مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۵، شماره ۹، آذر ۱۳۹۷ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

# تأثیر مصرف مکمل ویتامین D بر سطح پلاسمایی پروتئین ضد پیری کلوتو در سالمندان

**مریم جبرائیل عظیم زاد:** صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، تهران، ایران، و دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تغذیه، گروه علوم تغذیه، دانشکده بهداشت، پردیس بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

**فرزاد شیدفر:** صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، تهران، ایران، و استاد، گروه علوم تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) shidfar.f@iums.ac.ir

**شیما جزایری:** دانشیار، گروه علوم تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

**آغا فاطمه حسینی:** کارشناس ارشد مربی، گروه آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

## چکیده

**زمینه و هدف:** درصد افراد سالمند کشور ما رو به رشد است و سالخوردگی با بیماری‌های متعدد، ازکارافتادگی و هزینه‌های درمانی سنگین همراه است. پروتئین چند عملکردی جدید کلوتو نه‌تنها سبب کاهش روند پیری می‌شود بلکه بر بیماری‌های متعدد مرتبط با سنین بالا نیز مؤثر است. این مطالعه با هدف تعیین اثر مکمل ویتامین D بر سطح پلاسمایی کلوتو در سالمندان انجام گردید.

**روش کار:** این پژوهش به روش کارآزمایی بالینی تصادفی در سالمندان با سطح پلاسمایی ناکافی ویتامین D، ۳۰-۱۰ng/ml به مدت ۱۲ هفته، صورت گرفت. افراد به طور تصادفی به دو گروه دریافت‌کننده هفته‌ای ۱ عدد مکمل ویتامین D (IU50000) و دارونما تقسیم شدند. ویتامین D به روش Chemiluminescence و کلوتو به روش ELISA اندازه‌گیری شدند. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و $p<0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** میانگین سطح ویتامین D بعد از مداخله در گروه دارونما و ویتامین D به ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری داشت (به ترتیب $p<0.001$ و $p<0.001$) و تغییرات آن بین دو گروه بعد از مداخله نیز دارای تفاوت معنی‌داری شد ($p<0.001$). میانگین سطح کلوتو پلاسمایی و تغییرات آن بعد از مداخله بین دو گروه نیز تفاوت معنی‌داری پیدا کرد (به ترتیب $p=0.014$ و $p<0.001$). در گروه ویتامین D در سطح پروتئین کلوتو بعد از مداخله افزایش معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0.164$).

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد، مصرف هفته‌ای یک عدد مکمل ویتامین D با دوز IU 50000 در سالمندان، باعث ایجاد تفاوت معنی‌داری در تغییرات کلوتو و ویتامین D بین دو گروه و افزایش معنی‌دار سطح ویتامین D پلاسمایی در گروه ویتامین D می‌شود.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور

**کلیدواژه‌ها**

ویتامین D،
پروتئین کلوتو،
سالمند

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۱۹

**شیوه استناد به این مقاله:**

Jebreal Azimzadeh M, Shidfar F, Jazayeri Sh, Hosseini AF. The effect of vitamin D supplementation on plasma levels of anti-aging protein Klotho in elderly. Razi J Med Sci.2018;25(9):84-93.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 1.0 صورت گرفته است.



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]

Razi Journal of Medical Sciences.2018;25(9):84-93. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

# The effect of vitamin D supplementation on plasma levels of anti-aging protein Klotho in elderly

**Maryam Jebreal Azimzadeh**, Iran National Science Foundation, Tehran, Iran & MSc in Nutritional Sciences, Department of Nutrition, School of Health International Campus, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**Farzad Shidfar**, Iran National Science Foundation, Tehran, Iran & PhD in Nutritional Sciences, Department of Nutrition, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author) shidfar.f@iums.ac.ir
**Shima Jazayeri**, MD, PhD in Nutritional Sciences, Department of Nutrition, School of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
**Agha Fatemeh Hosseini**, MSc of Biostatistics, Department of Biostatistics, Faculty of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

## *Abstract*

**Background:** The percentage of elderly people is growing in our country. Aging is associated with multiple diseases, disabilities and heavy medical expenses. The new multi-functionalProtein, Klotho, not only reduces the aging process but also affects several diseases associated with older ages.The aim of this study was to evaluate the effect of vitamin D supplements on the plasma levels of klotho in the elderly.
**Methods:** This study was conducted in a randomized clinical trial in 81 elderly, with insufficient vitamin D plasma levels (10-30 ng/ml) for 12 weeks.Individuals randomly divided into two groups of vitamin D supplements (50000 IU) and placebo once a week. Vitamin D was measured by chemiluminescence method and klotho by ELISA. Data was analyzed by SPSS (version 22) software at meaningful level of $P < 0.05$.
**Results:** 25(OH)D levels were increased and decreased significantly in vitamin D and placebo group respectively ($p<0.001$ & $p<0.001$ respectively), and its changes between the two groups was significantly different at the end of the intervention ($p<0.001$). The mean klotho protein levels and its changes after the intervention were significantly different between the two groups ($p=0.014$ & $p<0.001$ respectively). The mean klotho protein levels in the vitamin D group was not change significantly ($p=0.164$).
**Conclusion:** The findings of this study showed, weekly intake of 50,000 IU vitamin D for 12 weeks in elderly peoplewith insufficient vitamin D levels, caused significant difference in klotho protein and vitamin D changes between the two groups, and also vitamin D levels in vitamin D group was increased significantly at the end of the intervention.

**Conflicts of interest:** None
**Funding:** Iran National Scince Foundation

**Keywords**
Vitamin D,
Klotho protein,
Elderly

Received: 19/06/2018
Accepted: 11/10/2018

**Cite this article as:**
Jebreal Azimzadeh M, Shidfar F, Jazayeri Sh, Hosseini AF. The effect of vitamin D supplementation on plasma levels of anti-aging protein Klotho in elderly. Razi J Med Sci.2018;25(9):84-93.

