR by impairing insulin secretion and impaired insulin signaling.

Generally, insulin signaling is initiated when insulin binds with insulin receptor. Activated signaling transduction pathway results in phosphorylation of insulin receptor as shown in **Figure 1** (Borst, 2004). TNF- $\alpha$  diminishes insulin signaling by several molecular mechanisms. TNF- $\alpha$  can diminish insulin signaling by inhibiting insulin receptor autophosphorylation (Kroder et al., 1996). Furthermore, TNF- $\alpha$  can bind to TNF-RI and subsequently contribute to serine or threonine phosphorylation of IRS-1. These actions result in IRS-1 resistance to tyrosyl phosphorylation which is stimulated by insulin (Feinstein et al., 1993; Hotamisgil et al., 1996; Draznin, 2006).



**Figure 1** The role of TNF- $\alpha$  in insulin signaling (Moller, 2000; Borst, 2004)

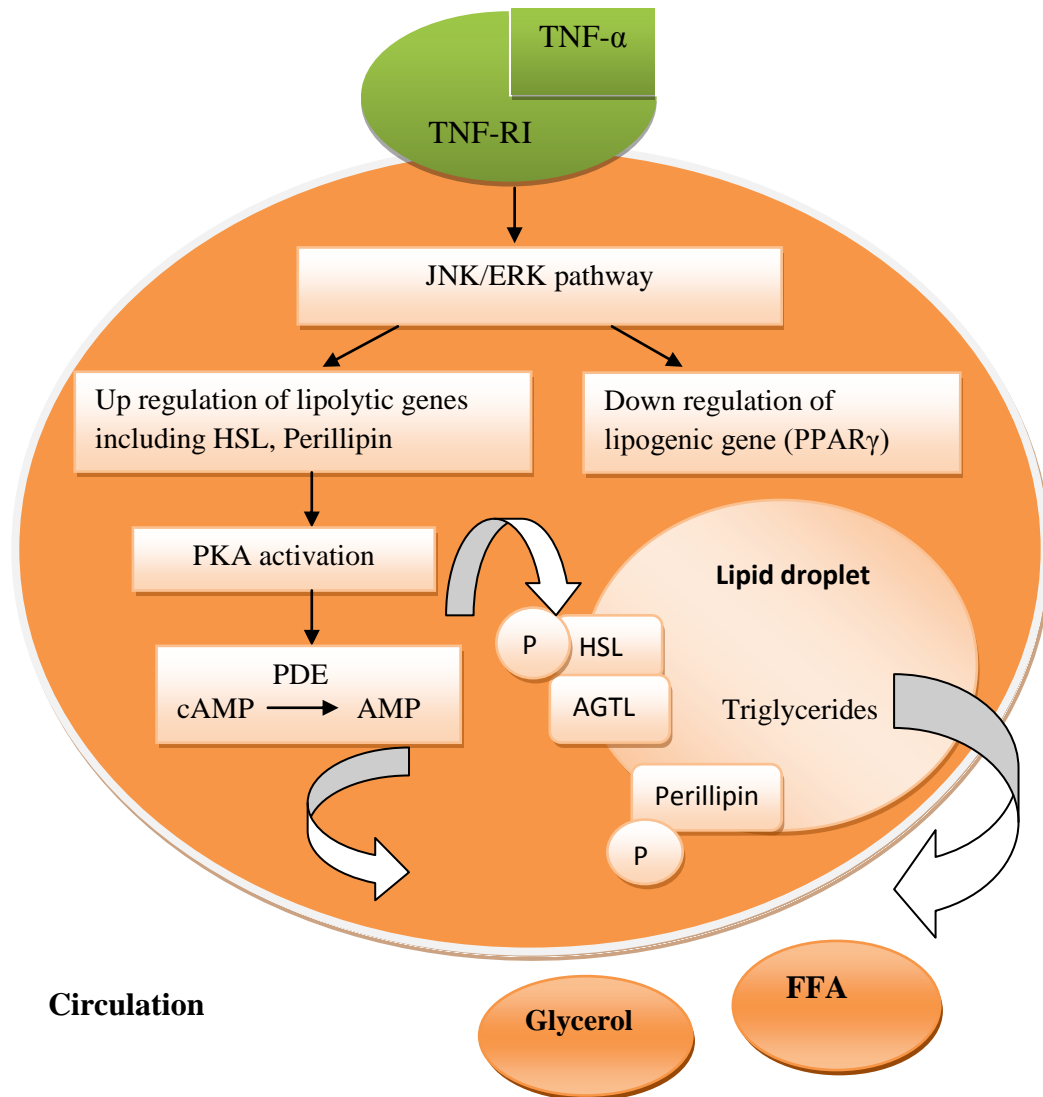
The other mechanism proposed is that TNF- $\alpha$  can induce down regulation of GLUT 4 synthesis and down regulation of insulin receptor and IRS-1 synthesis (Hotamisgil et al., 1994; Szalkowski et al., 1995; Stephen et al., 1999; Uysal et al., 1997).

### **2.3.1.3 Lipid abnormality**

Several studies have indicated that TNF- $\alpha$  is associated with lipid abnormality in patients with type 2 DM and/or MS (Nilsson et al., 1998; Saiem Al-Dahr and Essam, 2010). Saiem Al-Dahr and Essam (2010) found that plasma TNF- $\alpha$ , TC, LDL-C levels were significantly higher in type 2 diabetic patients with obesity than those in type 2 diabetic patients without obesity. Nilsson et al. (1998) found that TNF- $\alpha$  showed a significant positive correlation with serum TG levels and TNF- $\alpha$  had a significant negative correlation with HDL-C levels. TNF- $\alpha$  is considered to be associated with lipid abnormality in type 2 diabetic patient and/or MS patients (Pickup et al., 1994; Tsigos et al., 1999). For the role of sTNF- $\alpha$  in lipid abnormalities, sTNF- $\alpha$  acts on the liver to stimulate the production of cholesterols, triglycerides (TG) and very-low density lipoprotein (VLDL) which is changed in the bloodstream to low-density lipoprotein (LDL) resulting in high blood LDL-C levels. TNF- $\alpha$  also inhibits the biosynthesis of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in the liver. These are common features of dyslipidemia found in type 2 diabetic patients with MS (IDF, 2005). Moreover, sTNF- $\alpha$  stimulates release of cortisol hormone from the brain. This hormone is related with abdominal obesity.

Generally, in adipocytes excess energy is stored in the form of lipid droplets rich in triacylglycerols (TAG). The substrates for TAG synthesis (lipogenesis) are glycerol-3-P, which is an intermediate product in glycolysis, and free

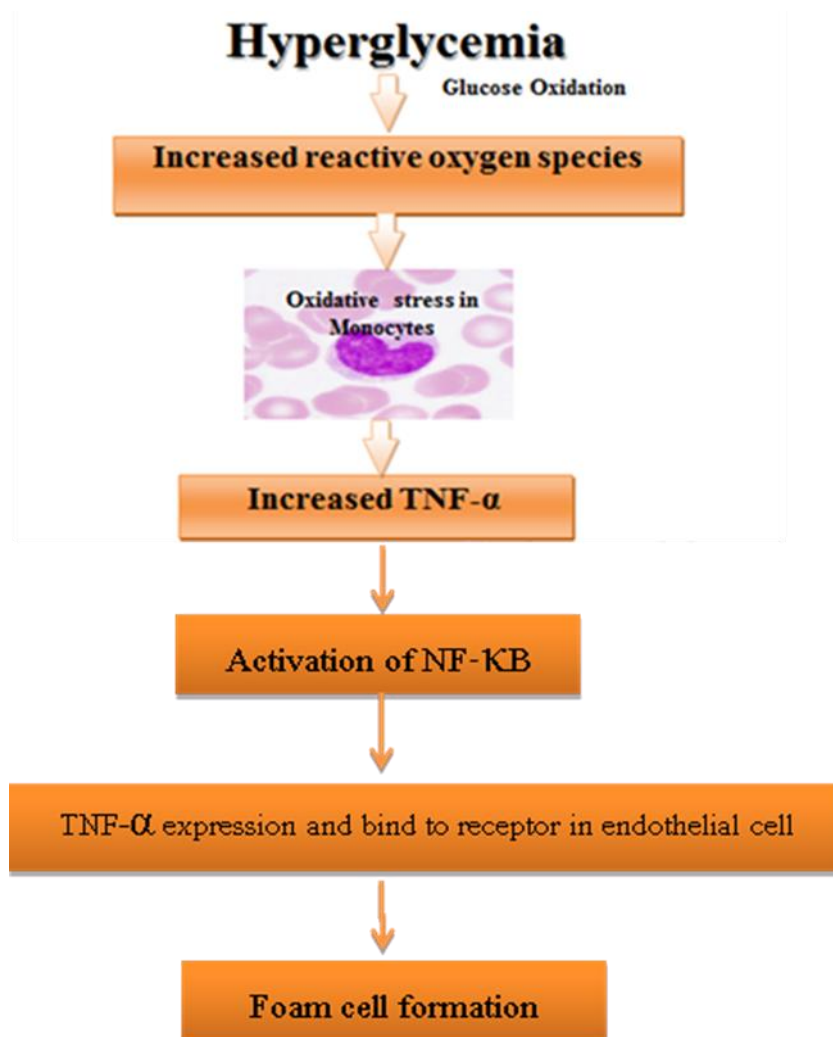
fatty acid (FFA). FFAs are released from chylomicron and VLDL in circulation by lipoprotein lipase (LPL) and *de novo* fatty synthesis from glucose, lactate and amino acid. sTNF- $\alpha$  inhibits fatty acid uptake into adipocytes by binding with TNF-RI, and consequently inhibits fatty acid transport protein, fatty acid translocase and LPL expression. For inhibition of *de novo* fatty synthesis, sTNF- $\alpha$  binds with TNF-RI resulting in down-regulation of lipogenic gene, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) (**Figure 2**). Moreover, sTNF- $\alpha$  induces lipolysis in adipocytes by binding with TNF-RI leading to up-regulation of lipolytic genes, including hormone sensitive lipase (HSL) and perillipin, which subsequently stimulate protein kinase A (PKA) via C-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway. PKA activates enzyme phosphodiesterase (PDE) in order to convert cyclic adenine monophosphate (cAMP) to adenine monophosphate (AMP), then enzyme HSL and perillipin are subsequently phosphorylated and stimulate lipolysis to release FFA into circulation (**Figure 2**) (Cawthorn and Sethi, 2008).



**Figure 2** Molecular mechanism of TNF- $\alpha$  on lipid metabolism (Cawthorn and Sethi, 2007)

#### **2.3.1.4 Role of TNF- $\alpha$ on coronary artery diseases complication**

TNF- $\alpha$  is associated with pathogenesis of CAD complications in DM and MS by stimulating the production of the C-reactive protein (CRP) and the plasminogen in the liver. These proteins are considered as strong risk factors for CHD (Pickup and Crook, 1994; Pickup, Dphil and Frcpath, 2004). Molecular mechanism is proposed by Guigliano et al. (1996). They indicated that TNF- $\alpha$  was associated with atherosclerotic plaque formation in diabetic patients. They discovered that increased levels of TNF- $\alpha$  had been detected in atherosclerotic plaque in diabetic patients. The researchers proposed the molecular mechanism of atherosclerotic plaque formation in diabetic patients that hyperglycemia produced reactive oxygen species (ROS) by slow auto-oxidation of glucose. An increase in ROS led to oxidative stress in monocytes and an increase in TNF- $\alpha$  mRNA expression via activation of transcription factors like the nuclear factor (NF)- $\kappa$ B. They were of the opinion that TNF- $\alpha$  bound with its receptor in endothelial cells, contributing formation of foam cells in diabetic patients **(Figure 3)**.



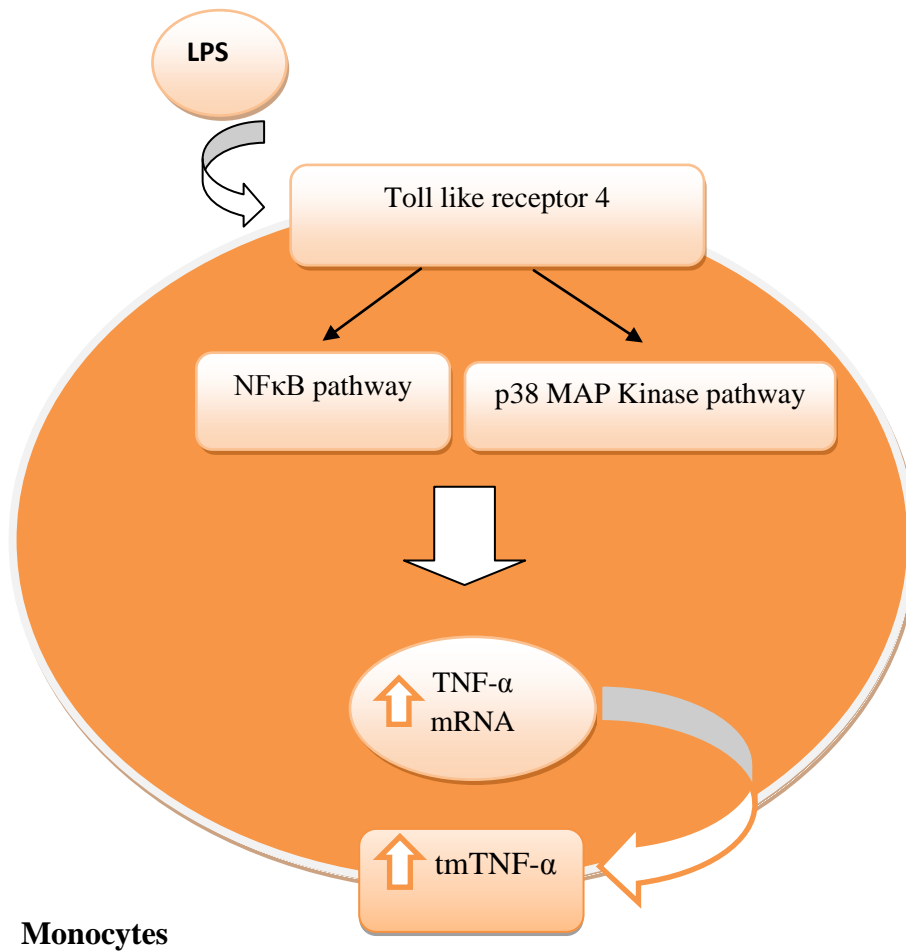
**Figure 3** Molecular mechanism of sTNF- $\alpha$  on CAD complication (Guha et al., 2000)



### 2.3.1.5 Role of tmTNF- $\alpha$ on immune functions

tmTNF- $\alpha$ , which is produced by macrophages/monocytes, plays a role in potent antibacterial and antitumor activities (Sigal and Ron, 1993). Moreover, several biological activities of the tmTNF- $\alpha$  are cytotoxic activity, host defense against intracellular pathogens, T cell activation and immunoglobulin production (Horiuchi et al., 2010). Immune dysfunction has been observed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of diabetic patients (Kolluru, Bir and Kevil, 2012). It was found that TNF- $\alpha$  production from PBMC in response to phorbol-myristate acetate in type 1 and type 2 diabetic patients were lower than those in healthy control (Alexandraki et al., 2007). The problem might be related with dysfunction in diabetic patients might be related with function abnormality of monocytes/macrophages. Lipopolysaccharides (LPS) is a component of the gram negative bacteria cell wall, recognized by the innate immunity especially on monocytes/macrophages through Toll Like Receptor 4 (TLR 4).

TLR 4 on monocytes/macrophages is activated by LPS and induces TNF- $\alpha$  secretion to regulate immune signaling including cell proliferation, cell growth and migration of immune cells via NF- $\kappa$ B, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (**Figure 4**) (Hoareau et al., 2010). Impaired secretion of TNF- $\alpha$  from monocytes/macrophages in response to LPS has been observed in both diabetic mice and in diabetic human (Lapchak et al., 1992; Ptak et al., 1998; Zykova et al., 2000; Komura et al., 2010). Based on the previous studies, monocytes/macrophages dysfunction plays a key role in the immune dysfunction in type 2 DM.



**Figure 4** Signaling pathway of TNF- $\alpha$  production in monocytes (Hoareau et al., 2010)

## 2.4 Zinc

### 2.4.1 Role of zinc in human

Zinc is an essential trace mineral. It is needed in a tiny amount to maintain normal body function. The amount of total body zinc is approximately 1.4 to 2.5 grams. It is stored in many organs and tissues including the skeletal muscle, bone, skin, brain, eye, liver, spleen, kidney, pancreas, red blood cells, white blood cells, and spermatozoa (Stargrove, Treasure and Mckee, 2008). Zinc can also be obtained from food, and major sources of zinc in food are seafood and red meats, especially

liver and other organ meats. Absorption of zinc occurs in the duodenum, jejunum, and ileum (Boullata, Armenti and Hardy, 2010). In plasma, zinc is bound to albumin (57%),  $\alpha$ 2-macroglobulin (40%) and low molecular weight ligands, such as amino acids (3%) for distribution to tissues (Boullata et al., 2010). Albumin is the major plasma carrier of zinc, and albumin is also a transport protein for various types of mineral cations. Thus, the amount of zinc transported in the bloodstream depends not only on an amount of zinc but also on availability of albumin. High calcium intake can reduce zinc absorption and homeostasis. Most of zinc in the blood is localized in erythrocytes for approximately 80% and circulates in the plasma around 16 % (Gallagher, 2008). Excretion of zinc in normal individuals is almost entirely via the feces but increased urinary excretion has been reported in patients with nephrosis, diabetes, and hepatic cirrhosis (Gallagher, 2008).

Zinc involves in biological activities of many enzymes, such as alcohol dehydrogenase, retinol dehydrogenase, delta-6-reductase, and super oxide dismutase. Moreover, zinc is a cofactor in biosynthesis of proteins, fats, and cholesterols (Stargrove et al., 2008). It is crucial for DNA synthesis, RNA transcription, cell division, and cell activation. In addition, zinc plays a central role not only in growth and health promotion, but also in disease prevention (Gallagher, 2008). Zinc is essential for maturation of sperm, for ovulation and fertilization, as well as for normal fetal development (Stargrove et al., 2008). Zinc can help reduce amounts of ROS (Roussel et al., 2003; Bao et al., 2010) and NF- $\kappa$ B expression (Bulow et al., 2007; Bao et al., 2010). Furthermore, zinc can reduce levels of inflammatory markers, such as C-reactive protein and plasma TNF- $\alpha$  (Kelishadi et al., 2010; Yalcin et al., 2011).

## **2.4.2. Role of zinc in diabetes mellitus and metabolic syndrome**

### **2.4.2.1 Zinc deficiency**

Zinc is essential for adequate immunological responses to all pathogens and it is associated with apoptosis and control immune signal transduction via regulating the activity of transcription factors, kinases and phosphatases (Haase and Rink, 2009). Generally, zinc is essential for activities of immune cells in innate and adaptive immunity. Cell proliferation and differentiation require zinc to protect human organism (Ibs and Rink, 2003). Zinc is important for normal development and function of cells mediating the innate immunity such as neutrophils, natural-killer cells, and macrophages (Prasad, 2008). Zinc deficiency is one of factor contributing to immune dysfunction in human. Zinc deficiency decreases physiologic functions of immune cells such as monocyte, natural killer (NK)-cell and neutrophil. (Ibs and Rink, 2003; Haase and Rink, 2009).

Zinc deficiency can lead to growth retardation, delayed sexual maturation, delayed wound healing, alopecia, and skin lesions. Zinc deficiency results in various immunologic defects. Severe deficiency is accompanied by thymic atrophy, lymphopenia, reduced lymphocyte proliferative response to mitogens, and decreased NK activity. Moderate zinc deficiency is associated with diminished Natural killer cell activity, but not with thymic atrophy or lymphopenia. Likewise, zinc deficiency could cause impairment in phagocytosis, parasite killing, oxidative burst of monocytes and neutrophils, and decrease in NK cell activity (Allen et al 1983; Wirth, Fraker and Kierzenbaum, 1989).

Zinc deficiency and high urinary zinc excretion in diabetic patients have been observed (Al-Timimi and Mahmoud, 2001; Al-Marroof and Al-Sharbatti, 2006). Mean value of serum zinc levels in both type 1 and type 2 diabetic patients ( $64.2 \pm 12.6$   $\mu\text{g/dL}$  in type 1 diabetic patients and  $68.9 \pm 11.9$   $\mu\text{g/dL}$  in type 2 diabetics patients) were significantly lower than healthy controls ( $83.4 \pm 12.5$   $\mu\text{g/dL}$ ). In addition, significant negative correlation between serum zinc level and baseline HbA1c in the diabetic groups was also observed (Al-Marroof and Al-Sharbatti, 2006). Poor zinc status in diabetic patients might be associated with abnormality of blood sugar levels in diabetic patients. Moreover, zinc deficiency could lead to increased oxidative stress and inflammation (Prasad et al., 2004; Bao et al., 2010), which are associated with the development and progression of atherosclerosis in diabetic and MS patients (Hansson et al., 2005). Molecular mechanisms of zinc deficiency on insulin resistance were found to be through decreased insulin receptor synthesis, interference in insulin receptor binding and impaired insulin secretion by the pancreas (Salgueiro et al., 2001). Hence, zinc supplementation would show the beneficial effects on clinical outcomes in type 2 diabetic patients and MS patients.

