ORIGINAL ARTICLE

The Effect of Microalgae Chlorella Vulgaris Supplementation on Lipid Profile and Lipid Peroxidation in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Double- blind randomized Clinical Trial

Mehrangiz Ebrahimi-Mameghani[1],
Soodabeh Aliashrafi[2],
Manouchehr Khoshbaten[3],
Bahareh Allahverdi Mamaghani[4]

[1] Associate Professor, Nutrition Research Center, Faculty of Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2] MSc Student in Nutritional Sciences, Student Research Committee, Nutrition Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3] Professor, Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4] PhD Student in Plant Physiology, School of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

(Received June 6, 2013 ; Accepted August 11, 2013)

Abstract

Background and purpose: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common type of liver disease. Using functional food such as microalgae is a new approach for improvement of metabolic disorders and oxidative stress in these patients. This study aimed at assessing the effect of microalgae Chlorella vulgaris (C.Vulgaris) supplementation on lipid profile and lipid peroxidation in NAFLD patients.

Material & Methods: This double-blind randomized placebo-controlled clinical trial was conducted in 70 patients with NAFLD (whose diseas was confirmed by ultrasonograohy). The subjects were randomly allocated into 2 groups of intervention (n=35) who received 400 mg/day vitamin E plus four 300 mg tablets of C.vulgaris before breakfast and the placebo who were given 400 mg/day vitamin E and four placebo tablets per day for eight weeks. Anthropometric measurements and biochemical parameters including total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), Triglyceride (TG), Malondialdehyde (MDA), Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST), and Alkaline phosphatase (ALP), were assessed at baseline and end of week eight.

Results: In both groups after eight weeks the weight, TC, LDL-c, TG, ALT, ALP, and MDA decreased significantly ($P<0.001$), but HDL-c increased significantly ($P=0.04$). AST significantly declined in intervention group ($P<0.001$). The mean changes in weight, MDA and ALP between the two groups reached statistically significant levels ($P<0.05$).

Conclusion: The results of this trial indicate *C.vulgaris* supplementation could decrease weight, MDA and improve lipid profile as well as liver function in patients with NAFLD.

(Clinical Trials Registry Number: IRCT201202233320N7)

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, Chlorella vulgaris, lipid profile, lipid peroxidation

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(105): 9-18 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۵ مهر سال ۱۳۹۲ (۱۸-۹)

تاثیر مکمل یاری میکروجلبک کلرلا ولگاریس بر الگوی لیپیدی و پراکسیداسیون لیپیدی بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی: کارآزمایی بالینی دو سو کور

مهرانگیز ابراهیمی ممقانی[۱]
سودابه علی اشرفی[۲]
منوچهر خوشباطن[۳]
بهاره الهوردی ممقانی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری کبد چرب غیر الکلی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های کبدی بوده و استفاده از غذاهای فراویژه هم‌چون میکروجلبک‌ها رویکرد جدید در بهبود اختلالات متابولیک و استرس اکسیداتیو در این بیماران است. لذا هدف از این مطالعه ارزیابی اثر مکمل یاری کلرلا ولگاریس *(C.vulgaris)* بر الگوی لیپیدی و پراکسیداسیون لیپیدی در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی بوده است.

مواد و روش‌ها: مطالعه کارآزمایی بالینی تصادفی دو سو کور حاضر بر روی ۷۰ بیمار مبتلا به کبد چرب غیر الکلی (تأیید شده با یافته‌های سونوگرافی) صورت گرفت. افراد به طور تصادفی به دو گروه تخصیص یافتند: "*گروه مداخله*" (۳۵ نفر) روزانه ۱ عدد قرص ۴۰۰ میلی‌گرمی ویتامین E و ۴ مکمل ۳۰۰ میلی‌گرمی مکمل C.vulgaris و "*گروه دارونما*" (۳۵ نفر) روزانه ۱ عدد ویتامین E و ۴ عدد دارونما به مدت ۸ هفته دریافت کردند. قبل و بعد از مداخله، اندازه‌گیری‌های وزن و ارزیابی‌های بیوشیمیایی شامل کلسترول تام، کلسترول LDL، کلسترول HDL، تری‌گلیسرید، پراکسیداسیون لیپید، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز در ابتدا و انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در پایان هفته هشتم، وزن، غلظت کلسترول تام، کلسترول LDL، تری‌گلیسرید، پراکسیداسیون لیپید، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز، کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) و کلسترول HDL افزایش معنی‌دار (p=۰/۰۴) در هر دو گروه داشت. آسپارتات آمینوترانسفراز فقط در گروه مداخله کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) یافت. در انتهای مطالعه وزن و پراکسیداسیون لیپید بین دو گروه تفاوت معنی‌دار نشان داد (p<۰/۰۵).

استنتاج: یافته‌های مطالعه حاضر حاکی از آن است که مکمل یاری C.vulgaris می‌تواند سبب کاهش وزن، پراکسیداسیون لیپید بهبود الگوی لیپیدی و عملکرد کبد شود.