This work is published under CC BY-NC-SA 1.0 licence.



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]

## مقدمه

پیری جمعیت یک پدیده جهانی است و فقط مربوط به کشورهای توسعه یافته و پر در آمد نمی‌باشد. در کشور ما بر اساس سرشماری عمومی نفوس و مسکن در سال ۱۳۹۵ سالمندان بالای ۶۰ سال حدود ۹ درصد کل جمعیت را تشکیل می‌دادند و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۱۴۲۹ به ۲۴/۹ درصد برسد (۱). تقسیم‌بندی گروه سنین سالمندان به‌صورت زیر می‌باشد: سن بین ۶۵ تا ۷۴ سال را سالمند جوان، بین ۷۵ تا ۸۴ سال را سالمند و بالای ۸۵ سال را سالمندترین سالمند می‌نامند (۲). پیری پدیده‌ای بیولوژیکی و تحت تأثیر فاکتورهای متعدد محیطی و ژنتیکی می‌باشد. سالخوردگی با افزایش بروز بیماری‌های بسیاری مرتبط است، مانند فشار خون بالا، دیابت، نقص عملکرد اندوتلیال، اختلالات عصبی و افزایش خطر مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی عروقی (۳). اما بسیاری از این بیماری‌ها قابل پیشگیری می‌باشند. در همین راستا، ژن جدیدی به نام کلوتو و معروف به پروتئین ضد پیری شناخته شده است.

ژن کلوتو بر روی کروموزوم ۱۳q۱۲ قرار دارد (۴) و دو فرم رونوشتی ایجاد می‌کند: ۱) فرم غشایی که رونوشت کامل پروتئین است و حاوی ۱۰۱۴ اسیدآمینه است و ۲) فرم ترشحی که حاوی ۵۵۰ اسیدآمینه است. فرم ترشحی پروتئین از دو مسیر ایجاد می‌شود: ۱) از طریق برداشت پروتئولیتیکی دمین خارج سلولی کلوتوی غشایی ۲) به‌وسیله شکسته شدن mRNA ژن کلوتو (۵). اغلب اثرات پروتئین کلوتو در بدن، مربوط به فرم ترشحی آن است (۶) که به عنوان فاکتور هورمونی عمل می‌کند (۳). پروتئین ضد پیری کلوتو در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی شرکت دارد. کلوتو به عنوان کورسپتور اجباری گیرنده۲۳ Fibroblast Growth Factor (FGF) (۲۳) سبب تنظیم کاهشی متابولیسم فسفات می‌شود (۷). این پروتئین با فعال کردن فاکتور رونویسی Forkhead box O (FOXO) و افزایش بیان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز میتوکندریایی (SOD) (۸) سبب افزایش مقاومت به استرس اکسیداتیو می‌شود (۹)، همچنین با مهار سیگنال انسولین /IGF-۱ (Insulin-like Growth Factor-1) از بسیاری از سلول‌ها و اندام‌ها در برابر صدمات اکسیداتیو محافظت می‌کند(۱۰). به‌علاوه کلوتو با شرکت در مسیرهای بیولوژیکی متعدد دیگری در کاهش سرعت پیری مؤثر است، مانند اثر بر مسیرهای cAMP (۱۱)، PKC (۷)، P ۵۳/P۲۱ (۱۲) و wnt (۱۳).

نقص در بیان ژن کلوتو در موش‌ها سبب بروز فنوتیپ‌های چندگانه پیری می‌شود (۶) که شامل هیپوگوناديسم هیپوگوناداوتروپیک، کوچک شدن سریع تیموس (۱۴)، آتروفی پوست، سارکوپنی، کلسیفیکاسیون عروق، استئوپنی (۱۵)، آمفیزم ریوی (۱۶)، نقص شناخت (۱۷)، اختلال شنوایی (۱۸)، تخریب نورون‌ها (۱۹) و مرگ زودرس در حوالی سن ۲ ماهگی می‌باشد. طول عمر موش‌های دچار کمبود کلوتو فقط در حدود ۶-۵ درصد انواع موش‌های وحشی است (۵). در مقابل افزایش بیان ژن کلوتو سبب افزایش طول عمر موش‌ها بین ۳۰-۲۰ درصد شد (۵). همچنین علایم شبه پیری در موش‌های فاقد کلوتو ، با افزایش بیان ژن کلوتو، معکوس شد (۲۰).

ژن کلوتو به طور برجسته‌ای در لوله پیچیده دور و نزدیک کلیه و شبکه مشیمیه مغز (۶) و به مقادیر کمتری در هیپوفیز، پاراتیروئید (۲۱)، پانکراس، تخمدان، بیضه و جفت (۶) بیان می‌شود. پروتئین ترشحی کلوتو در خون، ادرار و مایع مغزی نخاعی از طریق روش ELISA قابل اندازه‌گیری می‌باشد (۲۲). کاهش کلوتو در کلیه، پلاسما، ادرار و مایع مغزی نخاعی با افزایش سن، رخ می‌دهد (۲۳). Semba. در مطالعه خود مشاهده کرد که سالمندان دارای سطح پلاسمایی بالاتر کلوتو در معرض خطر مرگ و میر کمتری نسبت به سالمندان دارای سطح پایین کلوتو، بودند (۲۴). بین واریاسیون‌های مختلف پروتئین کلوتو و طول عمر (۲۵)، بیماری کرونر قلبی، استئوپورز ناشی از سالخوردگی، سکته قلبی مرتبط با افزایش سن (۲۶ و ۲۵) و خطر مرگ و میر (۲۵) در انسان‌ها ارتباط مشاهده شده است.



