

Interaction between C677T and A1298C MTHFR Gene Polymorphisms and Weight Loss Diet in Treatment of NAFLD

Alireza Ghaemi¹,
Hafez Fakheri²,
Alireza Rafiei³,
Vahid hosseini⁴,
Reza Homayounfar⁵,
Zohreh Amiri⁶,
Fourugh Azam Taleban⁷,
Azita Hekmatdoost⁸

¹ Assistant Professor, Department of Basic Sciences and Nutrition, Health Sciences Research Center, Faculty of public Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Gut and Liver Research Center, Department of Internal Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Gut and Liver Research Center, Department of Internal Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Noncommunicable Diseases Research Center, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

⁶ Associate Professor, Department Of Basic Sciences, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁷ Professor, Department of Clinical Nutrition and Dietetics, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁸ Associate Professor, Department of Clinical Nutrition and Dietetics, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received October 27, 2015 Accepted January 4, 2016)

Abstract

Background and purpose: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of liver dysfunction worldwide. Genetic factors are believed to affect the development of NAFLD. This study was conducted to evaluate the interaction of weight loss and MTHFR polymorphism on NAFLD characteristics.

Materials and methods: A single-arm trial was performed in 50 patients. They received a weight loss diet for 6 months. Anthropometric parameters, liver enzymes, dietary intakes, and physical activity were measured at first, and the end of months 3 and 6. Lipid profile, homocysteine, malondialdehyde, TNF- α , IL-6, and cytokeratin 18 were measured at baseline and at the end of the study. C677T and A1298C MTHFR gene polymorphisms were assessed in all patients using PCR-RFLP and Tetra-ARMS methods, respectively.

Results: Forty four patients completed the study protocol. According to MTHFR polymorphism the patients were classified as (CC) and (AC) group (n= 35), and (CT+TT) and (AC) group (n= 9). After 3 and 6 months, weight loss occurred equally in both groups. In CC genotype, fasting blood glucose (P= 0.012), total cholesterol (P= 0.001), and LDL (P=0.004) decreased significantly after 6 months. In those with CT+TT genotype, after 6 months, 6.6% weight loss occurred but it could not significantly reduce liver enzymes and the patients' homocysteine levels were higher than normal range.

Conclusion: In this study, no significant reduction in liver enzymes was observed in the CT+TT sub group, therefore, MTHFR gene polymorphisms should be considered in NAFLD management.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, diet, weight loss, MTHFR polymorphism

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(133): 10-24 (Persian).

اثر متقابل پلی مورفیسم های C677T و A1298C ژن متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) و رژیم غذایی کاهش وزن در درمان مبتلایان به کبد چرب غیر الکلی

علیرضا قائمی^۱
حافظ فاخری^۲
علیرضا رفیعی^۳
وحید حسینی^۴
رضا همایونفر^۵
زهره امیری^۶
فروغ اعظم طالبان^۷
آریتا حکمت دوست^۸

چکیده

سابقه و هدف: بیماری کبد چرب غیر الکلی (Non-alcoholic fatty liver disease یا NAFLD) شایع ترین بیماری کبدی در دنیاست. عوامل ژنتیکی، پیدایش و توسعه بیماری را تحت تاثیر قرار می دهد. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر متقابل کاهش وزن و نقش پلی مورفیسم های ژن متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) بر شاخص های بیماری کبد چرب انجام شد.

مواد و روش ها: ۵۰ بیمار، به مدت شش ماه تحت رژیم غذایی کاهش وزن قرار گرفتند. مطالعه حاضر کار آزمایی تک-گروهی (Single-arm trial) بود. شاخص های تن سنجی، دریافت تغذیه ای، فعالیت بدنی و سطح آنزیم های کبدی در ابتدا، ماه سوم و ششم مداخله و هم چنین مقدار چربی های خون، هموسیستین، مالون دی آلدهید، $TNF-\alpha$ ، اینترلوکین-۶ و سیتوکراتین ۱۸ در ابتدا و ماه ششم اندازه گیری شدند. پلی مورفیسم های C677T و A1298C ژن MTHFR به ترتیب با روش های PCR-RFLP و Tetra-ARMS نیز تعیین گردید.

یافته ها: ۴۴ بیمار، مداخله را کامل کردند. بر اساس پلی مورفیسم های MTHFR، بیماران به دو گروه (CC) و (AC) ۳۵ نفر، (CT+TT) و (AC) ۹ نفر تقسیم شدند. در پایان ماه سوم و ششم مطالعه دو گروه کاهش وزن مشابه داشتند. در گروه ژنوتیپ CC، گلوکز خون ناشتا ($p=0/012$)، کلسترول تام ($p=0/001$)، LDL-C ($p=0/004$) کاهش معنی دار پیدا کرد. در گروه ژنوتیپ CT+TT، علی رغم کاهش وزن ۶/۶ درصد در پایان ماه ششم، آنزیم های کبدی کاهش معنی دار نیافت و میزان هموسیستین سرم بالاتر از مقدار طبیعی اما افزایش معنی دار پیدا نکرد.

استنتاج: با توجه به عدم کاهش معنی دار آنزیم های کبدی در گروه ژنوتیپ CT+TT، پلی مورفیسم های MTHFR باید در درمان کبد چرب مد نظر قرار گیرند.

واژه های کلیدی: کبد چرب غیر الکلی، رژیم غذایی، کاهش وزن، پلی مورفیسم MTHFR

مقدمه

طیف گسترده ای از بیماری های کبدی است که ابتدای آن کبد چرب ساده (استئاتوز) است که سپس به استئاتوهپاتیت

بیماری کبد چرب غیر الکلی (Non-alcoholic fatty liver disease یا NAFLD) شامل

مؤلف مسئول: آریتا حکمت دوست - تهران: میدان صنعت، بلوار فرحزادی، خیابان ارغوان غربی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی شهید بهشتی E-mail: a_hekmat2000@yahoo.com

۱. استادیار، دکتری علوم تغذیه، گروه علوم پایه و تغذیه، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های غیرواگیر، دانشکده علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
۶. دانشیار، گروه علوم پایه، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۷. استاد، گروه تغذیه بالینی و رژیم درمانی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۸. دانشیار، گروه تغذیه بالینی و رژیم درمانی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۸/۱۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۱۴

غیر الکلی تبدیل می گردد و در نهایت به سیروز کبدی منجر می شود. بیماری کبد چرب غیر الکلی زمانی ظهور پیدا می کند که بیش از ۱۰-۵ درصد وزن کبد را چربی تشکیل دهد (۲،۱). شیوع این بیماری در افراد بالغ در جوامع غربی ۳۴ تا ۴۶ درصد گزارش شده است که در افراد چاق به ۷۰ تا ۸۰ درصد می رسد (۴،۳). در ایران شیوع بیماری ۲۱/۵ تا ۴۳/۸ درصد برآورد شده است (۷-۵). در این بیماری در مرحله اول، تعادل موجود بین برداشت و سنتز اسیدهای چرب در کبد، با اکسیداسیون و خروج چربی بر هم می خورد و در مرحله دوم افزایش تولید رادیکال های آزاد و سیتوکین های التهابی سبب آسیب، التهاب و فیروز سلول های کبدی می شود (۸-۱۰). از سوی دیگر در بیماری کبد چرب غیر الکلی، غلظت هموسیستئین و S- آدنوزیل هموسیستئین افزایش می یابد (۱۱،۸). S- آدنوزیل هموسیستئین نقش عمده ای در حساسیت سلول های کبدی به آپتوز (مرگ سلولی برنامه ریزی شده) القاء شده توسط سیتوکین های التهابی دارد (۱۲،۸). در بدن در طی متابولیسم، متیلن تراهایدروفولات توسط آنزیم متیلن ترا هیدروفولات ردوکتاز به ۵ متیل ترا هیدروفولات تبدیل می گردد و این کوآنزیم سبب کاهش غلظت هموسیستئین و S- آدنوزیل هموسیستئین می شود، لذا هرگونه اختلال در بیان ژن ۵ متیلن ترا هیدروفولات ردوکتاز می تواند سبب تشدید بیماری کبد چرب گردد (۱۵-۱۱،۸). در حال حاضر درمان ویژه ای برای مبتلایان به بیماری کبد چرب غیر الکلی وجود ندارد (۱۱،۱۰،۱۶-۱۸). سودمندی و ایمنی درمان دارویی کبد چرب غیر الکلی تاکنون نامعلوم باقی مانده است (۱۹،۱۸،۱۶). در این بیماری گام اول درمان، استفاده از رژیم کاهش وزن است. از طرفی، نشان داده شده است که عوامل ژنتیکی نقش مهمی در بیماری زائی NAFLD دارند و بالقوه می توانند اثر متقابل بین بیماری، نژاد، اثرات محیطی و سایر فنوتیپ ها را توضیح دهند و به طور اساسی استراتژی درمانی را تحت تاثیر قرار دهند. برآورد می شود که فاکتورهای ژنتیکی

