ORIGINAL ARTICLE

The effect of microalgae chlorella vulgaris supplementation on inflammatory factors in non-alcoholic fatty liver disease: A double-blind randomized clinical trial

Soodabeh Aliashrafi[1],
Mehrangiz Ebrahimi-Mameghani[2],
Farzad Kakaie[3],
Yousef Javadzadeh[4],
Mohammad Asghari Jafarabadi[5]

[1] MSc Student in Nutritional Sciences, Student Research Committee, Department of Nutrition, School of Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2] Associate Professor, Nutrition Research Center, Department of Nutrition in Society, School of Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Surgery, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4] Professor, Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[5] Assistant Professor, Medical Education Research Center, Department of Statistics and Epidemiology, School of Health, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received September 15, 2013; Accepted April 14, 2014)

Abstract

Background and purpose: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the chronic liver diseases. Microalgaeas, a functional food and prebiotic agent, is considered as a new approach in the treatment of NAFLD. Therefore, this study aimed to assess the effect of microalgae chlorella vulgaris (C. Vulgaris) supplementation on inflammatory factors in patients with NAFLD.

Materials and methods: This double-blind randomized placebo-controlled clinical trial was conducted on 70 NAFLD patients confirmed by ultrasonography and liver enzymes level. The subjects were randomly allocated into two groups: (1) "Intervention" (n = 35) who received 400 mg/d vitamin E plus four 300 mg tablets of C. vulgaris, and (2) "placebo" who received 400 mg/d vitamin E and four placebo tablets per day for eight weeks. Weight, dietary data and fasting serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), hs-CRP, and tumor necrosis factor α (TNF-α) were assessed at baseline and after 8 weeks.

Results: Weight, ALT and ALP significantly were decreased in both groups after the intervention ($P < 0.001$). There were significant reductions in AST and hs-CRP in the intervention group ($P < 0.001$). Intra-group changes in TNF-α level was statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion: C. vulgaris supplementation could improve liver function through decreasing weight, liver enzymes and hs-CRP concentrations after 8 weeks.

Keywords: Chlorella vulgaris, non-alcoholic fatty liver disease, inflammatory factors, liver enzymes

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(112): 113-21 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۲ اردیبهشت سال ۱۳۹۳ (۱۲۱-۱۱۳)

تأثیر مکمل‌یاری میکروجلبک کلرلا ولگاریس بر عوامل التهابی در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی: کارآزمایی بالینی دو سوکور

سودابه علی اشرفی[۱]
مهرانگیز ابراهیمی ممقانی[۲]
فرزاد کاکایی[۳]
یوسف جوادزاده[۴]
محمد اصغری جعفرآبادی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری کبد چرب غیر الکلی (Non alcoholic fatty liver disease یا NAFLD) یکی از بیماری‌های مزمن کبدی است. امروزه استفاده از میکروجلبک‌ها به عنوان مواد غذایی فراویژه و پری‌بیوتیک رویکرد جدید در درمان این بیماری می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر میکروجلبک کلرلا ولگاریس (Chlorella vulgaris یا C. vulgaris) بر عوامل التهابی در بیماران مبتلا به NAFLD بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت کارآزمایی بالینی تصادفی دو سوکور و بر روی ۷۰ بیمار مبتلا به NAFLD تأیید شده با یافته‌های سونوگرافی انجام شد. افراد به طور اختصاصی به دو گروه تقسیم شدند؛ گروه مداخله (۳۵ نفر) روزانه چهار مکمل ۳۰۰ میلی‌گرمی و گروه دارونما (۳۵ نفر) روزانه چهار عدد دارونما به مدت ۸ هفته دریافت کردند. افراد در هر دو گروه روزانه یک عدد قرص ۴۰۰ میلی‌گرمی ویتامین E نیز دریافت نمودند. وزن و دریافت غذایی و سطح آلانین آمینوترانسفراز (Alanine transaminase یا ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (Aspartate aminotransferase یا AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP یا Alkaline phosphatase)، TNF-α (Tumor necrosis factor alpha) و hs-CRP (High-sensitivity C-reactive protein) در سرم ناشتا قبل و پس از پایان مداخله ارزیابی شد.

یافته‌ها: وزن، سطح ALT و ALP در دو گروه مورد مطالعه کاهش معنی‌داری یافت ($P < ۰/۰۰۱$). پس از مداخله، AST و hs-CRP (هر دو $P < ۰/۰۰۱$) فقط در گروه مداخله کاهش نشان داد. در انتهای مطالعه تفاوت معنی‌دار بین‌گروهی در سطح TNF-α وجود داشت.

استنتاج: مکمل C. vulgaris می‌تواند سبب بهبود عملکرد کبد از طریق کاهش وزن، سطوح آنزیم‌های کبدی و عامل التهابی hs-CRP گردد.

واژه‌های کلیدی: کلرلا ولگاریس، کبد چرب غیر الکلی، عوامل التهابی، آنزیم‌های کبدی

مقدمه

کبد چرب غیر الکلی (Non alcoholic fatty liver disease یا NAFLD) بیماری خاموشی است (۱) که در دنیای امروز به عنوان یکی از معضلات سلامتی مطرح می‌باشد (۲). شیوع NAFLD در جمعیت عمومی بین ۳۵-۱۰ درصد (۳)، در آسیا ۳۰-۵ درصد (۴) و در کودکان ۱۰ درصد گزارش شده است

مولف مسئول: مهرانگیز ابراهیمی ممقانی – تبریز: خیابان گلگشت، خیابان عطار نیشابوری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز E-mail: ebrahimimamagani@tbzmed.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه تغذیه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم تغذیه، گروه تغذیه در جامعه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳. دانشیار، گروه جراحی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات آموزش پزشکی، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۱۰/۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱/۲۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