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]

در طی پیری سطح پروتئین کلوتو و ویتامین D (به علت کاهش توانایی پوست انسان در تولید ویتامین D) کاهش می‌یابد (۲۷). همچنین در مطالعه‌ای مشاهده شد که ژن کلوتو دارای جایگاه VDRE vitamin D response element)(می‌باشد و ۱و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D یا اتصال به دایمر VDR-RXR به VDRE روی ژن متصل شده و سبب بیان ژن کلوتو می‌شود (۲۸). از سوی دیگر کمبود ویتامین D از طریق مکانیسم اپی ژنتیک سبب هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن کلوتو و در نتیجه خاموشی آن می‌شود (۲۷). در بررسی‌های حیوانی مشاهده شده که درمان با ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی D سبب بیان mRNA ژن کلوتو در خط سلولی لوله پیچیده دور کلیه شد (۲۸). بر اساس بررسی متون انجام شده، تا به حال دو مطالعه انسانی تأثیر مکمل ویتامین D را بر پروتئین کلوتو مورد بررسی قرار داده است. این دو مطالعه بر روی بیماران کلیوی که تحت همودیالیز بودند، انجام شده است. در یکی از این مطالعات، مصرف مکمل ویتامین D همبستگی بسیار ضعیفی با سطح کلوتوی بیماران تحت همودیالیز در انتهای مطالعه داشت (۲۹) اما در بررسی دیگر مشاهده کردند که مصرف مکمل ویتامین D سبب کاهش معنی‌دار سطح پروتئین کلوتو در بیماران شد (۳۰). با توجه به اینکه پروتئین کلوتو به طور عمده در کلیه بیان می‌شود، احتمالاً بیان ژن کلوتو در شرکت‌کنندگان این دو مطالعه به علت ابتلا به بیماری کلیوی دچار نقص شده است. به هر حال تا به حال، مطالعه‌ای که اثر مکمل ویتامین D بر روی سالمندان را مورد بررسی قرار دهد، انجام نشده است.

با توجه به شیوع کمبود ویتامین D در ایران و افزایش جمعیت سالمندان ایران در سال‌های آینده، مطالعه حاضر به هدف تعیین اثر مصرف مکمل ویتامین D بر پروتئین کلوتو در سالمندان طراحی شده است، تا احتمالا بتوانیم به پیشگیری از پیری زودرس، بیماری‌های ناشی از آن و کاهش هزینه‌های درمانی در ایران، کمک نماییم.