پیدایش و توسعه NAFLD در ۳۵-۲۶ درصد بیماران را تحت تاثیر قرار می دهد (۲۱،۲۰،۱۵). لذا تعیین ارتباط پلی مورفیسم های ژن MTHFR با کبد چرب غیر الکلی می تواند سودمند واقع گردد. MTHFR از جمله ژن های موثر در تولید گونه های اکسیدان فعال و در نتیجه موثر در استئاتوزیس، التهاب و فیروز است (۲۲). در این صورت می توان افرادی که از نظر ژنتیکی مستعد ابتلا به بیماری هستند را سریع تر مورد مداخله قرار داد (۱۵). بررسی شیوع پلی مورفیسم MTHFR در ایران و جهان صورت گرفته اما تاکنون اثر پلی مورفیسم مورد نظر بر مداخله تغذیه ای انجام نشده است. در این مطالعه اثر متقابل بین پلی مورفیسم ژن آنزیم متیلن ترا هیدروفولات ردوکتاز و رژیم غذایی کاهش وزن مورد بررسی قرار گرفت تا نقش پلی مورفیسم این ژن در بهبود بیماری کبد چرب غیر الکلی مشخص گردد.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر، کارآزمایی تک- گروهی (Single-arm trial) بود. در پایان مداخله، بیماران بر اساس پلی مورفیسم های MTHFR به دو گروه تقسیم شدند. با استفاده از فرمول حجم نمونه برای مطالعات جفتی (Paired)، حجم نمونه ۴۳ نفر تعیین گردید که با در نظر گرفتن ۱۰ درصد، ریزش حجم نمونه نهائی ۵۰ نفر در نظر گرفته شد. از مهر ماه ۱۳۹۰ تا تیر ماه ۱۳۹۱، بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی از میان بیماران مراجعه کننده به مطب خصوصی یکی از همکاران طرح و کلینیک فوق تخصصی گوارش طبوبی در شهرستان ساری که اخیراً بیماری برای آن ها تشخیص داده شد، انتخاب شدند. روش نمونه گیری به صورت آسان و در دسترس (Convenience Sampling technique) بود. از کلیه افراد داوطلب شرکت در مطالعه، رضایت آگاهانه کتبی اخذ شد. طول دوره مطالعه ۶ ماه بود. در ابتدای مطالعه فرم جمع آوری داده تکمیل گردید. اندازه گیری های تن سنجی، فشار خون، استفاده از ۳ روز

یادآمد خوراک (۲ روز کاری و ۱ روز تعطیل) و فعالیت بدنی با استفاده از پرسشنامه فعالیت بدنی به دست آمد. سپس این بیماران تحت رژیم غذایی کاهش وزن قرار گرفتند. نحوه اجرای مطالعه، ارزیابی های تن سنجی، اندازه گیری فشارخون، ارزیابی وضعیت تغذیه و فعالیت بدنی، تنظیم برنامه غذایی مورد نظر و اندازه گیری فراسنج های بیوشیمیایی در مقاله های قبلی شرح داده شد (۲۴، ۲۳).

تعیین پلی مورفیسم های *C677T* و *A1298C* ژن آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز (*MTHFR*)

برای تعیین ژنوتیپ های مورد نظر، ابتدا DNA ژنومی از PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear cells) با استفاده از روش Modified Salting Out استخراج شد و میزان DNA هر نمونه با استفاده از دستگاه نانواسپکتروفتومتر UV در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر سنجیده شد. برای ارزیابی کیفیت و میزان خلوص DNA از شاخص جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر استفاده شد (۲۵). استخراج DNA با DNA Centrifugation Genomic DNA Kit و Isolation Nucleon Tm BACCII انجام شد. تکثیر ژن آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز (*MTHFR*) و تعیین ژنوتیپ های پلی مورفیسم های *C677T* (rs 1801133) و *A1298C* (rs 1801131) به ترتیب با روش های PCR-RFLP و Tetra-ARMS با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی زیر انجام شد (۲۶، ۲۷). پرایمرها از شرکت تکاپوزیست، سنتز در کشور کره بود. توالی پرایمرهای اختصاصی برای *C677T*:

Forward: 5'- CCTTGAACAGGTGGAGGCCAG-3'

Reverse: 5'- GCGGTGAGAGTGGGGTGG- 3'

و توالی پرایمرهای اختصاصی برای *A1298C*:

MTHFR 1298-Outer Forward:

5'- GGAGCTGACCAGTGAAGA-3'

MTHFR 1298-Outer Reverse:

5'- TGTGACCATTCCTGGTTTG- 3'

MTHFR 1298- Inner Forward:

5'- CTTTGGGGAGCTGAAGGA-3'

MTHFR 1298- Inner Reverse:

5'- AAGACTTCAAAGACACTTG- 3'

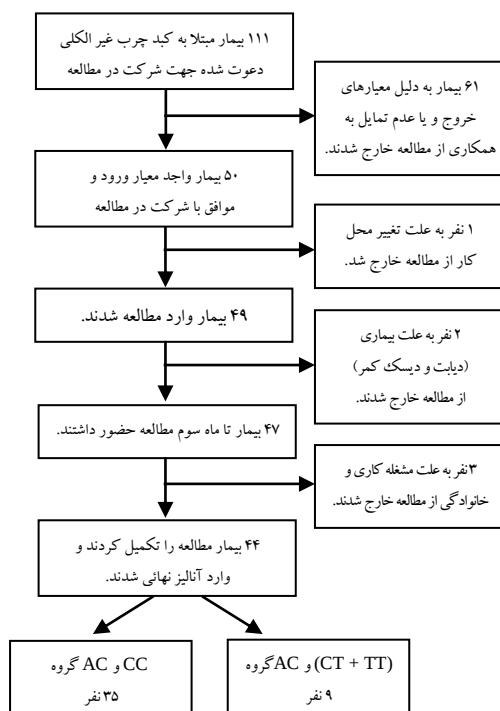
واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم از DNA جدا شده از هر نمونه، ۰/۵ میکرومول از هر کدام از پرایمرها و ۰/۵ واحد آنزیم Taq polymerase صورت گرفت. تکثیر ژن مورد نظر در موقعیت های *C677T* و *A1298C* با برنامه های دمایی زیر توسط دستگاه ترموسایکلر AG, 22331 (Eppendorf. Hamburg, Germany) انجام شد.