(۵). NAFLD طیفی از علایم بالینی و پاتولوژیک از یک استئاتوز (Steatosis) کبدی ساده تا استئاتوهپاتیت غیر الکلی، فیبروز، سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار را در برمی‌گیرد (۶). اصلی‌ترین عوامل خطر همراه NAFLD شامل چاقی، دیابت، بالا بودن چربی خون (Hyperlipidemia) و سندرم متابولیک است (۷). مهم‌ترین فرضیه در پاتوژنز این بیماری، تئوری دو ضربه‌ای (Two hit) نام دارد. در ضربه اول مقاومت به انسولین سبب تجمع چربی در سلول‌های کبدی می‌شود (۸) و در ضربه دوم، سیتوکین‌های پیش التهابی و التهابی دخیل هستند (۹). از بین عوامل التهابی، TNF-α (Tumor necrosis factor alpha) مهم‌ترین سیتوکین تولید شده در ضربه دوم است و در پیشرفت بیماری از مرحله استئاتوز تا استئاتوهپاتیت نقش مهمی دارد (۱۰). از سوی دیگر، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که hs-CRP (High-sensitivity C-reactive protein) یک مارکر مستقل با حساسیت بالا برای NAFLD است و حتی می‌توان از آن برای غربالگری بیماران مبتلا به NAFLD در جمعیت عمومی استفاده کرد (۱۱).

در حال حاضر درمان قطعی و مؤثری برای NAFLD وجود ندارد و همین مسأله منجر به ارایه روش‌های مختلف درمانی شده است که هیچ یک هنوز مورد توافق همه صاحب‌نظران قرار نگرفته است (۹). بنا به اعلام سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization)، ۲۵-۲۰ درصد بار بیماری‌های مزمن با شیوه زندگی به ویژه رژیم غذایی مرتبط است؛ بنابراین استفاده از رویکردهای تغذیه‌ای به عنوان یکی از گزینه‌های درمانی برای بیماری‌های مزمنی مانند NAFLD مطرح می‌باشد (۱۲). به تازگی غذاهای فراویژه مورد توجه قرار گرفته‌اند و اثرات سودمند آن‌ها در برخی از مطالعات مشاهده شده است (۱۳).

کلرلا، جلبک سبز تک سلولی یوکاریوتی (تک هسته‌ای) ساکن آب‌های شیرین و یکی از غذاهای فراویژه و پری‌بیوتیک در کل جهان به ویژه در کشورهای آسیایی از جمله کره، ژاپن و تایوان است و به عنوان Good food شناخته می‌شود (۱۴) و به صورت پودر، عصاره و قرص تهیه می‌گردد (۱۵). کلرلا منبع خوبی از پروتئین، ویتامین‌های محلول در چربی، کولین، فیبر و مواد معدنی ضروری است. کلرلا به طور تقریبی حاوی ۶۷-۵۵ درصد پروتئین می‌باشد که دارای همه اسیدآمینه‌ها به غیر از متیونین و تیروزین است و از نظر خواص تغذیه‌ای و مقدار اسید آمینه شبیه تخم‌مرغ است (۱۴). دیواره سلولی کلرلا از سلولز و همی‌سلولز تشکیل شده است (۱۶) و حاوی ۴-۱ درصد کلروفیل و ۱۸-۹ درصد فیبر می‌باشد (۱۷).

گونه خاصی از کلرلا با نام علمی کلرلا ولگاریس (Chlorella vulgaris یا C. vulgaris) در تحقیقات و مطالعات حیوانی و انسانی بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است که ارزش تغذیه‌ای آن بین سال‌های ۶۰-۱۹۵۰ شناسایی شد (۱۸). افزایش سرعت رشد، افزایش تولید سیتوکین‌ها (۱۹)، تقویت عملکرد ایمنی (۲۲-۲۰)، پیشگیری از زخم‌های ناشی از استرس و اختلال چربی خون (Dyslipidemia) القا شده توسط رژیم غذایی پرچرب از جمله عملکردهای C.vulgaris است (۲۳).

کارآزمایی بالینی با مکمل‌یاری ۱۲۰۰ میلی‌گرم C.vulgaris به مدت ۳ ماه در بیماران مبتلا به NAFLD منجر به کاهش معنی‌دار وزن گردید (۲۴). تاکنون مطالعه‌ای تأثیر مکمل C.vulgaris را بر عوامل التهابی در بیماران مبتلا به NAFLD بررسی نکرده است. با توجه به افزایش روزافزون NAFLD و اهمیت نقش عوامل التهابی در پاتوژنز این بیماری و اثرات سودمند غذاهای فراویژه از جمله میکروجلبک‌ها، بررسی تأثیر این میکروجلبک در بیماران مبتلا به NAFLD اهمیت بسزایی دارد؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر C.vulgaris بر عوامل التهابی در بیماران مبتلا به NAFLD انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع کارآزمایی بالینی تصادفی کنترل‌دار دو سوکور بود که بر روی ۷۰ بیمار مبتلا به NAFLD تأیید شده با سونوگرافی و سطح آنزیم‌های کبدی انجام شد. بیماران از

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

بین مراجعه کنندگان به کلینیک شیخ‌الرئیس دانشگاه علوم پزشکی تبریز در سال ۹۱-۱۳۹۰ انتخاب شدند. مطالعه حاضر مورد تأیید کمیته اخلاق پزشکی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز قرار گرفت و در مرکز ثبت کارآزمایی‌های بالینی ایران نیز ثبت گردید. معیارهای ورود به مطالعه شامل تأیید ابتلا به NAFLD از طریق سونوگرافی و آزمایشگاهی، داشتن سن ۵۰-۲۰ سال، نمایه توده بدن بیش از ۳۰ کیلوگرم بر مجذور متر و سطح فعالیت متوسط بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل مصرف الکل، بارداری، شیردهی، ورزشکار بودن، بستری بودن، سابقه ابتلا به پرفشاری خون، بیماری ریوی، بیماری کلیوی، انجام پیوند کبد، ابتلا به سایر بیماری‌ها و اختلالات مزمن یا حاد کبدی (هپاتیت B، C، عفونت‌های کبدی و...)، داشتن بیماری صفراوی، بیماری‌های خودایمنی شناخته شده، سرطان، اختلالات ارثی مؤثر بر وضعیت کبد (بیماری ذخیره‌ای آهن و مس و...) و یا مصرف برخی داروها مانند کنترل کننده‌های فشار خون، استاتین‌ها (کاهنده‌های کلسترول خون)، افزاینده‌های حساسیت انسولینی، داروهای هپاتوتوکسیک، قرص‌های ضد بارداری و استروژن بود.