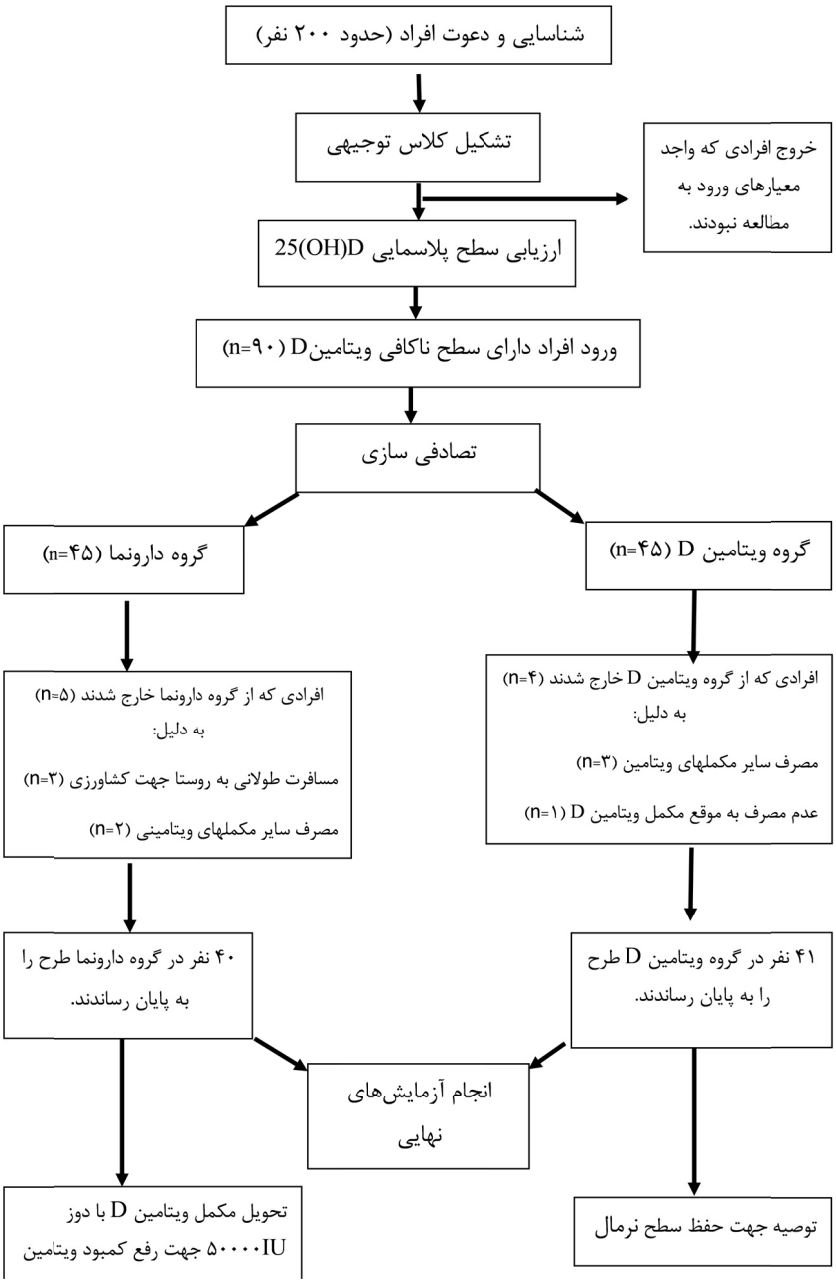
## روش کار

این پژوهش به روش کارآزمایی بالینی تصادفی بر روی افراد سالمند سالم مراجعه‌کننده به کانون سالمندان سراهای محله منطقه ۴ تهران انجام شد. کارآزمایی فوق در تاریخ ۹۴/۰۸/۲۷ در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد IR.IUMS.RES.۱۳۹۴.۹۳۱۳۶۸۰۰۰۲ به تصویب رسیده است. همچنین در سایت IRCT با کد IRCT۲۰۱۵۱۱۱۵۲۷۰۹N۳۶ ثبت شده است. حجم نمونه در این مطالعه با توجه به هدف و بر اساس مطالعه Eric Seibert و همکارانش (۲۹) در هر گروه ۴۰ نفر تعیین شد. با پیش‌بینی ۱۰٪ افت نمونه، تعداد نمونه در هر گروه به ۴۵ نفر افزایش یافت. نهایتاً ۹۰ نفر تعداد کل نمونه‌ها می‌باشد. معیارهای ورود به مطالعه عبارتند از:سن بالای ۶۰ سال، دارای سطح ناکافی ویتامین D (۳۰-۱۰ ng/ml)، تمایل به همکاری در طرح، عدم حساسیت به مکمل ویتامین D، عدم مصرف مکمل مولتی‌ویتامین و مینرال، امگا۳، ویتامین D و روی حداقل در ۳ ماه گذشته، عدم ابتلا به بیماری دیابت، عدم سابقه سکته یا بیماری قلبی عروقی شدید و عدم ابتلا به بیماری‌های کلیوی. معیارهای خروج از مطالعه عبارتند از: استفاده از مکمل امگا۳، مولتی‌ویتامین و کلسیم که حاوی ویتامین D باشد، تغییر میزان مواجهه با نور خورشید بعد از مداخله نسبت به قبل از مداخله، تغییر داروهای مصرفی، عدم مصرف مکمل ویتامین D یا دارونما در زمان مشخص شده و پذیرش نامناسب دارو و بروز هر گونه بیماری. افرادی که تمایل به شرکت در مطالعه را داشتند، بعد از شرکت در کلاس‌های توجیهی و کسب اطلاعات کامل در مورد جزئیات مطالعه، فواید شرکت در مطالعه و تکمیل فرم رضایت‌نامه، به آزمایشگاه نور معرفی شدند و تحت بررسی سطح پلاسمایی ۲۵ هیدروکسی D قرار گرفتند. در نهایت ۹۰ نفر که دارای سطح ناکافی ویتامین D پلاسمایی بودند بر طبق معیارهای ورود به مطالعه، وارد مطالعه شدند.شرکت کنندگان به‌صورت تصادفی مسدود (Blocked randomization) به دو گروه ویتامین D و دارونما تقسیم شدند (نمودار ۱). بر اساس مطالعات پیشین (۳۰) مکمل ۵۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D ساخت شرکت داروسازی زهراوی در اختیار گروه ویتامین D و دارونمای مکمل ویتامین D حاوی پارافین خوراکی، ساخت شرکت داروسازی زهراوی در اختیار گروه دارونما قرار داده شد. از شرکت کنندگان خواسته



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]




**نمودار ۱-** فلوچارت شرکت کنندگان کارآزمایی بالینی تاثیر مکمل ویتامین D بر سالمندی

شد تا به مدت ۱۲ هفته، هفته‌ای یک عدد از مکمل‌ها بعد از ناهار میل کنند و در رژیم غذایی، میزان فعالیت و داروهای مصرفی تغییری ایجاد نکنند. قبل و بعد از مداخله، از هر شرکت‌کننده، پس از ۱۲-۱۴ ساعت ناشتا بودن نمونه خون وریدی گرفته شد. قد، وزن، نمایه توده بدنی و فشارخون آن‌ها اندازه‌گیری شد و پرسشنامه‌های یاد آمد ۲۴ ساعته خوراک، فعالیت بدنی، میزان مواجهه با نور خورشید، مصرف سیگار و دارو تکمیل شدند. بعد از اتمام مطالعه، مکمل ویتامین D مورد نیاز گروه دارونما نیز در اختیار آن‌ها قرار گرفت.

سطح ۲۵ هیدروکسی‌ویتامین D خون به روش Chemiluminescence و به‌وسیله کیت LIAISON ساخت کشور آمریکا و سطح پروتئین کلوتوی پلاسما به‌وسیله کیت ZellBio ساخت کشور آلمان (Intra-Assayو Inter-Assayبه ترتیب ۱۰٪> و ۱۲٪>) و به روش ELISA اندازه‌گیری شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (version 22) استفاده شد. پس از گردآوری اطلاعات در خاتمه پژوهش، برای



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]

تعیین تبعیت داده‌ها از توزیع نرمال، آزمون kolomogrov-Smirnove انجام شد. همچنین پارامترهای پایه با آنالیز Chi-Sqare مورد آنالیز قرار گرفتند.برای محاسبه اختلاف میان متغیرهای کمی با توزیع نرمال در میان گروه‌ها از تست IndependentT Test و در صورتی‌که از توزیع نرمال تبعیت نمی‌کردند از تست Mann-Whitney استفاده شد.برای مقایسه متغیرهای کمی با توزیع نرمال قبل و بعد از مداخله در داخل هر گروه از تست PairedT Test و در صورتیکه از توزیع نرمال تبعیت نکنند از تست Wilcoxon استفاده شد. و در نهایت از تست ANCOVA جهت تعدیل متغیرهای مخدوشگر بهره بردیم. آزمون‌های آماری در سطح معنی‌داری، $p<0/05$ انجام شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های ثبت شده خوراک با استفاده از نرم‌افزار ۴ Nutritionist صورت گرفت.