#### **2.4.2.2 Roles of zinc supplementation in patients with type II DM and MS**

The recommended daily intake of zinc for the Thai people 6 years of age and older is 15 milligrams. The tolerable upper intake level of daily zinc intake is 40 mg/day, representing total zinc intake from food, water, and supplement (Gallagher, 2008). Zinc supplementation may help maintain the plasma zinc within the optimal level, and thus preserve optimal zinc functions to improve immune functions and control abnormality of metabolic parameters in patients with DM and MS. Zinc

supplementation also improves immune function by increasing T lymphocytes in response to phyohemagglutinin in diabetic patients (Niewoehner et al., 1996; Al-Marroof and Al-Shabatti, 2006). In addition, evidence has indicated that zinc can improve insulin sensitivity, reduce blood sugar levels, and improve lipid profiles in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome (Oh and Yoon, 2008; Hashemipour et al., 2009; Kelishadi et al., 2010; Jayawardena et al., 2012). Kelishadi et al. (2010) conducted a study by giving zinc sulfate supplementation (20 mg/day) to children with MS for 8 weeks. They found that zinc sulfate could significantly reduce levels of FBS, HOMA-IR, TG, TC, and LDL-C concentrations. Oh and Yoon (2008) conducted a study on zinc gluconate supplementation (50 mg/day) for 4 weeks in patients with type 2 diabetes mellitus. They found that zinc gluconate could significantly reduce the levels of fasting blood sugar and glycosylated haemoglobin. Moreover, zinc supplementation has beneficial effects on diabetic neuropathy and diabetic nephropathy (Farvid et al., 2005; Farvid et al., 2011).

## CHAPTER III

### MATERIALS AND METHODS

#### 3.1 Participants

The participants in this study were recruited from the outpatient section of the Public Health Center 66, Health Department, Bangkok Metropolitan Administration. The type 2 diabetic patients with MS who had body mass index (BMI) between 18.50-29.99 kg/m<sup>2</sup> were included. The MS was defined according to the International Diabetes Federation (IDF) criteria (IDF, 2005). Patients with diabetic nephropathy, diabetic neuropathy and diabetic retinopathy were excluded. All patients received sulfonylureas and/or biguanides only. None of them had acute or chronic inflammation for at least 1 month before participating into the study. They were not on insulin injection, aspirin, immunosuppressive medications, antibiotics, anti-inflammatory drugs, oral contraceptives, hormone replacement therapy or any nutritional or herbal supplements. In addition, they had no allergic history of zinc sulfate or any excipients in tested supplements. Pregnant and lactating patients were also excluded. Participants received oral and written information about the experimental procedures before they gave their written informed consent and were recruited into the study. The study was approved by the Ethics Committee for Researches Involving Human Subjects, the Bangkok Metropolitan Administration.

### 3.2 Study design

This study was a randomized double-blind placebo controlled trial. At the beginning of the study, the patients were required to fill in a questionnaire and were interviewed about their demographic characteristics. In addition, they were asked to answer the questions about their dietary patterns of the past 1 month and fill in the 24-hour recall questionnaire. Blood pressure, weight, height and waist circumference (WC) were measured. BMI was calculated, and the patients were categorized according to the WHO Asia-Pacific guidelines for Asian adults (International Obesity Task Force, 2000) as followed:

<b><u>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</u></b>	<b><u>Nutritional status</u></b>
< 18.5	underweight
18.5-22.9	normal weight
23.0-24.9	overweight
≥ 25	obese

The patients received nutrition counseling and diabetes self-care booklets. Blood samples (15 ml) were collected to determine the levels of plasma zinc, plasma tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , transmembrane TNF- $\alpha$  (tmTNF- $\alpha$ ) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), fasting blood sugar (FBS), hemoglobin A1c (HbA1c), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and complete blood count (CBC).

The patients were randomly assigned into the zinc group and the placebo group. Each patient in the zinc group administered zinc at a dose of 30 mg/day. They



were required to take 1 capsule of zinc sulfate (Zincate<sup>®</sup>, Thai pharmed 1942 Co., Ltd.) twice daily after breakfast and dinner for 8 weeks. Each capsule contained 66 mg of zinc sulfate (equivalent to 15 mg of elemental zinc). The patients in the placebo group administered placebo capsules containing 66 mg of cornstarch twice daily after breakfast and dinner for 8 weeks. The placebo capsules were also manufactured by the Thai pharmed 1942 Co., Ltd., and their appearances were identical with the zinc capsules. During the study period, the patients were called at least once a week to ensure their compliance. Additionally, they were asked about undesirable effects that might occur during supplementation period. At the end of the study (week 8), all parameters including dietary intake, blood pressure, anthropometry, and biochemistry were determined again.

### **3.3 Blood sample collection**

Venous blood samples of the patients were collected at baseline and at week 8 of the study. The patients were asked to fast overnight (about 8-10 hours) before blood samples were drawn in the morning. At each time point, 15 ml of the venous blood sample was collected. The sample in the amount of 2 ml was drawn into the tube containing sodium fluoride to determine the FBS levels while the blood sample in the amount of 5 ml was collected into the tube without clotting factor to determine serum lipid profiles including the levels of TG, TC, and HDL-C. Then, LDL-C level was calculated based on Friedewald equation:

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - (\text{HDL-C}) - (\text{TG}/5) \quad (\text{Friedewald et al., 1972}).$$

The vacutainer containing di-potassium ethylenediamine tetraacetate (K<sub>2</sub>EDTA) was used to collect the blood sample (5 ml) to determine HbA1c, CBC and plasma zinc

levels. The levels of plasma TNF- $\alpha$  and tmTNF- $\alpha$  in PBMC were determined from 3-ml blood samples collected in a lithium heparin vacutainer.

The levels of FBS, HbA1c, TG, TC, HDL-C and CBC were analyzed at the laboratory unit, Public Health Laboratory Division, Bangkok Metropolitan Administration. Plasma TNF- $\alpha$  levels were determined by the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the human TNF- $\alpha$  Quantikine HS kit (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, USA) following the manufacturing protocol. The tmTNF- $\alpha$  in PBMC were analyzed by flow cytometry at the Department of Immunology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. Plasma zinc levels were examined by atomic absorption spectrophotometry at Scientific and Technological Research Equipment Center of Chulalongkorn University.

### **3.4 PBMC isolation and measurement of tmTNF- $\alpha$ level**

PBMC were isolated by the density-gradient centrifugation technique at the Department of Food and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. Three milliliters of polysucrose sodium diatrizoate solution with a density of 1.077 g/mL (Histopaque<sup>®</sup>-1077, Sigma-Aldrich Corporation, ST. Louis, United States of America) was added into conical centrifuge tube, and blood sample at the same amount of Histopaque<sup>®</sup>-1077 was added subsequently on the top. The tube was then centrifuged at the speed of 400 g for 30 minutes. The plasma separated at the top of centrifuge tube was removed and kept at -70 °C for analysis of TNF- $\alpha$  level. The PBMC layer was carefully pipetted into a new conical centrifuge tube and washed 3 times with phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 by centrifugation at the speed of 250 g for 10 minutes.

After washing step, 1 % bovine serum albumin in PBS (1 ml) was added into isolated PBMC. The PBMC were counted and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at 22 °C. The PBMC were then washed with PBS pH 7.4 by centrifuging at 500 g for 5 minutes. Finally, the PBMC were resuspended in PBS. Monoclonal anti-TNF- $\alpha$ -fluorescein antibody (Sigma-Aldrich Corporation, ST. Louis, United States of America) was then added into PBMC solution, and the stained PBMC were incubated at 22 °C for 40 minutes. After incubation, the cells were washed 2 times with PBS by centrifuging at 500 g for 5 minutes and finally resuspended in 200  $\mu$ L of PBS. The fixative buffer (4% paraformaldehyde) was added, and tmTNF- $\alpha$  level in PBMC was analyzed by flow cytometry.

### **3.5 Determination of plasma zinc by atomic absorption spectrophotometry**

Plasma was separated from whole blood by centrifugation at 900 g for 20 minutes. One milliliter of plasma was pipetted into a conical centrifuge tube and diluted with 4-ml ultrapure water. Standard zinc solutions at the concentrations of 0, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.6 mg/L were diluted with 3 % glycerol. The plasma and standard zinc solutions were analyzed by atomic absorption spectrophotometer at the wavelength of 213.9 nm and the slit width of 1.0 nm. The standard curve was generated, and the plasma zinc concentration was obtained.

### 3.6 Compliance and adverse effects of zinc sulfate supplementation

The patients received a phone call once a week throughout the study to ensure about the compliance. They were also asked about adverse effects that may occur during supplementation period. At the end of study, the patients returned their remaining zinc sulfate or placebo capsules to be counted. The percentage of compliance was then calculated based on the following equation:

$$\% \text{ compliance} = \frac{\text{Number of eaten capsules}}{\text{Number of given capsules}} \times 100$$

### 3.7 Statistical analysis

Values were presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Distribution of each parameter was tested by Shapiro-Wilk test. Demographic data between the two groups were compared by Chi-square tests. Student's t-test was used to compare the difference between the groups when the data were normally distributed, and the Mann-Whitney U-test was used when the data were not normally distributed. Referring to the comparisons within the group, the paired t-test was used when the data were normally distributed, and Wilcoxon Signed Ranks test was used when the data were not normally distributed. For each analysis conducted, the significance level was set at the level of  $p < 0.05$ .

## CHAPTER IV

### RESULTS

#### 4.1 Baseline characteristics of the patients

Twenty-three (7 males and 16 females) type 2 diabetic patients with MS who had no neuropathy, nephropathy and retinopathy complications participated in this study. Baseline characteristics of the patients are presented in **Table 2**. Obesity, abdominal obesity, hyperglycemia, and high blood pressure were common baseline characteristics of the patients in this study (**Table 2** and **Table 3**). The levels of lipid profiles of the patients at baseline were within normal values, except for LDL-C. The levels of LDL-C were quite higher than referenced values. Correlation of study parameters was also determined. The correlations between the levels of plasma zinc, plasma TNF- $\alpha$  levels, and parameters including abdominal obesity (WC and BMI), glycemic control (FBS and HbA1c) and lipid levels (TC, TG, HDL-C, and LDL-C) were determined (**Table 4**). There were no correlations between these parameters.

In this study, the patients were divided into the zinc group (12 patients) and the placebo group (11 patients). However, only 21 patients completed the study. Two patients in the zinc group were excluded because one patient had flatulence and abdominal pain, and the other one lost to follow up. Therefore, the zinc group finally included 10 patients (4 males and 6 females), and the control group included 11 patients (2 males and 9 females).

**Table 2** Baseline characteristics of the patients

Parameters	Total ( n = 23)	Recommended ranges
Age (year)	58.52 ± 2.00	
Diabetic duration (years)	6.57 ± 0.94	
Plasma zinc (µg/dL)	73.37 ± 0.89	
Plasma TNF-α (pg/mL)	1.40 ± 0.13	
Weight (Kg)	69.03 ± 1.58	
Height (cm)	162.30 ± 1.53	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.17 ± 0.37	18.5-22.9 kg/m <sup>2</sup> <sup>(1)</sup>
WC (cm)		
male	96.50 ± 2.14	< 90 cm in male <sup>(2)</sup>
female	91.64 ± 1.62	< 80 cm in female <sup>(2)</sup>
FBS (mg/dL)	134.91 ± 8.96	70-130 mg/dL <sup>(3)</sup>
HbA1c (%)	7.22 ± 0.28	≤ 7 % <sup>(3)</sup>
TG (mg/dL)	116.26 ± 9.68	< 150 mg/dL <sup>(3)</sup>
TC (mg/dL)	187.61 ± 8.05	< 200 mg/dL <sup>(3)</sup>
HDL-C (mg/dL)		
male	46.60 ± 3.05	> 40 mg/dL in male <sup>(3)</sup>
female	62.16 ± 7.15	> 50 mg/dL in female <sup>(3)</sup>
LDL-C (mg/dL)	109.18 ± 5.99	< 100 mg/dL <sup>(3)</sup>
SBP (mmHg)	135.17 ± 3.09	< 140 mmHg <sup>(3)</sup>
DBP (mmHg)	80.30 ± 4.41	< 80 mmHg <sup>(3)</sup>

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

FBS levels were determined in 20 patients.

<sup>1</sup>The WHO Asia-Pacific guidelines for Asian adults, <sup>2</sup>IDF criteria for Asian adults, <sup>3</sup>American Diabetes Association 2013, TNF-α = tumor necrosis factor-alpha; BMI = body mass index; WC = waist circumference; FBS = fasting blood sugar; HbA1c = hemoglobin A1c; TG = triglycerides; TC = total cholesterol; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure; µg/dL = microgram per deciliter; pg/mL = pictogram per milliliter; kg = kilogram; cm = centimeters; kg/m<sup>2</sup> = kilogram per meter square; cm = centimeter; mg/dL = milligram per deciliter; mmHg = millimeter of mercury

**Table 3** The percentage of each component in the metabolic syndrome diagnosed by the International Diabetes Federation criteria (n = 23)

Parameters	Number (%)
Waist circumference	
≥ 90 cm in male and ≥ 80 cm in female	23 (100)
Fasting blood sugar	
≥ 100 mg/dL or previously-diagnosed type 2 DM	23 (100)
Blood pressure	
≥ 130/85 mmHg or previously-diagnosed hypertension	19 (82.61)
Triglycerides	
≥ 150 mg/dL or specific treatment for this lipid abnormality	9 (39.13)
High-density lipoprotein cholesterol	
< 40 mg/dL in male and < 50 mg/dL in female or specific treatment for this lipid abnormality	11 (47.83)

**Table 4** Correlation between the levels of plasma TNF- $\alpha$ , plasma zinc and other baseline parameters of the patients

	<b>Plasma TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Plasma zinc</b>	<b>WC</b>	<b>BMI</b>	<b>FBS</b>	<b>HbA1c</b>	<b>TG</b>	<b>TC</b>	<b>HDL-C</b>	<b>LDL-C</b>
<b>Plasma zinc</b>										
Correlation	0.035	1.000	-0.174	0.182	0.366	-0.198	-0.063	-0.053	0.135	-0.093
<i>p</i> -value	0.882	-	0.427	0.405	0.086	0.366	0.774	0.811	0.538	0.673
<b>Plasma TNF-<math>\alpha</math></b>										
Spearman correlation	1.000	0.035	-0.105	0.147	-0.331	0.168	0.277	-0.247	-0.195	-0.232
<i>p</i> -value	-	0.882	0.660	0.535	0.154	0.480	0.237	0.294	0.410	0.326

Correlations between plasma zinc and WC, TC, HDL-C, LDL-C were examined by Pearson's correlation.

Correlations between plasma zinc and plasma TNF- $\alpha$ , BMI, FBS, HbA1c, and TG were examined by Spearman's rank correlation.

Correlations between plasma TNF- $\alpha$  and all baseline parameters were examined by Spearman's rank correlation.



#### 4.2 Demographic data and baseline clinical parameters of the patients

General demographic data of the patients in the zinc group and the placebo group are presented in **Table 5**. There were no significant differences in gender, age, BMI and diabetic duration between groups. Most of the patients in both groups had age distribution between 40-59 years. In the zinc group, 10 % of the patients were classified into overweight category, and 90 % of the patients were classified into obese category. In the placebo group, 45.45 % of the patients were classified into overweight category, and 54.55 % of the patients were classified into obese category. Most of the patients in the zinc group had diabetic duration  $\geq 5$  years (60 %) while most of the patients in the placebo group had diabetic duration  $< 5$  years (54.55 %). Most of the patients in both groups had exercise  $< 3$  times/week (80 % in the zinc group and 72.73 % in the placebo group). For cigarette smoking, most of the patients in both groups were non-smokers (90 % in the zinc group and 90.91 % in the placebo group). The baseline characteristics data of the patients in the zinc group and the placebo group are shown in **Table 6**. None of the measured parameters differed between groups.

**Table 5** Demographic data of the patients

<b>Demographic data</b>	<b>Zinc group (n =10)</b>	<b>Placebo group (n =11)</b>	$\chi^2$	<i>p</i> -value
<b>Gender</b>				
Male	4 (40.00)	2 (18.18)	3.857	0.050
Female	6 (60.00)	9 (81.82)		
<b>Age distribution (years)</b>				
40-59	7 (70.00)	6 (54.55)	1.190	0.275
≥ 60	3 (30.00)	5 (45.45)		
<b>Body mass index (kg/m<sup>2</sup>)</b>				
23-24.9 (overweight)	1 (10.00)	5 (45.45)	3.857	0.050
25-29.9 (obese)	9 (90.00)	6 (54.55)		
<b>Diabetic duration (years)</b>				
< 5	4 (40.00)	6 (54.55)	0.048	0.827
≥ 5	6 (60.00)	5 (45.45)		
<b>Exercise (times/week)</b>				
< 3	8 (80.00)	8 (72.73)	5.762	0.016
≥ 3	2 (20.00)	3 (27.27)		
<b>Cigarette smoking</b>				
Non smoker	9 (90.00)	10 (90.91)	13.762	< 0.001
Current smoker	1 (10.00)	1 (9.09)		

Data are presented as number (% , percentage).

$\chi^2$  = comparison of frequency between groups by Chi-square test; kg/m<sup>2</sup> = kilogram per meter square

**Table 6** Baseline clinical parameters of the patients

Parameters	Zinc group (n =10)	Placebo group (n = 11)
Plasma zinc ( $\mu\text{g/dL}$ )	$73.45 \pm 1.25$	$73.67 \pm 1.34$
Plasma TNF- $\alpha$ (pg/mL)	$1.27 \pm 0.13$	$1.54 \pm 0.21$
Waist circumference (cm)		
male	$95.38 \pm 2.91$	$94.50 \pm 1.44$
female	$92.25 \pm 2.66$	$92.20 \pm 4.20$
Weight (kg)	$70.47 \pm 2.25$	$67.26 \pm 1.88$
Height (cm)	$162.40 \pm 2.41$	$161.91 \pm 2.13$
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	$26.70 \pm 0.54$	$25.66 \pm 0.53$
FBS (mg/dL)	$141.67 \pm 18.93$	$137.64 \pm 10.08$
HbA1c (%)	$7.23 \pm 0.57$	$7.25 \pm 0.31$
TG (mg/dL)	$123.20 \pm 13.76$	$115.00 \pm 15.98$
TC (mg/dL)	$201.60 \pm 15.57$	$178.45 \pm 8.11$
HDL-C (mg/dL)		
male	$46.32 \pm 4.61$	$47.95 \pm 8.05$
female	$60.63 \pm 8.75$	$60.85 \pm 4.15$
LDL-C (mg/dL)	$117.91 \pm 11.90$	$101.50 \pm 5.86$
SBP (mmHg)	$134.60 \pm 5.38$	$127.45 \pm 3.97$
DBP (mmHg)	$83.70 \pm 9.28$	$76.27 \pm 3.96$

Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean.

Plasma zinc and plasma FBS levels in the zinc group were examined in 9 patients.

Plasma TNF- $\alpha$  levels in the placebo group were examined in 10 patients.

FBS levels were determined by nonparametric statistics.

n = number; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor-alpha; WC = waist circumference; BMI = body mass index; FBS = fasting blood sugar; HbA1c = hemoglobin A1c; TG = triglycerides; TC = total cholesterol; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure;  $\mu\text{g/dL}$  = microgram per deciliter; pg/mL = pictogram per milliliter; cm = centimeter; kg = kilogram;  $\text{kg/m}^2$  = kilogram per meter square; mg/dL = milligram per deciliter; mmHg = millimeter of mercury

### **4.3 Effects of zinc and placebo supplementation on plasma zinc, plasma TNF- $\alpha$ and blood cells**

The levels of plasma zinc, plasma TNF- $\alpha$ , RBC, lymphocytes, monocytes, neutrophils, and basophils at baseline and week 8 are presented in **Table 7**. At baseline, plasma zinc levels of patients in the zinc group and the control group were  $73.45 \pm 1.25$   $\mu\text{g/dL}$  and  $73.67 \pm 1.34$   $\mu\text{g/dL}$  respectively. There was no significant difference in plasma zinc levels between groups. At week 8, plasma zinc levels of the patients in the zinc group were significantly increased from baselines ( $p < 0.001$ ), and the levels were significantly higher than those of the patients in the placebo group ( $p = 0.001$ ). In placebo group, there were no significant change in plasma zinc from baselines at week 8.

Baseline plasma TNF- $\alpha$  levels of the patients in the zinc group and in the placebo group were  $1.27 \pm 0.13$   $\text{pg/mL}$  and  $1.54 \pm 0.21$   $\text{pg/mL}$  respectively. The levels of plasma TNF- $\alpha$  were not significantly changed from baseline in both groups after 8-week zinc supplementation. There were no significant differences in plasma TNF- $\alpha$  levels between groups at baseline and week 8. Blood cells including RBC, lymphocytes, monocytes, neutrophils, and basophils were not significantly changed from baseline in both groups. The differences between groups in these parameters were not observed at baseline and week 8.

**Table 7** The levels of plasma zinc, plasma TNF- $\alpha$  and blood cells in the patients at baseline and week 8.

Parameters	Zinc group (n = 10)		Placebo group (n =11)	
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8
Plasma zinc ( $\mu\text{g/dL}$ )	73.45 $\pm$ 1.25	86.56 $\pm$ 1.13 <sup>*†</sup>	73.67 $\pm$ 1.34	73.93 $\pm$ 1.38
Plasma TNF- $\alpha$ (pg/mL)	1.27 $\pm$ 0.13	1.08 $\pm$ 0.12	1.54 $\pm$ 0.21	1.50 $\pm$ 0.25
RBC ( $10^6/\text{mL}$ )	4.81 $\pm$ 0.18	4.74 $\pm$ 0.19	4.49 $\pm$ 0.14	4.58 $\pm$ 0.15
% Lymphocytes	36.90 $\pm$ 1.90	40.74 $\pm$ 2.46	35.95 $\pm$ 2.21	37.05 $\pm$ 2.76
% Monocytes	6.80 $\pm$ 0.60	5.92 $\pm$ 0.45	5.93 $\pm$ 0.50	6.05 $\pm$ 0.68
% Neutrophils	49.11 $\pm$ 3.12	47.24 $\pm$ 2.96	54.29 $\pm$ 2.35	52.22 $\pm$ 3.26
% Basophils	0.43 $\pm$ 0.07	0.38 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.05

Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean.