جهت برآورد حجم نمونه از مطالعه Lee و همکاران استفاده شد (۲۴). آنزیم SOD (Superoxide dismutases) به دلیل داشتن بزرگ‌ترین انحراف معیار، ملاک برآورد حجم نمونه قرار گرفت (توان ۹۰ درصد و سطح اطمینان ۰/۹۵).

$$N = ۲۶ \text{ و } \alpha = ۰/۰۵ ،\beta = ۰/۹$$

$$N = (Z_{۱-\alpha} + Z_{۱-B})^۲ (S_۱ + S_۲)^۲/(m_۱-m_۲)^۲$$

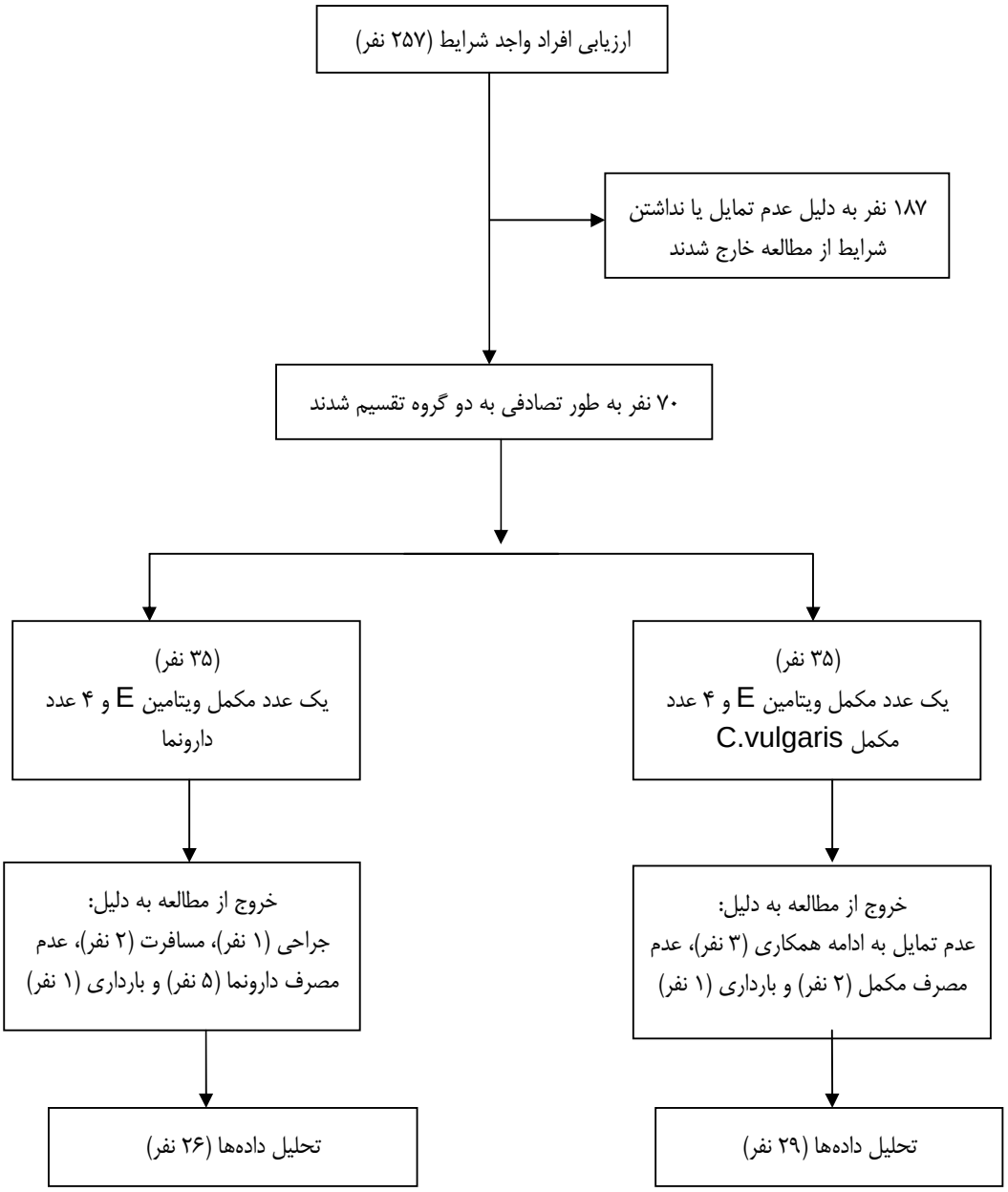
با توجه به احتمال ریزش، حجم نمونه در هر گروه ۳۵ نفر در نظر گرفته شد.

هدف و روش اجرای پژوهش در ابتدای مطالعه به بیماران توضیح داده شد و در صورت تمایل جهت شرکت در مطالعه، رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. برای هر یک از افراد شرکت کننده در مطالعه پرسش‌نامه فردی شامل ویژگی‌های جمعیتی، اجتماعی و تاریخچه بیماری تکمیل شد. وزن هر بیمار بدون کفش با حداقل لباس و با استفاده از ترازوی (Germany) Seca به ترتیب با دقت ۰/۱ سانتی‌متر و ۰/۱ کیلوگرم اندازه‌گیری گردید. دریافت غذایی افراد با استفاده از پرسش‌نامه ثبت غذایی ۳ روزه (دو روز معمول و یک روز تعطیل هفته) ارزیابی شد و توسط نرم‌افزار Nutritionist نسخه ۴ تعدیل شده بر اساس غذای ایرانیان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