## یافته‌ها

توزیع افراد از نظر خصوصیات در جداول شماره ۱ و ۲ آورده شده است. از نظر آماری بین دو گروه ویتامین D و دارونما، از نظر جنسیت و سن تفاوت معنی‌داری وجود داشت (به ترتیب $p=0/005$ و $p=0/006$) که به عنوان مخدوش کننده احتمالی در نظر گرفته شدند و اثر آن‌ها بر سایر متغییرها به‌وسیله تست ANCOVA تعدیل شد. سطح فعالیت بدنی، میزان مواجهه با نور خورشید، میزان فشار خون، مصرف سیگار، وزن و شاخص توده بدنی در ۲ گروه ویتامین D و دارونما قبل و بعد از مداخله تفاوت معنی‌داری نداشتند. داروهای مصرفی شرکت کنندگان شامل، آسپیرین، کاهنده چربی خون و کاهنده فشار خون بودند و از نظر آماری بین دو گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری از لحاظ مصرف دارویی مشاهده نشد. تغییرات دریافت‌های

**جدول ۱-** خصوصیات دموگرافیک شرکت کنندگان در مطالعه

| متغیر | گروه | ویتامین D n=۴۱ | شاهد n=۴۰ | p |
|---|---|---|---|---|
| | | (درصد) تعداد | (درصد) تعداد | |
| | زن | ۲۰ (۴۹) | ۳۰ (۷۵) | ۰/۰۵* |
| | مرد | ۲۱ (۵۱) | ۱۰ (۲۵) | |
| | مجموع | ۴۱(۱۰۰) | ۴۰ (۱۰۰) | |
| سیگار | خیر | ۳۹ (۹۵/۱۲) | ۳۹ (۹۷/۵) | ۱/۰۰** |
| | بله | ۲ (۴/۸۷) | ۱ (۲/۵) | |

*اختلاف میان گروه ها با استفاده از آزمون آماری chi-square مورد بررسی قرار گرفت.

** اختلاف میان گروه ها با استفاده از آزمون آماری Fisher's Exact test مورد بررسی قرار گرفت.

**جدول ۲-** سن، وزن و BMI شرکت کنندگن به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

| متغیر | گروه | گروه ویتامین D (n=۴۱) انحراف معیار ± میانگین | گروه دارونما (n=۴۰) انحراف معیار ± میانگین | p |
|---|---|---|---|---|
| | سن (سال) | ۶۹/۷ ± ۴/۲۴ | ۶۷/۳۸ ± ۲/۵۴ | ۰/۰۰۶‡ |
| وزن (Kg) | قبل از مداخله | ۷۷/۹۹ ± ۱۰/۳۴ | ۷۹/۰۳ ± ۱۰/۹۴ | |
| | بعد از مداخله | ۷۸/۳۳ ± ۱۰/۸۲ | ۷۸/۶۴ ± ۱۱/۵۵ | |
| | اختلاف میانگین | ۰/۳۴ ± ۲/۱۸ | −۰/۳۹ ± ۲/۴ | ۰/۲۸۵** |
| | Pvalue* | ۰/۳۲۳ | ۰/۳۱۴ | |
| BMI ($kg/m^2$) | قبل از مداخله | ۲۹/۱۱ ± ۴/۵۱ | ۳۰/۰۵± ۳/۸۵ | |
| | بعد از مداخله | ۲۹/۲۵ ± ۴/۷۷ | ۲۹/۹ ± ۴/۰۳ | |
| | اختلاف میانگین | ۰/۱۴ ± ۲/۱۸ | −۰/۱۵ ± ۰/۹۶ | ۰/۱۲۹** |
| | Pvalue* | ۰/۳۵۲ | ۰/۳۲۱ | |

* اختلاف میانگین داخل هر گروه با استفاده از آزمون آماریPaired T Test مورد بررسی قرار گرفت.

**اختلاف میانگین بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری Independent T Test مورد بررسی قرار گرفت.

‡اختلاف میان گروه‌ها بعد از انجام آزمون kolomogrove-Smirnove و بررسی نرمالیتی، با استفاده از آزمون Mann-Whitney انجام شد.



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]

جدول ۳ – یافته‌های مربوط به غلظت ویتامینD و پروتئین کلوتو

| متغیرها | | گروه | ویتامین D (n=۴۱) انحراف معیار± میانگین | شاهد (n=۴۰) انحراف معیار± میانگین | p* |
|---|---|---|---|---|---|
| ویتامین D (ng/ml) | | قبل از مداخله | ۱۳/۴±۹۲/۵۹ | ۲۶/۵±۰۳/۰۸ | <۰/۰۰۱ |
| | | بعد ازمداخله | ۴۵/۱۱±۷۳/۴۷ | ۲۱/۶±۳۰/۳۰ | <۰/۰۰۱ |
| | | اختلاف میانگین | ۳۱/۱۲±۸۱/۴۰ | −۴/۵±۷۳/۷۷ | <۰/۰۰۱ |
| | | Pvalue** | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | |
| Klotho (ng/ml) | | قبل از مداخله | ۲/۱±۲۹/۵۲ | ۳/۲±۳۹/۱۵ | ۰/۰۰۷ |
| | | بعد از مداخله | ۲/۱±۴۲/۲۹ | ۲/۱±۰۸/۵۲ | ۰/۰۱۴ |
| | | اختلاف میانگین | ۰/۱±۱۳/۰۶ | −۱/۱±۳۱/۹۶ | <۰/۰۰۱ |
| | | Pvalue** | ۰/۱۶۴ | <۰/۰۰۱ | |

*اختلاف میانگین میان گروه ها بعد از انجام آزمون کولموگروف اسمیرنوف و بررسی نرمالیتی، با استفاده از آزمون Mann-Whitney انجام شد.

**اختلاف میانگین داخل هر گروه بعد از انجام آزمون کولموگروف اسمیرنوف و بررسی نرمالیتی، با استفاده از آزمون Wilcoxon انجام شد.

