

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

Soodabeh Aliashrafi¹,
Mehrangiz Ebrahimi-Mameghani²,
Farzad Kakaie³,
Yousef Javadzadeh⁴,
Mohammad Asghari Jafarabadi⁵

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

تأثیر مکمل یاری میکروجلبک کلرلا ولگاریس بر عوامل التهابی در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی: کار آزمایی بالینی دو سوکور

سودابه علی اشرفی^۱

مهرانگیز ابراهیمی ممقانی^۲

فرزاد کاکایی^۳

یوسف جوادزاده^۴

محمد اصغری جعفر آبادی^۵

چکیده

سابقه و هدف: بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD یا Non alcoholic fatty liver disease) 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 میلی گرمی 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 میلی گرمی ویتامین E نیز دریافت نمودند. وزن و دریافت غذایی و سطح آلانین آمینوترانسفراز (Alanine transaminase یا ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (Aspartate aminotransferase یا AST)، آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase یا ALP)، 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 ($P < 0/001$). پس از مداخله، AST و hs-CRP (هر دو $P < 0/001$) فقط در گروه مداخله کاهش نشان داد. در انتهای مطالعه تفاوت معنی‌دار بین گروهی 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

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

کبد چرب غیر الکلی (Non alcoholic fatty liver disease) یا NAFLD بیماری خاموشی است (۱) که در دنیای امروز به

E-mail: ebrahimimamagani@tbzmed.ac.ir

مؤلف مسئول: مهرانگیز ابراهیمی ممقانی - تبریز: خیابان گلگشت، خیابان عطاری نیشابوری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

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: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵

(۵). NAFLD طیفی از علایم بالینی و پاتولوژیک از یک استئاتوز (Steatosis) کبدی ساده تا استئاتوهپاتیت غیر الکلی، فیروز، سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار را در برمی گیرد (۶). اصلی ترین عوامل خطر همراه NAFLD شامل چاقی، دیابت، بالا بودن چربی خون (Hyperlipidemia) و سندرم متابولیک است (۷). مهم ترین فرضیه در پاتوژنز این بیماری، تئوری دو ضربه ای (Two hit) نام دارد. در ضربه اول مقاومت به انسولین سبب تجمع چربی در سلول های کبدی می شود (۸) و در ضربه دوم، سیتو کین های پیش التهابی و التهابی دخیل هستند (۹). از بین عوامل التهابی، $TNF-\alpha$ (Tumor necrosis factor alpha) مهم ترین سیتو کین 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 داده اند که hs-CRP (High-sensitivity C-reactive protein) یک مارکر مستقل با حساسیت بالا برای NAFLD است و حتی می توان 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 روش های مختلف درمانی شده است که هیچ یک هنوز مورد توافق همه صاحب نظران قرار نگرفته است (۹). بنا به اعلام سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization)، ۲۵-۲۰ درصد بار بیماری های مزمن با شیوه زندگی به ویژه رژیم غذایی مرتبط است؛ بنابراین استفاده از رویکردهای تغذیه ای به عنوان یکی از گزینه های درمانی برای بیماری های مزمنی مانند NAFLD مطرح می باشد (۱۲). به تازگی غذاهای فراویژه مورد توجه قرار گرفته اند و اثرات سودمند آن ها در برخی از مطالعات مشاهده شده است (۱۳).

کلرلا، جلبک سبز تک سلولی یوکاریوتی (تک هسته ای) ساکن آب های شیرین و یکی از غذاهای فراویژه و پری بیوتیک در کل جهان به ویژه در کشورهای آسیایی از جمله کره، ژاپن و تایوان است و به عنوان Good food شناخته می شود (۱۴) و به صورت پودر، عصاره و قرص تهیه

می گردد (۱۵). کلرلا منبع خوبی از پروتئین، ویتامین های محلول در چربی، کولین، فیبر و مواد معدنی ضروری است. کلرلا به طور تقریبی حاوی ۶۷-۵۵ درصد پروتئین می باشد که دارای همه اسید آمینه ها به غیر از متیونین و تیروزین است و از نظر خواص تغذیه ای و مقدار اسید آمینه شبیه تخم مرغ است (۱۴). دیواره سلولی کلرلا از سلولز و همی سلولز تشکیل شده است (۱۶) و حاوی ۴-۱ درصد کلروفیل و ۱۸-۹ درصد فیبر می باشد (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 تغذیه ای آن بین سال های ۶۰-۱۹۵۰ شناسایی شد (۱۸). افزایش سرعت رشد، افزایش تولید سیتو کین ها (۱۹)، تقویت عملکرد ایمنی (۲۲-۲۰)، پیشگیری از زخم های ناشی از استرس و اختلال چربی خون (Dyslipidemia) القا شده توسط رژیم غذایی پرچرب از جمله عملکردهای *C.vulgaris* است (۲۳).