برای پلی مورفیسم *MTHFR-C677T*: دنا تورا سیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵°C و به دنبال آن ۳۰ سیکل به صورت: دنا تورا سیون (Denaturation) در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال (Annealing) در ۶۳/۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش (Extention) در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و سپس گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۴ دقیقه بود.

برای پلی مورفیسم *MTHFR-A1298C*: دنا تورا سیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴°C و به دنبال آن ۴۰ سیکل به صورت: دنا تورا سیون (Denaturation) در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال (Annealing) در ۶۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش (Extention) در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بود.

تجزیه و تحلیل آماری

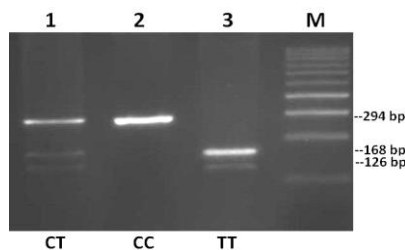
داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. نرمال بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون Shapiro-wilks ارزیابی شد. در صورتی که توزیع داده ها نرمال نبود، جهت مقایسه پارامترهای ابتدای مطالعه بین دو گروه از آزمون Mann-Whitney *U* test و برای مقایسه ی پارامترهای قبل و بعد درمان در هر گروه از آزمون Wilcoxon signed ranks test استفاده گردید. در صورت توزیع نرمال داده ها، برای مقایسه میانگین های بین ۲ گروه در ابتدای مطالعه از آزمون Student's *t*-tests و برای مقایسه پارامترهای قبل و بعد درمان در هر گروه از آزمون تی زوجی



تصویر شماره ۱: نمودار فرآیند انتخاب بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی شرکت کننده در مطالعه بر اساس پلی مورفیسم ژن MTHFR

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی ژنوتیپ و آللی پلی مورفیسم های C677T و A1298C ژن MTHFR در ۴۴ بیمار مبتلا به کبد چرب غیرالکلی

پلی مورفیسم A1298C			پلی مورفیسم C677T		
درصد	تعداد	ژنوتیپ	درصد	تعداد	ژنوتیپ
۶/۸	۳	AA	۷۹/۶	۳۵	CC
۹۳/۲	۴۱	AC	۱۵/۹	۷	CT
۰	۰	CC	۴/۵	۲	TT
۹۳/۲	۴۱	AC+CC	۲۰/۴	۹	CC+TT
آلل			آلل		
۵۳/۴	۴۷	A	۸۷/۵	۷۷	C
۴۶/۶	۴۱	C	۱۲/۵	۱۱	T



تصویر شماره ۲: تعیین ژنوتیپ های پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR به روش PCR-RFLP
 شماره ۱: C/T هتروزیگوت: (294 bp + 126 bp + 168 bp)
 شماره ۲: C/C هموزیگوت (طبیعی): (294 bp)
 شماره ۳: T/T هموزیگوت: (126 bp + 168 bp)
 DNA Ladder (Marker) : M

(Paired t test)، هم چنین برای مقایسه متغیرهایی که بیش از دو بار در طول مطالعه اندازه گیری شدند، از repeated measures ANOVA استفاده گردید. اطلاعات به دست آمده از طریق پرسشنامه یادآمد ۲۴ ساعته خوراک با استفاده از نرم افزار تغذیه Nutritionist IV مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS v.20 (Chicago, IL) انجام شد. p کم تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

خصوصیات شرکت کنندگان در مطالعه

از ۵۰ بیمار دعوت شده برای شرکت در مطالعه، ۴۴ بیمار شامل ۲۸ مرد و ۱۶ زن، دوره ۶ ماهه مداخله را کامل کردند. میانگین سن بیماران $36/9 \pm 8/8$ سال بود (تصویر شماره ۱). به منظور تعیین تاثیر پلی مورفیسم های C677T و A1298C ژن MTHFR بر اثر کاهش وزن، در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی، پلی مورفیسم های فوق در افراد مورد مطالعه بررسی شد. فراوانی ژنوتیپ و آللی پلی مورفیسم های C677T و A1298C ژن MTHFR در ۴۴ بیمار در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. ژنوتیپ CC در پلی مورفیسم A1298C وجود نداشت و اکثریت بیماران (۹۳/۲ درصد)، ژنوتیپ AC داشتند. بنابراین بیماران براساس پلی مورفیسم های C677T در انتهای مطالعه به دو گروه تقسیم شدند (تصویر شماره ۲).

اطلاعات دموگرافیک، تن سنجی و بیوشیمیایی بیماران در ابتدای مطالعه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. تنها متغیر FBG در ابتدای مطالعه بین دو گروه تفاوت معنی دار داشت ($p=0/02$) که مقایسه از طریق میانگین تغییرات انجام گرفت. تفاوت FBG ماه ششم نسبت به ابتدای مطالعه در گروه CC ($21/6 \pm 6/5$ mg/dL) و در گروه CC+TT ($6/6 \pm 8/1$ mg/dL) بود ($p=0/005$).

جدول شماره ۲: یافته‌های دموگرافیک، تن سنجی و بیوشیمیایی بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی بر اساس پلی مورفیسم ژن MTHFR در ابتدای مطالعه

متغیر	گروه CC (n=35)	گروه CT+TT (n=9)	سطح معنی داری
زن/مرد *	25/10	3/6	0/053
سن (سال)	36/3 ± 8/1	39/1 ± 11/7	0/513
وزن (کیلوگرم)	94/9 ± 16/1	89/8 ± 15/5	0/394
نمایه توده بدن (kg/m ²)	32 ± 4/8	33/4 ± 3/6	0/344
دور کمر (سانتی متر)	105/2 ± 12/3	108/3 ± 16/8	0/608
نسبت دور کمر به باسن (WHR)	0/93 ± 0/07	0/95 ± 0/12	0/688
فشار خون سیستولیک (mmHg)	118/8 ± 7/2	123/3 ± 8/6	0/181
فشار خون دیاستولیک (mmHg)	80/3 ± 4/4	78/9 ± 6	0/527
ALT (IU/L)	80/7 ± 3/9	73/9 ± 35/9	0/624
AST (IU/L)	45/9 ± 16/6	55/7 ± 33	0/407
GGT (IU/L)	47/6 ± 32/7	40 ± 33/1	0/431
FBG (mg/dL) **	106/6 ± 3/6	88/4 ± 9/1	0/02
انسولین ناشتا (μU/mL) **	9/7 ± 9/2	37/2 ± 47	0/405
HOMA-IR **	2/7 ± 3/2	7/6 ± 9/3	0/510
QUICKI	0/35 ± 0/04	0/34 ± 0/09	0/819
کلسترول تام (mg/dL)	208/7 ± 40/6	201/6 ± 53/7	0/720
HDL-C (mg/dL)	45/4 ± 13/3	46/8 ± 6/6	0/640
LDL-C (mg/dL)	117/1 ± 34/1	113/7 ± 38/9	0/817
تری گلیسرید (mg/dL)	207/9 ± 115/8	165/2 ± 57/7	0/131
هموسیتین (μmol/L) **	14 ± 3/2	23/6 ± 28/8	0/529
MDA (nmol/mL) **	24/4 ± 20/4	25/5 ± 20	0/548
TNF-α (pg/mL) **	46/1 ± 44/4	39/9 ± 19/7	0/586
IL-6 (pg/mL) **	59/2 ± 125	7/4 ± 17/9	0/492
CK18-M30 (U/L) **	543 ± 392/3	443/5 ± 149	0/647

تمام داده‌ها به صورت SD ± میانگین گزارش شده‌اند.