غذایی درشت مغذی‌ها (کربوهیدرات، پروتئین و چربی)، انرژی دریافتی غذایی و ریز مغذی‌ها (کلسیم، فسفر، روی، آهن، منگنز، مس، سلنیوم، ویتامین‌های A، C، D و بتاکاروتن) و فیبر بعد از مداخله بین دو گروه مورد مطالعه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. بعد از مداخله در داخل هر گروه نیز تغییرات معنی‌داری در دریافت‌های غذایی ذکر شده، مشاهده نشد.بین ریز مغذی‌های دریافتی غذایی، فقط میانگین دریافت ویتامین Eغذایی قبل از مداخله، بین گروه دارونما و گروه ویتامین D تفاوت معنی‌داری داشت (p=۰/۰۳۳) و به عنوان مخدوش کننده احتمالی اثر آن بر سایر متغیرها تعدیل شد.کلیه شرکت کنندگان در مطالعه به طور ۱۰۰٪ مکمل‌های ویتامین D و دارونما را مصرف نمودند، فقط یک نفر در گروه ویتامین D به دلیل فراموشی مکمل خود را به درستی مصرف نکرده بود، به همین دلیل از مطالعه خارج گردید.

میانگین سطح پلاسمایی پروتئین کلوتو و ویتامین Dقبل از مداخله بین دو گروه ویتامین Dو دارونما تفاوت معنی‌داری داشت (به ترتیب p=۰/۰۰۷ و p<۰/۰۰۱)، که می تواند به عنوان عامل مخدوش کننده احتمالی بر سایر پارامترهای مطالعه تأثیر گذار باشد، لذا اثر آن‌را به عنوان مخدوش کننده احتمالی در آنالیز کوواریانس تعدیل نمودیم (جدول ۳).

میانگین غلظت پلاسمایی ویتامین D و تغییرات آن بعد از مداخله، بین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت (به ترتیب p<۰/۰۰۱ و p<۰/۰۰۱). میانگین سطح پلاسمایی ویتامین D در گروه ویتامین D بعد از مداخله افزایش معنی‌داری یافت (p<۰/۰۰۱) و در گروه دارونما نیز کاهش معنی‌داری پیدا کرد (p<۰/۰۰۱) (جدول۳).

میانگین غلظت پلاسمایی پروتئین کلوتو بعد از مداخله بین گروه ویتامین D و شاهد تفاوت معنی‌داری داشت (p=۰/۰۱۴)، همچنین بعد از تعدیل اثر متغیرهای مخدوشگر احتمالی، تغییرات غلظت پلاسمایی کلوتو بعد از مداخله بین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱). درحالی‌که در گروه ویتامین D میانگین سطح پلاسمایی کلوتو افزایش پیدا کرد، ولی این افزایش معنی‌دار نشد (p=۰/۱۶۴)، اما میانگین سطح پلاسمایی کلوتو در گروه دارونما بعد از مداخله کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱) (جدول ۳).

## بحث و نتیجه‌گیری

مصرف مکمل ویتامین D در گروه مداخله سبب افزایش معنی‌دار سطح پلاسمایی ویتامین D گردید. میانگین سطح پلاسمایی ویتامین D و تغییرات آن بعد از مداخله بین دو گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری داشت. Eric Seibert (۲۹)، Anas Raed (۳۱) و نیما بازیار (۳۲) مشاهده کردند که مصرف مکمل ویتامین D سبب افزایش معنی‌دار سطح ویتامین D پلاسما در گروه مداخله می‌شود و تغییرات ویتامین D بین دو گروه بعد از مداخله نیز تفاوت معنی‌داری دارد. بنابراین نتایج ذکر شده درگروه ویتامین D در مطالعه ما و مطالعات مذکور همسو بودند. اما در مطالعه ما میانگین سطح پلاسمایی ویتامین D بعد از مداخله در گروه



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]

دارونما کاهش معنی‌داری یافت. در مطالعه Anas Raed (۳۱) مصرف مکمل ویتامین D در گروه دارونما تغییراتی در سطح ویتامین D پلاسما ایجاد نکرد، اما در مطالعه نیما بازیار (۳۲) سطح ویتامینD در گروه دارونما افزایش یافت. نتایج حاصله در گروه دارونما دو مطالعه ذکر شده با مطالعه ما ناهمسو هستند. لازم است به این نکته اشاره کنیم که جذب شرکت کنندگان و شروع مداخله در مطالعه ما در اوایل پاییز آغاز شد و تا اواسط بهار سال بعد به اتمام رسید. بنابراین احتمالا به دلیل کاهش نور خورشید در فصل زمستان و متعاقبا کاهش سنتز پوستی ویتامین D، سطح ویتامین D در گروه دارونما در مطالعه ما کاهش معنی داری یافته است.

در مطالعه حاضر مشاهده شد که میانگین سطح پروتئین کلوتو پلاسما و تغییرات آن بعد از مداخله بین دو گروه مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری داشتند. میانگین سطح پروتئین کلوتو در گروه ویتامین D بعد از مداخله افزایش یافت، ولی این افزایش معنی‌دار نبود، در حالیکه در گروه دارونما کاهش معنی‌داری پیدا کرد.

در مطالعه Eric Seibert (۲۹) مصرف مکمل ویتامین D تاثیری برسطح پروتئین کلوتو در گروه مدخله نداشت و نتیجه حاصله در گروه ویتامین D در این مطالعه با مطالعه ما همسو بود. در مطالعه مذکور سطح پروتئین کلوتو در گروه دارونما نیز تغییرات معنی‌داری پیدا نکرد، نتیجه حاصل در گروه دارونما در این دو مطالعه با هم ناهمسو بودند. حجم نمونه مطالعه Seibert ۳۸ نفر بود که به دو گروه ۱۹ نفره تقسیم شده بودند. احتمالا حجم کم نمونه در این مطالعه سبب معنی‌دار نشدن تغییرات کلوتو در گروه دارونما و در نتیجه ناهمسو شدن نتیجه دو مطالعه گردیده است (۲۸).

نتایج مطالعه Tomasz Hryszko (۳۰) با نتایج مطالعه ما ناهمسو بود.Hryszko در مطالعه خود مشاهده کرد که مصرف مکمل ویتامین D سبب کاهش معنی‌دار سطح پروتئین کلوتو در مصرف کنندگان مکمل ویتامین D گردید. احتمالا دلیل ناهمسو بودن و کاهش پروتئین کلوتو در این مطالعه، فقدان گروه دارونما در این مطالعه می‌باشد. همچنین شرکت کنندگان این مطالعه مبتلا به بیماری کلیوی بودند و اندام اصلی بیان کننده پروتئین کلوتو، کلیه می‌باشد. در نتیجه احتمالا افراد شرکت‌کننده در این مطالعه دچار نقص در تولید پروتئین کلوتو بودند.