شماره ثبت کارآزمایی بالینی: IRCT ۲۰۱۲۰۲۲۳۳۲۰ N۷

واژه های کلیدی: کبد چرب غیر الکلی، کلرلا ولگاریس، الگوی لیپیدی، پر اکسیداسیون لیپیدی

مقدمه

بیماری کبد چرب غیر الکلی (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) به عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قرن حاضر بوده و طبق تعریف، به تجمع چربی در کبد به میزان بیش از

مولف مسئول: سودابه علی اشرفی- تبریز: خیابان گلگشت، خیابان عطار نیشابوری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز E-mail:sa.nut89@yahoo.com
۱. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم تغذیه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات علوم تغذیه، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳. استاد، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴. دانشجوی دکترای تخصصی فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۳/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۴/۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۵/۲۰

۵ تا ۱۰ درصد وزن کبد اطلاق می‌شود(۳- ۱). شیوع NAFLD در جمعیت عمومی بین ۱۰ تا ۳۵ درصد(۴) و در جمعیت ایران ۳ تا ۲۴ درصد(۵) گزارش شده است. NAFLD طیفی از بیماری‌های بالینی می‌باشد که سبب‌شناسی آن از استئاتوز کبدی ساده تا استئوهپاتیت غیرالکلی، سیروز و کارسینوم کبدی را شامل می‌شود(۶). تقریباً ۹۰ درصد بیماران مبتلا به NAFLD یکی از اختلالات سندرم متابولیک را دارند. به همین دلیل کبد چرب به عنوان تظاهرات کبدی سندرم متابولیک شناخته می‌شود(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). در ضربه دوم استرس اکسیداتیو نقش دارد که با سیتوکین‌های پیش التهابی شروع شده و مقاومت انسولینی و آسیب کبدی را تشدید می‌کند(۹). مطالعات بالینی متعدد، محصولات سیتوتوکسیک پراکسیداسیون لیپیدها از جمله مالون دی آلدئید را در کبد بیماران NAFLD شناسایی نموده‌اند این محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها، اثرات پیش التهابی داشته و سبب آسیب عملکرد سلولی می‌شود(۱۰،۱۱).

در حال حاضر درمان قطعی و مؤثری برای NAFLD وجود ندارد. درمان‌های کنونی رایج بر مسیرهای مختلفی که در پاتوژنز این بیماری دخیل هستند متمرکز شده‌اند. رویکردهای متعدد هم‌چون رژیم، ورزش، عمل جراحی و دارودرمانی جهت درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۲). در این میان رویکردهای تغذیه‌ای می‌تواند به عنوان یکی از گزینه‌های درمانی مطلوب مطرح باشد(۱۳). از این رو غذاهای فراویژه به دلیل دارا بودن اثرات سودمند آن‌ها بر التهاب، مقاومت انسولینی، چاقی و استرس اکسیداتیو توجه زیادی را به خود جلب کرده است(۱۴).

میکروجلبک‌ها منابع با ارزشی از عوامل پری‌بیوتیک می‌باشند(۱۵). کلرلا (*Chlorella*)- نوعی جلبک سبز تک سلولی- منبع خوبی از پروتئین، ویتامین‌های محلول در چربی، کولین، فیبر و مواد معدنی ضروری بوده(۱۶،۱۷) و امروزه به عنوان یکی از غذاهای فراویژه در کل جهان شناخته می‌شود(۱۸). کلرلا ولگاریس (*C.vulgaris*) که ارزش تغذیه‌ای آن در بین سال‌های ۱۹۵۰ تا ۱۹۶۰ شناسایی شده(۱۹)، به عنوان منبع ارتقاءدهنده سلامت در انواع مختلفی از اختلالات هم‌چون زخم معده، یبوست، آنمی، اختلالات چربی خون، آترواسکلروز، کاهش قند خون و فشار خون می‌باشد(۲۰). *C. vulgaris* منبع غنی آنتی اکسیدان‌هایی هم‌چون لوتئین، آلفا و بتا کاروتن، اسید آسکوربیک و توکوفرول است که توانایی جاروب کردن رادیکال‌های آزاد را دارند و به نظر می‌رسد استفاده از *C. vulgaris* بتواند در تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی بدن در بیماری‌های بدخیم ناشی از استرس اکسیداتیو اثرات مطلوبی داشته باشد(۲۴-۲۱). تا کنون در چندین مطالعه که اغلب حیوانی بوده تأثیر *C. vulgaris* بر روی الگوی لیپیدی مورد بررسی قرار گرفته است و مطالعات انسانی محدودی در این زمینه وجود دارد. مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که تجویز پودر *C. vulgaris* در موش‌ها می‌تواند سبب بهبود الگوی لیپیدی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شود(۲۵،۲۶).