Plasma zinc levels and blood cells in the zinc group were examined in 9 patients.

Plasma TNF- $\alpha$  levels in the placebo group were examined in 10 patients.

\*Significant difference from baseline within group ( $p < 0.05$ )

†Significant difference from the control group at the same time point ( $p < 0.05$ )

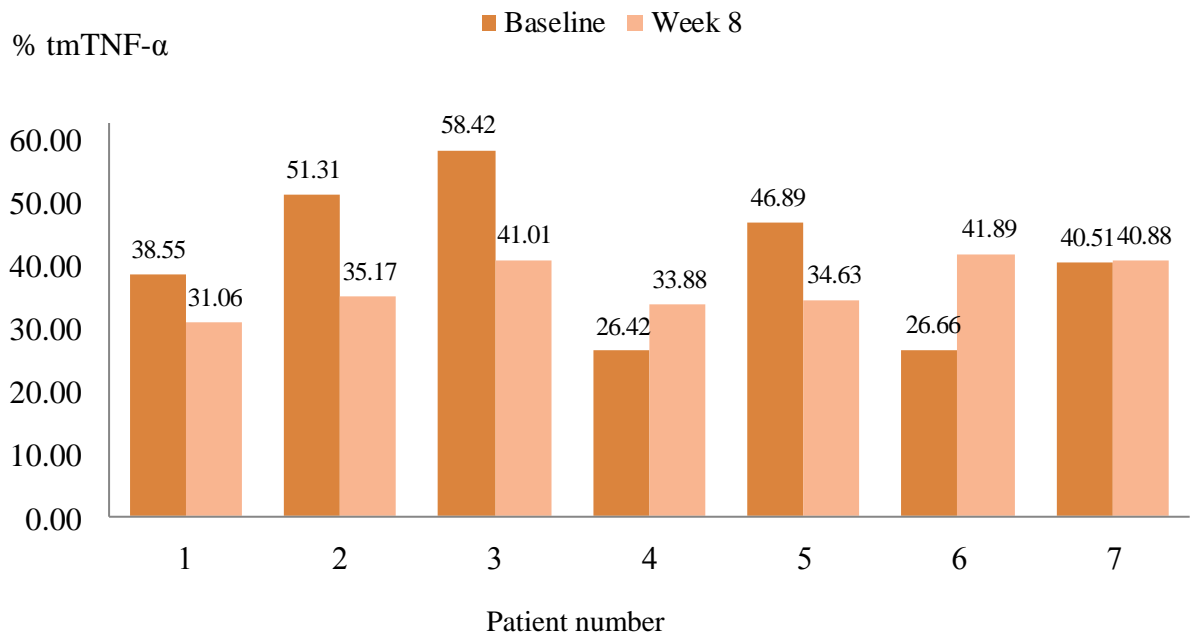
n = number; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor-alpha; RBC = red blood cell;  $\mu\text{g/dL}$  = microgram per deciliter; pg/mL = pictogram per milliliter;  $10^6/\text{mL}$  = 1,000,000 per milliliter; % = percentage

#### **4.4 Effects of zinc and placebo supplementation on tmTNF- $\alpha$ in peripheral blood mononuclear cells (PBMC)**

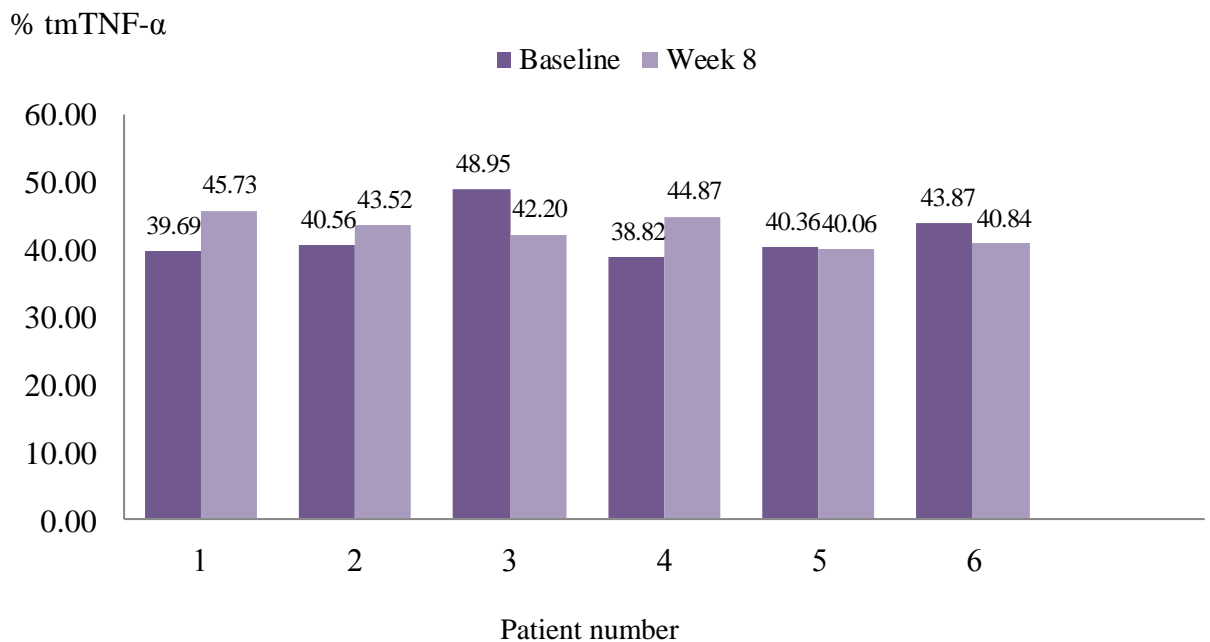
The levels of tmTNF- $\alpha$  in PBMC of 7 patients in the zinc group and 6 patients in the placebo group were analyzed by flow cytometry. As shown in **Figures 5 and 6**, the levels of tmTNF- $\alpha$  in PBMC of the patients were not significantly changed from baselines in both groups. There were no significant differences in tmTNF- $\alpha$  levels between groups at baseline and week 8.

#### **4.5 Effects of zinc and placebo supplementation on glycemic control, lipid profiles and blood pressure**

The levels of FBS, HbA1c, TG, TC, HDL-C, LDL-C, SBP and DBP of the patients at baseline and week 8 are presented in **Table 8**. At baseline, FBS levels of patients in the zinc group and the control group were  $141.67 \pm 18.93$   $\mu\text{g/dL}$  and  $137.64 \pm 10.08$   $\mu\text{g/dL}$  respectively. There were no significant differences in baseline FBS levels between groups. After 8 weeks of zinc supplementation, the levels of FBS in the zinc group were significantly decreased from their baselines ( $p = 0.007$ ). However, there were no significant differences in FBS levels between groups. The other clinical parameters including HbA1c, TG, TC, HDL-C, LDL-C, SBP and DBP at week 8 were not significantly different from their baselines in both groups. The differences between groups in these parameters were not observed at baseline and week 8.



**Figure 5** The percentage of tmTNF- $\alpha$  in PBMC at baseline and week 8 in the zinc group



**Figure 6** The percentage of tmTNF- $\alpha$  in PBMC at baseline and week 8 in the placebo group

**Table 8** Glycemic control, lipid profiles and blood pressure in the patients at baseline and week 8

Parameters	Zinc group (n = 10)		Placebo group (n =11)	
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8
FBS (mg/dL)	141.67 ± 18.93	130.22 ± 20.08*	137.64 ± 10.08	129.73 ± 7.43
HbA1c (%)	7.23 ± 0.57	7.00 ± 0.54	7.25 ± 0.31	6.94 ± 0.24
TG (mg/dL)	123.20 ± 13.76	122.40 ± 15.01	115.00 ± 15.98	131.73 ± 24.44
TC (mg/dL)	201.60 ± 15.57	192.30 ± 15.32	178.45 ± 8.11	196.36 ± 12.67
HDL-C (mg/dL)	58.05 ± 5.52	58.72 ± 5.36	53.92 ± 3.16	53.13 ± 3.82
LDL-C (mg/dL)	117.91 ± 11.90	109.01 ± 11.72	101.50 ± 5.86	112.53 ± 8.79
SBP (mmHg)	134.60 ± 5.38	119.80 ± 6.80	127.45 ± 3.97	126.18 ± 3.76
DBP (mmHg)	83.70 ± 9.28	71.50 ± 2.38	76.27 ± 3.96	72.45 ± 2.88

Data are presented as mean ± standard error of the mean.

FBS levels in the zinc group were determined in 9 patients.

FBS levels in both groups were determined by nonparametric statistics.

\*Significant difference from baseline within group ( $p < 0.05$ )

FBS = fasting blood sugar; HbA1c = hemoglobin A1c; TG = triglycerides; TC = total cholesterol; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure; mg/dL = milligram per deciliter; % = percentage; mmHg = millimeter of mercury



**Table 9** Anthropometric parameters of the patients at baseline and week 8

Parameters	Zinc group (n=10)		Placebo group (n=11)	
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8
WC (cm)	93.17 ± 1.18	93.61 ± 2.16	89.35 ± 1.44	89.38 ± 1.38
Weight (kg)	70.47 ± 2.25	70.49 ± 2.61	67.26 ± 1.88	67.22 ± 1.83
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.70 ± 0.54	26.70 ± 0.65	25.66 ± 0.53	25.62 ± 0.43

Data are presented as mean ± standard error of the mean.

WC levels in both groups were determined by nonparametric statistics. WC = waist circumference; BMI = body mass index; cm = centimeter; kg = kilogram; kg/m<sup>2</sup> = kilogram per meter square

#### 4.6 Effects of zinc and placebo supplementation on anthropometric parameters

Anthropometric parameters including WC, weight and BMI of the patients are shown in **Table 9**. These anthropometric parameters at week 8 were not significantly different from their baselines in both groups. There were no significant differences between groups in these parameters at baseline and week 8.

#### **4.7 Dietary intake of the patients**

Dietary patterns, macronutrient and energy intake of the patients are shown in **Tables 10** and **11**. Dietary patterns of the patients at baseline and week 8 were not significantly different from their baselines in both groups. It was found that total energy intake (TE) at baseline was approximately 1,500 kcal/day in both groups, and there was no significant difference in the amount of TE between groups. At the end of study, there was no significant difference in amount of TE from baseline in both groups. The amount of carbohydrate, fat and protein intakes were not significantly different from their baselines in both groups. The differences between groups in these parameters were not observed at baseline and week 8. At baseline, energy distribution of carbohydrate, fat and protein were 54: 26: 20 in the zinc group and 55: 25: 20 in the placebo group. There was no significant difference in energy distribution between groups. At the end of study, no significant differences in the amount of total energy intake from baselines were found in both groups.

**Table 10** Dietary patterns of the patients

Parameters	Zinc group (n=10)		Placebo group (n=11)	
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8
Frequency of meat and meat product intake				
4-7 days/week	7 (70)	6 (60)	7 (63.6)	6 (54.5)
1-3 days/week	2 (20)	3 (30)	3 (27.3)	4 (36.4)
1-3 days/month	1 (10)	1 (10)	1 (9.1)	1 (9.1)
Frequency of fried food intake				
4-7 days/week	4 (40)	3 (30)	4 (36.3)	4 (36.3)
1-3 days/week	5 (50)	5 (50)	2 (18.2)	1 (9.1)
1-3 days/month	1 (10)	2 (20)	5 (45.5)	6 (54.6)
Frequency of vegetable intake				
4-7 days/week	6 (60)	6 (60)	6 (54.5)	6 (54.5)
1-3 days/week	3 (30)	3 (30)	2 (18.2)	3 (27.3)
1-3 days/month	1 (10)	1 (10)	3 (27.3)	2 (18.2)
Frequency of fruit intake				
4-7 days/week	5 (50)	6 (60)	7 (63.6)	7 (63.6)
1-3 days/week	3 (30)	4 (40)	2 (18.2)	3 (27.3)
1-3 days/month	2 (20)	0 (0.0)	2 (18.2)	1 (9.1)

Data are presented as number (percentage).

$\chi^2$  = comparison frequency between groups by Chi-square test

**Table 10** Dietary patterns of the patients

Parameters	Zinc group (n=10)		Placebo group (n=11)	
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8
Frequency of cereal intake				
4-7 days/week	2 (20)	2 (20)	1 (9.1)	1 (9.1)
1-3 days/week	2 (20)	2 (20)	2 (18.2)	1 (9.1)
1-3 days/month	6 (60)	6 (60)	8 (72.7)	9 (81.8)
Frequency of sweeten or carbonated beverages intake				
4-7 days/week	2 (20)	1 (10)	1 (9.1)	1 (9.1)
1-3 days/week	3 (30)	4 (40)	2 (18.2)	1 (9.1)
1-3 days/month	5 (50)	5 (50)	8 (72.7)	9 (81.8)
Frequency of dairy products intake				
4-7 days/week	3 (30)	3 (30)	2 (18.2)	2 (18.2)
1-3 days/week	4 (40)	3 (30)	5 (45.5)	4 (36.3)
1-3 days/month	3 (30)	4 (40)	4 (36.3)	5 (45.5)
Frequency of tea and coffee intake				
4-7 days/week	2 (20)	2 (20)	2 (18.2)	3 (27.3)
1-3 days/week	2 (20)	2 (20)	2 (18.2)	1 (9.1)
None	6 (60)	6 (60)	7 (63.6)	7 (63.6)

Data are presented as number (percentage).

$\chi^2$  = comparison frequency between groups by Chi-square test

**Table 11** Average dietary energy intakes of the patients

Parameters	Zinc group (n=10)		Placebo group (n =11)	
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8
<b>Total energy intake</b>				
kcal/day	1513.44 ± 39.46	1481.45 ± 40.10	1475.68 ± 35.34	1505.58 ± 24.46
<b>Carbohydrate intake</b>				
gram/day	205.06 ± 5.74	203.93 ± 5.01	207.60 ± 6.44	204.81 ± 4.41
kcal/day	820.22 ± 22.96	815.72 ± 20.05	810.38 ± 25.80	819.24 ± 17.63
% total energy intake	54.18 ± 0.36	55.09 ± 0.14	55.13 ± 0.93	54.48 ± 0.71
<b>Fat intake</b>				
gram/day	43.74 ± 0.84	41.18 ± 1.50	41.82 ± 1.50	42.34 ± 1.36
kcal/day	393.62 ± 7.54	370.64 ± 13.54	376.36 ± 13.52	381.44 ± 12.26
% total energy intake	26.12 ± 0.63	25.06 ± 0.77	24.86 ± 0.72	25.15 ± 0.99
<b>Protein intake</b>				
gram/day	74.90 ± 3.90	73.77 ± 4.26	72.23 ± 3.88	76.32 ± 4.91
kcal/day	299.60 ± 15.61	295.09 ± 17.10	288.93 ± 15.53	305.30 ± 19.64
% total energy intake	19.70 ± 0.59	19.85 ± 0.81	19.55 ± 0.90	20.21 ± 1.15
<b>Energy distribution</b>				
CHO: Fat: Protein	54: 26: 20	55: 25: 20	55: 25: 20	55: 25: 20

Data are presented as mean ± standard error of the mean.

n = number; CHO = carbohydrate

#### **4.8 Compliance and adverse effects of zinc sulfate and placebo**

In this study, the patients were administered with zinc sulfate at the dose of 132 mg/day (equivalence to 30 mg/day of elemental zinc) or placebo for 8 weeks. At the end of study, the patients were evaluated for their compliance by counting the remaining zinc or placebo capsules. All patients had good compliance, the average percentage of compliance of the patients in the zinc group and the placebo groups were  $99.94 \pm 0.88$  and  $98.45 \pm 1.27$  respectively. The adverse effects of zinc sulfate found in this study were flatulence and abdominal pain. These effects were found only in one patient, and this patient finally withdrew from the study. There was no complaint about adverse effects from the other patients in the zinc group and all patients in the placebo group.

## **CHAPTER V**

### **DISCUSSION**

This study examined the effects of zinc supplementation on the levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  including, soluble TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ) and transmembrane (tmTNF- $\alpha$ ) in peripheral blood mononuclear cell (PBMC), glycemic control (FBS and HbA1c), and lipid control (TG, TC, HDL-C, and LDL-C) in type 2 diabetic patients with MS at the Public Health Center 66, Health Department, Bangkok Metropolitan Administration.

#### **5.1 Zinc status and plasma TNF- $\alpha$ levels in type 2 diabetic patients with MS**

Plasma or serum zinc level is normally used to indicate zinc status. The optimal ranges of zinc in the blood vary among a number of studies. Al-Marroof and Al-Sharbetti (2001) suggested that plasma zinc level of higher than 80  $\mu\text{g/dL}$  was normal in healthy individuals, while Al-Timimi and Mahmoud (2011) stated that zinc deficiency was classified when serum zinc levels were lower than 70  $\mu\text{g/dL}$ . The results of the present study showed that mean plasma zinc levels of the type 2 diabetic patients with MS were considered normal. These findings were in agreement with those of Marreiro et al. (2004) and Dourado Ferro et al. (2011). Normally, zinc deficiency has been observed in both type 1 and type 2 diabetic patients particularly in patients with poor glycemic control (Al-Marroof and Al-Sharbatti, 2006; Al-Timimi and Mahmoud, 2011).

It was reported that excretion of zinc in urine was increased (hyperzincuria) in patients with DM (Salgueiro et al., 2001). Nevertheless, zinc

deficiency, based on plasma zinc levels, was not found in the patients with type 2 DM and MS in the present study. This may be due to the differences in characteristics and severity of the disease of the patients in this study compared to the other studies (Marreiro et al., 2004; Al-Marroof and Al-Sharbatti., 2006; Dourado Ferro et al., 2011). In addition, capability of controlling blood sugar and blood lipid of the patients are also involved in differences of zinc status among the studies (Marreiro et al., 2004; Al-Marroof and Al-Sharbatti., 2006; Dourado Ferro et al., 2011). Oxidative stress could be the result from hyperglycemia and hyperlipidemia and consequently induces zinc deficiency (Tesfamariam and Cohen, 1992; Eide, 2011). It was found that most of the patients in this study could maintain their glycemic levels and lipid profiles within acceptable ranges, thus optimal zinc status could be also maintained.

In the present study, the mean plasma TNF- $\alpha$  level in type 2 diabetic patients with MS at the baseline was in the range of  $1.40 \pm 0.13$  pg/mL. The levels of plasma TNF- $\alpha$  in the healthy subjects, diabetic patients, and MS patients varied among previous studies. In healthy subjects, Al-dahr and Jiffri (2010) demonstrated that plasma TNF- $\alpha$  levels in individuals aged 40 to 60 years were in the range of  $1.07 \pm 0.2$  pg/mL, while Winkler et al. (1998) stated that plasma TNF- $\alpha$  levels in those aged 40 to 71 years were in the range of  $6.32 \pm 0.26$  pg/mL. In obese patients with type 2 DM and MS, the levels of plasma TNF- $\alpha$  were in the range of 2-13 pg/mL (Winkler et al., 1998; Al-dahr and Jiffri, 2010; Gupta et al., 2012). Al-dahr and Jiffri (2010) demonstrated that plasma TNF- $\alpha$  levels in obese patients with type 2 DM aged 40 to 60 years were in the range of  $1.9 \pm 0.5$  pg/mL, whereas Winkler et al. (1998) stated that plasma TNF- $\alpha$  levels in type 2 diabetic patients with abdominal obesity (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> and WHR > 0.9) aged 48 to 73 years were in the range of  $10.51 \pm$



0.84 pg/mL. In MS patients, Gupta et al. (2012) suggested that plasma TNF- $\alpha$  levels in MS patients aged 20 to 40 years were in the range of  $13.0 \pm 7.51$  pg/mL.

Based on previous studies, the baseline TNF- $\alpha$  levels in the present study were considered low when compared to those in the patients with DM and MS in previous studies (Marreiro et al., 2004; Al-Marroof and Al-Sharbatti., 2006). The variation among the previous studies may be associated with age. It was found that the levels of plasma TNF- $\alpha$  showed positive correlations with increasing age and with insulin resistance (Kirwan et al., 2001; Prasad et al., 2007). Severity of inflammation also affects plasma TNF- $\alpha$  level. In chronic systematic inflammatory disease such as rheumatoid arthritis and congestive heart failure, the levels of plasma TNF- $\alpha$  were much higher than those in healthy subjects (Yalcin et al., 2011; Satoh et al., 2004). It was found that plasma TNF- $\alpha$  levels in the patients with severe congestive heart failure were in the range of  $173.5 \pm 63.5$  pg/mL (Dutka et al., 1993), and plasma TNF- $\alpha$  levels in rheumatoid arthritis were in the range of 100-170 pg/mL (Sato et al., 2011).

Severity of inflammation is one of the factors influencing plasma TNF- $\alpha$  levels (Dutka et al., 1993; Satoh et al., 2004; Sato et al., 2011; Yalcin et al., 2011). In the present study, the patients had well-controlled levels of blood sugar and lipid profiles (except LDL-C levels). The patients also had no severe complications and had no acute or chronic inflammation during participating in the study. The patients in this study, therefore, were in healthy conditions. Although pathogenesis of type 2 DM is associated with inflammation, good glycemic control without complications can keep inflammation to be in subclinical stage. The levels of circulating TNF- $\alpha$  may not

be as high as those observed in other inflammatory diseases. However, inflammation is still a common feature found in type 2 diabetic patients with MS, and pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  is found to be related with initiation and progression of insulin resistance and CAD complications in patients with DM and MS (Pick up and Crook, 1998; Wassink et al., 2007). Strategy for inhibiting the production of TNF- $\alpha$  in circulation is essential for treatment and prevents complications in patients with DM and/or MS.