* استفاده از آزمون دقیق فیشر

** استفاده از آزمون Mann-Whitney

ALT: آلانین آمینو ترانسفراز، AST: آسپاراتات آمینو ترانسفراز، GGT: گاما گلو تاملیل ترانسفراز، FBG: گلوکز ناشتای خون، HOMA-IR: نماگر مقاومت به انسولین، QUICKI: نماگر حساسیت انسولین، MDA: مالون دی آلدئید، TNF-α: فاکتور نکروز دهنده تومور، IL-6: اینترلوکین - 6، Cytokeratin 18-M30: سیتوکرآتین ۱۸

فراسنج های تن سنجی و بالینی بیماران بر اساس پلی مورفیسم ژن MTHFR: در پایان ماه سوم مطالعه، گروه CC به طور متوسط ۴/۹ درصد (۵±۷/۹ کیلوگرم) و گروه CT+TT نیز ۴/۹ درصد (۳±۹/۳ کیلوگرم) و در پایان ماه ششم گروه CC ۶/۳ درصد (۶±۸/۴ کیلوگرم) و در گروه CT+TT ۶/۶ درصد (۴±۵/۷ کیلوگرم) کاهش وزن داشتند که بین دو گروه معنی دار نبود (جدول شماره ۳).

یافته های سطح گلوکز، انسولین و پروفایل لیپیدی خون بیماران بر اساس پلی مورفیسم ژن MTHFR: گلوکز خون ناشتا در گروه CC کاهش معنی دار و در گروه CT+TT افزایش معنی دار پیدا کرد که در این گروه در دامنه مقدار طبیعی بود. کلسترول تام و LDL-C در گروه CC و HDL-C در گروه CT+TT کاهش معنی دار پیدا کرد (جدول شماره ۴).

سطح آنزیم های کبدی بیماران بر اساس پلی مورفیسم ژن MTHFR: فقط در گروه CC، میزان آنزیم های کبدی در ماه سوم و ششم در مقایسه با ابتدای مطالعه کاهش معنی دار پیدا کرد (جدول شماره ۵).

مقادیر هموسیستئین، شاخص های استرس اکسیداتیو، التهابی و سیتوکرآتین ۱۸ سرم بیماران بر اساس پلی مورفیسم ژن MTHFR: IL-6 در گروه CC افزایش معنی دار داشت (جدول شماره ۶).

جدول شماره ۳: شاخص های تن سنجی و بالینی بیماران دو گروه در ابتداء، انتهای ماه سوم و ششم مداخله بر اساس پلی مورفیسم ژن MTHFR

متغیر	گروه CC (n=35)			گروه CT+TT (n=9)			سطح معنی داری
	ابتدای مطالعه	ماه سوم	ماه ششم	ابتدای مطالعه	ماه سوم	ماه ششم	
وزن (کیلوگرم)	94/9 ± 16/1	89/9 ± 14/6	89/6 ± 14/7	89/8 ± 15/5	85/4 ± 16/1	84 ± 16/6	****
نمایه توده بدن (kg/m ²)	32 ± 4/8	30/4 ± 4/5	29/9 ± 14/4	33/4 ± 3/6	31/7 ± 3/3	31 ± 3/2	****
دور کمر (سانتی متر)	105/2 ± 12/3	100/4 ± 10/9	99/2 ± 10/7	108/3 ± 16/8	106/3 ± 16/1	103/4 ± 16/6	****
نسبت دور کمر به باسن (WHR)	0/93 ± 0/07	0/91 ± 0/06	0/91 ± 0/05	0/95 ± 0/12	0/95 ± 0/11	0/94 ± 0/11	****
فشار خون سیستولیک (mmHg)	118/8 ± 7/2	119/4 ± 6/4	118/9 ± 6/6	123/3 ± 8/6	119/4 ± 3/9	114/4 ± 5/3	****
فشار خون دیاستولیک (mmHg)	80/3 ± 4/4	79/8 ± 3/7	76/7 ± 4/9	78/9 ± 6	80/5 ± 1/7	78/9 ± 3/3	****

تمام داده ها به صورت SD ± میانگین گزارش شده اند. استفاده از آزمون repeated measures ANOVA

* $p < 0/05$ در مقایسه با ابتدای مطالعه **** $p < 0/05$ در مقایسه با ماه سوم مطالعه
 ** $p < 0/01$ در مقایسه با ابتدای مطالعه **** $p < 0/01$ در مقایسه با ماه سوم مطالعه
 **** p -value Student's t-tests بین دو گروه در ماه ششم با استفاده از آزمون
 **** p -value Mann-Whitney بین دو گروه در ماه ششم با استفاده از آزمون

جدول شماره ۴: مقایسه گلوکز، انسولین، HOMA-IR، QUICKI و پروفایل لیپیدی دو گروه بیماران در ابتدا و انتهای مطالعه بر اساس پلی مورفیزم

ژن MTHFR

متغیر	گروه CC (n=۳۵)			گروه CT+TT (n=۹)			سطح معنی داری
	ابتدای مطالعه	ماه ششم	سطح معنی داری	ابتدای مطالعه	ماه ششم	سطح معنی داری	
FBG (mg/dl) *	۱۰۶/۶ ± ۳/۶	۱۰۰/۱ ± ۴۷/۶	۰/۰۱۲	۸۸/۴ ± ۹/۱	۹۵ ± ۸/۳	۰/۰۴۲	** ۰/۵۲۹
انسولین ناشتا (μU/mL) *	۹/۷ ± ۹/۲	۱۱/۳ ± ۱۱/۵	۰/۵۰۸	۳۷/۲ ± ۴۷	۱۶/۶ ± ۱۴/۱	۰/۵۱۵	** ۰/۱۷۴
HOMA-IR *	۲/۷ ± ۳/۲	۲/۸ ± ۲/۹	۰/۸۳۱	۷/۶ ± ۹/۳	۳/۸ ± ۳/۱	۰/۵۱۵	** ۰/۱۶۵
QUICKI	۰/۳۵ ± ۰/۰۴	۰/۳۵ ± ۰/۰۵	۰/۶۹۸	۰/۳۴ ± ۰/۰۹	۰/۳۳ ± ۰/۰۴	۰/۶۰۸	۰/۱۷۱
کلسترول تام (mg/dl)	۲۰۸/۷ ± ۴۰/۶	۱۸۹/۱ ± ۳۶/۷	۰/۰۰۱	۲۰۱/۶ ± ۵۳/۷	۱۷۲/۹ ± ۴۴/۶	۰/۱۸۸	۰/۲۶۸
HDL-C (mg/dl)	۴۵/۴ ± ۱۳/۳	۴۲/۶ ± ۹/۴	۰/۱۵۷	۴۶/۸ ± ۶/۶	۴۱/۲ ± ۷/۴	۰/۰۱۲	۰/۶۹۷
LDL-C (mg/dl)	۱۱۷/۱ ± ۳۴/۱	۱۰۲/۵ ± ۲۴/۷	۰/۰۰۴	۱۱۳/۷ ± ۳۸/۹	۹۴/۵ ± ۳۲/۹	۰/۲۱۰	۰/۴۲۱
تری گلیسرید (mg/dl)	۲۰۷/۹ ± ۱۱۵/۸	۱۹۶/۶ ± ۱۲۶/۷	۰/۴۲۳	۱۶۵/۲ ± ۵۷/۷	۱۴۷/۴ ± ۵۶/۹	۰/۳۰۱	۰/۲۶۶

تمام داده ها به صورت $\pm$ میانگین گزارش شده اند.