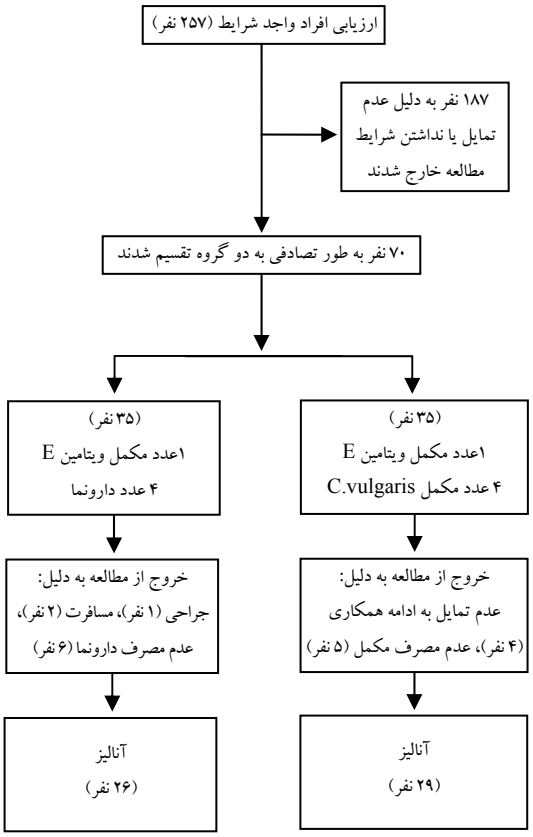
Panahi و همکاران(۲۷)، در مطالعه خود بر روی بیماران NAFLD به این نتیجه رسیدند که ۱۲۰۰mg مکمل *C.vulgaris* می‌تواند سبب کاهش AST،ALT و تری‌گلیسرید سرم در طول ۳ ماه شود. لذا با توجه به شیوع فزاینده این بیماری و عوارض جانبی غیر قابل برگشت ناشی از آن از یک سو و محدودیت‌های مطالعاتی در خصوص اثرات *C.* Vulgaris در حیوانات و نبود مطالعه انسانی در خصوص اثرات این میکروجلبک بر پراکسیداسیون لیپیدی در بیماران NAFLD از سوی دیگر، مطالعه حاضر با هدف تأثیر *C. vulgaris* بر الگوی لیپیدی و پراکسیداسیون لیپید در بیماران NAFLD انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

کارآزمایی بالینی کنترل دار حاضر بر روی ۷۰ بیمار مبتلا به NAFLD تأیید شده با سونوگرافی، از بیماران مراجعه‌کننده به کلینیک شیخ الرئیس دانشگاه علوم پزشکی تبریز در سال ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ صورت گرفت. این مطالعه از نظر رعایت اصول اخلاقی مورد تأیید کمیته اخلاق پزشکی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز قرار گرفت. معیارهای ورود به مطالعه شامل تأیید ابتلاء به NAFLD از طریق سونوگرافی و آزمایشگاهی، نمایه توده بدن بیش از ۳۰ Kg/m^2 و محدوده سنی ۲۰ تا ۵۰ سال و سطح فعالیت متوسط بود. معیارهای خروج مطالعه شامل مصرف الکل، بارداری، شیردهی، ورزشکار بودن، بستری بودن، سابقه ابتلا به فشار خون بالا، بیماری ریوی، بیماری کلیوی، انجام پیوند کبد، ابتلا به سایر بیماری‌ها و اختلالات مزمن یا مصرف برخی داروها چون کنترل‌کننده‌های فشار خون، استاتین‌ها، افزاینده‌های حساسیت انسولینی، داروهای هپاتوتوکسیک، قرص‌های ضد بارداری و استروژن بود.

در ابتدای مطالعه هدف و روش اجرای پژوهش به بیماران توضیح داده شد و در صورت تمایل جهت شرکت در مطالعه، رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. برای هر یک از افراد شرکت‌کننده در مطالعه پرسشنامه فردی شامل ویژگی‌های جمعیتی، اجتماعی و تاریخچه بیماری تکمیل شد. قد و وزن هر بیمار بدون کفش با حداقل لباس ممکن و با استفاده از قد سنج و ترازوی Seca (Germany) به ترتیب با دقت ۰/۱ سانتی‌متر و ۰/۱ کیلوگرم اندازه‌گیری شده و با متر آنتروپومتری دور کمر افراد بین پایین‌ترین دنده و ستیغ ایلیاک و دور باسن در بزرگ‌ترین دور در بالای ران هر دو با دقت ۰/۱ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. دریافت غذایی افراد با استفاده از پرسشنامه ثبت غذایی ۳ روزه (دو روز معمول و یک روز تعطیل هفته) مورد ارزیابی و توسط نرم‌افزار Nutritionist IV 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 می‌نمودند. به‌علاوه افراد گروه مداخله روزانه چهار عدد قرص مکمل ۳۰۰ میلی‌گرمی *C.vulgaris* (۱ عدد قبل از صبحانه، ۲ عدد قبل از ناهار و ۱ عدد قبل از شام) و افراد گروه دارونما عیناً در همان زمان و به همان تعداد قرص دارونما مصرف کردند (فلوچارت 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.



فلوچارت شماره ۱: الگوریتم و نحوه انتخاب بیماران

برای تهیه دارونما از رنگ‌های مجاز داروسازی و از اکسی پیان‌هایی که از نظر فارماکولوژیکی بی‌اثر هستند مثل میکروکریستالین، سلولز، لاکتوز، نشاسته و منیزیوم استئارات استفاده شد. برای دو سو کور سازی

(محقق و بیماران) بسته‌بندی مکمل و دارونما در یک شکل و رنگ و اندازه توسط فرد دیگری صورت گرفت و در پاکت‌های مشابه شماره گذاری شده قرار گرفت. پس ازتجویز مکمل‌ها، هر دو هفته یک‌بار، بیماران جهت ویزیت، تجویز داروها و اطمینان از مصرف داروها مراجعه می‌نمودند.