## **5.2 Correlation between the levels of plasma zinc, plasma TNF- $\alpha$ levels, and other parameters**

This study showed that plasma zinc was not correlated with metabolic abnormality in type 2 diabetic patients with MS. These findings were in compliance with the results from the studies of Akhuemokhan, Eregie, and Fasanmade (2010) and Taghdir et al. (2011) in which there were no significant correlations between serum zinc concentrations and the levels of TNF- $\alpha$ , FBS, and HbA1c in diabetic patients. Similarly, in the work of Negger (2001), there were no significant correlations between serum zinc concentrations and the levels of TC, HDL-C, LDL-C, and TG. On the other hand, several studies have suggested a negative correlation between serum zinc and the levels of TNF- $\alpha$ , FBS, HbA1c, TG, TC, and LDL-C, while positive correlation between zinc and HDL-C was found in diabetic patients (Al-Marroof and Al-Shabarti, 2006; Mariani et al., 2006; Al-Sabaawy, 2012).

Hyperglycemia and hyperlipidemia contribute to oxidative stress inducing zinc deficiency (Disilvestro, 2000; Eide, 2011). Normally, reduction of plasma zinc levels together with their relations with blood sugar and blood lipids were found in

DM patients and MS patients who had chronic hyperglycemia and hyperlipidemia (Al-Marroof and Al-Shabarti, 2006; Mariani et al., 2006; Al-Sabaawy, 2012). However, the levels of blood sugar and blood lipids in most of the patients in this study were in the recommended ranges. This might be the reason why correlations of plasma zinc and metabolic abnormalities were not noticed in the present study.

The present study suggested that plasma TNF- $\alpha$  level was not correlated with metabolic abnormality in type 2 diabetic patients with MS. The results were in agreement with those of the studies by Bluher, Kratzsoh, and Paschke (2001) and Morris, Noakes, and Clifton (2004). There were no correlations between the levels of plasma TNF- $\alpha$ , WC, BMI, weight, and the degree of insulin resistance in both insulin resistance subjects and obese patients with type 2 DM (Kratzsoh and Paschke, 2001; Morris et al., 2004). On the other hand, the results were different from several studies (Nillson et al., 1998; Tsigos et al., 1999; Mishima et al., 2001; Gwozdziwiczova et al., 2005; Swaroop, Rajarajeswari, and Naidu, 2012). Abdominal obesity is a major cause of insulin resistance and chronic inflammation, and TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine that induces insulin resistance (Hotamisgil et al., 1995). It was reported that the levels of plasma TNF- $\alpha$  were positively correlated with the degree of insulin resistance in obese subjects (Katsuki et al., 1998). The use of anti-TNF- $\alpha$  antibody has been successful in improving insulin resistance (Ofei et al., 1996).

Previous studies found that plasma TNF- $\alpha$  level was positively correlated with waist to hip ratio (parameter of abdominal obesity), BMI, FBS, HOMA-IR, insulin level, and TG level (Nillson et al., 1998; Tsigos et al., 1999; Mishima et al., 2001; Gwozdziwiczova et al., 2005; Swaroop et al., 2012), but negatively correlated with HDL-C in diabetic patients, MS patients and obese patients with DM (Tsigos et

al., 1999; Gwozdziwiczova et al., 2005). Furthermore, Bertin et al. (2000) discovered positive association between plasma TNF- $\alpha$  levels, and BMI. Katsuki et al. (1998) also found a significant positive association between serum TNF- $\alpha$  levels and the areas of visceral fat in obese type 2 DM patients. Generally, the relations between plasma TNF- $\alpha$  and blood sugar and lipids profiles were observed in obese patients, especially abdominal obesity together with poor glyceemic and lipid control (Hotamisgil, Shargil, and Haffner., 1995; Kern et al., 1995; Zinman et al., 1999; Gupta et al., 2012). In the present study, there were no correlations between TNF- $\alpha$  and abdominal obesity (WC and BMI), glyceemic control (FBS and HbA1c), and blood lipid profiles (TC, TG, LDL-C, and HDL-C) in type 2 diabetic with MS. This may be the results of the patients' characteristics. The information in the present study showed that the levels of blood sugar and lipid profiles in type 2 diabetic patients with MS were similar to those in healthy subjects. Hence, the correlations of plasma TNF- $\alpha$  level and the study parameters were not clearly found in this study.

### **5.3 Effects of zinc supplementation on plasma zinc levels**

Zinc is an essential micronutrient that provides several beneficial functions in the body. The important functions of zinc in diabetic patients and MS patients may be through its anti-oxidant and anti-inflammatory (Bulow et al., 2007; Bao et al., 2010). Plasma zinc levels in the patients with DM and MS can be decreased resulting from oxidative stress. Zinc is a structure component of an anti-oxidant enzyme superoxide dismutase, and zinc ion also has anti-oxidant effect (Ozata et al., 2002; Roussel et al., 2003; Prasad et al., 2004; Smolin and Grosvenor, 2008). During oxidative stress event, superoxide dismutase requires high levels of zinc to maintain

its activity in order to protect organisms, leading to reduced zinc levels (Ozata et al., 2002). Likewise, high urinary zinc excretion and zinc deficiency in diabetic patients have been observed (Al-Timimi and Mahmoud, 2001). Zinc deficiency involves in pathogenesis of DM (Salgueiro et al., 2001). Molecular mechanisms of zinc deficiency inducing insulin resistance were found to be through decreased insulin receptor synthesis, interference in insulin receptor binding and impaired insulin secretion in the pancreas (Salgueiro et al., 2001).

Progression of disease stage and several complications such as diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, diabetic neuropathy and coronary artery disease (CAD) involves oxidative stress and inflammation (Prasad et al., 2004; Jansen et al., 2009; Bao et al., 2010). Furthermore, immune dysfunction has been found in zinc deficiency and diabetic patients (Alexadraki et al., 2007). Zinc supplementation appeared to provide various beneficial effects in patients with DM and MS in many studies such as reduction of pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and reduction of blood sugars and blood lipid profiles (Oh and Yoon, 2008; Bao et al., 2010; Kelishadi et al., 2010). In this study, the plasma zinc levels of the patients were significantly increased after daily supplementation of 30 mg elemental zinc for 8 weeks. The increased zinc levels could indicate good compliance of the patients with zinc supplementation. An elevation of plasma zinc levels after zinc supplementation may improve various clinical outcomes, which are related with zinc functions and may also prevent several diabetic complications, such as infection, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy, CAD, and enhance immune functions in diabetic patients (Bao et al., 2008; Bulow et al., 2007; Jansen et al., 2009).

#### **5.4 Effects of zinc supplementation on sTNF- $\alpha$ and tmTNF- $\alpha$ in PBMC**

The present study evaluated the effects of zinc supplementation on sTNF- $\alpha$  (plasma TNF- $\alpha$ ) and tmTNF- $\alpha$  in PBMC in type 2 diabetic patients with MS. Although many studies suggested that zinc has anti-inflammatory and anti-oxidants effects (Bulow et al., 2007; Prasad et al., 2007; Bao et al., 2008), zinc supplementation at the dose of 30 mg/day for 8 weeks did not affect the levels of plasma TNF- $\alpha$  in the patients with type 2 DM with MS in this study. The results were consistent with those found by Mocchegiani et al. (2008), in which the plasma TNF- $\alpha$  levels of healthy adults aged 65-85 years did not change from the baseline levels after zinc aspartate supplementation (elemental zinc 10 mg daily) for 48 days. In contrast, the finding disagreed with previous randomized double blind placebo control trials conducted by Kara et al. (2011) and Yalcin et al. (2011). Serum TNF- $\alpha$  levels in children with cardiac diseases aged 9-18 years were decreased from the baseline when supplemented with zinc sulfate (30 mg zinc/day) for 28 days (Yalcin et al., 2011).

Based on previous studies, anti-inflammatory effect of zinc is dependent on zinc dosage. Zinc provides anti-inflammatory effect when elemental zinc was supplemented at the dose of  $\geq 30$  mg (Yalcin et al., 2011). Administration of zinc at the dose of 10 mg daily did not show anti-inflammatory effect (Foster and Samman, 2012). A significant reduction of plasma TNF- $\alpha$  may also depend on severity of inflammation in the patients. It was found that mean plasma TNF- $\alpha$  levels in patients with congestive heart failure were in the range of  $173.5 \pm 63.5$  pg/mL (Dutka et al., 1993), while the mean plasma TNF- $\alpha$  in type 2 diabetic patients with MS in the present study were in the range of  $1.40 \pm 0.13$  pg/mL. Zinc supplementation only

showed a significant anti-inflammatory effect in patients with cardiac disease who had high inflammation (Yalcin et al., 2011), but did not affect plasma TNF- $\alpha$  levels in healthy subjects (Mocchegiani et al., 2008). In subclinical inflammation as observed in the patients in the present study, no change in plasma TNF- $\alpha$  was found after 8-week zinc supplementation. However, there was a trend of decreased plasma TNF- $\alpha$  level at week 8 of zinc supplementation. Longer supplementation period may be required in order to clarify the effects of zinc on plasma TNF- $\alpha$  level.

Impaired immune function has been observed in PBMC of diabetic patients (Alexandraki et al., 2007). It was found that tmTNF- $\alpha$  production from PBMC in response to phorbol-myristate acetate in type 1 and type 2 diabetic patients were lower than in healthy control (Alexandraki et al., 2007). The production of tmTNF- $\alpha$  produced from monocytes/macrophage provides potent antibacterial and antitumor activities. When impairment of tmTNF- $\alpha$  was found, incidences of infections, cancer and delayed wound healing have shown to be increased in patients with DM and MS (Zykova et al., 2000; Komura et al., 2010). It was reported that zinc supplementation improves functions of various immune cells (Shanger and Prasad, 1998; Ibs and Rink, 2003; Smolin and Grosvenor, 2008). Strategy of zinc supplementation to enhance immune function through increased tmTNF- $\alpha$  levels in PBMC could be beneficial in the treatment of type 2 diabetic patients with MS.

Although zinc supplementation was found to improve immune functions in the previous study (Ibs and Rink, 2003), the results in the present study showed that tmTNF- $\alpha$  levels in PBMC of type 2 diabetic patients with MS did not differ from the baseline levels after zinc administration (30 mg daily) for 8 weeks. These results were

in disagreement with those of previous studies (Driessen et al., 1994; Wellinghausen et al., 1996; Prasad et al., 2004; Chang et al., 2006; Bulow et al., 2007; Prasad et al., 2007; Bao et al., 2008; Bao et al., 2010) that showed both stimulatory effects and inhibitory effects of zinc supplementation on TNF- $\alpha$  secretion in PBMC. The effects were dependent on zinc dosages. Zinc supplementation at the dose of  $\leq 20$  mg/day were associated with increase in *ex vivo* generated levels of TNF- $\alpha$  in stimulated mononuclear cells isolated from human subjects (Aldemir et al., 2006; Kahmann et al., 2008). It was reported that zinc supplementation can stimulate immune cells by increasing *ex vivo* generated levels of TNF- $\alpha$  in stimulated mononuclear cells isolated from human subjects (Aldemir et al., 2006; Kahmann et al., 2008). Aldemir et al. (2006) demonstrated that *ex vivo* TNF- $\alpha$  generation in mononuclear cells after LPS stimulation in healthy men aged 19-31 years old was increased from the baseline levels after zinc supplementation (15 mg/day) for 10 days. Kahmann et al. (2008) indicated that *ex vivo* TNF- $\alpha$  generation in mononuclear cells of healthy individuals after streptococcal pyrogenic exotoxin A (SPEA) stimulation was increased from the baseline levels after zinc supplementation (10 mg daily) for 48 days. The results from zinc-supplemented subjects have advocated the hypothesis of the immune-stimulatory role for zinc.

Capability of immune response might be related with zinc status in individuals. Zinc deficiency can cause impaired functions of monocytes and neutrophils as well as impairment of phagocytosis processes (Ibs and Rink, 2003; Haase and Rink, 2009). Thus, zinc supplementation may show significantly beneficial effects on immune cells when zinc deficiency is presented. It appears that zinc shows an effect on specific immune cells, particularly on monocytes which is a major cell



for tmTNF- $\alpha$  production. Data have shown that zinc is essential for LPS-mediated signal transduction in monocytes (Haase et al., 2008). Interestingly, our early study (unpublished data) suggested that zinc supplementation (30 mg daily) for 8 weeks increased tmTNF- $\alpha$  levels in monocytes, but not in lymphocytes. Therefore, when the study on the role of zinc in tmTNF- $\alpha$  production was conducted in PBMC which consist of various immune cells, the improved tmTNF- $\alpha$  production could not be seen. The clear effects possibly can be observed only when specific immune cells were isolated.

### **5.5 Effect of zinc supplementation on blood sugar**

The present study evaluated the effects of zinc supplementation on FBS and HbA1c in type 2 diabetic patients with MS. The result showed that the levels of FBS were significantly decreased from the baseline after 8-week zinc supplementation. However, the levels of HbA1c were not significantly reduced from the baseline after 8-week zinc supplementation. Reduction of FBS levels after zinc supplementation in this study is consistent with many studies (Al-Marouf et al., 2006; Afkhami-ardekani et al., 2008; Oh and Yoon, 2008; Parham et al., 2008; Hashemipour et al., 2009; Kelishadi et al., 2010). Several molecular mechanisms of zinc have been suggested to improve insulin sensitivity and thus reduce blood glucose. Zinc is useful in the synthesis, storage, and secretion of insulin and it is also related with insulin signaling (Jansen et al, 2009). It appears that zinc improves insulin signaling by stimulating autophosphorylation of the  $\beta$  subunit of insulin receptor and subsequently stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (Jansen et al., 2009). Phosphatidyl inositol-3 kinase is then activated and subsequently

induces the translocation of GLUT-4 to the plasma membrane, leading to an increased uptake of glucose into tissue cells including liver, muscle and adipocytes (Jansen et al., 2009). Furthermore, oxidative stress is considered as one of the factors contributing to the initiation and progression of insulin resistance. Zinc is a component of antioxidant enzyme superoxide dismutase and is required for optimum superoxide dismutase activity (Jansen et al., 2009). Hence, an antioxidant effect of zinc is one of the molecular mechanisms of zinc in improving insulin resistance.

In the present study, the levels of HbA1c were not significantly reduced from the baseline after 8-week zinc supplementation. The result of zinc supplementation on HbA1c levels agreed with Roussel et al. (2003) in which zinc gluconate (zinc 30 mg/day) supplementation for 4 weeks could not affect HbA1c in Tunisian type 2 diabetic patients. Conversely, previous studies have shown beneficial effect of zinc on HbA1c in patients with DM. Al-Marroof and Al-sharbetti (2006) indicated that the level of HbA1c was reduced after zinc sulfate (zinc 30 mg/day) supplementation in diabetic patients for 3 months. Additionally, the levels of HbA1c in type 2 diabetic patients were reduced after supplementation with 150 mg/d of zinc for 3 months (Afkhami-Ardekani et al., 2008). Based on these previous studies, the reduction of HbA1c levels were found when zinc was supplemented for  $\geq 12$  weeks (3 months). The 8-weeks supplementation in the present study may not be enough time to observe the change in HbA1c.

More than 75 % of all hospitalizations for diabetic complications and about 65 % of causes of death in patients with DM are related with CAD (Aronson and Rayfield, 2002; American Heart Association, 2007). Moreover, the prevalence of

CAD has been highest in type 2 diabetic patients with MS (Alexander et al., 2003). Hyperglycemia in patients with DM promotes atherosclerosis by several molecular mechanisms such as oxidative stress, inflammation and protein kinase C activation (Wassink et al., 2007). Thus, controlling blood sugar within the recommendation ranges can decrease hospitalization and mortality from CAD complication in diabetic patients and/or MS patients. It was suggested that zinc is an anti-atherosclerotic agent, and the inhibition of TNF- $\alpha$  mRNA and NF- $\kappa$ B expression are proposed as molecular mechanisms of zinc (Bulow et al., 2007; Bao et al., 2010). Beneficial effect of zinc on FBS levels in the present study suggested that zinc may be used as a supplement to control blood sugar and consequently prevent diabetic complications in patients with DM who also had MS.

### **5.6 Effect of zinc supplementation on lipid profiles**

No significant change in the levels of lipid profiles after 8-week zinc supplementation in the present study. These findings were consistent with those of Parham et al. (2008). Parham et al. (2008) stated that the levels of TG, TC, HDL-C and LDL-C of type 2 diabetic patients did not change from the baseline levels after zinc sulfate supplementation for 12-weeks (30 mg zinc/day). In contrast, several studies found improved serum lipid levels after zinc supplementation in diabetic patients and in MS patients (Partida-Hernandez et al., 2006; Afkhami-ardekani et al., 2008; Hashemipour et al., 2009; Kelishadi et al., 2010; Jayawardena et al., 2012). In type 2 diabetic patients, Partida-Hernandez et al. (2006) demonstrated that 12-week zinc sulfate supplementation (22.76 mg zinc/day) could reduce the levels of TG, TC and increase the levels of HDL-C. With increasing the dose of zinc sulfate (150 mg

zinc/day), Afkhami-ardekani et al. (2008) also found reduced levels of TG, TC and LDL-C in type 2 diabetic patients after 12-weeks of supplementation. In MS children, Hashemipour et al. (2009) and Kelishadi et al. (2010) showed that the levels of TG, TC and LDL-C were reduced after 8-week zinc sulfate supplementation (20 mg zinc/day).

Base on the previous studies, it seemed that zinc supplemented  $\geq 30$  mg/d (around two fold the RDA for adults) and the duration of zinc supplementation  $\geq 12$  weeks (3 months) enhances serum lipid profiles in diabetic patients. For children with MS, it was found that a dose of 20 mg zinc/day (around two fold the RDA for children) could improve lipid profiles. Although there were no significant changes in the levels of lipid profiles of type 2 diabetic patients with MS in the present study, there were trends of decreases in TC and LDL-C levels after 30 mg/d of zinc supplementation for 8 weeks. Hyperlipidemia contributes to lipid peroxidation, and subsequently increased in free fatty acid in circulation. Thus, the inhibition of lipid peroxidation by antioxidant effect of zinc is proposed as a possible mechanism in lowering plasma lipid concentrations in diabetic patients (Faure et al., 1995, Faure et al., 1993; Bao et al., 2010).

Although zinc supplemented 150 mg zinc/day for 3 months could improve serum lipid profiles (Afkhami-ardekani et al., 2008), high dose of elemental zinc  $\geq 150$  mg/day is not recommended because zinc supplementation at the dose higher than 150 mg/day contributes to immune dysfunction (Chandra, 1984). Furthermore, zinc supplementation at the dose of higher than 50 mg/day for 1 year was found to contribute to copper deficiency (Sandstead et al., 1995). For long-term zinc

supplementation ( $\geq 1$  years), copper supplementation 1-2 mg daily may be considered (Hashemipour et al., 2009). Hence, zinc supplementation should be carefully considered about an appropriate dosage to maximize the benefits and minimize the risks that may occur.

### **5.7 Effects of zinc supplementation on anthropometric parameters**

Benefits of zinc supplementation on anthropometric parameters were not observed in this study. These results were in agreement with those of other double blind randomized placebo-controlled trials conducted by Marreiro et al. (2006), Afkhani-Ardekani et al. (2008) and Hashemipour et al. (2009). Kim and Lee (2012) and Marreiro et al. (2006) indicated that the supplementation of zinc aminochelate at the dose of 30 mg elemental zinc daily for 4-weeks did not affect BMI and WC in obese women. Afkhani-Ardekani et al. (2008) also demonstrated no effect of 6-week zinc sulfate supplementation (150 mg zinc/day) on BMI in type 2 diabetic patients. In addition, it was found that zinc sulfate supplementation (elemental zinc 20 mg/day) for 8 weeks did not affect WC and BMI in obese Iranian children with MS (Hashemipour et al., 2009). In obese Korean women, zinc gluconate supplementation (30 mg zinc/day) for 8-weeks shows no effects on WC and BMI (Kim and Lee, 2012).

Despite of no effect of zinc supplementation on anthropometry in the present study, Kelishadi et al. (2010) found that zinc sulfate supplementation with elemental zinc 20 mg daily for 8-weeks decreased weight and BMI without causing change in WC in obese Iranian children with MS (Kelishadi et al., 2010). A similar result was found with increased amount of supplemented zinc with shorter duration.

Payahoo et al. (2013) found that 30 mg/day of zinc administration for 4-weeks can reduce weight and BMI in either obese male and obese female adults.

Several factors promote obesity such as type of disease (hypothyroidism), genetic and lifestyle (Dandona and Aljada, 2004; Wassink et al., 2007). Patterns of food intakes and exercise are also important factors which influence anthropometric parameters. In the present study, the energy distribution of carbohydrate, fat and protein were complied with recommendation of American Diabetes Association (Franz, 2008). At week 8, the pattern and amount of dietary intakes did not differ from the baseline. In addition, the patients still maintained their activity at the same levels throughout the study. Dietary intake and activity factors may be one of the reasons of unchanged anthropometric parameters in this study. Currently, knowledge about effects of zinc supplementation on anthropometric parameters is still limited and the effects seem to be inconsistent in type 2 diabetic patients and in MS patients.

### **5.8 Adverse effects of zinc sulfate supplementation**

The minor adverse effect of zinc sulfate was found in the present study. It was found that one patient had flatulence and abdominal pain, and this patient finally withdrew from the study. This observation is consistent with Afkhami-Ardekani et al. (2008). They reported two cases of mild abdominal pain in type 2 diabetic patients who obtained 150 mg zinc/day of zinc sulfate for 3 months.