* استفاده از آزمون Wilcoxon signed rank test درون گروه

** p-value بین دو گروه در ماه ششم با استفاده از آزمون Mann-Whitney

FBG: گلوکز ناشتای خون، HOMA-IR: نماگر مقاومت به انسولین، QUICKI: نماگر حساسیت انسولین

جدول شماره ۵: مقایسه میزان آنزیم های کبدی دو گروه بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی در ابتداء، ماه سوم و ششم مداخله بر اساس پلی مورفیزم

ژن MTHFR

متغیر	گروه CC (n=۳۵)			گروه CT+TT (n=۹)			سطح معنی داری *
	ابتدای مطالعه	ماه سوم	ماه ششم	ابتدای مطالعه	ماه سوم	ماه ششم	
ALT (IU/L)	۸۰/۷ ± ۳/۹	۴۶/۵ ± ۲۴/۷	** ۴۹/۶ ± ۲۷/۸	۷۳/۹ ± ۳۵/۹	۵۰ ± ۱۱/۴	۵۶/۱ ± ۲۲/۵	۰/۲۶۱
AST (IU/L)	۴۵/۹ ± ۱۶/۶	** ۳۱/۳ ± ۱۲/۵	** ۳۳/۳ ± ۱۵/۷	۵۵/۷ ± ۳۳	۳۸/۴ ± ۸/۴	۴۰/۵ ± ۱۴/۸	۰/۱۱۱
GGT (IU/L)	۴۷/۶ ± ۳۲/۷	** ۳۷/۴ ± ۲۸/۳	** ۳۸/۱ ± ۲۲	۴۰ ± ۲۳/۱	۴۱/۹ ± ۲۳/۲	۴۷/۲ ± ۳۳/۹	۰/۰۹۸

تمام داده ها به صورت $\pm$ میانگین گزارش شده اند. استفاده از آزمون repeated measures ANOVA

* p-value بین دو گروه در ماه ششم با استفاده از آزمون Mann-Whitney

** $p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با ابتدای مطالعه درون گروه

ALT: آلانین آمینو ترانسفراز، AST: آسپارات آمینو ترانسفراز، GGT: گاما گلو تامیل ترانسفراز

جدول شماره ۶: مقایسه سطوح هموسیستین، مالون دی آلدئید، شاخص های التهابی سرم و سیتو کراتین ۱۸ در ابتدا و ماه ششم مداخله بر اساس پلی مورفیزم

ژن MTHFR

متغیر	گروه CC (n=۳۵)			گروه CT+TT (n=۹)			سطح معنی داری **
	ابتدای مطالعه	ماه ششم	سطح معنی داری *	ابتدای مطالعه	ماه ششم	سطح معنی داری *	
هموسیستین (μmol/l)	۱۴ ± ۳/۲	۱۴/۷ ± ۳/۵	۰/۱۲۵	۲۳/۶ ± ۲۸/۸	۲۴/۵ ± ۲۹/۷	۰/۲۵۱	۰/۸۶۴
MDA (nmol/ml)	۲۴/۴ ± ۲۰/۴	۲۷ ± ۱۸/۴	۰/۰۸۴	۲۵/۵ ± ۲۰	۲۳/۹ ± ۱۵/۹	۰/۲۶۰	۰/۹۷۷
TNF-α (pg/ml)	۴۶/۱ ± ۴۴/۴	۴۱/۴ ± ۴۶/۲	۰/۳۰۲	۳۹/۲ ± ۱۹/۷	۴۹/۲ ± ۴۳/۸	۰/۶۷۸	۰/۶۴۷
IL-6 (pg/ml)	۵۹/۲ ± ۱۲/۵	۷۳/۵ ± ۱۳/۹	۰/۰۰۱	۷/۴ ± ۱۷/۹	۱۰/۴ ± ۲۱/۵	۰/۸۸۹	۰/۱۱۷
CK18-M30 (U/L)	۵۴۳/۱ ± ۳۹۲/۳	۴۸۰/۱ ± ۳۵۶/۵	۰/۰۸۵	۴۴۳/۵ ± ۱۴۹	۴۲۶/۹ ± ۱۳۵/۶	۰/۹۵۳	۰/۶۸۹

* استفاده از آزمون Wilcoxon signed rank test درون گروه

** p-value بین دو گروه در ماه ششم با استفاده از آزمون Mann-Whitney

MDA: مالون دی آلدئید، Cytokeratin 18-M30: سیتو کراتین ۱۸، TNF-α: فاکتور نکروز دهنده تومور، IL-6: اینترلوکین-۶

دریافت مواد مغذی و فعالیت بدنی بیماران بر اساس

پلی مورفیزم ژن MTHFR: در آنالیز دریافت رژیم

غذائی ابتدای مطالعه، فقط فیبر کل اختلاف معنی دار

داشت که مقایسه از طریق میانگین تغییرات انجام

گرفت. تغییرات ماه ششم نسبت به ابتدای مطالعه در

گروه CC (۱۷/۲ ± ۱۳/۷ -) و در گروه CT+TT

(۲۱/۲ ± ۳/۹ -) بود که از نظر آماری معنی دار

نبود (p = ۰/۱۵۲). انرژی، پروتئین، کربوهیدرات، کل

قند، ساکارز، کل چربی، چربی اشباع شده، اسید چرب

تک غیر اشباع (MUFA)، اسید چرب چند غیر اشباع

(PUFA)، ویتامین B6 و کل فولات در ماه سوم و ششم نسبت به ابتدای مطالعه و بتاکاروتن در ماه ششم نسبت به ابتدای مطالعه در هر دو گروه کاهش معنی دار داشت. فروکتوز، کل فیبر، کلسترول، سدیم، پتاسیم، ویتامین C، ویتامین E و سلنیوم در گروه CC در ماه سوم و ششم نسبت به ابتدای مطالعه کاهش معنی دار داشت. ویتامین A، آلفاکاروتن، ویتامین B12 در دو گروه تفاوت معنی دار آماری نداشت. هم چنین فعالیت بدنی در دو گروه در طول مدت مطالعه تغییر معنی داری نداشت (اطلاعات نشان داده نشده است).

بحث

پژوهش حاضر، اولین مطالعه‌ای است که اثر پلی مورفیسم‌های (rs 1801133) C677T و (rs 1801131) MTHFR A1298C بر رژیم غذایی کاهش وزن را در درمان بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی ارزیابی کرد. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که کاهش ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ کیلوکالری از انرژی دریافتی روزانه برحسب وزن تعدیل شده، اگر چه در هر دو گروه در پایان ماه سوم و ششم سبب میزان کاهش وزن مشابه شده بود، اما در گروه CC با کاهش معنی دار گلوکز ناشتا، کلسترول تام، LDL-C، آنزیم‌های کبدی و افزایش IL-6 همراه بود و در گروه CT+TT سبب افزایش معنی دار میزان گلوکز ناشتا و کاهش معنی دار HDL-C گردید. اگر چه هموسیستئین در هر دو گروه افزایش اندک یافت، اما در گروه CT+TT میزان هموسیستئین بالاتر از حد طبیعی قرار داشت. در ارتباط با شاخص‌های تن سنجی، یافته‌های این مطالعه مشابه با یافته‌های مطالعات پیشین است (۲۸، ۳۵-۳۱، ۱۶). مطالعه ما یک مداخله انحصاری تغذیه ای است. این نتایج همسو با مطالعاتی است که تعدیل اصلاح شیوه زندگی شامل رژیم غذایی و فعالیت بدنی را توصیه می‌کند (۳۱، ۳۳-۳۱، ۱۶). یافته‌های این مطالعه نشان داد که کاهش وزن، اثر مفیدی بر روی فشارخون نیز دارد.

با وجود این که فشار خون افراد مورد مطالعه در دامنه طبیعی بود، ۶/۳ درصد کاهش وزن در پایان ماه ششم مربوط به گروه CC پلی مورفیسم کاهش معنی داری در فشارخون دیاستولیک ایجاد نمود، اما فشارخون سیستولیک نیز در پایان ماه ششم با ۶/۶ درصد در گروه CT+TT پلی مورفیسم کاهش معنی دار پیدا کرد.