کار آزمایی بالینی با مکمل یاری ۱۲۰۰ میلی گرم *C.vulgaris* به مدت ۳ ماه در بیماران مبتلا به NAFLD منجر به کاهش معنی دار وزن گردید (۲۴). تاکنون مطالعه ای 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 میکرو جلبک ها، بررسی تأثیر این میکرو جلبک 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 روش ها

این مطالعه از نوع کار آزمایی بالینی تصادفی کنترل دار دو سو کور بود که بر روی ۷۰ بیمار مبتلا به NAFLD تأیید شده با سونوگرافی و سطح آنزیم های کبدی انجام شد. بیماران از

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).

$$N = 26 \text{ و } \alpha = 0.05, \beta = 0.9$$

$$N = (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2 (S_1 + S_2) / (m_1 - m_2)^2$$

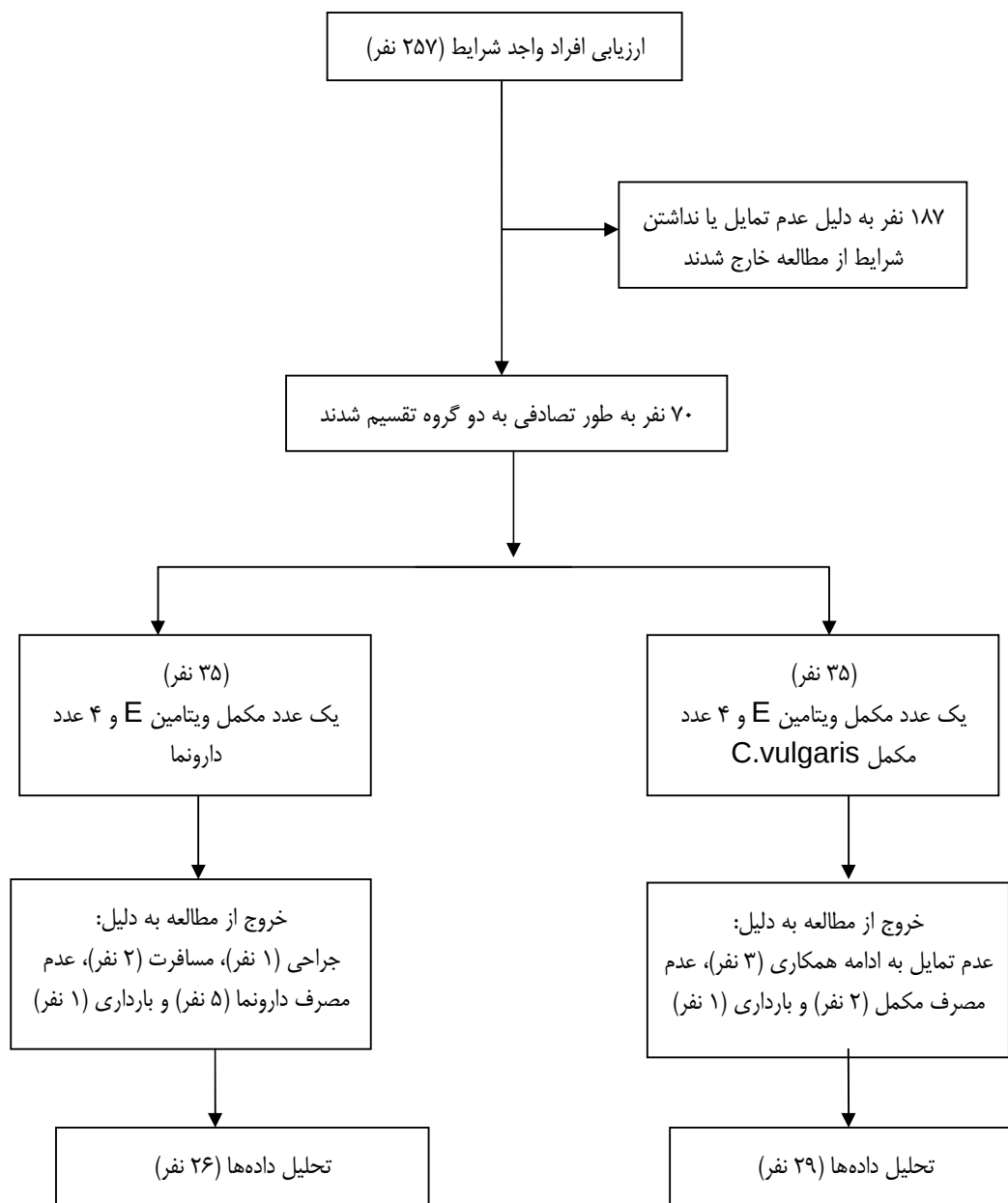
با توجه به احتمال ریزش، حجم نمونه در هر گروه ۳۵ نفر در نظر گرفته شد.