## **CHAPTER VI**

### **CONCLUSION**

The present study was conducted to assess the effects of zinc supplementation on the levels of plasma zinc, TNF- $\alpha$  in plasma and PBMC, glycemic control and lipid profiles in type 2 diabetic patients with MS according to the IDF criteria. The levels of plasma zinc were significantly increased after 8-week zinc supplementation. In the patients supplemented with zinc, FBS levels were significantly decreased from baseline, but the levels were still not different from those in the control group at week 8. Zinc supplementation did not influence the levels of plasma TNF- $\alpha$ , tmTNF- $\alpha$ , HbA1c, lipid profiles, anthropometric parameters and dietary intake in this study. There were no severe adverse effects of zinc supplementation. Only flatulence and abdominal pain were found in one patient.

The information obtained in the present study suggested the beneficial effects of zinc sulfate supplementation in increasing plasma zinc levels and reducing FBS levels in type 2 diabetic patients with MS.

**Recommendations for further research**

Further studies may consider increased sample size and duration for supplementation to confirm the effects of zinc supplementation on clinical outcomes of type 2 DM patients with MS. For immune-related functions of zinc, PBMC isolated from the patients may be stimulated with mitogens in order to evaluate immune response at baseline and after zinc supplementation. Healthy individuals may be included in the study as controls to compare the results with those found in the patients.



## REFERENCES

- Afkhami Ardekani M, Karimi M, Mohammadi M, Nourani F. 2008. Effect of Zinc Sulfate Supplementation on Lipid and Glucose in Type 2 Diabetic Patients. Pakistan Journal of Nutrition 7(4): 550-553.
- Aguilar, M.V., Saavedra, P., Arrieta, F.J., Mateos, C.J., Gonzalez, M.J., Meseguer, I. et al. 2007. Plasma Mineral Content in Type-2 Diabetic Patients and Their Association with the Metabolic Syndrome. Annals of Nutrition and Metabolism 51(5): 402-406.
- Akhuemokhan, KI., Eregie, A., Fasanmade, OA. 2010. Trace mineral status and glycaemic control in Nigerians with type 2 DM. African Journal of Diabetes medicines :1-3.
- Al-dhar, MHS., and Jiffri, EH. 2010. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in obese subjects with type II diabetes. World Journal of Medical Sciences 5(2): 30-35.
- Alexander, CM., Landsman, PB., Teutsch, SM., Haffner, SM. 2003. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. Diabetes 52: 1210-1214.
- Alexandraki, KI., Piperi, C., Ziakas, PD., Apostolopoulos, NV., Makrilakis, K., Syriou, V., et al. 2008. Cytokine secretion in long-standing diabetes

mellitus type 1 and 2: associations with low-grade systemic inflammation. Journal of Clinical Immunology 28(4): 314-321.

Al-Sabaawy, O.M. 2012. The relationship between serum lipid profile and selected trace elements for adult men in mosul city. Oman Medical Journal 27 (4): 300-303.

Al-Marroof, RA., Al-Sharbatti, S. 2006. Serum zinc levels in diabetic patients and effect of zinc supplementation on glycemc control of type 2 diabetics. Saudi Medical Journal 27 344-350.

Al-Timimi, DJ and Mahmoud, HM. 2011. Evaluation of zinc status among patients with diabetes mellitus. Hospital 26: 1-7.

Al-Timimi, DJ., and Al-Rubaii, AY. 2011. Current status of zinc in healthy and sick elderly. Journal of the Medicine England 43:73-76.

Ardekani, M.A., Karimi, M., Mohammadi, S.M., Nourani, F. Effect of zinc sulfate supplementation on lipid and glucose in type 2 diabetic patients. Parkistan Journal of Nutrition 7: 550-553.

Aronson, D., and Rayfield. 2002. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. Cardiovascular Diabetology 1(1): 1-10.

American Diabetes association. 2013. Standards of Medical Care in Diabetesd 2013. Diabetes Care 36(1): S11-S50.

Ando, K., and Fujita, T. 2009. Metabolic syndrome and oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine 47: 213-218.

- Aydemir, T.B., Blanchard R.K., and Cousins R.J. 2006. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (6): 1699–1704.
- Bao, B., Prasad, A.S., Beck, FWJ., Snell, D., Suneja, A., Sarkar, FH., et al. 2008. Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease. Translational Research 152:67–80.
- Bao, B., Prasad, A.S., Beck, F., Fitzgerald, J.T., Snell, D., Bao, G.W. 2010. Zinc decrease C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammation cytokines in elderly subjects: a potential implication of zinc as an atheroprotective agent. The American Journal of Clinical Nutrition 91: 1634-1641.
- Beck, FW., Prasad,AS., Kaplan, J., Fitzgerald, JT and Brewer, G.J. 1988. Zinc, Insulin and Diabetes. Journal of the American College of Nutrition, 17: 109-115.
- Bertin, E., Nguyen, P., Guenounocu, M., Durlach, V., Potron, G., Leutenegger, M. 2000. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) are essentially dependent on visceral fat amount in type 2 diabetic patients. Diabetes & Metabolism 26: 178–182.
- Bluher, M., Kratzsch, J., Paschke, R. 2001. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha, angiotensin II, Growth hormone, and IGF- 1 are not elevated in

- insulin-resistant obese individuals with impaired glucose tolerance. Diabetes Care 24: 328–334.
- Borst, S.E. 2004. The role of TNF- $\alpha$  in insulin resistance. Endocrine 23: 177-180.
- Bulow, V., Dubben, S, Engelhardt, G., Hebel, S., Plumakers, B., Heine, H. 2007. Zinc-dependent suppression of TNF- $\alpha$  production is mediated by protein kinase a induced inhibition of Raf-1, I $\kappa$ B kinase, and NF- $\kappa$ B. The Journal of Immunology 179: 4180-4186.
- Bulow, V., Rink, L., Haase, H. 2005. Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF- $\alpha$  and IL-1 beta production in monocytes by elevation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. The Journal of Immunology 175 (7): 4697-4705.
- Bulow, V., Dubben, S., Engelhardt, G., Hebel, S., Plumakers, B., Heine, H. 2007. Zinc-dependent suppression of TNF- $\alpha$  production is mediated by protein kinase a-induced inhibition of Raf-1, I $\kappa$ B kinase  $\beta$ , and NF- $\kappa$ B. The Journal of Immunology 179: 4180-4186.
- Cawthorn, WP., and Sethi, JK. 2007. TNF- $\alpha$  and adipocyte biology. FEBS Letters 582: 117-131.
- Ceriello, A., and Motz, E. 2011. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 24: 816-823.
- Chandra RK. 1984. Excessive zinc intake of zinc impaired immune responses. Journal of the American Medical Association 252: 1443-1446.

- Chang, K.L., Hung, T.C., Hsieh, B.S., Chen, Y.H., Chen, T.F., Cheng, H.L. 2006. Zinc at pharmacologic concentrations affects cytokine expression and induces apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells. Nutrition 22: 465–474.
- Chang, FE., and Shaio, MF. 1995. Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice 28: 137-146.
- Crook, M. 2004. Type 2 diabetes mellitus: a disease of the innate immune system? An update. Diabetic Medicine 21: 203-207.
- Dandona, P., Aljada, A., and Bandyopadhyay. 2004. Inflammation: the link between insulin resistance obesity and diabetes. TRENDS in Immunology 25(1): 4-7.
- Dandona, P., Weinstock, R Thusu, K., Abdelrahman, E.A., Ijada, A., Wadden, T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients fall with weight loss. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 83 (8): 2907-2910.
- Disilvestro, RA. 2000. Zinc in relation to diabetes and oxidative stress. Human Nutrition & Food Management 130: 1509S-1511S.
- Diwan, AG., Pradhan, AB., Lingojar. 2008. Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. Biological Trace Element Research 122: 1-18.
- Dourado Ferro, FE., de Sousa Lima, VB., Mello Soares, NR., Franciscato Cozzolino, SM., Nascimento Marreiro, D. 2011. Biomarkers of metabolic syndrome and its relationship with the zinc nutritional status in obese women. Nutrición Hospitalaria 26(3): 650-654.

- Draznin, B. 2006. Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85 $\alpha$ . Diabetes 55: 2392-2395.
- Driessen, C., Hirv, K., Rink, L., Kirchner, H. 1994. Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. Lymphokine & Cytokine Research 13: 15–20.
- Dutka, DP., Elborn J.S., Delamere F, Shale DJ., Morris, G.K. 1993. Tumour necrosis factor alpha in severe congestive cardiac failure. British Heart Journal 70(2): 141–143.
- Eide., DJ. The oxidative stress of zinc deficiency. 2011. Metallomics 3: 1124-1129.
- Esposito, K., and Giuglisno, D. 2004. The metabolic syndrome and inflammation association or causation. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 24: 228-232.
- Esposito, K., Nappo, F., Marfella, R., Guigliano, G., Giugliano, F., Ciotola, M., and et al. 2010. Inflammatory cytokine concentration are acutely increased by hyperglycemia in Humans: Role of oxidative stress. Circulation 106: 2067-2072.
- Ettinger, W.H., Miller, L.D., Albers, J.J., Smiths, T.K., Parks, J.S. 1990. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor cause a fall in plasma concentration of lecithin: cholesterol acyltransferase in cynomolgus monkeys. Journal of Lipid Research 31: 1099-1107.

- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. Diabetes 52: 1-6.
- Farah, R., Shurtz-Swirski, R., and Lapin, O. 2008. Intensification of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes despite antihyperglycemic treatment. Cardiovascular Diabetology 7(20): 1-8.
- Faure, P., Benharmou P.Y., Perad, S., Halimi and Roussel, A.M. 1995. Lipid peroxidation in insulin dependent diabetic patients with early retina degenerative lesion: Effect of an oral zinc. European Journal of Clinical Nutrition 49 : 282-288.
- Faure, P., Corticelli, P., Richard, J., Arnaud, C and Coudray, A.M. 1993. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: Influence of insulin therapy. Clinical Chemistry 39: 789-793.
- Franz, M.F. 2008. Medical nutrition therapy for diabetes mellitus and hypoglycemia of nondiabetic origin. Krause's Food & Nutrition therapy edition 12: 773-786.
- Friedewald, W.T., Robert, I L and Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. Clinical Chemistry 18:499-502.
- Ford, E.S. 2005. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome. Diabetes Care 28: 1769-1776.

- Foster, M., and Samman, S. 2012. Zinc and Regulation of Inflammatory Cytokines: Implications for Cardiometabolic. Disease Nutrients 4(7): 676–694.
- Foster, M., Petocz, P., and Samman, S. Effects of zinc on plasma lipoprotein cholesterol concentrations in humans: A meta-analysis of randomised controlled trials. 2010. Atherosclerosis 210: 344–352.
- Frayn, K.N. 2000. Visceral fat and insulin resistance-causative or correlative?. The British Journal of Nutrition 83: S71-77.
- Gatto and Samman. 1995. Effect of zinc supplementation on plasma lipid and low density lipoprotein oxidation in males. Free radical biology & medicine, 19: 517-521.
- Garden, B.2007. Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiovascular Disease. Diabetes Care 30: 2164-2170.
- Giuseppe, G., Biondi-Zoccai, L., Abbate, A., Liuzzo, G., Biasucci, LM. 2003. Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. Journal of the American college of Cardiology 41(7): 1071-1076.
- Goodwin, JS., Hunt, WC., Hooper, P., Philip J. Garry, PJ. 1985. Relationship between zinc intake, physical activity, and blood levels of high-density lipoprotein cholesterol in a healthy elderly population. Metabolism 34: 519–523.
- Grundy, S.M. 2006. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. Journal of the American College of Cardiology 47(6): 1093-1098.



- Guha, M., Bai, W., Jerry, L., Natarajant, R. 2000. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and independent pathways. The Journal of Biology Chemistry 23: 17737-17739.
- Gunasekara, P., Hettiarachchi, M., Liyanage, C., Lekamwasam, S. 2011. Effects of zinc and multimineral vitamin supplementation on glycemic and lipid control in adult diabetes. *Diabetes, Metabolic syndrome and obesity: Target and Therapy* 4: 53-60.
- Gupta, V., Gupta, A., Jafar, T., Gupta, V., Agrawal, S., Srivastava, N. 2012. Association of TNF- $\alpha$  promotor gene G 308A polymorphism with metabolic syndrome, insulin resistance, serum TNF- $\alpha$  and leptin levels in Indian adult women. Cytokine 57: 32-36.
- Gwozdziwiczova, S., Lichnovska, R., Yahia, R., Chlup, R., Hrebicek, J. 2005. TNF- $\alpha$  in the development of insulin resistance and other disorders in metabolic syndrome. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic 149: 109–117.
- Haase, H., Ober-Blobaum, JL., Engelhardt, G., Hebel, S., Heit, A., Heine, H., et al. 2008. Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. The Journal of Immunology 181: 6491-6502.
- Haase, H., and Rink, L. 2009. The immune system and the impact of zinc during aging. Immunity & Ageing 6(9): 1-17.
- Haffner S.M., 2006. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. The American Journal of Cardiology 97: 3A-11A.

- Hamann, A., Benecke, H., Marchand, Y., Susulic, V.S., Lowell, B.B. Flier, J.S. 1995. Characterization of insulin resistance and NIDDM in transgenic mice with reduced brown fat. Diabetes 44: 1266-1273.
- Hansson GK. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. The New England Journal of Medicine 352: 1685-1695.
- Hashemipour, M., Kelishadi, R., Shapouri, J., Sarrafzadegan, N., Amini, M., Tavakoli, N., et al. 2009. Effect of zinc supplementation on insulin resistance and components of the metabolic syndrome in prepubertal obese children. Hormones 8(4): 279-285.
- Heart disease and stroke statistics. 2007. Update Dallas, TX: American Heart Association.
- Hebel, S., Heit, A., Heine, H., Rink, L., Haase, H., Julia, L., et al. 2008. Zinc Signals Are Essential for LPS-induced signaling monocytes. The Journal of Immunology 181: 6491-6502.
- Hivert, M.F. Sullivan, L.M. Fox, C.S., Nathan, D.M., Agostino, R.B., Peter, W.F., et al. 2008. Association of adiponectin, resistin and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 93: 3165-3172.
- Hoareau, L., Bencharif, K., Rondeau, P., Murumalla, R., Ravanan, P., Tallet, F., et al. 2010. Signaling pathways involved in LPS induced TNF- $\alpha$  production in human adipocytes. Journal of Inflammation 7: 1-12.

- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H, Shimoda, T. 2010. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure function and interaction with anti-TNF agents. Rheumatology 1: 1-10.
- Hotamisgil, GS., Murray, DL., Choy, LN., Spiegelman, BM. 1994. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 91: 4854-4858.
- Hotamisligil, GS, Shargill, NS, Spiegelman, BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259: 87-91.
- Hotamisgil, GS., Arner, P., Cara, J., Atkinson, RL., Spiegeiman, BM. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. Journal of Clinical Investigation 95: 2409-2415.
- Horsssen, RV., Timo, L. M., Hagen, T., Alexander, M., Eggermont, M. 2006. The TNF- $\alpha$  in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. Oncologist 11: 397-408.
- Hotamisligil, GS., Shargil, NS., Haffner, S.M. 2006. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. The American Journal of Cardiology 97: 3A-11A.
- Hotamisligil, G.S. 1999. The role of TNF-alpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. Journal of International Medicine 245: 621-624.
- Hughes, S., and Samman, S. 2006. The effect of zinc supplementation in humans on plasma lipids, antioxidant status, and thrombogenesis. Journal of the American College of Nutrition 25: 285-291.

- Hussain, SA., Khadim, HM., Khalaf, BH., Ismail, SH., Hussein, KI., Sahib, AS. 2006. Effects of melatonin and zinc on glycemic control in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. Saudi Med J 27(10):1483-1488.
- International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the syndrome [Online]. Accessed 17 March 2013. Available from [http://www.idf.org/webdata/docs/IDF\\_Meta\\_def\\_final.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf).
- Ibs, KL., and Rink, L. 2003. Zinc-altered immune function. Journal of Nutrition 133: 1452S-1456S.
- Jansen, J., Karges, W., Rink, L. 2009. Zinc and diabetes-clinical links and molecular mechanisms. Journal of Nutrition Biochemistry 20: 399-417.
- Jayawardena, R., Ranasinghe, P., Malkanthi, GR., Katulanda, P. 2012. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Diabetology & Metabolic Syndrome 4:13-15.
- John, C., Pickup., Dphil., Frcpath. 2004. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. Diabetes Care 27: 813-818.
- Kadhim, HM., Ismail, SH., Hussein, KI., Bakir, IH., Sahib, AS., Khalaf, BH., et al. 2006. Effects of melatonin and zinc on lipid profile and renal function in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. Journal of Pineal Research 41(2):189-193.

- Kahmann, L.; Uciechowski, P.; Warmuth, S.; Plumakers, B.; Gressner, A.M.; Malavolta, M., et al. 2008. Zinc supplementation in the elderly reduces spontaneous inflammatory cytokine release and restores T cell functions. Rejuvenation Research 11: 227–237.
- Kara, E., Ozal, M., Gunay, M., Kilic, M., Baltaci, A.K., Mogulkoc, R. 2011. Effects of exercise and zinc supplementation on cytokine release in young wrestlers. Biological Trace Element Research 143: 1435–1440.
- Katsuki, A., Sumida, Y., Murashima, S., Murata, K., Takarada, Y., Ito, K., et al. 1998. Serum levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 83: 859–862.
- Kazi, TG., Afridi, HI., Kazi, N., Jamali, MK., Arain, MB., Jalbani, N. et al. 2009. Serum zinc and magnesium in type-2 diabetic patients. Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan 19: 483-488.
- Kelishadi, R., Hashemipour, M., Adeli, K., Tavakoli, N., Movahedian-attar, A., Shapouri, J. 2010. Effect of zinc supplementation on markers of insulin resistance, oxidative stress, and inflammation among prepubescent children with metabolic syndrome. Metabolic Syndrome and Related Disorders 8: 1-6.
- Kern, P.A., Saghizadeh, M., Ong, J.M., Bosch, R.J., Deem, R., Simsolo, R.B. 1995. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. The Journal of Clinical Investigation 95(5): 2111-2119.

- Kim, J., and Lee, S. 2012. Effect of zinc supplementation on insulin resistance and metabolic risk factors in obese Korean women. Nutrition Research and Practice 6(3): 221–225.
- Kirwan, JP., Krishnan, RK., Weaver, JA., Aguila, LD., Evans, W. 2001. Human aging is associated with altered TNF- $\alpha$  production during heperglycemia and hyperinsulinemia. Endocrinology and Metabolism: American Journal of Physiology 281: E1137-E1143.
- Koehler, C., Ott, P., Benke, I., Hanefeld, M. 2007. Comparison of the prevalence of the metabolic syndrome by WHO, AHA/NHLBI, and IDF definitions in a German population with type 2 diabetes: the diabetes in Germany (DIG) study. Hormone and Metabolic Research 39: 632-635.
- Komura, T., Sakai, Y., Honda, M., Takamura, T., Matsushima, K., Kaneko, S. 2010. CD14+ Monocytes Are Vulnerable and Functionally Impaired Under Endoplasmic Reticulum Stress in Patients With Type 2 Diabetes. Diabetes 59(3): 634–643.
- Koo, SI and William, DA. 1981. Relationship between the nutritional status of zinc and cholesterol concentration of serum lipoproteins in adult male rats”. American Journal of Clinical Nutrition 34: 2376-2381.
- Laaksonen, D.E., Lakka, HM., Niskanen, LK., Kaplan, GA., Salinen, JT., Lakka, TA. 2002. American Journal of Epidemiology 156: 1070-1077.
- Mackman, N., Brand, K., Edgington, T.S. 1991. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1

monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. The Journal of Experimental Medicine 174: 1517-1526.

Mantzoros, CS., Prasad, AS., Beck, FW., Grabowski, S., Kaplan, J., Adair, C., et al. 1998. Zinc may regulate serum leptin concentrations in humans. Journal of the American College of Nutrition 17(3): 270-275.

Maret, W., and Sandstead, H.H. 2006. Zinc requirement and the risks and benefits of zinc supplementation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 20: 3-18.

Marreiro, DN., Fisberg, M., Cozzolino, SMF. 2004. Zinc nutritional status and its relationships with hyperinulinemia in obese children and adolescents. Biological Trace Element Research 99: 137-150.

Mariani, E., Cattini, L., Neri, S., Malavolta, M., Mocchegiani, E., Ravaglia, G., et al. 2006. Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. Biogerontology 7(5-6): 449-459.

Mishima, Y., Kuyama, A., Tada, A., Takahashi, K., Ishioka, T., Kibata, M. 2001. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in obese men with type 2 diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice 52: 119-123.

Mocchegiani, E., Giacconi, R., Costarelli, L., Muti, E., Cipriano, C., Tesei, S., Pierpaoli, S., et al. 2008. Zinc deficiency and IL-6-174G/C polymorphism in old people from different European countries: Effect of

- zinc supplementation. ZINCAGE study. Experimental Gerontology 43: 433-444.
- Moller, D.E. 2000. Potential role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Trends in Endocrinology and Metabolism 11: 212-216.
- Morris, AM., Noakes, M., Clifton, PM. 2004. In vitro mononuclear cell production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and weight loss. Diabetes Research and Clinical Practice 63: 179-184.
- Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Shibutani, Y., Aoki, E., Tsutsumi, Z., Takahashi., S et al. 2003. Elevated levels of IL-18 and TNF- $\alpha$  in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with Diabetic Nephropathy. Metabolism 52: 605-608.
- Neggers, YH., Bindon, JR., William, W. 2001. The relationship between zinc and copper status and lipid levels in African-Americans status and lipid levels in African-Americans. Biological Trace Element Research 79: 1-13.
- Nilsson, J., Jovinge, S., Niemann, A., Reneland, R., Lithell, H.1998. Relation between plasma tumor necrosis factor-alpha and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 18(8): 1199-1202.
- Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., Taylor, R. 1996. Effects of engineered human anti-TNF- $\alpha$  antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. Diabetes 45: 881-885.