سپس بیماران با استفاده از طراحی بلوک‌های تصادفی به دو گروه مداخله و دارونما تقسیم شدند. افراد در هر دو گروه روزانه یک عدد قرص ۴۰۰ میلی‌گرمی ویتامین E دریافت نمودند. به علاوه، افراد گروه مداخله روزانه چهار عدد قرص مکمل ۳۰۰ میلی‌گرمی C.vulgaris (یک عدد قبل از صبحانه، دو عدد قبل از ناهار و یک عدد قبل از شام) و افراد گروه دارونما به طور دقیق در همان زمان و به همان تعداد قرص دارونما مصرف کردند (تصویر شماره ۱). مکمل و دارونما از نظر اندازه و رنگ شبیه هم بودند. مکمل C.vulgaris با نام تجاری آلگومد (Algomed) از شرکت فردای سبز ایرانیان تهیه شد. برای تهیه دارونما از رنگ‌های مجاز داروسازی و از اکسیپیان‌ها (موادی که از نظر فارماکولوژیک بی‌اثر هستند، مانند میکروکریستالین، سلولز، لاکتوز، نشاسته و منیزیم استئارات) استفاده شد. برای دو سوکورسازی (محقق و بیماران) بسته‌بندی مکمل و دارونما در یک شکل و رنگ و اندازه توسط فرد دیگری انجام شد و در پاکت‌های مشابه شماره‌گذاری شده قرار گرفت. پس از تجویز مکمل‌ها، بیماران هر دو هفته یک‌بار جهت ویزیت، تجویز داروها و اطمینان از مصرف داروها مراجعه می‌نمودند.

نمونه خون وریدی بیماران پس از ۱۴-۱۲ ساعت ناشتایی اخذ و پس از جداسازی سرم در میکروتیوب ۱ میلی‌لیتری ریخته شد و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. آنزیم‌های ALT (Alanine transaminase)، AST (Aspartate aminotransferase) و ALP (Alkaline phosphatase) به روش فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی (IFCC یا International Federation of Clinical Chemistry) و کیت پارس آزمون (ساخت ایران)، hs-CRP به روش ایمنوتوربیدومتری و کیت پارس آزمون (ساخت ایران) و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]



تصویر شماره ۱: نحوه انتخاب بیماران

TNF-α بـه روش ELISA و کیـت Diasource (سـاخت مکزیک) اندازه‌گیری شد. در مورد تمام بیماران سـونوگرافی کبـد در ابتـدا و انتهـای مطالعـه توسـط یـک سونوگرافیسـت و بـا یـک دستگاه جهت بررسی وضعیت اکوژنیسیته کبدی و اسـتئاتوز انجـام گرفت. اندازه‌گیری‌های تن‌سنجی، دریافت غذایی، خـون‌گیـری و سونوگرافی در انتهای مطالعه تکرار گردید. نرم‌افـزار SPSS نسـخه ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) بـرای تحلیـل داده‌هـا مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت. توزیـع داده‌هـا بـا آزمـون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. کلیـه داده‌هـای کمـی در صورت نرمال بـودن بـه صـورت میـانگین و انحـراف معیـار ارایه گردید. برای مقایسه میانگین داده‌ها بـین گـروه مداخلـه و دارونما در صورت نرمال بودن و با تعـدیل روی مقـادیر قبـل از مداخلـه، تحلیـل کوواریـانس، بـرای مقایسـه درون گروهـی از آزمون Paired t و جهت ارتباط داده‌های کیفی با یکـدیگر از

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

آزمون χ^2 استفاده شد.

برای ارزیابی درصد تغییرات متغیرها نیز از رابطه زیر استفاده گردید:

۱۰۰ × اندازه ابتدای مطالعه/ اندازه ابتدای مداخله – اندازه انتهای مداخله

یافته‌ها

از ۷۰ بیمار شرکت کننده در مطالعه، ۵۵ نفر (۲۹ نفر در گروه مداخله و ۲۶ نفر در گروه دارونما) مطالعه را به پایان رساندند. میانگین و انحراف معیار سن در گروه مداخله ۷/۴ ± ۳۷/۰ سال و در گروه دارونما ۸/۲ ± ۳۷/۷ سال بود. ویژگی‌های دموگرافیک بیماران مورد مطالعه در جدول شماره ۱ ارایه شده است. جنسیت نیمی از بیماران، زن و بیشتر متأهل بودند. مقایسه سن، جنس، وضعیت تأهل، سطح تحصیلات، سطح فعالیت بدنی و شدت کبد چرب در دو گروه تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد.

جدول شماره ۱: ویژگی‌های دموگرافیک بیماران در ابتدای مطالعه

متغیر	مداخله (۲۹ نفر) تعداد (درصد)	دارونما (۲۶ نفر) تعداد (درصد)	P*
جنس (مرد)	۱۵ (۵۱/۸)	۱۵ (۵۱/۸)	۰/۸۸۷
متأهل	۲۷ (۹۳/۱)	۲۳ (۸۸/۵)	۰/۶۵۹
تحصیلات			
زیر دیپلم	۸ (۲۵/۷)	۱۴ (۵۳/۸)	۰/۷۴۴
دیپلم و بالاتر	۲۱ (۷۲/۴)	۱۲ (۴۶/۲)	
سطح فعالیت بدنی			
سبک	۱۱ (۳۷/۹)	۱۱ (۴۲/۳)	۰/۸۷۰
متوسط	۷ (۲۴/۱)	۸ (۳۰/۸)	
سنگین	۱۱ (۳۷/۹)	۷ (۲۶/۹)	
شدت کبد چرب			
خفیف	۱۴ (۴۸/۳)	۱۷ (۶۵/۴)	۰/۷۴۴
متوسط	۱۳ (۴۴/۸)	۸ (۳۰/۸)	
شدید	۲ (۶/۹)	۱ (۳/۸)	

* آزمون χ^2

دریافت انرژی و درشت مغذی‌های دو گروه مورد مطالعه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. بین دو گروه مورد مطالعه از لحاظ میزان دریافت انرژی و درشت مغذی‌ها در ابتدا، پایان هفته چهارم و پایان هفته هشتم مطالعه اختلاف معنی‌داری یافت نشد ($P > ۰/۰۵۰$) و تنها در گروه مداخله در طول ۸ هفته مقدار کربوهیدرات دریافتی کاهش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵۰$).