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 تاریخیچه 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 میلی گرمی ویتامین E دریافت نمودند. به علاوه، افراد گروه مداخله روزانه چهار عدد قرص مکمل ۳۰۰ میلی گرمی *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 بی اثر 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 شماره گذاری 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 میلی لیتری ریخته شد و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد 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 آمون (ساخت ایران)، hs-CRP به روش ایمونوتوربیدومتری و کیت پارس آمون (ساخت ایران) و



تصویر شماره ۱: نحوه انتخاب بیماران

داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. توزیع داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. کلیه داده‌های کمی در صورت نرمال بودن به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه گردید. برای مقایسه میانگین داده‌ها بین گروه مداخله و دارونما در صورت نرمال بودن و با تعدیل روی مقادیر قبل از مداخله، تحلیل کوواریانس، برای مقایسه درون گروهی از آزمون Paired t و جهت ارتباط داده‌های کیفی با یکدیگر از

TNF- α به روش ELISA و کیت Diasource (ساخت مکزیک) اندازه‌گیری شد. در مورد تمام بیماران سونوگرافی کبد در ابتدا و انتهای مطالعه توسط یک سونوگرافست و با یک دستگاه جهت بررسی وضعیت اکوتیسته کبدی و استئاتوز انجام گرفت. اندازه‌گیری‌های تن‌سنجی، دریافت غذایی، خون‌گیری و سونوگرافی در انتهای مطالعه تکرار گردید. نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) برای تحلیل

آزمون χ^2 استفاده شد.

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

$$100 \times \text{اندازه ابتدای مطالعه} / \text{اندازه ابتدای مداخله} - \text{اندازه انتهای مداخله}$$

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 $37/0 \pm 7/4$ سال و در گروه دارونما $37/7 \pm 8/2$ 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)		P*
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
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

مطالعه از لحاظ میزان دریافت انرژی و درشت مغذی‌ها در ابتدا، پایان هفته چهارم و پایان هفته هشتم مطالعه اختلاف معنی‌داری یافت نشد ($P > 0/050$) و تنها در گروه مداخله در طول ۸ هفته مقدار کربوهیدرات دریافتی کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/050$).

جدول شماره ۲: 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	$1974/99 \pm 424/02$	$2007/99 \pm 584/22$	۰/۸۱۰
هفته چهارم	$1950/00 \pm 387/00$	$1978/00 \pm 545/00$	۰/۹۴۲
هفته هشتم	$1944/00 \pm 370/00$	$1969/00 \pm 550/00$	۰/۸۴۰
P**	۰/۱۷۱	۰/۰۶۳	
کربوهیدرات (گرم)			
پایه	$291/10 \pm 83/21$	$248/04 \pm 94/96$	۰/۰۷۹
هفته چهارم	$275/86 \pm 79/51$	$237/79 \pm 92/35$	۰/۸۱۲
هفته هشتم	$264/01 \pm 70/33$	$248/01 \pm 70/33$	۰/۴۰۹
P**	۰/۰۰۲	۰/۷۶۹	
چربی (گرم)			
پایه	$54/75 \pm 16/51$	$58/30 \pm 23/49$	۰/۵۱۶
هفته چهارم	$52/90 \pm 17/91$	$57/77 \pm 22/81$	۰/۳۵۵
هفته هشتم	$64/01 \pm 70/33$	$58/00 \pm 22/50$	۰/۰۶۰
P**	۰/۰۶۴	۰/۶۵۷	
پروتئین (گرم)			
پایه	$72/22 \pm 17/49$	$67/30 \pm 23/55$	۰/۳۸۸
هفته چهارم	$71/70 \pm 17/97$	$66/97 \pm 24/07$	۰/۷۶۳
هفته هشتم	$71/69 \pm 15/92$	$67/10 \pm 23/72$	۰/۹۷۹
P**	۰/۶۷۹	۰/۷۷۳	
فیبر (گرم)			
پایه	$15/24 \pm 5/25$	$13/59 \pm 4/55$	۰/۲۲۵
هفته چهارم	$14/66 \pm 5/81$	$13/66 \pm 4/83$	۰/۷۸۲
هفته هشتم	$14/16 \pm 4/42$	$14/98 \pm 6/04$	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