- Oh, H.M., Yoon, J.S. 2008. Glycemic control of type 2 diabetic patients after short-term zinc supplementation. Nutrition Research and Practice 2: 283-288.
- Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, et al. 2002. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. Clinical Biochemistry 35: 627-31.
- Partida-Hernandez, G., Arreola, F., Fenton, B., Cabeza, M., Roman-Ramos, R., Revilla-Monsalve, M.C. 2006. Effect of zinc replacement on lipids and lipoproteins in type 2-diabetic patients. Biomedicine & Pharmacotherapy 60: 161-168.
- [http://www.moph.go.th/ops/thp/images/stories/Report\\_pics/Thai\\_Report/HighLight/Y54/April/Issue\\_25.pdf](http://www.moph.go.th/ops/thp/images/stories/Report_pics/Thai_Report/HighLight/Y54/April/Issue_25.pdf) สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. Available online: 19 March 2013.
- Parham, M., Amini, M., Aminorroaya, A., Heidarian, E. 2008. Effect of zinc supplementation on microalbuminuria in patients with type 2 diabetes: A double blind, randomized, placebo-controlled, cross-over trial. Review of Diabetic Studies 5:102-109.
- Payahoo, L., Ostadrahimi1., Mobasser, M., Bishak, Y.K., Farrin, N., Mohammad., et al. 2013. Effects of Zinc Supplementation on the Anthropometric Measurements, Lipid Profiles and Fasting Blood Glucose in the Healthy Obese Adults. Advanced Pharmaceutical Bulletin 3(1): 161-165.

- Peraldi, P., Hotamisligil, G.S., Buurman, W.A., White, M.F., Spiegelman, B.M. 1996. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. The Journal of Biological Chemistry 271: 13018–13022.
- Pickup, J.C., Crook, M.A. 1998. Is Type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?. Diabetologia 41: 1241-1248.
- Popa, C., Netea, MG., Riel, P., Meer, J., Stalenhoef. 2007. The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. Journal of Lipid Research 48: 751-759.
- Prasad, AS. 1991. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. American Journal Clinical Nutrition 53: 403-412.
- Prasad, AS., Meftah, S., Abdallah, J., Kaplan, J., Brewer, GJ., Bach, JF and Dardenne, M. 1988. Serum thymulin in human zinc deficiency. The Journal of Clinical Investigation 82: 1202–1210.
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH. 2004. Antioxidant effect of zinc in humans. Free Radical Biology and Medicine 37:1182-90.
- Prasad, AS., Frances, WJ., Beck., WJ., Bao, B., Fitzgerald, J.T., Snell, DC., et al. 2007. Zinc supplementation decrease incidence of infections in the elderly effect of zinc on generation of cytokine and oxidative stress. American Journal of Clinical Nutrition 85: 837-844.

- Pradhan, A. 2007. Obesity, Metabolic syndrome, and type 2 diabetes inflammatory basis of glucose metabolic disorders. Nutrition Reviews 65(12): S152-S156.
- Rajarajeswari, D., Ramalingam, K., Krishnamma, A., Sharmila, T., Krishna. 2011. Association of TNF- $\alpha$  with obesity in type 2 diabetes mellitus. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2: 352-335.
- Rasheed, K., Tariq, MI., Munir, C., Hussain, I., Siddiqui, HL. 2008. Synthesis, characterization and hypoglycemic activity of Zn (II), Cd (II) and Hg (II) complexes with glibenclamide. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 56(2):168-172.
- Roussel, AM., Kerkeni, A., Zouari, N., Mahjoub, S., Matheau, JM., Anderson, RA. 2003. Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. Journal of the American College of Nutrition 22(4): 316-321.
- Saghizadeh, M., Ong, J.M., Garvey, W.T., Henry, R.R., Kern, P.A. 1996. The expression of TNF- $\alpha$  by human muscle: relationship to insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation 97: 1111-1116.
- Salgueiro, MJ., Krebs, N., Zubillaga MB., Weill, R., Postaire, E., Lysionek, E. 2001. Zinc and diabetes. Is there a need a of zinc supplementation in diabetes mellitus patients ?. Biological Trace Element Research 81: 215-228.

- Sandstead, HH. 1995. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. American Journal of Clinical Nutrition 61(3): 621S-624S.
- Sata, M., Takemura, M., Shinohe, R., Shimizu, K. 2011. Serum Cytokine Concentrations in a Patient with Rheumatoid Arthritis on Etanercept Therapy Who Subsequently Developed Pneumocystis Pneumonia: A Case Report. Case Reports in Rheumatology 2011: 2.
- Stargrove, MB., Treasure, J., Mckee, DL. Herb, Nutrient, and Drug Interactions Clinical Implications and Therapeutic Strategies. USA: Linda Duncan., 2008: 624.
- Satoh, M., Iwasaka, J., Nakaura, M., Akatsu, T., Shimoda, Y., Hiramori, K. 2004. Increased expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme and tumor necrosis factor- $\alpha$  in peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced congestive heart failure. The European Journal of Heart Failure 6: 869-875.
- Sethi, J. K., Xu, H., Uysal, K.Y., Wiesbrock, S.M., Scheja, L., Hotamisligil, G.S. 2000. Characterisation of receptor-specific TNF- $\alpha$  functions in adipocyte cell lines lacking type 1 and 2 TNF receptors. FEBS Lett 469: 77-82.
- Shanger, AH., and Prasad, As. 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. American Journal of Clinical Nutrition 68: 447S-63S.

- Shoelson, SE., Lee, J., and Goldfine, A.B. 2006. Inflammation and insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation 116: 1793-1799.
- Smolin, L.A., Grosvenor, M.B. 2008. Zinc. Nutrition: science and applications: 471-475, 4<sup>th</sup> edition. Hoboken, NJ: Wiley.
- Son, S.M., Whalin, M.K., Harrison, D.G., Taylor, R., and Griendling. Oxidative stress and diabetic vascular complications. Current Diabetes Reports 4: 247-252.
- Swaroop, J.J., Rajarajeswari, D., Naidu, J.N. 2012. Association of TNF- $\alpha$  with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus Indian. Journal of International Medical Research 135(1): 127–130.
- Taghdir, M., Djazayeri, A., Sepandi, M., Ashourpour, M., Fatehi, F, Djalali, M. 2011. Relationships between serum zinc concentrations and inflammatory intermediate factors, blood glucose, and HbA1c in postmenopausal diabetic women. Journal of Diabetes and Metabolic disorders 10: 1-6.
- Tesfamariam, B., Cohen, R.A. 1992. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 263: H321-H326.
- Tinoco-Veras, C.M., Bezerra Sousa, M.S., Silva, BD., Franciscato Cozzolino, S.M., Viana Pires, L., Coelho Pimentel, J.A. 2011. Analysis of plasma and erythrocyte zinc levels in premenopausal women with breast cancer. Nutrición Hospitalaria 26(2): 293-297.
- Tong, PC., Kong, AP., So, WY., Yang, X., Ho, CS., Ma, RC., et al. 2007. The usefulness of the international diabetes federation and the national cholesterol education Program's adult treatment panel III definitions of

- the metabolic syndrome in predicting coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes. Diabetes Care 30: 1206-1211.
- Totzke, G., Schulze-Osthoff, K., Janicke, RU. 2003. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition. Oncogene 22: 8021–8030.
- Tsigos, C., Kyrou, I., Chala, E., Tsapogas, P., Sturidis, JC., Raptis, SA., et al. 1999. Circulating TNF-alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. Metabolism 48:1332-1335.
- Viktorinova, A., Toserova, E., Krizko, M., Durackova, Z. 2009. Altered metabolism of copper, zinc, and magnesium is associated with increased levels of glycated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. Metabolism 58: 1-5.
- Wajunt, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death and Differentiation 10: 45-65.
- Wassink, A.M., Olijhoek, J.K., and Visseren, F.L. 2007. The metabolic syndrome: metabolic change with vascular consequences. European Journal of Clinical Investigation 37: 8-17.
- Wellen, K.E., and Hotamisligil, GS. 2005. Inflammation, stress and diabetes. The Journal of Clinical Investigation 115: 1111-1117.
- Wellinghausen, N., Driessen, C., Rink, L. 1996. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. Cytokine 8: 767–771.

- Wellinghausen, N., MartiHotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., Spiegelman, B.M. 1995. Increased adipose expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation 95: 2409 -2415.
- Winkler, G., Salamon, F., Harnos, G., Salamon, D., Speer, G., Szekeres, O. 1998. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha concentrations and bioactivity in type 2 diabetic and patients with android type obesity. Diabetes Research and Clinical Practice 42: 169-174.
- World Health Organization. Diabetes Fact Sheet# September 2006. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/print.html>. Accessed November 9, 2010.
- Yalcin, SS., Engur-Karasimav, D., Alehan, D., Yurdakok, K., Ozkutlu, S., Coskun, T. 2011. Zinc supplementation and TNF- $\alpha$  levels in vaccinated cardiac patients. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 25: 85-90.
- Yao, J., Mackmann, N., Edgington, T.S., Fan, S.T. 1997. Lipopolysaccharides induction of the tumor necrosis factor- $\alpha$  promotor in human monocytic cells regulation by Egr-1, c-Jun, and NF- $\kappa$ B transcription factor. The Journal of Biological Chemistry 272: 17795-17801.
- Zagariya, A., Mungre, S., Lovis, R., Birrer, M., Ness, S., Thimapaya, B. 1998. Tumor necrosis factor alpha gene regulation: enhancement of C/EBP-induced activation by c-Jun. American Society for Microbiology 18: 2815-2824.

- Zhao, C., Wang, H., Zhang, J., Feng, L. 2008. Correlations of trace elements, glucose and body compositions in type 2 diabetics. Wei Sheng Yan Jiu 37:600-605.
- Zheng, Y., Li, XK., Wang, Y., Cai, L.. 2008. The role of zinc, copper and iron in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications: therapeutic effects by chelators. Hemoglobin 32:135-145.
- Zinman, B., Hanley, AJG., Harris, SB., Kwan, J., Fantus, IG. 1999. Circulating tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84: 272 -278.
- Zucker-Franklin. 1974. The Percentage of Monocytes among “Mononuclear” Cell Fractions Obtained from Normal Human Blood. J Immunol 112: 234-240.
- Zykova, SN., Jenssen, TG., Berdal, M., Olsen, R., Myklebust, R., Seljelid, R. 2000. Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like db/db mice. Diabetes 49: 1451–1458.



# **APPENDICES**

## **APPENDIX A**

### **Approval letter for human study**



ที่ กท ๐๗๐๒/๒๓๐๑

สำนักงานพัฒนาระบบสาธารณสุข สำนักงานมัย  
๑๑๑ ถนนมิตรไมตรี เขตดินแดง กทม. ๑๐๔๐๐

๒๗ กรกฎาคม ๒๕๕๔

เรื่อง ผลการพิจารณาและมติคณะกรรมการฯ

เรียน นางสาวไรรัตน์ เสริมศรี

สิ่งที่ส่งมาด้วย ใบรับรองโครงการวิจัย

ตามที่ ท่านและคณะจะดำเนินโครงการวิจัย เรื่อง ผลของการเสริมสังกะสีต่อทุเมอร์เนโครซิสแพคเตอร์อัลฟาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ ๒ ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก ซึ่งคณะอนุกรรมการพิจารณาและควบคุมการวิจัยในคนของสำนักอนามัย เสนอให้คณะกรรมการพิจารณาและควบคุมการวิจัยในคนของกรุงเทพมหานคร พิจารณานั้น

โครงการวิจัยดังกล่าวได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการพิจารณาและควบคุมการวิจัยในคนของกรุงเทพมหานครแล้ว ซึ่งคณะกรรมการ พิจารณาและเห็นว่าโครงการได้มาตรฐาน ไม่ขัดต่อสวัสดิภาพและอันตรายแก่ผู้ถูกวิจัย เห็นควรให้ดำเนินการวิจัยในขอบข่ายของโครงการที่เสนอได้ และให้ผู้วิจัยรายงานผลการดำเนินงานต่อคณะกรรมการฯ ทุก ๖ เดือน และเมื่อโครงการวิจัยดำเนินการแล้วเสร็จ ให้ผู้วิจัยส่งข้อมูลงานวิจัยทั้งฉบับที่ดำเนินการเสร็จสมบูรณ์พร้อมบทความย่อ ลงในแผ่น CD มายังสำนักงานพัฒนาระบบงานสาธารณสุข พร้อมทั้งได้ส่งใบรับรองโครงการวิจัยดังกล่าวจำนวน ๑ ฉบับ

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และดำเนินการตามกำหนด

ขอแสดงความนับถือ

(นางรัตนา บรรณาธรรม)

นักวิชาการสาธารณสุข 8ว (ด้านบริหารทงวิชาการ)

ฝกษาการในค้ำตงนึ่งผู้อำนวยการสำนักงานพัฒนาระบบสาธารณสุข

สำนักอนามัย

เลขานุการและอนุกรรมการ

คณะอนุกรรมการพิจารณาและควบคุมการวิจัยในคน สำนักอนามัย

กลุ่มวิจัยและพัฒนาทางสาธารณสุข

โทร. ๐ ๒๒๔๕ ๐๘๕๗

โทรสาร ๐ ๒๒๔๕ ๐๘๕๗

www.bangkok.go.th/health



**ด่วนที่สุด**

**บันทึกข้อความ**

ส่วนราชการ กองวิชาการ (ฝ่ายพัฒนาบุคคล โทร. 0 2224 9710 โทรสาร 0 2221 6029)  
ที่ กท 0602.4/วค.195 วันที่ 22 กรกฎาคม 2554  
เรื่อง อนุมัติโครงการวิจัย ของ ภาสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี  
เรียน ผู้อำนวยการสำนักอนามัย

กลุ่มวิจัยและพัฒนาทางสาธารณสุข  
รับที่ 2207  
วันที่ 27 ก.ค. 2554  
เวลา

สำนักอนามัย  
รับที่ 7499  
วันที่ 25 ก.ค. 2554  
เวลา

สำนักพัฒนาบุคลากร  
รับที่ 6139  
วันที่ 25 ก.ค. 2554  
เวลา 16.00

ตามบันทึก กท.0702/1443 ลงวันที่ 23 พฤษภาคม 2554 เรื่อง ขอส่งโครงร่างการวิจัย  
ขอให้คณะกรรมการพิจารณาและควบคุมการวิจัยในคนของกรุงเทพมหานคร ที่พิจารณาโครงการวิจัย ของ  
ภาสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี เรื่อง "ผลของการเสริมสังกะสีต่อทุเมอริเนโคซิสแพคเตอร์อัลฟาในผู้ป่วย  
โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก" นั้น

บัดนี้คณะกรรมการพิจารณาและควบคุมการวิจัยในคนของกรุงเทพมหานคร ได้พิจารณา  
โครงการวิจัยที่นำเสนอแล้ว มีความเห็นว่า โครงการได้มาตรฐาน ไม่ขัดต่อสวัสดิภาพ และไม่ก่อให้เกิด  
ภัยอันตรายแก่ผู้ถูกวิจัย เห็นควรให้ดำเนินการวิจัยในขอบข่ายของโครงการที่นำเสนอได้ ให้ผู้วิจัยรายงานผลการ  
ดำเนินงานต่อคณะกรรมการ ฯ เมื่อโครงการวิจัยดำเนินการแล้วเสร็จ และให้ผู้วิจัยส่งข้อมูลงานวิจัยทั้งฉบับที่  
ดำเนินการเสร็จสมบูรณ์พร้อมบทความย่อ ลงในแผ่น CD ให้กรุงเทพมหานคร ต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และแจ้งผู้เกี่ยวข้องทราบต่อไป

ปรสมอติ โสนเดช  
(นางสาวเปรมวดี คฤหเดช)  
กรรมการและเลขานุการ  
คณะกรรมการพิจารณาและควบคุมการวิจัยในคน  
ของกรุงเทพมหานคร

**ด่วนที่สุด**

เรียน ผอ.สภชอ  
เพื่อโปรดพิจารณาดำเนินการ

(นางกิ่งแก้ว วงษ์พันธุ์)  
เลขานุการสำนักอนามัย  
๒๕ ก.ค. ๒๕๕๔

- เรียน  หัวหน้าฝ่ายบริหารงานทั่วไป
- หัวหน้ากลุ่มยุทธศาสตร์ฯ
- หัวหน้ากลุ่มสถิติและสารสนเทศฯ
- หัวหน้ากลุ่มวิจัยฯ
- หัวหน้ากลุ่มพัฒนาสุขภาพฯ
- หัวหน้ากลุ่มส่งเสริมฯ
- หัวหน้ากลุ่มหลักประกันฯ

- เพื่อทราบ
- เพื่อดำเนินการ

(นายสุนทร สุนทรชาติ)  
นายแพทย์ 9

ผู้อำนวยการสำนักงานพัฒนาระบบสาธารณสุข  
สำนักอนามัย  
26 ก.ค. 2554

No. W. 91 .....

Ethics Committee  
For  
Researches Involving Human Subjects, the Bangkok Metropolitan Administration

Title of Project : Effect of Zinc Supplementation on Tumor  
Necrosis Factor-Alpha in Type II Diabetic  
Patients with Metabolic Syndrome

Registered Number : 041.54

Principal Investigator : Ms. Uirut Sermsri

Name of Institution : Chulalongkorn University

The aforementioned project has been reviewed and approved by Ethics  
Committee for Researches Involving Human Subjects, based on the Declaration of  
Helsinki.

P. Saicheua ..... Chairman

(Mr. Pirapong Saicheua)  
Deputy Permanent Secretary for BMA

DATE OF APPROVAL 20 JUL 2011

## **Appendix B**

**Information sheet for patients and consent form**

### เอกสารชี้แจงข้อมูล/ คำแนะนำสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อโครงการวิจัย ผลของการเสริมสังกะสีต่อทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก  
EFFECT OF ZINC SUPPLEMENTATION ON TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME
2. ผู้วิจัย เกศชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี
3. สถานที่วิจัย ศูนย์บริการสาธารณสุข 66 ตำหนักพระแม่กวนอิม โชคชัย 4
4. ผู้สนับสนุนการวิจัย ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วม โครงการวิจัย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมสังกะสีต่อทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก เปรียบเทียบระหว่าง zinc sulfate ขนาด 66 มิลลิกรัม (มีธาตุสังกะสี 15 มิลลิกรัม/แคปซูล) รับประทานวันละ 2 ครั้ง หลังอาหาร เข้า เย็นเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และแคปซูลยาหลอกที่ประกอบด้วยแป้งข้าวโพด (corn starch) แทนส่วนประกอบสังกะสี ซึ่งมีลักษณะภายนอกและน้ำหนักเทียบเท่ากับผลิตภัณฑ์สังกะสีทุกประการ โดยรับประทานครั้งละ 1 แคปซูล วันละ 2 ครั้ง หลังอาหาร เข้า เย็น

#### 5. ทำไมต้องศึกษาเรื่องนี้

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่มีความสำคัญระดับโลกซึ่งองค์การอนามัยโลก (2006) ระบุว่า มีผู้ที่เป็นโรคเบาหวานทั่วโลกมากกว่า 180 ล้านล้านคนและคาดว่าจะเพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่าในปี 2030 นอกจากนี้ผู้ป่วยยังอาจมีภาวะแทรกซ้อนจากโรคหัวใจและหลอดเลือดได้โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก (metabolic syndrome) ร่วมด้วยจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งภาวะแทรกซ้อนจากโรคหัวใจและหลอดเลือดนับว่าเป็นปัญหาที่มีความสำคัญมากโดย American Heart Association (2007) ระบุว่าสาเหตุการตายในผู้ป่วยโรคเบาหวานเกิดจากโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดสมองสูงถึงร้อยละ 65 จากข้อมูลการศึกษาในปัจจุบันพบว่าทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาเป็นไซโตไคน์ก่อการอักเสบที่มีบทบาทสำคัญต่อภาวะคืออินซูลินและฮิวลงพุง อาการแสดงต่างๆของกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก และปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ที่ทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ดังนั้นหากสามารถลดระดับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาได้ก็น่าจะเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคเบาหวาน

ชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก ในด้านการควบคุมระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดสามารถป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้

สังกะสีจัดเป็นแร่ธาตุที่ร่างกายต้องการเพียงเล็กน้อย (trace minerals) แต่ไม่สามารถขาดได้ เพราะมีความสำคัญต่อการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกายพบมากในเนื้อแดง ตับ ไข่ อาหารทะเล ผลิตภัณฑ์หมักนม สังกะสีมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของร่างกายช่วยในเรื่องการเจริญเติบโต การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและเอนไซม์มากกว่า 300 ชนิด รวมทั้งเอนไซม์ superoxide dismutase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระออกซิเจนที่ว่องไว (Smolin และ Grosvenor, 2008) ในปัจจุบันมีการศึกษาบทบาทของสังกะสีในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มากขึ้นและมีผลิตภัณฑ์สังกะสีออกมาในรูปแบบต่างๆ เช่น zinc sulfate, zinc gluconate, zinc amino chelate เป็นต้นซึ่งมีข้อมูลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการเสริมสังกะสีน่าจะเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และผู้ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิกและผลิตภัณฑ์ zinc sulfate เป็นรูปแบบที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางว่าให้ผลดีในแง่ของการลดระดับน้ำตาลในเลือด (fasting blood glucose; FBS), glycated hemoglobin (HbA1c) ลดภาวะดื้ออินซูลินซึ่งประเมินโดย Homeostasis assessment model of insulin resistance (HOMA-IR) รวมทั้งสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลรวม (total cholesterol; TC), LDL-cholesterol (LDL-C) และ TG ได้ (Marreiro และคณะ, 2006; Oh และ Yoon, 2008; Kelishadi และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่า zinc sulfate สามารถลดระดับทูเมอร์เน โครซิสแฟคเตอร์อัลฟาในการศึกษาระดับเซลล์ได้

ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และผู้ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิกพบว่าทูเมอร์เน โครซิสแฟคเตอร์อัลฟามีระดับสูงขึ้น ดังนั้นหากสามารถลดระดับทูเมอร์เน โครซิสแฟคเตอร์อัลฟาได้ก็น่าจะเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยเหล่านี้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในปัจจุบันมักศึกษาถึงผลของการเสริมสังกะสีในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือผู้ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิกเท่านั้นดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของการเสริมสังกะสีรูปแบบ zinc sulfate ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิกร่วมด้วยต่อระดับทูเมอร์เน โครซิสแฟคเตอร์อัลฟาในพลาสมาและที่สร้างจาก peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ผลต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดตลอดจนอาการไม่พึงประสงค์ซึ่งข้อมูลที่ได้อาจเป็นแนวทางสำหรับการเลือกใช้สังกะสีในการรักษา ป้องกัน และลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิกร่วมด้วยต่อไป



## 6. วัตถุประสงค์

ศึกษาผลของการเสริมสังกะสีในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิกต่อระดับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาในเลือดและจาก PBMC และต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด

## 7. จะปฏิบัติต่อท่านอย่างไร

ท่านจะได้รับการสัมภาษณ์เพื่อบันทึกในแบบบันทึกและแบบสอบถามต่างๆ ที่ใช้งานวิจัย โดยในการบันทึกข้อมูลประวัติการรักษาโรคเบาหวานของอาสาสมัครจะใช้ข้อมูลจากเวชระเบียนของผู้ป่วยย้อนหลัง 3 เดือนและข้อมูลผลตรวจทางห้องปฏิบัติจะใช้ข้อมูลจากเวชระเบียนของผู้ป่วยย้อนหลัง 3 ครั้ง ท่านจะได้รับการชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง วัดรอบเอว โดยเภสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี การวัดความดันโลหิตและการเจาะเลือดปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยพยาบาลวิชาชีพ ณ ศูนย์บริการสาธารณสุข 66 เพื่อตรวจวัดระดับสังกะสี ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count; CBC), FBS, HbA<sub>1c</sub>, TG, TC, HDL-C, LDL-C (ได้จากการคำนวณ) ระดับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาในพลาสมาและที่สร้างจาก PBMC จากนั้นท่านจะได้รับประทานยาเม็ดแคปซูลซึ่งบรรจุ zinc sulfate หรือแป้งข้าวโพดอย่างใดอย่างหนึ่งด้วยวิธีสุ่มขอให้ท่านรับประทานครั้งละ 1 แคปซูล วันละ 2 ครั้ง หลังอาหาร เข้า เย็น เป็นเวลา 8 สัปดาห์ติดต่อกัน นอกจากนี้ยังได้รับคู่มือและคำแนะนำเกี่ยวกับการบริโภคอาหารและการปฏิบัติตัวที่เหมาะสมจากเภสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี

เพื่อติดตามความร่วมมือและอาการไม่พึงประสงค์ในระยะ 8 สัปดาห์นับตั้งแต่วันที่ท่านเซ็นใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัยท่านจะได้รับโทรศัพท์จากเภสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ทั้งหมด 8 ครั้งและเมื่อท่านมาตรวจตามนัดในครั้งต่อไปให้นำผลิตภัณฑ์ที่ได้รับมาคืนให้เภสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรีเพื่อผู้วิจัยจะได้คำนวณการใช้ยาของท่านได้ถูกต้อง

เมื่อสิ้นสุดการศึกษาในสัปดาห์ที่ 8 ท่านจะได้ทำแบบสอบถามข้อมูลการบริโภคอาหาร การทำงานและการออกกำลังกายและแบบบันทึกการบริโภคอาหารย้อนหลัง 24 ชั่วโมงและท่านจะได้รับการชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง วัดรอบเอว โดยเภสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี วัดความดันโลหิตและการเจาะเลือดปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยพยาบาลวิชาชีพ ณ ศูนย์บริการสาธารณสุข 66 เพื่อตรวจวัดระดับสังกะสี ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count; CBC), FBS, HbA<sub>1c</sub>, TG, TC, HDL-C, LDL-C (ได้จากการคำนวณ) ระดับ TNF- $\alpha$  ในพลาสมาและที่สร้างจาก PBMC และการสัมภาษณ์อาการไม่พึงประสงค์ครั้งสุดท้าย

หมายเหตุ สำหรับค่าผลิตภัณฑ์สังกะสีหรือยาหลอกและค่าวิเคราะห์ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการผู้วิจัยเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่าย (ค่าวิเคราะห์ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการผู้วิจัยจะดำเนินการชำระเงินสดที่แผนกการเงิน ณ ศูนย์บริการสาธารณสุข 66 โดยตรง)

## 8. ประโยชน์

ท่านได้ทราบข้อมูลภาวะการอักเสบโดยตัวชี้วัดการอักเสบในงานวิจัยนี้คือ ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟา หากงานวิจัยครั้งนี้พบว่าการเสริมผลิตภัณฑ์สังกะสีสามารถลดระดับทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาและควบคุมระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดได้ดี การเสริมผลิตภัณฑ์สังกะสีก็น่าจะเกิดประโยชน์ในการรักษา ป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคหัวใจและหลอดเลือดสำหรับตัวท่านเอง รวมถึงเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยท่านอื่นๆ ในอนาคตต่อไปได้นอกจากนี้ท่านจะได้รับคู่มือและคำแนะนำเรื่องการปฏิบัติตัวและการบริโภคอาหารที่เหมาะสมจากเภสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี

## 9. ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น

ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ จะไม่ทำให้เกิดอันตรายแต่อย่างใด ผู้ป่วยบางท่านอาจพบอาการไม่พึงประสงค์ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย รู้สึกกระคายเคืองในทางเดินอาหาร ปวดท้องหรือปวดศีรษะได้ อย่างไรก็ตาม ถ้าท่านมีอาการไม่พึงประสงค์ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย รู้สึกกระคายเคืองในทางเดินอาหาร ปวดท้องหรือปวดศีรษะมาก จนไม่สามารถทนได้ ขอให้ท่านมาที่ศูนย์บริการสาธารณสุข 66 ตำบลพระแม่กวนอิม โชคชัย 4 เพื่อรับการตรวจรักษาที่เหมาะสมต่อไป โดยไม่จำเป็นต้องรอให้ถึงวันนัด และสามารถติดต่อเภสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี ได้ตลอด 24 ชั่วโมง หรือติดต่อพญ.จิตรลดา บุตรงามดี โทร. ๐ ๒๒๑๘ ๘๒๕๕ ในเวลาราชการเท่านั้น โดยผู้วิจัยเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการตรวจและค่ายา ในการบำบัดรักษาอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย ผู้วิจัยจะดำเนินการชำระเงินสดที่แผนกการเงิน ณ ศูนย์บริการสาธารณสุข 66 และสถานพยาบาลอื่นๆ ที่ท่านเข้ารับการตรวจและรักษาโดยตรง

## 10. ท่านจำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการนี้หรือไม่

ไม่จำเป็นต้องขึ้นอยู่กับท่านเอง ถ้าท่านไม่สะดวกที่จะเข้าร่วมโครงการวิจัย และแม้ว่าท่านเข้าร่วมโครงการแล้วท่านจะหยุดยาเองได้โดยไม่ต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้า แพทย์ก็จะให้การดูแลท่านตามปกติ

## 11. ทางเลือกของการรักษาวิธีอื่น

ท่านที่ไม่ได้เข้าร่วมโครงการวิจัย แพทย์ก็จะให้การดูแลท่านตามปกติ

**12. ค่าตอบแทน**

โครงการวิจัยนี้ไม่ได้จ่ายค่าตอบแทน ค่าเดินทางและค่าเสียเวลาให้ท่าน

**13. การรักษาความลับของท่าน**

ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวท่านเป็นความลับ และจะเปิดเผยต่อหน่วยงานเฉพาะสรุปผลการวิจัยด้วยเหตุผลทางวิชาการ โดยไม่มีการระบุชื่อของท่าน

**14. เจ้าหน้าที่หรือแพทย์ผู้ที่ท่านสามารถติดต่อได้**

ถ้าท่านมีข้อสงสัยประการใด โปรดสอบถามเภสัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี หัวหน้าโครงการวิจัย โทร ๐๘๖ ๕๕๘ ๕๑๕๒ ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

## หนังสือให้ความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

ทำที่.....

วันที่.....

ข้าพเจ้า.....อายุ.....ปี อยู่บ้านเลขที่.....ถนน.....หมู่ที่.....แขวง/ตำบล.....เขต/อำเภอ.....จังหวัด.....ขอทำหนังสือนี้ให้ไว้ต่อหัวหน้าโครงการวิจัยเพื่อเป็นหลักฐานแสดงว่า

- ข้อ 1. ข้าพเจ้าได้รับทราบโครงการวิจัยของ เกษัชกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี (หัวหน้าผู้วิจัยและคณะ) เรื่อง ผลของการเสริมสังกะสีต่อทอมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก
- ข้อ 2. ข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจโดยมิได้มีการบังคับ บังคับ หลอกลวงแต่ประการใด และพร้อมจะให้ความร่วมมือในการวิจัย
- ข้อ 3. ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยเกี่ยวกับวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย ประสิทธิภาพ ความปลอดภัย อาการ หรืออันตรายที่อาจเกิดขึ้น รวมทั้งประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัยโดยละเอียดแล้วจากเอกสารการวิจัยที่แนบท้ายหนังสือให้ความยินยอมนี้
- ข้อ 4. ข้าพเจ้าได้รับการรับรองจากผู้วิจัยว่า จะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ จะเปิดเผยเฉพาะผลสรุปการวิจัยเท่านั้น

ข้อ 5. ข้าพเจ้าได้รับทราบจากผู้วิจัยแล้วว่าหากมีอันตรายใด ๆ ในระหว่างการวิจัยหรือภายหลังการวิจัยอันพิสูจน์ได้จากผู้เชี่ยวชาญของสถาบันที่ควบคุมวิชาชีพนั้น ๆ ได้ว่าเกิดขึ้นจากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการดูแลและค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลจากผู้วิจัยและ / หรือผู้สนับสนุนการวิจัย และจะได้รับค่าชดเชยรายได้ที่สูญเสียไปในระหว่างการรักษาพยาบาลดังกล่าว ตามมาตรฐานค่าแรงขั้นต่ำตามกฎหมาย ตลอดจนมีสิทธิได้รับค่าทดแทนความพิการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยตามมาตรฐานค่าแรงขั้นต่ำตามกฎหมายและในกรณีที่ข้าพเจ้าได้รับอันตรายจากการวิจัยถึงแก่ความตายทายาทของข้าพเจ้ามีสิทธิได้รับค่าชดเชยและค่าทดแทนดังกล่าวจากผู้วิจัยและ/หรือผู้สนับสนุนการวิจัยแทนตัวข้าพเจ้า

- ข้อ 6. ข้าพเจ้าได้รับทราบว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิจะบอกเลิกการร่วมโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ และการบอกเลิกการร่วมโครงการวิจัยจะไม่มีผลกระทบต่อ การได้รับบรรดาค่าใช้จ่าย ค่าชดเชยและค่าทดแทนตามข้อ 5 ทุกประการ
- ข้อ 7. หัวหน้าผู้วิจัยได้อธิบายเกี่ยวกับรายละเอียดต่าง ๆ ของโครงการ ตลอดจนประโยชน์ของการวิจัย รวมทั้งความเสี่ยงและอันตรายต่างๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นในการเข้าโครงการนี้ให้ข้าพเจ้าได้ทราบ และตกลงรับคิดชอบตามคำรับรองในข้อ 5 ทุกประการ
- ข้าพเจ้าได้อ่านและเข้าใจข้อความตามหนังสือนี้โดยตลอดแล้ว เห็นว่าถูกต้องตามเจตนาของข้าพเจ้า จึงได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นสำคัญ พร้อมกับหัวหน้าผู้วิจัยและต่อหน้าพยาน

ลงชื่อ.....ผู้ยินยอม	ลงชื่อ.....พยาน
(.....)	(.....)
ลงชื่อ.....หัวหน้าผู้วิจัย	ลงชื่อ.....พยาน
(.....)	(.....)

หมายเหตุ 1) กรณีผู้ยินยอมคนให้ทำวิจัย ไม่สามารถอ่านหนังสือได้ ให้ผู้วิจัยอ่านข้อความในหนังสือให้ความยินยอมนี้ ได้แก่ ผู้ยินยอมให้ทำวิจัยฟังจนเข้าใจดีแล้ว และให้ผู้ยินยอมคนให้ทำวิจัยลงนาม หรือพิมพ์ลายนิ้วหัวแม่มือรับทราบในการให้ความยินยอมดังกล่าวด้วย

2) ในกรณีที่ผู้ให้ความยินยอมมีอายุไม่ครบ 20 ปีบริบูรณ์ จะต้องมิใช่ปกครองตามกฎหมายเป็นผู้ให้ความยินยอมด้วย

## **Appendix C**

**Data record sheet and booklet for diabetic patient**

## แบบสอบถามข้อมูลทั่วไป

1. เพศ  1. ชาย  2. หญิง
2. อายุ
 

<input type="checkbox"/> 1. 35-39	<input type="checkbox"/> 2. 40-44	<input type="checkbox"/> 3. 45-49
<input type="checkbox"/> 4. 50-54	<input type="checkbox"/> 5. 55-60	<input type="checkbox"/> 6. 60 ปี ขึ้นไป
3. สถานภาพสมรส
 

<input type="checkbox"/> 1. โสด	<input type="checkbox"/> 2. คู่/สมรส
<input type="checkbox"/> 3. หย่าร้าง/ แยกกันอยู่	<input type="checkbox"/> 4. หม้าย (คู่สมรสเสียชีวิต)
4. ระดับการศึกษาสูงสุด
 

<input type="checkbox"/> 1. ไม่ได้เรียนหนังสือ	<input type="checkbox"/> 2. ประถมศึกษา
<input type="checkbox"/> 3. มัธยมศึกษา	<input type="checkbox"/> 4. ปวช./ ปวส./ อนุปริญญา
<input type="checkbox"/> 5. ปริญญาตรี/ สูงกว่าปริญญาตรี	
5. อาชีพ
 

<input type="checkbox"/> 1. ไม่ได้ประกอบอาชีพ	<input type="checkbox"/> 2. รับราชการ
<input type="checkbox"/> 3. พนักงานรัฐวิสาหกิจ	<input type="checkbox"/> 4. ค้าขาย/ธุรกิจส่วนตัว
<input type="checkbox"/> 5. อื่นๆ โปรดระบุ.....	
6. สิทธิการรักษา
 

<input type="checkbox"/> 1. ชำระเงินเอง	<input type="checkbox"/> 2. เบิกคืนสังกัด/ โครงการเบิกจ่ายตรง
<input type="checkbox"/> 3. ประกันสังคม	<input type="checkbox"/> 4. โครงการหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้า
<input type="checkbox"/> 5. อื่นๆ โปรดระบุ.....	
7. ท่านสูบบุหรี่หรือไม่
 

<input type="checkbox"/> 1. ไม่เคยสูบ	<input type="checkbox"/> 2. เคยสูบ แต่เลิกแล้ว
<input type="checkbox"/> 3. สูบ จำนวน.....มวนต่อวัน	

8. ปัจจุบันท่านควบคุมน้ำหนักตัวหรือไม่

1. ไม่เคยควบคุมน้ำหนักตัว       2. ควบคุมด้วยวิธีการลดปริมาณอาหาร  
 3. ควบคุมด้วยวิธีการอดอาหาร       4. ควบคุมด้วยวิธีอื่นๆ.....

9. ปัจจุบันท่านรับประทานยารักษาโรคใดบ้าง

1. โรคความดันโลหิตสูง       2. โรคเบาหวาน  
 3. โรคไขมันในเลือดสูง       4. โรคอื่นๆ ระบุ.....  
 5. ไม่มี

10. ท่านรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือวิตามินบำรุงหรือไม่

- 1 ไม่รับประทาน  
 2. รับประทาน ระบุ

.....  
 .....  
 .....

11. ท่านมีญาติสายตรงเป็นโรคต่อไปนี้หรือไม่โปรดระบุว่าเป็นใคร

	พ่อแม่	พี่น้อง	ปู่ย่า	ตายาย
1. โรคความดันโลหิตสูง	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. โรคเบาหวาน	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. โรคไขมันในเลือดสูง	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. อื่นๆ ระบุ.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. ไม่มี.....				

12. โดยปกติท่านออกกำลังกายหรือไม่

1. ไม่ได้ออกกำลังกาย  
 2. 1-2 วันต่อสัปดาห์  
 3. 3 วันต่อสัปดาห์  
 4. 4 วันต่อสัปดาห์  
 5. 5 วันขึ้นไปต่อสัปดาห์

(ถ้ามี) ชนิดของการออกกำลังกาย คือ.....ครั้งละ.....นาที

## แบบบันทึกประวัติผู้ป่วย

## 2.1 แบบบันทึกประวัติผู้ป่วย

ผู้ป่วย ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ระยะเวลาที่เป็น.....ปี

ประวัติการแพ้ยา  ไม่มี  มี.....อาการ.....ประวัติการแพ้อาหาร  ไม่มี  มี.....อาการ.....

ประวัติการเจ็บป่วยหรือการผ่าตัด

.....

โรคประจำตัวอื่นๆ

.....

## ประวัติการรักษาโรคเบาหวาน (ย้อนหลัง 3 เดือน)

วัน เดือน ปี

ยาและขนาดยาที่ได้รับ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## อาการแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานที่เคยเกิดขึ้น

 มือสั่น/ใจสั่น กระหายน้ำบ่อย ปัสสาวะบ่อย ตาพร่ามัว ชาปลายมือ/เท้า เจ็บแน่นหน้าอกด้านซ้าย

เวลาทำงาน

 มีแผลที่เท้า เท้าเย็น/ เป็นตะคริว ปวดร้อนตามปลายมือ/เท้า

อาการเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นเป็นประจำ (ไม่ใช่สาเหตุจากโรคเบาหวาน)

.....

.....

.....



**แบบบันทึกการประเมินกลุ่มอาการทางเมแทบอลิกโดยใช้เกณฑ์  
International Diabetes Federation (IDF)**

ตัวชี้วัด	เกณฑ์การวินิจฉัยกลุ่มอาการเมแทบอลิก ตาม IDF	เข้าเกณฑ์	ไม่เข้า เกณฑ์
1) WC.....cm	เพศชาย $\geq 90$ cm, เพศหญิง $\geq 80$ cm		
2) FBS.....mg/dl	$\geq 100$ mg/dl หรือ type 2 DM หรือได้รับยาลดน้ำตาล		
3) TG.....mg/dl	$\geq 150$ mg/dl หรือได้รับยาลดไขมัน		
4) HDL-C.....mg/dl	เพศชาย $< 40$ mg/dl, เพศหญิง $< 50$ mg/dl หรือได้รับยาลดไขมัน		
5) BP.....mmHg	$\geq 130/85$ mmHg หรือได้รับยาลดความดันโลหิต		
<b>ผลการประเมินกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก</b>			

น้ำหนัก.....kg

ส่วนสูง.....cm

ค่าดัชนีมวลกาย (BMI.....kg/m<sup>2</sup>)

$< 18.50$  kg/m<sup>2</sup>

$18.50 - 22.99$  kg/m<sup>2</sup>

$23.00 - 24.99$  kg/m<sup>2</sup>

$25.00 - 29.99$  kg/m<sup>2</sup>

$\geq 30.00$  kg/m<sup>2</sup>

### แบบสอบถามข้อมูลการบริโภคอาหาร

คำชี้แจง ในระหว่าง 1 เดือนที่ผ่านมา ท่านรับประทานอาหารต่างๆ เหล่านี้ บ่อยครั้งเพียงใด โปรด  
ใส่เครื่องหมาย ✓ ลงในช่องว่างแต่ละข้อเลือกเพียงคำตอบเดียว

	4-7 วันต่อ สัปดาห์	1-3 วันต่อ สัปดาห์	1-3 วันต่อ เดือน	ไม่เคย
1. เนื้อสัตว์ป่นมัน/หนังสัตว์ เช่น หมูสามชั้น หมูกรอบ หนังหมูและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ฯลฯ				
2. อาหารที่มีแป้ง-เนยสูง เช่น ขนมปังทานเนย เค้ก คุกกี้ โดนัท ฯลฯ				
3. อาหารทอด อาหารมัน เช่น หมูทอด ไก่ทอด ไข่เจียว ทอดมัน ฯลฯ				
4. ผักต่างๆ เช่น ผักใบเขียว ฯลฯ				
5. ผลไม้ต่างๆ เช่น ส้ม มะละกอ ฝรั่ง แอปเปิ้ล ฯลฯ				
6. ธัญพืชไม่ขัดสี เช่น ข้าวกล้อง ขนมปังโฮลวีท งา ลูก เดือย ฯลฯ				
7. อาหารที่มีน้ำตาลสูง เช่น ขนมหวาน ผลไม้แช่อิ่ม				
8. เครื่องดื่ม เช่น ชา กาแฟ เป็นต้น				

## แบบบันทึกการบริโภคอาหารย้อนหลัง 24 ชั่วโมง

คำชี้แจง กรุณาระบุวันที่กินอาหาร เครื่องดื่ม และขนมทุกชนิด ที่ท่านรับประทาน เมื่อวานนี้ตลอดทั้งวัน

วันที่บันทึก.....เดือน.....พ.ศ. ....