جدول شماره۲: میانگین و انحراف معیار دریافت روزانه انرژی و درشت مغذی‌ها در دو گروه مورد مطالعه (ابتدا، پایان هفته چهارم و پایان هفته هشتم مطالعه)

متغیرها	مداخله (۲۹ نفر)	دارونما (۲۶ نفر)	P*
انرژی (کیلوگرم)			
پایه	۱۹۷۴/۹۹ ± ۴۲۴/۰۲	۲۰۰۷/۹۹ ± ۵۸۴/۲۲	۰/۸۱۰
هفته چهارم	۱۹۵۰/۰۰ ± ۳۸۷/۰۰	۱۹۷۸/۰۰ ± ۵۴۵/۰۰	۰/۹۴۲
هفته هشتم	۱۹۴۴/۰۰ ± ۳۷۰/۰۰	۱۹۶۹/۰۰ ± ۵۵۰/۰۰	۰/۸۴۰
P**	۰/۱۷۱	۰/۰۶۳	
کربوهیدرات (گرم)			
پایه	۲۹۱/۱۰ ± ۸۳/۲۱	۲۴۸/۰۴ ± ۹۴/۹۶	۰/۰۷۹
هفته چهارم	۲۷۵/۸۶ ± ۷۹/۵۱	۲۳۷/۷۹ ± ۹۲/۳۵	۰/۸۱۲
هفته هشتم	۲۶۴/۰۱ ± ۷۰/۳۳	۲۴۸/۰۱ ± ۷۰/۳۳	۰/۴۰۹
P**	۰/۰۰۲	۰/۷۶۹	
چربی (گرم)			
پایه	۵۴/۷۵ ± ۱۶/۵۱	۵۸/۳۰ ± ۲۳/۴۹	۰/۵۱۶
هفته چهارم	۵۲/۹۰ ± ۱۷/۹۱	۵۷/۷۷ ± ۲۲/۸۱	۰/۳۵۵
هفته هشتم	۶۴/۰۱ ± ۷۰/۳۳	۵۸/۰۰ ± ۲۲/۵۰	۰/۰۶۰
P**	۰/۰۶۴	۰/۶۵۷	
پروتئین (گرم)			
پایه	۷۲/۲۲ ± ۱۷/۴۹	۶۷/۳۰ ± ۲۳/۵۵	۰/۳۸۸
هفته چهارم	۷۱/۷۰ ± ۱۷/۹۷	۶۶/۹۷ ± ۲۴/۰۷	۰/۷۶۳
هفته هشتم	۷۱/۶۹ ± ۱۵/۹۲	۶۷/۱۰ ± ۲۳/۷۲	۰/۹۷۹
P**	۰/۶۷۹	۰/۷۷۳	
فیبر (گرم)			
پایه	۱۵/۲۴ ± ۵/۲۵	۱۳/۵۹ ± ۴/۵۵	۰/۲۲۵
هفته چهارم	۱۴/۶۶ ± ۵/۸۱	۱۳/۶۶ ± ۴/۸۳	۰/۷۸۲
هفته هشتم	۱۴/۱۶ ± ۴/۴۲	۱۴/۹۸ ± ۶/۰۴	۰/۲۰۱
P**	۰/۲۳۶	۰/۳۴۴	

* آزمون Independent t

** آزمون Repeated measures

سطح عوامل بیوشیمیایی سرم در دو گروه قبل و بعد از مداخله در جدول شماره ۳ آمده است. در طول مطالعه وزن در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

هر دو گروه (مداخله و دارونما) کاهش معنی‌داری یافت، اما میزان کاهش در گروه مداخله بیشتر از گروه دارونما بود (P < ۰/۰۰۱). در انتهای مطالعه نیز از بین شاخص‌های تن‌سنجی فقط در وزن تفاوت معنی‌داری بین گروه مداخله و دارونما مشاهده گردید (P < ۰/۰۵۰).

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار وزن و شاخص‌های بیوشیمیایی در دو گروه مورد مطالعه

متغیرها	مداخله (۲۹ نفر) میانگین ± انحراف معیار	دارونما (۲۶ نفر) میانگین ± انحراف معیار	P*
وزن (کیلوگرم)			
قبل از مداخله	۸۶/۲۱ ± ۱۰/۷۴	۸۹/۵۰ ± ۱۳/۸۷	۰/۳۲۷
بعد از مداخله	۸۲/۶۰ ± ۱۱/۱۵	۸۷/۳۴ ± ۱۳/۳۳	۰/۰۱۰
درصد تغییرات	-۴/۲۶ ± ۲/۰۵	-۲/۳۶ ± ۱/۶۰	۰/۰۱۰
P**	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	
آلانین آمینوترانسفراز (واحد بین‌الملل بر لیتر)			
قبل از مداخله	۴۳/۵۹ ± ۲۲/۸۰	۴۲/۶۲ ± ۲۳/۷۱	۰/۸۷۸
بعد از مداخله	۳۹/۳۸ ± ۱۸/۳۲	۳۶/۸۸ ± ۲۲/۸۳	۰/۱۵۴
درصد تغییرات	-۲۶/۶۰ ± ۱۹/۷۵	-۳/۹۳ ± ۶۲/۴۸	۰/۱۵۴
P**	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد بین‌الملل بر لیتر)			
قبل از مداخله	۲۹/۱۴ ± ۱۲/۱۹	۲۸/۶۹ ± ۱۲/۳۴	۰/۸۹۴
بعد از مداخله	۲۱/۹۳ ± ۹/۰۱	۲۵/۶۲ ± ۱۰/۶۵	۰/۱۸۸
درصد تغییرات	-۲۰/۸۹ ± ۴۱/۲۱	-۳/۳۷ ± ۴۴/۴۶	۰/۱۸۸
P**	۰/۰۰۱	۰/۰۷۰	
آلکالین فسفاتاز (واحد بین‌الملل بر لیتر)			
قبل از مداخله	۱۸۸/۵۹ ± ۵۵/۳۱	۱۹۴/۱۵ ± ۷۰/۲۱	۰/۷۴۴
بعد از مداخله	۱۵۸/۷۹ ± ۵۲/۷۲	۱۹۱/۵۰ ± ۶۳/۱۳	۰/۰۴۰
درصد تغییرات	-۱۴/۸۵ ± ۱۸/۰۷	۰/۸۰ ± ۱۸/۹۰	۰/۰۴۰
P**	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	
hs-CRP (میلی‌گرم بر لیتر)			
قبل از مداخله	۲/۹۶ ± ۲/۹۹	۳/۲۹ ± ۳/۲۴	۰/۲۵۳
بعد از مداخله	۲/۰۶ ± ۲/۲۱	۳/۴۱ ± ۳/۸۹	۰/۰۲۴
درصد تغییرات	-۲۳/۰۴ ± ۳۵/۹۸	۵/۶۶ ± ۷۶/۴۳	۰/۰۲۴
P**	< ۰/۰۰۱	۰/۴۴۰	