نمونه خون وریدی بیماران پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی اخذ و پس از جداسازی سرم در میکروتیوب ۱ میلی‌لیتری ریخته و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. اندازه‌گیری گلوکز و الگوی لیپیدی به روش آنزیمی- رنگ سنجی، آنزیم‌های ALT، ALP و AST با روش IFCC[1] (فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) و مالون‌دی‌آلدئیدی (MDA) به روش اسید تیوباربیتوریک انجام گرفت. سونوگرافی کبد در مورد تمام بیماران در ابتدا و انتهای مطالعه توسط یک سونوگرافیست و با یک دستگاه جهت بررسی وضعیت اکوژنسیته کبدی و استئاتوز انجام گرفت. در پایان مداخله اندازه‌گیری‌های تن‌سنجی، دریافت غذایی، خون‌گیری و سونوگرافی مجدداً تکرار گردید.

برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 17 استفاده شد. توزیع داده‌ها با آزمون Kolmogrov-Smirnov بررسی شد. کلیه داده‌های کمی در صورت نرمال بودن به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها بین گروه مداخله و دارونما در صورت نرمال بودن و با تعدیل روی مقادیر قبل از مداخله تحلیل کوواریانس و برای مقایسه درون گروهی از Pair t-test و ارتباط داده‌های کیفی با یکدیگر از آزمون مجذور کای (Chi-Square) استفاده شد. برای ارزیابی درصد تغییرات متغیرها، از رابطه زیر استفاده گردید:

$$\frac{\text{اندازه ابتدای مداخله} - \text{اندازه انتهای مداخله}}{\text{اندازه ابتدای مطالعه}} \times ۱۰۰$$

1. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

یافته ها

میانگین و انحراف معیار سن در گروه مداخله ۳۷±۷/۴۵ سال و در گروه دارونما ۸/۲۴ ± ۳۷/۷۳ سال بود. ویژگی‌های پایه بیماران مورد مطالعه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نیمی از بیماران زن و اغلب متأهل بودند. مقایسه سن، جنس، وضعیت تأهل، سطح تحصیلات، سطح فعالیت بدنی و شدت کبد چرب در دو گروه تفاوت آماری معنی داری را نشان نداد. ارزیابی دریافت انرژی و درشت‌مغذی‌ها در بیماران قبل و بعد از مداخله نشان داد که تفاوت معنی‌دار بین دو گروه وجود ندارد (p >۰/۰۵) و تنها در گروه مداخله در طول ۸ هفته مقدار کربوهیدرات دریافتی کاهش معنی‌داری یافت (p <۰/۰۵).

در ابتدای مطالعه، تفاوت آماری معنی‌دار از نظر وزن، الگوی لیپیدی، MDA و آنزیم‌های کبدی بین دو گروه مشاهده نشد. در طول مطالعه وزن در هر دو گروه کاهش معنی‌دار یافت ولی میزان کاهش وزن در گروه مداخله در مقایسه با گروه دارونما در مدت ۸ هفته بیش‌تر بود (۳/۶۰±۱/۶۴ Kg) در برابر ۲/۱۵±۱/۵۱ Kg و p <۰/۰۵) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: ویژگی عمومی بیماران در ابتدای مطالعه

متغیر	مداخله (۲۹ نفر) تعداد (درصد)	دارونما (۲۶ نفر) تعداد (درصد)	سطح معنی داری
جنس			
مرد	۱۵ (۵۱/۷۶)	۱۵ (۵۱/۷۶)	۰/۸۸۷
متاهل	۲۷ (۹۳/۱)	۲۳ (۸۸/۵)	۰/۶۵۹
تحصیلات			
زیر دیپلم	۸ (۲۵/۷)	۱۴ (۵۳/۸)	
دیپلم و بالاتر	۲۱ (۷۲/۴)	۱۲ (۴۶/۲)	۰/۷۴۴
سطح فعالیت بدنی			
سبک	۱۱ (۳۷/۹)	۱۱ (۴۲/۳)	
متوسط	۷ (۲۴/۱)	۸ (۳۰/۸)	۰/۸۷
سنگین	۱۱ (۳۷/۹)	۷ (۲۶/۹)	
شدت کبد چرب			
خفیف	۱۴ (۴۸/۳)	۱۷ (۶۵/۴)	
متوسط	۱۳ (۴۴/۸)	۸ (۳۰/۸)	۰/۷۴۴
شدید	۲ (۶/۹)	۱ (۳/۸)	

جدول شماره ۲: میانگین و انحراف معیار وزن و شاخص های بیوشیمیایی قبل و بعد از مداخله و درصد تغییرات آن