در مطالعه Ryan E. Forster (۳۳) مشاهده شد که توالی VDRE در توالی آغازگر ژن کلوتو در انسان و موش وجود دارد. در این مطالعه نشان داده شد که ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D (فرم فعال ویتامین) با اتصال به VDR می تواند سبب بیان ژن کلوتو گردد. البته باید تاکید شود که، در مطالعه ما به علت کمبود بودجه، فقط سطح ۲۵ هیدروکسی ویتامین D ( فرم غیر فعال ویتامین) اندازه‌گیری شد.

در مطالعه سلولی و مولکولی مشاهده شده است که ویتامین D با تنظیم مکانیسم اپی‌ژنتیک باعث بیان ژن‌های هدف می‌شود. دایمر VDR/RXR، هیستون استیل ترانسفرازها را به کار می‌گیرد تا با استیلاسیون ژن‌ها، ساختار کروماتین آن‌ها را برای تسهیل بیان ژن باز کنند. از طرف دیگر ویتامین D متیلاسیون ژن‌های پروموتور را تنظیم می‌کند. متیلاسیون جزایر CPGواقع در منطقه پروموتور ژن‌ها می‌تواند سبب خاموشی ژن‌ها شود (۳۵، ۳۴). بیان ژن کلوتو نیز به‌وسیله متیلاسیون پروموتور ژن آن، خاموش می‌شود. هایپرمتیلاسیون منطقه پروموتور ژن با افزایش سن، افزایش می‌یابد (۳۷، ۳۶). این در حالی است که ویتامین D قادر به ثبات فنوتیپی ژن‌ها است. توانایی ویتامین D در تنظیم اپی‌ژنتیک به‌وسیله اثر آن بر بیان ژن‌های کلیدی دی-متیلازهای DNA می باشد، تا از طریق کاهش متیلاسیون منطقه پروموتور ژن‌ها، سبب افزایش بیان آن‌ها گردد (۳۵، ۳۴). بنابراین، احتمالا به علت کمبود اولیه ویتامین D در گروه ویتامین D در بدو مطالعه، آنزیم‌های هیستون دمتیلاز کاهش یافته‌اند. این امکان وجود دارد که قبل از مداخله، منطقه پروموتور ژن کلوتو مستعد متیلاسیون بوده و یا متیلاسیون پروموتور ژن کلوتو آغاز گشته است. در نتیجه، احتمالا کمبود اولیه ویتامین D در گروه ویتامین قبل از مداخله از طریق مکانیسم اپی‌ژنتیک سبب هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن کلوتو گشته و منجر به خاموشی و کاهش بیان ژن کلوتو گردیده است. لذا در گروه ویتامین D مصرف مکمل ویتامین D سبب افزایش معنی‌دار پروتئین کلوتو نشده است. باید به این نکته دقت شود



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]

که گرچه مصرف مکمل ویتامین D در گروه ویتامین سبب افزایش معنی‌دار پروتئین کلوتو نشده است ولی از کاهش سطح پروتئین که در گروه دارونما رخ داده، پیشگیری نموده است.

Imura (۳۴) در بررسی خود به این نکته اشاره می‌کند که پروتئین کلوتوی بیان شده در سلول‌ها، در سطح سلول‌ها حضور نمی‌یابد، بلکه به طور گسترده‌ای در سیتوپلاسم، رتیکولوم اندوپلاسمیک و دستگاه گلژی قرار می‌گیرد. کلوتو با اتصال به پمپ Na+,K+_ATPase در داخل سلول محبوس می‌شود و در پاسخ به نوسانات کلسیم خارج سلولی، کمپلکس کلوتو و Na+,K+_ATPase به سطح سلول رفته و فرم ترشحی کلوتو وارد فضای خارج سلولی و متعاقباً وارد گردش خون می‌شود. در مطالعه حاضر، با توجه به مطالب فوق، این امکان وجود دارد که مصرف مکمل ویتامین D در گروه مداخله بر بیان ژن کلوتو درون سلول مؤثر بوده ولی پروتئین کلوتوی بیان شده به پمپ Na+,K+_ATPase متصل بوده و در زمان اندازه‌گیری پارامترهای مورد مطالعه در انتهای پژوهش، هنوز به سطح سلول و در نتیجه به داخل خون وارد نشده است. از آنجاییکه در این پژوهش فقط پروتئین کلوتوی محلول در پلاسما مورد بررسی قرار گرفته است، از تأثیر ویتامین بر بیان ژن اطلاعاتی نداریم.

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که مکمل ویتامین D در افراد سالمند، سبب افزایش معنی‌دار سطح پلاسمایی ویتامین D بعد از مداخله در گروه ویتامین Dو کاهش معنی‌دار آن در گروه دارونما گردید. همچنین میانگین سطح پلاسمایی کلوتو و تغییرات آن در پایان مداخله بین دو گروه شرکت‌کننده تفاوت معنی‌داری داشت. مصرف مکمل ویتامینD در گروه مداخله بعد از مداخله تأثیر معنی‌داری بر سطح پروتئین کلوتو ایجاد نکرد، اما در گروه دارونما بعد از مداخله کاهش معنی‌داری در سطح پلاسمایی پروتئین کلوتو ایجاد شد.

در این بررسی به دلیل کمبود بودجه قادر به اندازه‌گیری سطح پلاسمایی ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D نبودیم. لذا پیشنهاد می‌شود در بررسی‌های آتی مشابه مطالعه ما، آزمایش مذکور انجام شود.

## تقدیر و تشکر

لازم است از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که هزینه این مطالعه را ( شماره طرح: ۹۴۰۱۷۷۶۹) به عهده گرفتند تقدیر و تشکر به عمل آوریم.