* آزمون ANCOVA

** آزمون Paired t

hs-CRP: High sensivity-C Reactive protein;
TNF-α: Tumor necrosis factor alpha

در گروه مداخله، غلظت آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP در پایان هفته هشتم نسبت به زمان شروع مطالعه کاهش معنی‌داری داشت (P < ۰/۰۰۱). در گروه دارونما غلظت ALT و ALP در طول مطالعه کاهش معنی‌داری را نشان داد (P < ۰/۰۰۱). بعد از مداخله از بین آنزیم‌های کبدی فقط در ALP بین دو گروه مورد بررسی کاهش معنی‌داری مشاهده شد (P < ۰/۰۵۰). میزان hs-CRP در گروه مداخله کاهش معنی‌داری را نشان داد (P < ۰/۰۰۱). در مقایسه با گروه دارونما در انتهای مطالعه، کاهش معنی‌داری در سطح TNF-α مشاهده گردید (P < ۰/۰۵۰).

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین مکمل‌یاری C.vulgaris بر عوامل التهابی در بیماران مبتلا به NAFLD انجام گرفت. در این مطالعه، ارزیابی دریافت غذایی انرژی و درشت مغذی‌ها به عنوان عوامل مخدوشگر نشان دهنده تغییر معنی‌دار در کربوهیدرات در گروه مداخله بود که اثر مخدوش کنندگی آن در ارایه نتایج با استفاده از آزمون تحلیل کوواریانس تعدیل گردید. از این‌رو در بحث عوامل بیوشیمیایی، اثر عوامل غذایی به صورت کنترل شده می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر حاکی از کاهش معنی‌دار وزن در هر دو گروه بود که این کاهش در گروه مداخله در مقایسه با دارونما از نظر آماری معنی‌دار مشاهده شد (۱/۶۴ ± ۳/۶۰ کیلوگرم در برابر ۱/۵۱ ± ۲/۱۵ کیلوگرم). بررسی منابع موجود منتشر شده در ارزیابی اثر C.vulgaris بر وزن، تنها به یک مطالعه انسانی محدود می‌شود که در این مطالعه مکمل‌یاری ۱۲۰۰ میلی‌گرم C.vulgaris به مدت ۳ ماه در بیماران مبتلا به NAFLD منجر به کاهش معنی‌دار وزن گردید (۲۵) که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد. تاکنون مکانیسم عملکرد C. vulgaris بر کاهش شاخص‌های تن‌سنجی ناشناخته باقی مانده است که احتمال دارد به دلیل وجود ترکیبات پلی‌فنولی موجود در C. vulgaris باشد. به هر حال کاهش وزن به ترکیبات پلی‌فنولی موجود در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

C.vulgaris نسبت داده می‌شود. پلی‌فنول‌ها از طریق چند مسیر آنزیمی دخیل در متابولیسم انرژی، مسیرهای آنابولیک را مهار و مسیرهای کاتابولیک را فعال می‌کنند. به عنوان مثال آنزیم استیل کوآکربوکسیلاز، اسید چرب سنتتاز و هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآ ردوکتاز مهار می‌شود و سنتز و تجمع چربی کاهش می‌یابد و با تنظیم افزایشی کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز ۱، بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب افزایش و گلیسرول ۳ فسفات آسیل ترانسفراز ۱ از استریفیکاسیون اسیدهای چرب کاهش می‌یابد و از تبدیل آن‌ها به تری‌گلیسرید جلوگیری می‌کند (۲۸-۲۶).

پلی‌فنول‌ها اثر مهاری بر لیپاز پانکراسی دارد و از جذب چربی در روده جلوگیری می‌کنند و نیز با کاهش بیان ژن PPARγ (Peroxisome proliferatoractivated receptors) -که از فاکتورهای رونویسی بافت چربی است- از تمایز پری-آدیپوسیت‌ها (Pre-adipocyte) به آدیپوسیت‌ها جلوگیری می‌کند (۲۹).

در مطالعه حاضر بعد از ۸ هفته مداخله، سطوح آنزیم‌های کبدی در دو گروه کاهش یافت که با نتایج مطالعات موجود در این زمینه متناقض می‌باشد. در دو مطالعه حیوانی مکمل‌یاری با C. vulgaris در موش‌ها، تغییری در سطوح ALT و AST ایجاد نشد (۳۰، ۲۳)؛ در حالی که در تنها مطالعه انسانی موجود توسط Panahi و همکاران با مکمل‌یاری ۱۲۰۰ میلی‌گرم در روز C. vulgaris به مدت ۳ ماه در بیماران مبتلا به NAFLD، کاهش سطح ALT و AST مشاهده گردید (۲۵). علت تفاوت‌های موجود در مطالعات می‌تواند ناشی از تفاوت‌های موجود در روش‌شناسی مطالعه، طول مدت مداخله، دوز و نوع ماده مداخله باشد.