متغیرها	مداخله (۲۹ نفر) Mean ±SD	دارونما (۲۶ نفر) Mean ±SD	سطح معنی داری
وزن (Kg)			
قبل مداخله	۸۶/۲۱±۱۰/۷۴	۸۹/۵±۱۳/۸۷	۰/۳۲۷
بعد مداخله	۸۲/۶۰±۱۱/۱۵	۸۷/۳۴±۱۳/۳۳	۰/۰۱
درصد تغییرات	-۴/۲۶±۲/۰۵	-۲/۳۶±۱/۶	۰/۰۱
سطح معنی داری **	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	
کلسترول تام (mg/dl)			
قبل مداخله	۲۱۲/۰۳±۴۰/۹	۲۰۴/۸۸±۳۷/۲۴	۰/۵۰۱
بعد مداخله	۱۸۶±۳۱/۹۹	۱۹۲/۳۵±۳۳/۸۱	۰/۳۸۷
درصد تغییرات	-۱۱/۱۲±۱۰/۰۱	-۵/۷۶±۸/۷۲	۰/۳۸۷
سطح معنی داری **	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	
کلسترول LDL (mg/dl)			
قبل مداخله	۱۳۱/۰۸±۳۵/۶۳	۱۲۲/۵۱±۳۱/۵۹	۰/۵۶۱
بعد مداخله	۱۱۰/۹۲±۲۸/۳۷	۱۱۲/۵۱±۳۱/۵۹	۰/۸۲۱
درصد تغییرات	-۱۳/۳۹±۱۶/۳۵	-۶/۹۵±۱۷/۵۷	۰/۸۲۱
سطح معنی داری **	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	
کلسترول HDL (mg/dl)			
قبل مداخله	۴۱/۵۹±۸/۳۶	۴۳/۵۸±۱۰/۶۵	۰/۴۴۲
بعد مداخله	۴۵/۹۳±۸/۵۴	۴۳/۸۱±۱۰/۳۹	۰/۸۴۵
درصد تغییرات	۱۵/۰۵±۳۸/۵۴	۲/۱۴±۱۶/۸۰	۰/۸۴۵
سطح معنی داری **	۰/۰۴	<۰/۰۰۱	
تری گلیسرید (mg/dl)			
قبل مداخله	۱۷۸/۸۶±۸۹/۳۶	۱۶۹/۷۳±۸۱/۱۴	۰/۶۹۴
بعد مداخله	۱۵۶/۳۶±۶۶/۲۷	۱۶۰/۸۱±۷۰/۶۱	۰/۳۱۸
درصد تغییرات	-۶/۸۶±۲۳/۷۷	-۱/۴۶±۳۱/۷۰	۰/۳۱۸
سطح معنی داری **	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	
مالون دی آلدئید (nmol/ml)			
قبل مداخله	۳/۷۶±۱/۳۳	۳/۱۴±۱/۳۱	۰/۰۸
بعد مداخله	۲/۵۵±۰/۸۴	۳/۰۵±۱/۵۱	۰/۰۰۶
درصد تغییرات	-۲۸/۹۰±۱۷/۹۹	۳/۶۲±۴۴/۰۲	۰/۰۰۶
سطح معنی داری **	۰/۰۱	۰/۰۱	
آلانین آمینو ترانسفراز (IU/L)			
قبل مداخله	۴۳/۵۹±۲۲/۸	۴۲/۶۲±۲۳/۷۱	۰/۸۷۸
بعد مداخله	۳۹/۳۸±۱۸/۳۲	۳۶/۸۸±۲۲/۸۳	۰/۱۵۴
درصد تغییرات	-۲۶/۶۰±۱۹/۷۵	-۳/۹۳±۶۲/۴۸	۰/۱۵۴
سطح معنی داری **	< ۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	
آسپارتات آمینو ترانسفراز (IU/L)			
قبل مداخله	۲۹/۱۴±۱۲/۱۹	۲۸/۶۹±۱۲/۳۴	۰/۸۹۴
بعد مداخله	۲۱/۹۳±۹/۰۱	۲۵/۶۲±۱۰/۶۵	۰/۱۸۸
درصد تغییرات	-۲۰/۸۹±۴۱/۲۱	-۳/۳۷±۴۴/۴۶	۰/۱۸۸
سطح معنی داری**	< ۰/۰۰۱	۰/۰۷	
آلکالین فسفاتاز (IU/L)			
قبل مداخله	۱۸۸/۵۹±۵۵/۳۱	۱۹۴/۱۵±۷۰/۲۱	۰/۷۴۴
بعد مداخله	۱۵۸/۷۹±۵۲/۷۲	۱۹۱/۵۰±۶۳/۱۳	۰/۰۴
درصد تغییرات	-۱۴/۸۵±۱۸/۰۷	۰/۸۰±۱۸/۹۰	۰/۰۴
سطح معنی داری**	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	

* ANCOVA
** Paired t test

سطوح کلسترول تام، کلسترول LDL، تری گلیسرید در هر دو گروه مورد مطالعه کاهش معنی‌دار (p <۰/۰۰۱) و کلسترول HDL به طور معنی‌دار افزایش یافت (p =۰/۰۴ در گروه مداخله و p<۰/۰۰۱ در گروه دارونما) اما تفاوت معنی‌دار بین دو گروه مورد مطالعه در الگوی لیپیدی مشاهده نشد (p>۰/۰۵) تفاوت‌های داخل گروهی و بین گروهی در مورد MDA سرم در گروه مداخله در مقایسه با دارونما معنی‌دار بود (p=۰/۰۰۱).

در گروه مداخله، غلظت آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP در پایان هفته هشتم نسبت به زمان شروع مطالعه کاهش معنی‌دار یافتند (p<۰/۰۵). در گروه دارونما غلظت ALT و ALP در طول مطالعه کاهش معنی‌دار نشان دادند ولی در غلظت AST در طول مطالعه تغییر معنی‌دار مشاهده نشد (p>۰/۰۵). بعد از مداخله از بین آنزیم‌های کبدی فقط ALP بین دو گروه مورد بررسی کاهش معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵).