دریافت انرژی و درشت مغذی‌های دو گروه مورد مطالعه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. بین دو گروه مورد

هر دو گروه (مداخله و دارونما) کاهش معنی داری یافت، اما میزان کاهش در گروه مداخله بیشتر از گروه دارونما بود ($P < 0/001$). در انتهای مطالعه نیز از بین شاخص‌های تن سنجی فقط در وزن تفاوت معنی داری بین گروه مداخله و دارونما مشاهده گردید ($P < 0/050$).

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

متغیرها	مداخله (۲۹ نفر)		دارونما (۲۶ نفر)		P*
	میانگین ± انحراف معیار		میانگین ± انحراف معیار		
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 بین الملل 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		
آسپاراتات آمینوترانسفراز (واحد بین الملل 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 بین الملل 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 (میلی گرم 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 sensitivity-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 معنی داری داشت ($P < 0/001$). در گروه دارونما غلظت ALT و ALP در طول مطالعه کاهش معنی داری را نشان داد ($P < 0/001$). بعد از مداخله از بین آنزیم‌های کبدی فقط در ALP بین دو گروه مورد بررسی کاهش معنی داری مشاهده شد ($P < 0/050$). میزان hs-CRP در گروه مداخله کاهش معنی داری را نشان داد ($P < 0/001$). در مقایسه با گروه دارونما در انتهای مطالعه، کاهش معنی داری در سطح TNF- α مشاهده گردید ($P < 0/050$).

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 معنی دار در کربوهیدرات در گروه مداخله بود که اثر مخدوش کنندگی آن در ارایه نتایج با استفاده از آزمون تحلیل کوواریانس تعدیل گردید. از این رو در بحث عوامل بیوشیمیایی، اثر عوامل غذایی به صورت کنترل شده می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر حاکی از کاهش معنی دار وزن در هر دو گروه بود که این کاهش در گروه مداخله در مقایسه با دارونما از نظر آماری معنی دار مشاهده شد ($3/60 \pm 1/64$ کیلوگرم در برابر $2/15 \pm 1/51$ 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 میلی گرم C.vulgaris به مدت ۳ ماه در بیماران مبتلا به NAFLD منجر به کاهش معنی دار وزن گردید (۲۵) که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد. تاکنون مکانیسم عملکرد C. vulgaris بر کاهش شاخص‌های تن سنجی ناشناخته باقی مانده است که احتمال دارد به دلیل وجود ترکیبات پلی فنولی موجود در C. vulgaris باشد. به هر حال کاهش وزن به ترکیبات پلی فنولی موجود در

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 گلو تاریل کوآ ردوکتاز مهار می‌شود و سنتز و تجمع چربی کاهش می‌یابد و با تنظیم افزایشی کارنیتین پالمیتویل ترانسفراز ۱، بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب افزایش و گلیسرول ۳ فسفات 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 PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated 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 دریافت‌کننده 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 دریافت‌کننده دارونما افزایش غیر معنی‌دار TNF- α مشاهده 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، گاو 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-۱۱ پپتید (والین، اسید گلو تامیک، سیستین، تیروزین، گلیسین، پرولین، آسپاراژین، آرژنین، پرولین، گلو ت آمین، فیل آلانین) سطوح mRNA (Messenger ribonucleic acid)، نیتریک اکسید، TNF- α ، NF-kappaB و پروستاگلاندین E $_2$ را در موش‌های دارای التهاب کاهش داد (۳۲). مطالعات نشان داده است که *C. vulgaris* با کاهش فعالیت گلو ت اتیون-S- ترانسفراز و نیز با کاهش هم‌زمان فعالیت سیکلواکسیژناز و ترومبوکسان A $_2$ سنتتاز می‌تواند از تولید واسطه‌های التهابی جلوگیری کند (۳۳). همچنین این میکرو جلیک 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 میکرو جلیک با کاهش میزان SHP۲ در سلول‌ها و با ممانعت از فعالیت برخی پروتئین کینازهای مهم در پاتولوژی التهاب مزمن، باعث

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.

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 $TNF-\alpha$ 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 ارائه نماید.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، با وجود برآورد حجم نمونه بر اساس محدود 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

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 Indusrtly 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-

- 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, Sopia 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.