## References

1. Statistical center of Iran, Selection of the results of general census of population and housing, 1st ed, Tehran, Statistical center of Iran, 1396. P.22. (Persian)
2. Mahan LK, Escoot-Stump S. Krause's food & the nutrition care process. Elsevier Saunders. 2017.
3. Sopjani M, Rinnerthaler M, Kruja J, Dermaku-Sopjani M. Intracellular Signaling of the Aging Suppressor Protein Klotho. Curr Mol Med; 2015. 15: 27-37.
4. Su XM, Yang W. Klotho protein lowered in elderly hypertension. Inter Jl of Clin and Experi Med; 2014. 7(8): 2347-2350.
5. Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. Ageing Res Rev; 2009.8(1): 43-51.
6. Kuro-o MKlotho in health and disease. Curr Opin Nephrol Hypertens; 2012. 21(4): 362-8.
7. Kuro-o M. Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. Trends Endocrinol Metab; 2008. 19(7): 239-45.
8. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature. 2002; 419: 316-321.
9. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aginghormone klotho. J Biol Chem; 2005. 280(45):38029-34.
10. Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF 1 and FGF pathways in human breast cancer. Oncogene; 2008. 27:7094-7105.
11. Rakugi H, Matsukawa N, Ishikawa K, Yang J, Imai M, Ikushima M, et al. Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. Endocrine; 2007. 31(1):82-7.
12. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun; 2006. 339(3):827-32.
13. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. Scince; 2007. 317(5839):803-6.
14. Min D, Panoskaltsis-Mortari A, Kuro-O M, Holländer GA, Blazar BR, Weinberg KI. Sustained



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]

thymopoiesis and improvement in functional immunity induced by exogenous KGF administration in murine models of aging. Blood J abrev; 2007. 109(6): 2529-37.

15. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. Science; 2005. 309(5742): 1829-33.

16. Yu X, Sabbagh Y, Davis SI, Demay MB, White KE. Genetic dissection of phosphate- and vitamin D-mediated regulation of circulating Fgf23 concentrations. Bone; 2005. 36(6): 971-7.

17. Nagai T, Yamada K, Kim HC, Kim YS, Noda Y, Imura A, et al. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice :a role of oxidative stress. Faseb J; 2003. 17(1): 50-2.

18. Kamemori M, Ohyama Y, Kurabayashi M, Takahashi K, Nagai R, Furuya N. Expression of Klotho protein in the inner ear. Hear Res; 2002. 171(1-2): 103-110.

19. Anamizu Y, Kawaguchi H, Seichi A, Yamaguchi S, Kawakami E, Kanda N, et al. Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells. Acta Neuropathol; 2005. 109(5): 457-66.

20. Masuda H, Chikuda H, Suga T, Kawaguchi H, Kuro-o M. Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice. Mech Ageing Dev; 2005. 126(12): 1274-83.

21. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. J Clin Invest; 2007. 117(12):4003-8.

22. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, et al. Secreted Klothoprotein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. FEBS Lett; 2004. 565(1-3): 143-7.

23. Ding HY, Ma HX. Significant roles of anti-aging protein klotho and fibroblast growth factor23 in cardiovascular disease. J Geriatr Cardiol; 2015. 12(4): 439-47.

24. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, et al. Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults. J Gerontol A Biol Sci Med Sci; 2011. 66(7): 794-800.

25. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. Circ Res; 2005. 96(4): 412-8

26. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, et al. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. J Bone Miner Res; 2002. 17(10): 1744-51.

27. Berridge MJ. Vitamin D cell signalling in health and disease. Biochem Biophys Res Commun; 2015. 460(1): 53-71.

28. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Forster R, Saini R, Hsieh JC, et al. The role of vitamin D in the FGF23, klotho, and phosphate bone-kidney endocrine axis. Rev Endocr Metab Disord; 2012. 13(1): 57-69.

29. Seibert E, Heine GH, Ulrich C, Seiler S, Köhler H, Girndt M. Influence of cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients on monocyte subsets: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Nephron Clin Pract; 2013. 123(3-4): 209-19.

30. Hryszko T, Rydzewska-Rosołowska A, Goździkiewicz J, Brzósko S, Koc-Żórawska E, Żelazowska-Rutkowska B, et al. Cholecalciferol supplementation reduces soluble Klotho concentration in hemodialysis patients. Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrzne J; 2013. 123 (6): 277-281.

31. Raed A, Bhagatwala J, Zhu H, Pollock NK, Samip J. Dose responses of vitamin D3 supplementation on arterial stiffness in overweight African Americans with vitamin D deficiency: A placebo controlled randomized trial. Plos One; 2017. 12(12): e0188424.

32. Bazyar N, Jafarian K, Shadman J, Ghorbani M, Khosh Niat Nikoo M, Razi F. The effect of supplementation with vitamin D and insulin resistance in patients with type 2 diabetes with insufficient levels and vitamin D deficiency. Iranian Jof Diabet and Metab; 2014. 13(5): 425-433. (Persian)

33. Forster RE, Jurutka PW, Hsieh JC, Haussler CA, Lowmiller CL, Kaneko I, et al. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. Biochem Biophys Res Commun; 2011. 414(3): 557-62.

34. Fetahu IS, Höbausand J. Vitamin D and the epigenome. FrontierSin; 2014. 5: 164.

35. Pereira F, Barbáchano A, Singh PK, Campbell MJ, Muñoz A, Larriba MJ. Vitamin D has wide regulatory effects on histonedemethylase genes. Cell Cycle; 2012. 11(6):1081-1089.

36. Gwendalyn D, Douglas L, Carmela R. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. Age; 2012. 34:1405–1419.

37. Lee J, Jeong D, Kim J, Lee J, Park J, Chang B, et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target forepigenetic silencing in human cervical carcinoma. Mol Cancer; 2010. 9:109.



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.9.10.9 ]