Shah و همکاران کاهش معنی دار در فشارخون سیستولی در بیماران NAFLD با مداخله‌ی تغذیه‌ای و فشارخون سیستولی و دیاستولی در بیماران با مداخله‌ی تغذیه‌ای و فعالیت بدنی گزارش کردند (۳۳). هم چنین Oza و همکاران نشان دادند که اصلاح شیوه‌ی زندگی، سبب کاهش معنی دار فشار خون سیستولی و دیاستولی در بیماران مبتلا به NAFLD می‌شود (۳۲)؛ هر چند هر دو این مطالعات در بیماران با سنین بالا انجام شد. Thomas و همکاران تغییرات معنی داری در فشارخون سیستولی و دیاستولی مشاهده نکردند که این نتیجه می‌تواند ناشی از درصد کم کاهش وزن (۴ درصد) در جمعیت مورد مطالعه و تعداد کم نمونه‌ها (۱۰ نفر) باشد (۳۴).

در مطالعه حاضر، کاهش معنی دار دریافت Mg, Ca, K, Na از طریق رژیم غذایی در گروه‌هایی که فشار خون دیاستولیک آن‌ها کاهش پیدا کرد، دیده شد. اما در گروه CT+TT که فشارخون سیستولیک کاهش یافت، کاهش دریافت معنی دار نبود. البته لازم به ذکر است که میزان دریافت مواد معدنی فوق در طول مطالعه در دامنه میزان مورد نیاز روزانه بود.

در مطالعه حاضر و مطالعات مشابه، ارزیابی میزان دریافت نمک مصرفی به عنوان عامل مخدوشگر در تعیین میزان تغییرات فشارخون صورت نگرفت، از طرفی با توجه به این که توصیه ای درباره‌ی مصرف نمک به بیماران ارائه نشد، به نظر می‌رسد که کاهش وزن بیش از ۵ درصد می‌تواند بر کاهش فشار خون بیماران مبتلا به NAFLD تاثیر داشته باشد. از سوی دیگر کاهش دریافت انرژی در رژیم کاهش وزن، به یقین با کاهش دریافت سدیم همراهِ است که این امر نیز می‌تواند در

پائین آمدن فشارخون تاثیر داشته باشد. نشان داده شده که کاهش وزن می تواند سفتی جدار رگ ها (Arterial Stiffness) را کاهش و عملکرد آندوتلیالی را بهبود بخشد که زمینه ساز اثرات کاهندگی فشارخون است (۳۶،۳۷). اثر کاهش وزن بر سطح گلوکز و انسولین ناشتا در گروه CC به صورت کاهش معنی دار و در گروه CT+TT پلی مورفیسم سبب افزایش معنی دار میزان گلوکز ناشتا شد که البته در گروه اخیر در دامنه مقدار طبیعی بود. یافته های این بررسی با مطالعات Promrat (۱۶)، Lang (۳۰)، Thomas (۳۴) هماهنگ است. این امر ممکن است به دلیل سطح طبیعی گلوکز و انسولین قبل از مداخله باشد. با وجود الگوی نسبتاً طبیعی چربی خون در بیماران، یافته ها کاهش معنی دار سطح کلسترول تام و LDL را در گروه CC و کاهش معنی دار مقدار HDL را در گروه CT+TT نشان داد. یافته های مطالعه حاضر نشان داد که کاهش وزن بیش از ۵ درصد همانند آن چه در فشارخون اتفاق افتاد، سبب بهبود معنی دار در سطح لیپیدهای خون می شود و اثرات مفیدی را بر وضعیت سلامتی و فاکتورهای خطر قلبی و عروقی دارد. نتایج مطالعه با مطالعه Lang (۳۰)، Elias (۲۸)، de Luis (۳۸) مطابقت دارد. اما در مطالعه Thomas (۳۴) و همکاران، تغییرات معنی داری در این رابطه مشاهده نشد که می تواند ناشی از میزان کم کاهش وزن (۴ درصد) و تعداد کم نمونه ها (۱۰ نفر) باشد.

به طور کلی پذیرفته شده است که کاهش وزن بیش تر از ۵ درصد در افراد چاق، تغییرات مطلوبی در بسیاری از عوامل خطر بروز بیماری های قلبی عروقی ایجاد می کند (۳۹). این امر به ویژه برای مبتلایان به کبد چرب از اهمیت بیش تری برخوردار است. در تحلیل یافته های مربوط به گروه پلی مورفیسم، میزان آنزیم های کبدی در گروه CT+TT با وجود ۴/۹ درصد و ۶/۶ درصد کاهش وزن به ترتیب در ماه سوم و ششم که مشابه گروه CC بود، کاهش معنی دار پیدا نکرد و حتی آنزیم GGT افزایش یافت.

آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز (MTHFR)، ۵-۱۰ متیلن تترا هیدروفولات را به ۵-متیل تترا هیدروفولات تبدیل می کند که برای متیلاسیون مجدد هموسیستئین و تبدیل به متیونین مورد استفاده قرار می گیرد. کاهش در فعالیت آنزیم MTHFR به دلیل پلی مورفیسم های C677T و A1298C، منجر به افزایش سطح هموسیستئین می شود (۱۳،۱۴،۴۰). این امر سبب استرس شبکه آندوپلاسمیک، پراکسیداسیون لیپیدی و منجر به استئاتوزیس کبدی شدیدتر می گردد. این فرآیند عاملی جهت افزایش میزان آنزیم های کبدی در افراد گروه CT+TT است (۱۳،۱۴،۴۱،۴۲). لذا با وجود کاهش وزن مشابه دو گروه در ماه سوم و پایان مطالعه، عدم تغییر معنی دار فعالیت بدنی در دو گروه، کاهش معنی دار دریافت انرژی، پروتئین، کربوهیدرات، کل قند، ساکارز، کل چربی، چربی اشباع شده در هر دو گروه و نیز عدم کاهش معنی دار در دریافت آنتی اکسیدان ها از طریق رژیم غذایی بر خلاف گروه CC، سطوح افزایش یافته آنزیم های کبدی کاهش معنی داری پیدا نکرد. این مطالعه برای اولین بار اثرات هم افزایی پلی مورفیسم C677T/A1298C ژن MTHFR را بر روی آنزیم های کبدی، علیرغم رژیم غذایی کاهش وزن نشان می دهد. کاهش وزن در پایان ماه ششم در گروه CC سبب کاهش بیش تر سطح سیتوکراتین ۱۸ گردید، اما معنی دار نبود. سیتوکراتین ۱۸، پروتئین داخل سلولی است که در سطوح بالا توسط بسیاری از سلول ها با مبدا اپی تلیال از جمله سلول های کبدی بیان می شود. چون این پروتئین احتمالاً فقط بعد از تجزیه و از هم پاشیدگی غشاء پلاسمایی در خون ظاهر می شود، از سطوح پلاسمایی آن به عنوان یک وسیله اندازه گیری مرگ سلولی استفاده می شود (۴۳،۴۴). در این مطالعه، سطوح IL-6 افزایش یافت که در گروه CC معنی دار بود. مقدار TNF- α نیز در گروه CT+TT، افزایش نشان داد، ولی معنی دار نبود.