یافته‌های مطالعه حاضر حاکی از آن است که مکمل‌یاری C. vulgaris به مدت ۸ هفته باعث کاهش معنی‌دار hs-CRP گردید؛ در صورتی که بر خلاف گروه دریافت کننده مداخله، میزان hs-CRP در گروه دارونما افزایش غیر معنی‌داری یافت. در مطالعه حاضر مکمل‌یاری C. vulgaris به مدت ۸ هفته باعث کاهش غیر معنی‌دار در سطوح TNF-α شد؛ در صورتی که در گروه دریافت کننده دارونما افزایش غیر معنی‌دار TNF-αمشاهده گردید. در مقایسه با گروه دارونما در انتهای مطالعه، کاهش معنی‌داری در سطح TNF-α وجود داشت. مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که به بررسی تأثیر مکمل‌یاری C. vulgaris بر وضعیت التهابی در بیماران مبتلا به NAFLD پرداخت. همچنین به علت عدم وجود مطالعه مشابه انسانی در این زمینه، مقایسه و بحث با مطالعات حیوانی صورت گرفت. بر اساس مطالعه Aizzat و همکاران، گاواژ ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم C. vulgaris به موش‌های مبتلا به دیابت در طول ۴ هفته تغییری در سطوح TNF-α ایجاد نکرد که احتمال دارد به دلیل کوتاه بودن طول دوره مداخله باشد (۳۱).

در یک مطالعه حیوانی ماده بیولوژی کلرلا-۱۱پپتید (والین، اسید گلوتامیک، سیستئین، تیروزین، گلیسین، پرولین، آسپاراژین، آرژنین، پرولین، گلوتامین، فنیل آلانین) سطوح m-RNA (Messenger ribonucleic acid)، نیتریک اکسید، NF-kappaB، TNF-α و پروستاگلاندین E۲ را در موش‌های دارای التهاب کاهش داد (۳۲). مطالعات نشان داده است که C.vulgaris با کاهش فعالیت گلوتاتیون-S-ترانسفراز و نیز با کاهش هم‌زمان فعالیت سیکلواکسیژناز و ترومبوکسان A۲ سنتتاز می‌تواند از تولید واسطه‌های التهابی جلوگیری کند (۳۳). همچنین این میکروجلبک با جلوگیری از بیان NF-kappaB و متعاقب آن با ممانعت از فعالیت TACE (TNF-alpha converting enzymes)، سطح TNF-α را کاهش دهد (۳۴).

پروتئین تیروزین فسفاتاز (SHP۲) در مسیرهای سیگنالینگ بیشتر سیتوکین‌ها و گیرنده فاکتور رشد بیان می‌شود. افزایش سنتز این آنزیم به عنوان یکی از عوامل دخیل در التهاب عروق، افزایش رشد تومور و ایجاد متاستاز معرفی شده است. استفاده از مهار کننده‌های پروتئین کینازها نیز یکی از اهداف درمانی مهم در کاهش التهاب مزمن محسوب می‌شود. مطالعات نشان داده است که مصرف این میکروجلبک با کاهش میزان SHP۲ در سلول‌ها و با ممانعت از فعالیت برخی پروتئین کینازهای مهم در پاتولوژی التهاب مزمن، باعث

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

کاهش التهاب می‌گردد (۳۵).

در مجموع مکمل‌یاری ۱۲۰۰ میلی‌گرم C. vulgaris به مدت ۳ ماه می‌تواند سبب کاهش وزن، کاهش آنزیم‌های کبدی و hs-CRP بدون تغییر در سطوح TNF-α در بیماران مبتلا به NAFLD شود. انجام مطالعات مشابه با طول دوره مداخله طولانی‌تر و حجم نمونه بیشتر و دوز بالای C.vulgaris می‌تواند ارزیابی دقیق‌تری از تأثیر C.vulgaris در بیماران مبتلا به NAFLD ارایه نماید.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، با وجود برآورد حجم نمونه بر اساس معدود مطالعات انسانی منتشر شده با ارزیابی متغیرهای دیگر، شاید بتوان کمی حجم نمونه و نیز دوره کوتاه مطالعه (۸ هفته) را مطرح نمود که با انجام مطالعات دارای نمونه بیشتر و با مدت طولانی‌تر می‌توان نتایج کاربردی بهتری را به دست آورد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات علوم تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز به دلیل حمایت مالی و از شرکت فردای سبز ایرانیان (تهران، ایران) به دلیل تهیه مکمل کلرلا ولگاریس اعلام می‌دارند. مقاله حاضر از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد و طرح پژوهشی کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز استخراج گردید.