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین مکمل یاری *C.vulgaris* بر الگوی لیپیدی و پر اکسیداسیون لیپیدی در بیماران 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 با استفاده از آزمون تحلیل کوواریانس اثر مخدوش‌کنندگی آن در ارائه نتایج تعدیل گردید. از این رو در بحث عوامل بیوشیمیایی، اثرعوامل غذائی به صورت کنترل شده می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر حاکی از کاهش معنی‌دار وزن در هر دو گروه مورد مطالعه بود که این کاهش در گروه مداخله در مقایسه با دارونما از نظر آماری معنی‌دار بود (p <۰/۰۵). بررسی منابع موجود منتشره در ارزیابی اثر *C.vulgaris* بر وزن تنها به یک مطالعه انسانی محدود می‌شود که در این مطالعه مکمل یاری ۱۲۰۰mg *C.vulgaris* برای ۳ ماه در بیماران NAFLD منجر به کاهش معنی‌دار وزن گردید(۲۷). گرچه مکانیسم دقیق تأثیر *C.vulgaris* بر وزن ناشناخته است ولی کاهش وزن به ترکیبات پلی‌فنولی موجود در *C.vulgaris* نسبت داده می‌شود که از طریق کاهش سطح mRNA

آنـزیم‌هـای اسـید چـرب سـنتتاز و آسـیل کـوآ کربوکسیلاز(۲۸)، بتا اکسیداسیون و لیپولیز سلول‌های چربی ناشی از نوراپی نفرین را افزایش می‌دهد(۲۹،۳۰). به علاوه پلی‌فنول‌ها اثر مهاری بر لیپاز پانکراسی داشته و از جذب چربی در روده جلوگیری می‌کنند و نیز با کاهش بیان ژن PPARγ[1] که از فاکتورهای رونویسی بافت چربی می باشد از تمایز پری آدیپوسیت‌ها به آدیپوسیت‌ها جلوگیری می کند(۳۱).

در این مطالعه بعد از ۸ هفته مداخله بهبود الگوی لیپیدی در هر دو گروه مشاهده شد که این یافته مشابه با نتایج مطالعه Lee و همکاران(۳۲) می‌باشد. در یک مطالعه اخیر اثرمکمل یاری *C.vulgaris* به میزان ۵ درصد و ۱۰ درصد کل مواد مغذی، به مدت ۹ هفته در رت‌های سالم با رژیم پرچرب بررسی شد که به طور معنی‌داری سبب کاهش چربی تام، تری‌گلیسرید وکلسترول تام سرم و کبد شد. استفاده از *C.vulgaris* در افراد با عوامل خطر سبک زندگی نادرست در یک دوره ۱۶ هفته‌ای بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای متابولیسم چربی‌ها را افزایش داد و نتایج حاکی از آن بود که مصرف *C.vulgaris* می‌تواند اثرات فیزیولوژیکی مثبتی بر کاهش چربی خون و کلسترول تام سرم نشان دهد(۳۳). هم‌چنین در یک کارازمایی بالینی استفاده از عصاره *C.vulgaris* به مدت ۳ ماه در ۷۶ بیمار مبتلا به NAFLD تاثیر مطلوب بر سطح سرمی ALT ، AST و تری‌گلیسرید داشت(۲۷). در مطالعه‌ای دیگر مکمل یاری با *C.vulgaris* ۶۰۰ mg/d و آترواستاتین (۲۰mg/d) سبب کاهش کلسترول تام، کلسترول LDL و تری‌گلیسرید شد(۳۴). اثرات هیپولیپیدمی *C.vulgaris* را احتمالا می‌توان به محتوای بالای فیبر (۱۳/۱۰۰g)، گلیکولیپید و فسفو لیپید موجود در آن نسبت داد(۲۰). فیبر به چربی غذایی و اسیدهای صفراوی در روده متصل شده و سبب دفع آن‌ها در مدفوع می‌شود. از سوی دیگر *C.vulgaris* با بهبود مقاومت انسولینی، کاهش لیپولیز و متعاقب آن با کاهش اسیدهای چرب آزاد سبب کاهش تری‌گلیسرید می‌شود(۳۲). علاوه بر فیبر، محتوای بالای نیاسین موجود در *C.vulgaris* (۲۳/۸mg/۱۰۰g) نیز مسئول اثرات کاهنده چربی به ویژه کاهش تری‌گلیسرید و افزایش کلسترول HDL است. به نظر می‌رسد اسید چرب امگا ۳ موجود در *C.vulgaris* احتمالاً می‌تواند در کاهش الگوی لیپیدی به خصوص تری‌گلیسرید نقش داشته باشد(۳۴).