มื้ออาหาร	สถานที่รับประทาน	รายการอาหาร	ส่วนประกอบ (คร่าวๆ)	ปริมาณที่รับประทาน (ระบุเป็นหน่วยที่ใช้ใน ครัวเรือน เช่น ถ้วย ทัพพี ช้อนโต๊ะ ช้อนชา แก้ว มิลลิเมตร ชัน ลูก ผล ฯลฯ)
<b>ตัวอย่าง</b> มื้อเย็น	ร้านอาหาร	ก๋วยเตี๋ยวปลา	เส้นใหญ่ เนื้อปลา ถั่วงอก	2 ทัพพี 4 ช้อนโต๊ะ 1 ทัพพี
มื้อเช้า				
มือกกลางวัน				
มื้อเย็น				
มื้อค่ำ หรือ อาหารว่าง				

อาหารที่รับประทาน  เหมือนปกติ  น้อยกว่าปกติ เพราะ..... มากกว่าปกติ เพราะ.....

## คู่มือแนะนำการปฏิบัติตัวและการบริโภคอาหารสำหรับผู้ป่วย

### โครงการวิจัย

ผลของการเสริมสังกะสีต่อทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์อัลฟา  
ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก

โดย

เกศกรหญิงอุไรรัตน์ เสริมศรี

นิสิตปริญญาโท สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

### ที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก

คือ ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีความผิดปกติที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

ซึ่งประกอบด้วยอาการต่างๆเหล่านี้ อย่างน้อย 3 ข้อ

- ภาวะอ้วนลงพุง มีเส้นรอบเอวมากกว่า 90 ซม. ในเพศชายและมากกว่า 80 ซม. ในเพศหญิง
- ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงมากกว่า 100 mg/dl หรือรักษาด้วยยาลดน้ำตาล
- ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (ระดับไตรกลีเซอไรด์มากกว่า 150 mg/dl) หรือรักษาด้วยยาลดไขมัน
- ระดับ HDL-cholesterol น้อยกว่า 40 mg/dl ในเพศชาย และ น้อยกว่า 50 mg/dl ในเพศหญิง หรือรักษาด้วยยาลดไขมัน
- ภาวะความดันโลหิตสูง มากกว่า 130/80 มิลลิเมตรปรอท หรือรักษาด้วยยาลดความดันโลหิต

**ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลก (2006) ระบุว่า**  
ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีกลุ่มอาการทาง  
เมแทบอลิกร่วมด้วยมีอัตราเสี่ยงต่อการเกิด  
โรคหัวใจและหลอดเลือดสูงถึง 8.19 เท่าในเพศ  
หญิงและ 3.09 เท่าในเพศชาย เมื่อเทียบกับ  
อาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และไม่  
มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิก

**American Heart Association (2007) ระบุว่า**  
สาเหตุการตายในผู้ป่วยโรคเบาหวานเกิดจาก  
โรคหัวใจและโรคหลอดเลือดสมองสูงถึง  
ร้อยละ 65

## สหพันธ์โรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกา

### (American Diabetes Association)

ได้แนะนำอาหารสำหรับโรคเบาหวานให้มีส่วนประกอบดังนี้

#### 1. โปรตีน

ในผู้ป่วยเบาหวานควรได้รับพลังงานจากโปรตีนคิดเป็นร้อยละ 10-20 ของพลังงานทั้งหมดในแต่ละวัน หรือประมาณ 0.8-1.6 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โปรตีนที่ได้รับอาจมาจากพืช เช่น ถั่วเหลือง เป็นต้นหรือโปรตีนจากเนื้อสัตว์ที่ไม่ติดมัน

ในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีภาวะของโรคไตร่วมด้วยควรได้รับโปรตีนประมาณ 0.6 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน

#### 2. ไขมัน

ในผู้ป่วยเบาหวานควรได้รับพลังงานจากไขมัน คิดเป็นร้อยละ 30 ของพลังงานทั้งหมดในแต่ละวัน การประกอบอาหารควรใช้น้ำมันถั่วเหลืองแทนน้ำมันปาล์ม หลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารที่มีไขมันอิ่มตัวในปริมาณสูง เช่น กะทิ เป็นต้น เนื่องจากการรับประทานปริมาณมากในระยะยาวอาจทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดตามมาได้

ปริมาณคอเลสเตอรอลที่ได้รับจากอาหารควรน้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อวัน ดังนั้นจึงควรจำกัด หรือหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง ซึ่งอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงเกิน 1 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กรัม ได้แก่ ไข่แดง หอย เครื่องในสัตว์ ปลาหมึก และเนยเหลว

### 3. คาร์โบไฮเดรต

ในผู้ป่วยโรคเบาหวานควรได้รับพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 55

- คาร์โบไฮเดรตที่เป็นชนิดเชิงเดี่ยว ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทราย จะถูกย่อยและดูดซึมเร็วกว่า คาร์โบไฮเดรตชนิดเชิงซ้อน เช่น ข้าว ขนมปัง จึงมีผลทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงได้มากกว่า



## เส้นใยอาหาร

ในแต่ละวันควรบริโภคใยอาหารประมาณ 20 กรัม ช่วยดูดซับไขมันและคอเลสเตอรอลจากผนังลำไส้พบในผลไม้ต่างๆ เช่น ส้ม แอปเปิ้ล เป็นต้น

- ดัชนีน้ำตาล (glycemic index) คือ ดัชนีที่ใช้วัดระดับน้ำตาลที่ถูกดูดซึมได้ในอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ผู้ป่วยเบาหวานควรรับประทานอาหารที่มีดัชนีน้ำตาลน้อย ผลไม้ไทยมีค่าดัชนีน้ำตาลเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ ทูเรียน สับปะรด ลำไย ส้ม องุ่น มะม่วง มะละกอ และกล้วย ดังนั้น ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีกลุ่มอาการทางเมแทบอลิควรรเลือกรับประทานกล้วย ส้ม และหลีกเลี่ยงการรับประทานทุเรียน ลำไยในปริมาณที่มากเกินไป

## แอลกอฮอล์

สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานแนะนำให้ไม่ควรดื่มสุราเกินวันละ 2 ส่วน



1 ส่วน = เบียร์ 360 มิลลิลิตร = ไวน์ 150 มิลลิลิตร

ผู้ป่วยที่ไม่ควรดื่มสุรา ได้แก่ ผู้ที่มี  
ไตรกลีเซอไรด์สูง ไขมันในเลือดสูง  
เป็นต้น

## อันตรายจากบุหรื

- ทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้น เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้หลอดเลือดเกิดการอักเสบและการตีบตันของหลอดเลือด โดยเฉพาะหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงที่หัวใจและขา หากเกิดการตีบที่เส้นเลือดบริเวณนี้ จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย การเน่าที่เท้า และนำไปสู่การตัดขาเพิ่มสูงขึ้น

ดังนั้นจึงควรหยุดสูบบุหรี่เพื่อ  
ลดโรคแทรกซ้อนจาก  
โรคหัวใจและหลอดเลือด

## การออกกำลังกาย

- การออกกำลังกายจะช่วยทำให้อินซูลินทำงานได้ดีขึ้น
- การออกกำลังกายครั้งละ 20-30 นาที เป็นอย่างน้อย ควรมีการตรวจสอบระดับน้ำตาลร่วมด้วย เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมอาหารและกำหนดขนาดยาที่ใช้

## เอกสารอ้างอิง

1. วิทยา ศรีมาดา. 2541. การควบคุมอาหารในผู้ป่วยเบาหวาน. การดูแลรักษาผู้ป่วยเบาหวาน. หน้า 18- 38, กรุงเทพมหานคร: คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. วรางคณา วารีน้อยเจริญ. 2542. โภชนบำบัดในโรคเบาหวาน. โภชนบำบัด 2000. หน้า 31-39, พิมพ์ ครั้งที่ 1, กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัดมาถลงคุณ.
3. World Health Organization. Diabetes. Fact sheet#312. September 2006. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/print.html>. Accessed November 9, 2010.
4. Heart disease and stroke statistics. 2007. Update Dallas, TX: American Heart Association .
5. Obrien, R.C. 1998. Dietary managemen of diabetes: basic principles. Diabetographia (special issue):17-18.
6. Quibrera, R. 1998. The place of exercise and sport in the management of diabetes. Diabetographia (special issue): 19-20.
7. International Diabetes Federation 2006. Available at [http://www.idf.org/webdata/docs/MetS\\_def\\_update2006.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf). Accessed November 9, 2010.

## **Appendix D**

**Analytical report of zinc capsule and placebo capsule**

## THAIPHARMED 1942 CO., LTD., BANGKOK , THAILAND

Quality Control Department

## Analytical Report

Product : ZINCATE*			
Reg. No. : 1A 497/42	Lot No. : 59495	Control No. : 63/2010	
MFG. : 17.3.2010	EXP. : 17.3.2013	Batch size : 100,000 's	Report date : 30.3.2010

Description : Blue-grey gelatin capsule no.4 with white powder inside, printed ZINCATE in black color on cap and body.

Content : Each capsule contains :-  
Zinc Sulfate eq. to elemental Zinc 15 mg

Identification test : Positive.

Average net weight per capsule 0.1797 g

Average gross weight per capsule 0.2201 g

Weight variation - 4.2582 ;+ 5.7612 % (± 10%)

Disintegration time 2 min. ( nmt. 30 min. )

Analytical Items	Method of Analysis	Limit	Result of Analysis	
			Quantity per unit	%labeled amount
Zinc sulfate eq. to elemental Zinc	USP 23, p.1646	90.0 - 110.0 %la of Zinc (Zn)	14.6976 mg/capsule	97.98 %la

Comment : *The samples meet the requirements.*

Analyst : <i>Jiraporn</i>	<i>21 3 1 2010</i>	Chief of QC.dept. : <i>[Signature]</i>	<i>30 MAR. 2553</i>
---------------------------	--------------------	--	---------------------

รายละเอียดและชื่อของปริมาณของวัตถุดิบเป็นส่วนประกอบใน

Placebo นี้ ..... 1 capsule ..... (หน่วย)

มีวัตถุดิบเป็นส่วนประกอบของ Placebo คือ

ชื่อวัตถุดิบ	ปริมาณ
Corn starch	66 mg
Lactose	20 mg
Colloidal Silicon Dioxide	0.5 mg
starch (Tapioca)	79 mg
Purified water *	0.03 ml

\* Removed during Processing

วันที่  
2/27



## **APPENDIX E**

### **Normality test of data and statistical analysis**

**Table E-1** Shapiro-Wilk's of data

<b>Parameters<sup>a</sup></b>	<b>Groups</b>	<b>Shapiro-Wilk's Value</b>	<b><i>p-value</i></b>
Plasma zinc (µg/dL)	Zinc	0.946	0.649
	Placebo	0.948	0.723
Plasma TNF-α (pg/mL)	Zinc	0.861	0.099
	Placebo	0.846	0.147
% tmTNF-α in PBMC	Zinc	0.948	0.672
	Placebo	0.923	0.527
Weight (Kg)	Zinc	0.872	0.129
	Placebo	0.908	0.422
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Zinc	0.876	0.142
	Placebo	0.911	0.445
WC (cm)	Zinc	0.652	< 0.001*
	Placebo	0.557	< 0.001*
FBS (mg/dL)	Zinc	0.737	0.004*
	Placebo	0.864	0.203
% HbA1c	Zinc	0.831	0.046
	Placebo	0.886	0.299
TG (mg/dL)	Zinc	0.966	0.858
	Placebo	0.839	0.127
TC (mg/dL)	Zinc	0.849	0.073
	Placebo	0.987	0.980

\*Data were not normally distributed ( $p < 0.05$ ), <sup>a</sup>Mean differences were used to analyze normality test of data. Mean differences = Data at Baseline – Data at week 8

**Table E-1** Shapiro-Wilk's of data (continued)

<b>Parameters<sup>a</sup></b>	<b>Groups</b>	<b>Shapiro-Wilk's Value</b>	<b><i>p</i>-value</b>
HDL-C (mg/dL)	Zinc	0.921	0.400
	Placebo	0.914	0.464
LDL-C (mg/dL)	Zinc	0.881	0.163
	Placebo	0.940	0.662
SBP (mmHg)	Zinc	0.888	0.189
	Placebo	0.970	0.891
DBP (mmHg)	Zinc	0.958	0.776
	Placebo	0.826	0.100
RBC (10 <sup>6</sup> /mL)	Zinc	0.978	0.955
	Placebo	0.876	0.252
% Lymphocytes	Zinc	0.955	0.740
	Placebo	0.911	0.443
% Monocytes	Zinc	0.861	0.099
	Placebo	0.881	0.272
% Neutrophils	Zinc	0.879	0.155
	Placebo	0.957	0.798
% Basophils	Zinc	0.920	0.395
	Placebo	0.805	0.066
TE (kcal/d)	Zinc	0.959	0.777
	Placebo	0.931	0.423

---

Mean differences = Data at Baseline - Data at week 8

**Table E-1** Shapiro-Wilk's of data (continued)

<b>Parameters<sup>a</sup></b>	<b>Groups</b>	<b>Shapiro-Wilk's Value</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Protein intake (g/d)	Zinc	0.932	0.471
	Placebo	0.855	0.049
Protein intake (kcal/d)	Zinc	0.932	0.471
	Placebo	0.855	0.049
% Protein	Zinc	0.915	0.319
	Placebo	0.862	0.061
CHO intake (g/d)	Zinc	0.932	0.471
	Placebo	0.898	0.174
CHO intake (kcal/d)	Zinc	0.932	0.471
	Placebo	0.898	0.174
% CHO	Zinc	0.860	0.076
	Placebo	0.920	0.317
Fat intake (g/d)	Zinc	0.737	0.182
	Placebo	0.646	0.095
Fat intake (kcal/d)	Zinc	0.737	0.182
	Placebo	0.646	0.095
% Fat	Zinc	0.867	0.092
	Placebo	0.887	0.126

<sup>a</sup>Mean differences were used to analyze normality test of data.  
Mean differences = Data at Baseline – Data at week 8

**Table E-2** Paired t test

<b>Parameters</b>	<b>Groups</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Plasma zinc ( $\mu\text{g/dL}$ )	Zinc	< 0.001*
	Placebo	0.296
Plasma TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Zinc	0.079
	Placebo	0.805
% tmTNF- $\alpha$ in PBMC	Zinc	0.393
	Placebo	0.710
Weight (Kg)	Zinc	0.971
	Placebo	0.950
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	Zinc	0.992
	Placebo	0.897
% HbA1c	Zinc	0.071
	Placebo	0.291
TG (mg/dL)	Zinc	0.947
	Placebo	0.155
TC (mg/dL)	Zinc	0.149
	Placebo	0.069
HDL-C (mg/dL)	Zinc	0.814
	Placebo	0.774

\* Significant difference from baseline within group ( $p < 0.05$ )

**Table E-2** Paired t test (continued)

<b>Parameters</b>	<b>Groups</b>	<b><i>p</i>-value</b>
LDL-C (mg/dL)	Zinc	0.191
	Placebo	0.229
SBP (mmHg)	Zinc	0.143
	Placebo	0.617
DBP (mmHg)	Zinc	0.191
	Placebo	0.399
RBC (10 <sup>6</sup> /mL)	Zinc	0.346
	Placebo	0.259
% Lymphocytes	Zinc	0.052
	Placebo	0.518
% Monocytes	Zinc	0.238
	Placebo	0.897
% Neutrophils	Zinc	0.347
	Placebo	0.328
% Basophils	Zinc	0.489
	Placebo	0.093
Total energy intake (kcal/d)	Zinc	0.223
	Placebo	0.245

**Table E-2** Paired t test (continued)

<b>Parameters</b>	<b>Groups</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Carbohydrate intake (g/d)	Zinc	0.743
	Placebo	0.538
Carbohydrate intake (kcal/d)	Zinc	0.743
	Placebo	0.538
% Carbohydrate intake	Zinc	0.056
	Placebo	0.700
Fat intake (g/d)	Zinc	0.091
	Placebo	0.400
Fat intake (kcal/d)	Zinc	0.091
	Placebo	0.400
% Fat intake	Zinc	0.268
	Placebo	0.755
Protein intake (g/d)	Zinc	0.703
	Placebo	0.546
Protein intake (kcal/d)	Zinc	0.703
	Placebo	0.546
% Protein intake	Zinc	0.824
	Placebo	0.659

**Table E-3** Wilcoxon Signed Ranks Test

<b>Parameters</b>	<b>Groups</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Fasting blood sugar (mg/dL)	Zinc	0.007*
	Placebo	0.859
Waist circumference (cm)	Zinc	0.500
	Placebo	0.500

\* Significant difference from baseline within group ( $p < 0.05$ )

**Table E-4** Mann-Whitney Test

<b>Parameters</b>	<b>Baseline</b>	<b>Week 8</b>
Fasting blood sugar (mg/dL)	0.710	0.131
Waist circumference (cm)	0.197	0.247

Data are presented as *p*-value



**Table E-5** Independent t-test at baseline and week-8

<b>Parameters</b>	<b>Baseline</b>	<b>Week 8</b>
Plasma zinc ( $\mu\text{g/dL}$ )	0.909	0.001*
Plasma TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0.313	0.146
% tmTNF- $\alpha$ in PBMC	0.881	0.056
Weight (Kg)	0.284	0.310
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	0.184	0.178
% HbA1c	0.328	0.460
TG (mg/dL)	0.102	0.462
TC (mg/dL)	0.146	0.774
HDL-C (mg/dL)	0.835	0.610
LDL-C (mg/dL)	0.247	0.604
SBP (mmHg)	0.410	0.456
DBP (mmHg)	0.456	0.803
RBC ( $10^6/\text{mL}$ )	0.163	0.205
% Lymphocytes	0.756	0.260
% Monocytes	0.276	0.533
% Neutrophils	0.193	0.205
% Basophils	0.600	0.776

Data are presented as *p*-value.

\* Significant difference from the control group at the same time point ( $p < 0.05$ )

**Table E-5** Independent t-test at baseline and week-8 (continued)

<b>Parameters</b>	<b>Baseline</b>	<b>Week 8</b>
Total energy intake (kcal/d)	0.483	0.615
Carbohydrate intake (g/d)	0.780	0.896
Carbohydrate intake (kcal/d)	0.780	0.896
% Carbohydrate intake	0.498	0.332
Fat intake (g/d)	0.292	0.575
Fat intake (kcal/d)	0.292	0.575
% Fat intake	0.654	0.795
Protein intake (g/d)	0.702	0.894
Protein intake (kcal/d)	0.702	0.894
% Protein intake	0.800	0.796

Data are presented as *p*-value

**Table E-6** Chi-Square Test

Parameters	Zinc		Placebo	
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8
Meat	6.200	3.800	5.091	3.455
<i>p</i> -value	0.045	0.150	0.078	0.178
Meat product	1.400	1.400	2.364	1.273
<i>p</i> -value	0.479	0.479	0.307	0.529
High carbohydrate and high fat	0.200	2.600	1.273	1.273
<i>p</i> -value	0.905	0.273	0.529	0.529
Fried food	2.600	1.400	3.455	0.727
<i>p</i> -value	0.273	0.497	0.178	0.695
Saturated fatty acid food	4.400	2.000	0.727	0.182
<i>p</i> -value	0.221	0.572	0.695	0.913
Vegetable	3.800	3.800	2.364	2.364
<i>p</i> -value	0.150	0.150	0.307	0.367
Fruit	1.400	0.400	4.545	5.091
<i>p</i> -value	0.497	0.527	0.103	0.078
Cereal	3.200	3.200	5.091	2.909
<i>p</i> -value	0.202	0.202	0.078	0.234
Fast food	3.800	2.600	4.545	2.364
<i>p</i> -value	0.150	0.273	0.103	0.307

---

Data are presented as  $\chi^2$

**Table E-6** Chi-Square Test (continued)

Parameters	Zinc		Placebo	
	Baseline	Week 8	Baseline	Week 8
Salty food	4.400	3.600	6.091	4.636
<i>p</i> -value	0.221	0.308	0.107	0.200
Sweeten or carbonated beverage	1.400	2.600	3.455	5.091
<i>p</i> -value	0.497	0.273	0.178	0.078
Snack	1.400	2.600	2.364	1.273
<i>p</i> -value	0.497	0.273	0.367	0.529
Tea	3.800	3.800	4.545	2.364
<i>p</i> -value	0.150	0.150	0.103	0.307
Coffee	3.200	3.200	4.545	5.091
<i>p</i> -value	0.202	0.202	0.103	0.078

---

Data are presented as  $\chi^2$

**BIOGRAPHY**

<b>NAME</b>	Miss Urairat Sermsri
<b>DATE OF BIRTH</b>	August 16, 1981
<b>PLACE OF BIRTH</b>	Surin, Thailand
<b>INSTITUTIONS ATTENDED</b>	Silpakorn University, 2001-2005; Bachelor of Science in Pharmacy (Clinical Pharmacology) Chulalongkorn University, 2009-2012; Master of Science in Pharmacy (Food Chemistry and Medical Nutrition)
<b>OCCUPATIONS</b>	Pharmacist at Theptarin Hospital; 2005-2011 Regulatory Affairs Coordinator at Berli Jucker Public Company Limited (Eurodrug Laboratories); June 2012- December 2012