References

1. Duvnjak M, Tomasic V, Gomercic M, Smircic DL, Barsic N, Lerotic I. Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status. J Physiol Pharmacol 2009; 60(Suppl 7): 57-66.
2. Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Ann Hepatol 2009; 8(Suppl 1): S4-S8.
3. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. Pediatrics 2006; 118(4): 1388-93.
4. Khedmat H, Fallahian F, Abolghasemi H, Hajibeigi B, Attarchi Z, Alaeddini F, et al. Serum gamma-glutamyltransferase, alanine aminotransferase, and aspartate aminotransferase activity in Iranian healthy blood donor men. World J Gastroenterol 2007; 13(6): 889-94.
5. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology 2004; 40(6): 1387-95.
6. Ong JP, Younossi ZM. Approach to the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. Clin Liver Dis 2005; 9(4): 617-34, vi.
7. Setji TL, Holland ND, Sanders LL, Pereira KC, Diehl AM, Brown AJ. Nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic Fatty liver disease in young women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(5): 1741-7.
8. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. Q J Med 2010; 103(2): 71-83.
9. Lam BP, Younossi ZM. Treatment regimens for non-alcoholic fatty liver disease. Ann Hepatol 2009; 8(Suppl 1): S51-S59.
10. Ono M, Okamoto N, Saibara T. The latest idea in NAFLD/NASH pathogenesis. Clinical Journal of Gastroenterology 2010; 3(6): 263-70.
11. Riquelme A, Arrese M, Soza A, Morales A, Baudrand R, Perez-Ayuso RM, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and its association with obesity, insulin resistance and increased serum levels of C-reactive protein in Hispanics. Liver Int 2009; 29(1): 82-8.
12. Yasutake K, Kohjima M, Nakashima M, Kotoh K, Nakamuta M, Enjoji M. Nutrition therapy for liver diseases based on the status of nutritional intake. Gastroenterol Res Pract 2012; 2012: 859697.
13. Park HEA, Bruno RS. Hepatoprotective activities of green tea in nonalcoholic fatty liver disease. Agro FOOD Indusrty Hi Tech 2010; 21(1): 37-41.
14. Jeong H, Kwon HJ, Kim MK. Hypoglycemic effect of Chlorella vulgaris intake in type 2 diabetic Goto-Kakizaki and normal Wistar rats. Nutr Res Pract 2009; 3(1): 23-30.
15. Mizoguchi T, Arakawa Y, Kobayashi M, Fujishima M. Influence of Chlorella powder intake during swimming stress in mice. Biochem Biophys Res Commun 2011; 404(1): 121-6.
16. Son YA, Shim JA, Hong S, Kim MK. Intake of Chlorella vulgaris improves antioxidative capacity in rats oxidatively stressed with dietary cadmium. Ann Nutr Metab 2009; 54(1): 7-14.
17. Hasegawa T, Noda K, Kumamoto S, Ando Y, Yamada A, Yoshikai Y. Chlorella vulgaris culture supernatant (CVS) reduces psychological stress-

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

induced apoptosis in thymocytes of mice. Int J Immunopharmacol 2000; 22(11): 877-85.
18. Janczyk P, Langhammer M, Renne U, Guiard V, Souffrant WB. Effect of feed supplementation with Chlorella vulgaris powder on mice reproduction. Archiva Zootechnica 2006; 9: 122-34.
19. Queiroz ML, Bincoletto C, Valadares MC, Dantas DC, Santos LM. Effects of Chlorella vulgaris extract on cytokines production in Listeria monocytogenes infected mice. Immunopharmacol Immunotoxicol 2002; 24(3): 483-96.
20. Wang H, Pan J, Chen C, Chiu C, Yang M, Chang H, et al. Identification of anti-lung cancer extract from Chlorella vulgaris C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. Process Biochemistry 2010; 45(12): 1865-72.
21. Hasegawa T, Matsuguchi T, Noda K, Tanaka K, Kumamoto S, Shoyama Y, et al. Toll-like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from Chlorella vulgaris. Int Immunopharmacol 2002; 2(4): 579-89.
22. An HJ, Choi HM, Park HS, Han JG, Lee EH, Park YS, et al. Oral administration of hot water extracts of Chlorella vulgaris increases physical stamina in mice. Ann Nutr Metab 2006; 50(4): 380-6.
23. Lee HS, Park HJ, Kim MK. Effect of Chlorella vulgaris on lipid metabolism in Wistar rats fed high fat diet. Nutr Res Pract 2008; 2(4): 204-10.
24. Lee SH, Kang HJ, Lee HJ, Kang MH, Park YK. Six-week supplementation with Chlorella has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. Nutrition 2010; 26(2): 175-83.
25. Panahi Y, Ghamarchehreh ME, Beiraghdar F, Zare R, Jalalian HR, Sahebkar A. Investigation of the effects of Chlorella vulgaris supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial. Hepatogastroenterology 2012; 59(119): 2099-103.
26. Wolfram S, Raederstorff D, Wang Y, Teixeira SR, Elste V, Weber P. TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. Ann Nutr Metab 2005; 49(1): 54-63.
27. Nakazato K, Song H, Waga T. Effects of dietary apple polyphenol on adipose tissues weights in Wistar rats. Exp Anim 2006; 55(4): 383-9.
28. Lin J, Della-Fera MA, Baile CA. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. Obes Res 2005; 13(6): 982-90.
29. Meydani M, Hasan ST. Dietary Polyphenols and Obesity. Nutrients 2010; 2(7): 737-51.
30. Kim YJ, Kwon S, Kim MK. Effect of Chlorella vulgaris intake on cadmium detoxification in rats fed cadmium. Nutr Res Pract 2009; 3(2): 89-94.
31. Aizzat O, Yap SW, Sopiah H, Madiha MM, Hazreen M, Shailah A, et al. Modulation of oxidative stress by Chlorella vulgaris in streptozotocin (STZ) induced diabetic Sprague-Dawley rats. Adv Med Sci 2010; 55(2): 281-8.
32. Cherng JY, Liu CC, Shen CR, Lin HH, Shih MF. Beneficial effects of Chlorella-11 peptide on blocking LPS-induced macrophage activation and alleviating thermal injury-induced inflammation in rats. Int J Immunopathol Pharmacol 2010; 23(3): 811-20.
33. Cheng FC, Feng JJ, Chen KH, Imanishi H, Fujishima M, Takekoshi H, et al. Chlorella powder inhibits the activities of peptidase cathepsin S, PLA2, cyclooxygenase-2, thromboxane synthase, tyrosine phosphatases, tumor necrosis factor-alpha converting enzyme, calpain and kinases. Int J Food Sci Nutr 2009; 60(Suppl 1): 89-98.
34. Park JY, Cho HY, Kim JK, Noh KH, Yang JR, Ahn JM, et al. Chlorella dichloromethane extract ameliorates NO production and iNOS expression through the down-regulation of NF kappa B activity mediated by suppressed oxidative stress in RAW 264.7 macrophages. Clin Chim Acta 2005; 351(1-2): 185-96.
35. Cheng FC, Lin A, Feng JJ, Mizoguchi T, Takekoshi H, Kubota H, et al. Effects of chlorella on activities of protein tyrosine phosphatases, matrix metalloproteinases, caspases, cytokine release, B and T cell proliferations, and phorbol ester receptor binding. J Med Food 2004; 7(2): 146-52.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]