یافته‌های مطالعه حاضر هم‌چنین نشان دهنده تغییر معنی‌دار MDA در طول ۸ هفته در هر دو گروه و نیز تفاوت معنی‌دار در بین دو گروه مورد مطالعه بود به طوری که کاهش آن در گروه مداخله بیشتر بود (p=۰/۰۰۶). در مطالعه Vijayavel و همکاران(۲۶) عصاره الکلی*C.vulgaris* سبب کاهش پراکسیداسیون لیپید در سرم، کلیه و کبد موش‌های مواجهه یافته با نفتالین شد. Kim و همکاران(۳۵) نشان دادند که دوزهای صفر، ۵ و ۱۰ درصد *C.vulgaris* در موش‌ها، سبب کاهش MDA پلاسما و کبد می شود. در یک مطالعه دیگر استفاده از عصاره الکلی *C.vulgaris* به مدت ۱۵ روز در موش‌های آلبینوی در معرض استرس اکسیداتیو از طریق مصرف نفتالین غلظت MDA را کاهش داد(۳۶). در مطالعه YUN و همکاران با تجویز *C.vulgaris* در ۳ دوز ۲، ۵ و ۱۰ درصد به موش‌های مواجهه یافته با کادمیوم در طول ۴ هفته با کاهش ۴۷ تا ۷۱ درصد در MDA سرم همراه بود(۲۳). مکانیسم احتمالی تأثیر مکمل *C.vulgaris* بر کاهش پراکسیداسیون لیپید را می‌توان منتسب به ترکیبات پلی فنولی و کاروتنویدهای موجود در این میکروجلبک دانست(۳۶). کاروتنوئیدها به خصوص α وβ کاروتن به دلیل دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل و پتانسیل ردوکس پایین، سبب پاکسازی رادیکال‌های آزاد شده و فرآیند پراکسیداسیون را خاتمه می‌دهند(۳۷). کلروفیل رنگدانه سبز و کلروفیلین نمک سدیم مس و آنالوگ محلول در آب کلروفیل و دو ترکیب پیش‌ساز کلروفیل شامل Chlorophyllide a,b و Pheophorbide a,b، ترکیبات هیدروفیلی، ترکیبات

حاوی سولفور و ویتامین C و E موجود در *C.vulgaris* دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند(۳۸).

یافته‌های مطالعه ما حاکی از کاهش سطوح آنزیم‌های کبدی در گروه مداخله بود که با نتایج مطالعات موجود در این زمینه متناقض می‌باشد. در مطالعه Lee با تجویز دوزهای مختلف ۵ و ۱۰ درصد *C.vulgaris* به موش‌های مواجهه یافته با رژیم پرچرب (۲۰ درصد چربی) در طول ۹ هفته، تفاوت معنی‌داری در سطوح ALT و AST مشاهده نشد(۳۲). در مطالعه دیگری *C.vulgaris* بعد از ۴ هفته، سطوح ALT و AST را در موش‌های مواجهه یافته با کادمیوم تغییر نداد(۳۵) که این نتایج دو مطالعه در تضاد با مطالعه حاضر می‌باشند. در حالی‌که در تنها مطالعه انسانی موجود توسط Panahi و همکاران(۲۷) با مکمل یاری *C.vulgaris* به مقدار ۱۲۰۰ mg/d به مدت ۳ ماه در بیماران NAFLD کاهش سطح ALT و AST مشاهده گردید. علت تفاوت‌های موجود در مطالعات می‌تواند احتمالاً ناشی از تفاوت‌های موجود در متدولوژی مطالعه، طول مدت مداخله، دوز و نوع ماده مداخله باشد.

گرچه مکانیسم عمل *C.vulgaris* بر آنزیم‌های کبدی مشخص نیست ولی به نظر می‌رسد کاهش وزن ناشی از مکمل یاری *C.vulgaris* در بهبود سطوح آنزیم‌های کبدی دخیل باشد. نتایج این مطالعات حاکی از آن است که کاهش وزن سبب تغییر قابل ملاحظه آنزیم‌های کبدی و نرمال کردن سطح آن‌ها در بیش از ۵۰ درصد موارد می‌شود(۳۹). کاهش وزن احتمالاً از طریق تأثیر بر مقاومت انسولینی موجب بهبودی سطوح آنزیم‌های کبدی می‌شود(۴۰،۴۱).

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

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نتایج این مطالعه حاکی از اثر بخشی مکمل *C.vulgaris* در کاهش وزن، پراکسیداسیون لیپیدی، بهبود الگوی لیپیدی و عملکرد کبد در بیماران NAFLD می باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی، مرکز تحقیقات علوم تغذیه و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به دلیل حمایت مالی و ازشرکت فردای سبز ایرانیان (تهران، ایران) به دلیل تهیه مکمل کلرلا ولگاریس اعلام می‌دارند. مقاله حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد و طرح پژوهشی کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز می باشد.

References

1. Taghvaei T, Bahar A, Hosseini V, Maleki I, Kasrai M. Efficacy of Silymarin on Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(98): 164-171 (Persian).
2. Dietrich CF, Lee JH, Gottschalk R, Herrmann G, Sarrazin C, Caspary WF, et al. Hepatic and portal vein flow pattern in correlation with intrahepatic fat deposition and liver histology in patients with chronic hepatitis C. AJR Am J Roentgenol 1998; 171(2): 437-443.
3. Oguzkurt L, Yildirim T, Torun D, Tercan F, Kizilkilic O, Niron EA. Hepatic vein Doppler waveform in patients with diffuse fatty infiltration of the liver. Eur J Radiol 2005; 54(2): 253-257.
4. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley Ch, Behling C. Prevalence of

fatty liver in children and adolescents. Pediatrics 2006; 118(4): 1388-1393.

5. 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 Gastroentrol 2007; 13(6): 889-894.
6. Ong JP, Younossi ZM. Approach to the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. Clin Liver Dis 2005; 9(4): 617-634.
7. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic Fatty Liver disease and the metabolic Syndrome: An update. World J Gastroenterol 2008; 14(2): 185-192.
8. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. QJM 2010; 103(2): 71-83.
9. Lam BP, Younossi ZM. Treatment regimens for non-alcoholic fatty liver disease. Ann Hepatol 2009; 8(Suppl 1): 51-59.
10. Leclerc IA. Antioxidant defence mechanism: new players in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis? Clin Sci (Lond) 2004; 106(3): 235-237.
11. Samy W, Hassanian MA. Paraoxnase-1 activity, malondialdehyde and glutathione peroxidase in non-alcoholic fatty liver disease and the effect of atrorvastatin. Arab J Gastroenterol 2011; 12(2): 80-85.
12. Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and Therapy of Nonalcoholic Steatohepatitis. Gastroentrology 2008; 134(6): 1682-1698.
13. 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(2012): 1-8.
14. Park HJ, Bruno RS. Hepatoprotective activities of grean tea in nonalcoholic fatty liver disease. Agro Food Industry High-Tech 2010; 21(1): 37-40.
15. Guzman S, Gato A, Calleja JM. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae Chlorella stigmatophora and Phaeodactylum tricornutum. Phytotherapy Research 2001; 15: 224-230.
16. Jong-Yuh C, Mei-Fen S. Potential hypoglycemic effects of Chlorella in streptozotocin-induced diabetic mice. Life Sci 2005; 77(9): 980-990.
17. Yamagishi S, Nakamura K, Inoue H. Therapeutic potentials of unicellular green alga Chlorella in advanced glycation end product (AGE)-related disorders. Med Hypotheses 2005; 65(5): 953-955.
18. 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.
19. 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: 122-134.
20. Gouveia L, Batista AP, Sousa I, Raymundo A, Bandarra NM, (eds). Microalgae in novel food products. In: Food chemistry Research Development. Konstantions N, Papadoulis PP. New York (Hauppauge): Nova Science Publishers; 2008. p. 1-37.
21. Queiroz MLS, Torello CO, Perhs SMC, Rocha MC, Bechara EJH, Morgano MA, et al. Chlorella vulgaris up-modulation of myelossupression induced by lead: The role of stromal cells. Food Chem Toxicol 2008; 46(9): 3147-3154.

22. Queiroz ML, Da Rocha MC, Torello Co, de Souza Queiroz J, Bincoletto C, Morgano MA, et al. Chlorella Vulgaris restores bone marrow cellularity and cytokine production in lead-exposed mice. Food Chem Toxicol 2011; 49(11): 2934-2941.
23. Yun H, Kim I, Kwon SH, Kang JS, Om AS. Protective Effect of Chlorella Vulgaris against Lead-Induced Oxidative Stress in Rat Brains. J Health Sci 2011; 57(3): 245-454.
24. 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): 281-288.
25. Shibata S, Hayakawa K, Egashira Y, Sanada H. Hypocholesterolemic mechanism of chlorella: chlorella and its indigestible fraction enhance hepatic cholesterol catabolism through up-regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase in rats. Biosci Biotechnol Biochem 2007; 71(4): 916-925.
26. Vijayavel K, Anbuselvam C, Balasubramanian MP. Antioxidant effect of the marine algae Chlorella vulgaris against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. Mol Cell Biochem 2007; 303(1-2): 39-44.
27. Panahi Y, Ghamarchehreh ME, Beiraghdar F, Zare M, Parandeh 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): 2099-2103.
28. 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.
29. Nakazato K, Song H, Waga T. Effects of dietary apple polyphenol on adipose tissues weights in wistar rats. Exp Anim 2006; 55(4): 383-389.
30. 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): 982-990.
31. Meydani M, Hasan ST. Dietary polyphenols and obesity. Nutrients 2010; 2(7): 737-751.
32. 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): 204-210.
33. Mizoguchi T, Takehara I, Saito T, Naoki Y. Nutrigenomic Studies of Effects of *Chlorella* on Subjects with High-Risk Factors for Lifestyle-Related Disease. J Med Food 2008; 11(3): 395-404.
34. Panahi Y, Pishgoo B, Jalalian HR, Mohammadi E, Taghipour HR, Sahebkar A, et al. Investigation of the effects of Chlorella vulgaris as an adjunctive therapy for dyslipidemia: Results of a randomized open-label clinical trial. Nutrition& Dietetics 2012; 69(1): 13-19.
35. Kim YJ, Jeong S, Kwon S, Kim MK. Effect of chlorella vulgaris Intake on Antioxidative capacity in rats oxidatively stressed with dietary cadmium. Food Sci Biotechnol 2009; 18(5): 1055-1062.
36. Valdivia VB, Butron RO, Reynoso MP, Garcia AH, Europa EC. Chlorella vulgaris administration prevents HgCl2-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. J Appl Phycol 2011; 23: 53-58.
37. 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.

38. 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): 175-183.
39. Bellentani S, Dalle Grave R, Suppini A, Marchesini G. Behavior Therapy for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: the Need for a multidisciplinary Approach. Hepatology 2008; 47(2): 746-754.
40. Sreenivasa Baba C, Alexander G, Kalyani B, Pandey R, Rastogi S, Pandey A, et al. Effect of exercise and dietary modification on serum aminotransferase levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. J Gastroenterol Hepatol 2006; 21(1): 191-198.
41. Bath G, Sreenivasa Baba C, Pandey A, Kumari N, Choudhuri G. Life style modification improves insulin resistance and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. World J Hepatol 2012; 4(7): 209-217.