گزارش‌های اولیه، عملکرد محافظت کننده و ضد آپوپتوزی IL-6 را در بیماری کبد چرب پیشنهاد می‌کند که مربوط به توانایی آن در سرکوب استرس اکسیداتیو و عملکرد معیوب میتوکندریایی و پیشگیری از آزادسازی گونه‌های فعال اکسیژن است (۴۵-۴۷). با وجود این، مواجهه مزمن IL-6، کبد را به صدمه آپوپتوز سلولی (apoptotic cell death) حساس می‌کند (۴۹،۴۸،۱۰). Esposito و همکاران در کارآزمایی بالینی، کاهش وزن ۱۰ درصد یا بیش‌تر در زنان چاق و مدت زمان ۲ سال را برای کاهش IL-6 مطرح کردند (۵۰). Lang و همکاران پیشنهاد کردند که کاهش وزن معنی‌دار و طولانی مدت از طریق اصلاح شیوه زندگی به مدت ۱۲ ماه برای کاهش سطوح TNF- α لازم است (۳۰). بنابراین مدت زمان کم مداخله (۶ ماه) در مطالعه حاضر ممکن است یکی از دلایل چنین یافته‌هایی باشد. از طرفی شواهد بسیاری نقش مرکزی TNF- α و سایر سیتوکین‌های پیش التهابی را در پیدایش کبد چرب پیشنهاد می‌کند. اگرچه دلایل متعدد دیگری نیز احتمالاً برای یافته‌های ما وجود دارد. در حقیقت TNF- α به‌طور نسبی نیمه عمر کوتاهی دارد و سطوح کم در گردش آن ممکن است تغییرات اتفاق افتاده در بافت کبدی را نشان ندهد. علاوه بر این، حساسیت سنجش در جمعیت‌های مختلف و فقدان تطبیق برای فاکتورهای دیگر ممکن است TNF- α در گردش را تحت تاثیر قرار دهند (۴۶،۴۸). بیان ژن TNF- α و رستور TNF در کبد بیماران NASH در مقایسه با کبد سالم و کبد چرب افزایش می‌یابد و بیان ژن بیش‌تر در بیمارانی که بیماری آن‌ها شدیدتر است (severe NASH) دیده می‌شود (۴۷، ۵۱). الگوی مشابهی در مورد سطوح IL-6 دیده شده است (۴۹). در مطالعه حاضر مقدار مالون دی آلدئید سرم (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی اندازه‌گیری شد و تغییرات معنی‌داری در سطح سرمی آن دیده نشد و در گروه CT+TT کمی کاهش یافت. MDA در ۹۰ درصد بیماران مبتلا به NASH در مقایسه با بیماران مبتلا به استئاتوزیس افزایش می‌یابد که

توجه‌کننده افزایش استرس اکسیداتیو است. استفاده از MDA به عنوان بیومارکر، بحث‌انگیز باقی مانده است، چون به‌طور انحصاری از پراکسیداسیون لیپید به وجود نمی‌آید و از نظر متابولیکی پایدار نیست و تعیین رنگ سنجی آن اختصاصیت (specificity) کم‌تری دارد (۵۲). اجزای تشکیل‌دهنده رژیم غذایی شامل ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند واکنش‌های اکسیداسیون و استرس اکسیداتیو را تعدیل کند (۵۳). اگرچه اصلاح رژیم غذایی در این مطالعه منجر به کاهش دریافت عوامل آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین C، E و سلنیوم شد، با این حال مقدار این مواد در برنامه غذایی روزانه افراد در دامنه DRI بود و این امر نمی‌تواند سیستم احیاء بدن را تحت تاثیر قرار دهد. افزون بر این، دریافت تمام اجزای رژیم غذایی شامل عوامل آنتی‌اکسیدانی و اکسیدان به میزان مشابهی کاهش یافتند. از طرف دیگر ارتباط معنی‌داری بین اندازه استرس اکسیداتیو و درجه التهاب یا مرحله فیروز در بیماران مبتلا به NAFLD دیده نشده است (۵۴، ۵۵). این گونه به نظر می‌رسد که بین استرس اکسیداتیو در کبد و سطح فراسنج‌های مربوط به آن در گردش خون، ناهماهنگی وجود دارد. در مطالعه حاضر، میزان هموسیستئین سرم بعد از ۶ ماه مداخله در گروه CC با افزایش اندک تقریباً در محدوده طبیعی بود و در گروه پلی‌مورفیسم CT+TT این میزان بالاتر از حد طبیعی قرار داشت که معنی‌دار نبود. دو پلی‌مورفیسم شایع ژن MTHFR عبارتند از C677T و A1298C که پلی‌مورفیسم C677T با افزایش متوسط میزان هموسیستئین خون همراه است. این پلی‌مورفیسم در جایگاه کاتالیز آنزیم است که سبب می‌شود به حرارت حساس گردد. فعالیت آنزیم در افراد دارای ژنوتیپ TT تقریباً ۳۰ درصد و در افراد CT، ۶۵ درصد در مقایسه با حالت طبیعی CC است (۱۱، ۱۴، ۴۲). با این حال به نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم A1298C به تنهایی تاثیر قابل توجهی بر سطح هموسیستئین پلاسما ندارد و نقش تعیین‌کننده خود را در ترکیب با C677T ایفا می‌کند (۵۶). خصوصاً

زمانی که پلی مورفیسم های ژن MTHFR در حالت هتروزیگوت مرکب (A1298C / C677T) باشند که می تواند فعالیت آنزیم را تا ۵۰ درصد کاهش دهد (۵۷). مطالعه حاضر شواهدی را فراهم می کند که زمینه ژنتیکی مانند پلی مورفیسم MTHFR از طریق افزایش هموسیستئین خون، سبب اختلال متابولیسم لیپیدها می گردد و ممکن است در توسعه درجات شدیدتر استئاتوزیس موثر باشد و می تواند پیشرفت بیماری به سمت فیروز کبدی را تسریع بخشد. مکانیسم های پایه این اثر شامل افزایش حساسیت های سلول های کبدی به استرس اکسیداتیو، صدمه با واسطه سیتوکین ها و مقاومت انسولین وابسته به استئاتوزیس است.

محدودیت های این مطالعه شامل استفاده از سنجش آنزیم های کبدی و سونوگرافی برای تشخیص بیماری کبد چرب غیر الکلی که در نتیجه امکان شناسایی بیماران کبد چرب ساده و NASH با استفاده از این روش ها وجود نداشت (نمونه برداری از کبد، دقیق ترین روش ارزیابی میزان و وسعت آسیب کبدی در بیماران

مبتلا به NAFLD است که انجام آن در بیماران سرپائی تحقیق حاضر، امکان پذیر نبود). حجم کم نمونه و با توجه به نوع مطالعه، فقدان گروه شاهد، از دیگر محدودیت های مطالعه است.

به طور کلی یافته های این مطالعه پس از ۶ ماه مداخله کاهش وزن در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی، نشان می دهد که پلی مورفیسم های ژن متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) در درمان بیماری باید مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از تمامی بیماران شرکت کننده در مطالعه که بدون همکاری و همراهی آنان، انجام این مطالعه امکان پذیر نبود، کمال تشکر و سپاس را داریم. این طرح برگرفته از پایان نامه دکتری تغذیه بوده که بودجه آن توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران و انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور تامین شده است.

References

1. Mensink RP, Plat J, Schrauwen P. Diet and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19(1): 25-29.
2. Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(2): 285-300
3. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40(6): 1387-1395.
4. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011; 140(1): 124-131.
5. Lankarani KB, Ghaffarpasand F, Mahmoodi M, Lotfi M, Zamiri N, Heydari ST, et al. Non Alcoholic Fatty Liver Disease in Southern Iran: A Population Based Study. *Hepat Mon* 2013; 13(5): e9248.
6. Sotoudehmanesh R, Sotoudeh M, Ali-Asgari A, Abedi-Ardakani B, Tavangar S-M, Khakinejad A, et al. Silent liver diseases in autopsies from forensic medicine of Tehran. *Arch Iran Med* 2006; 9(4): 324-328.
7. Amirkalali B, Poustchi H, Keyvani H, Khansari MR, Ajdarkosh H, Maadi M, et al.

- Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Its Predictors in North of Iran. *Iran J Public Health* 2014; 43(9): 1275-1283.
8. De Bruyne RML, Fitzpatrick E, Dhawan A. Fatty liver disease in children: eat now pay later. *Hepatol Int* 2010; 4(1): 375-385.
 9. Lonardo A, Caldwell SH, Loria P. Clinical physiology of NAFLD: a critical overview of pathogenesis and treatment. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2010; 5(3): 403-423.
 10. Tsochatzis EA, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators Inflamm* 2009; 831670.
 11. McClain CJ, Mokshagundam SP, Barve SS, Song Z, Hill DB, Chen T, et al. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 2004; 34(1):67-79.
 12. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* 2007; 18(3): 184-195.
 13. Sazci A, Ergul E, Aygun C, Akpinar G, Senturk O, Hulagu S. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Cell Biochem Funct* 2008; 26(3): 291-296.
 14. Serin E, Güçlü M, Ataç FB, Verdi H, Kayaselçuk F, Özer B, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2007; 52(5): 1183-1186.
 15. Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Yang H, Zhan Q, Huang J, et al. Influence of polygenetic polymorphisms on the susceptibility to non alcoholic fatty liver disease of Chinese people. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(4): 772-777.
 16. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010; 51(1): 121-129.
 17. Vuppalanchi R, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology* 2009; 49(1): 306-317.
 18. Zelber-Sagi S, Ratziu V, Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol* 2011; 17(29): 3377-3389.
 19. Duvnjak M, Tomasic V, Gomercic M, Smircic-Duvnjak L, Barsic N, Lerotic I. Therapy of nonalcoholic fatty liver disease: current status. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60(suppl 7): 57-66.
 20. Anstee QM, Daly AK, Day CP. Genetic modifiers of non-alcoholic fatty liver disease progression. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812(11): 1557-1566.
 21. Attar BM, Van Thiel DH. Current Concepts and Management Approaches in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Scientific World Journal* 2013; 2013: 481893.
 22. Hernaez R. Genetic factors associated with the presence and progression of nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. *Gastroenterol Hepatol* 2012; 35(1): 32-41.
 23. Ghaemi A, Taleban FA, Hekmatdoost A, Rafiei A, Hosseini V, Amiri Z, et al. How Much Weight Loss is Effective on Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Hepat Mon* 2013; 13(12): e15227.
 24. Ghaemi AR, Taleban FA, Hekmatdoost A, Rafiei A, Hosseini V, Amiri Z, et al. Effect

- of weight reduction diet on non-alcoholic fatty liver disease. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2013; 8(2): 123-134.
25. Gaaib JN, Nassief AF, Al-Assi A. Simple salting-out method for genomic DNA extraction from whole Blood. *Tikrit J Pure Sci* 2011; 16(2): 9-11.
 26. de Deus DM, de Lima EL, Seabra Silva RM, Leite EP, Cartaxo Muniz MT. Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, A1298C, and G80A Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia Research and Treatment* 2012; 292043.
 27. Saravani M, Salimi S, Yaghmaei M, Mokhtari M, Jafari M. Association between methylene tetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism with preeclampsia in south-east of Iran. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2011; 13(7): 39-43.
 28. Elias MC, Parise ER, Carvalho L, Szejnfeld D, Netto JP. Effect of 6-month nutritional intervention on non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition* 2010; 26(11-12): 1094-1099.
 29. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, et al. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut* 2004; 53(3): 413-419.
 30. Lang HF, Chou CY, Sheu WH, Lin JY. Weight loss increased serum adiponectin but decreased lipid levels in obese subjects whose body mass index was lower than 30 kg/m². *Nutr Res* 2011; 31(5): 378-386.
 31. Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Heilbronn LK, Volaufova J, Smith SR, Alfonso AJ, et al. Effect of 6-month calorie restriction and exercise on serum and liver lipids and markers of liver function. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16(6): 1355-1362.
 32. Oza N, Eguchi Y, Mizuta T, Ishibashi E, Kitajima Y, Horie H, et al. A pilot trial of body weight reduction for nonalcoholic fatty liver disease with a home-based lifestyle modification intervention delivered in collaboration with interdisciplinary medical staff. *J gastroenterol* 2009; 44(12): 1203-1208.
 33. Shah K, Stufflebam A, Hilton TN, Sinacore DR, Klein S, Villareal DT. Diet and exercise interventions reduce intrahepatic fat content and improve insulin sensitivity in obese older adults. *Obesity* 2009; 17(12): 2162-2168.
 34. Thomas EL, Brynes AE, Hamilton G, Patel N, Spong A, Goldin RD, et al. Effect of nutritional counselling on hepatic, muscle and adipose tissue fat content and distribution in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12(36): 5813-5819.
 35. Uslan I, Acarturk G, Karaca E, Albayrak R, Yuksel S, Colbay M, et al. The effects of weight loss on normal transaminase levels in obese patients. *Am J Med Sci* 2007; 334(5): 327-330.
 36. Dengel DR, Kelly AS, Olson TP, Kaiser DR, Dengel JL, Bank AJ. Effects of weight loss on insulin sensitivity and arterial stiffness in overweight adults. *Metabolism* 2006; 55(7): 907-911.
 37. Pierce GL, Beske SD, Lawson BR, Southall KL, Benay FJ, Donato AJ, et al. Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older

- overweight/obese adults. *Hypertension* 2008; 52(1): 72-79.
38. de Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Gonzalez JM. Effect of a hypocaloric diet in transaminases in nonalcoholic fatty liver disease and obese patients, relation with insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79(1): 74-78.
 39. Vetter ML, Wadden TA, Chittams J, Diewald LK, Panigrahi E, Volger S, et al. Effect of lifestyle intervention on cardiometabolic risk factors: results of the POWER-UP trial. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37 (Suppl 1): S19-24.
 40. de Carvalho SC, Muniz MT, Siqueira MD, Siqueira ER, Gomes AV, Silva KA, et al. Plasmatic higher levels of homocysteine in Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutr J* 2013; 12(1): 37.
 41. Hooper AJ, Adams LA, Burnett JR. Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J lipid Res* 2011; 52(4): 593-617.
 42. Siqueira ER, Oliveira CP, Muniz MT, Silva F, Pereira LM, Carrilho FJ. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and high plasma homocysteine in chronic hepatitis C (CHC) infected patients from the Northeast of Brazil. *Nutr J* 2011; 19(10): 86.
 43. Tamimi TI, Elgouhari HM, Alkhouri N, Yerian LM, Berk MP, Lopez R, et al. An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *J Hepatol* 2011; 54(6): 1224-1229.
 44. Wieckowska A, McCullough AJ, Feldstein AE. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. *Hepatology* 2007; 46(2): 582-589.
 45. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, et al. Adipokines and cytokines in non - alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27(5): 412-421.
 46. Puppala J, Siddapuram SP, Akka J, Munshi A. Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. *J Genet Genomics* 2013; 40(1): 15-22.
 47. Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 2006; 131(3): 934-945.
 48. Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(4): 1036-1042.
 49. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(6): 1372-1379.
 50. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women. *JAMA* 2003; 289(14): 1799-1804.
 51. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(1): 59-69.
 52. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2011; 412(15-16): 1297-1305.
 53. Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *J Nutr Biochem* 2008; 19(8): 491-504.
 54. Bonnefont-Rousselot D, Ratzu V, Giral P, Charlotte F, Beucler I, Poynard T. Blood oxidative stress markers are unreliable

- markers of hepatic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23(1): 91-98.
55. Madan K, Bhardwaj P, Thareja S, Gupta SD, Saraya A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol* 2006; 40(10): 930-935.
56. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, et al. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001; 156(2): 409-415.
57. Varga EA, Sturm AC, Misita CP, Moll S. Homocysteine and MTHFR mutations relation to thrombosis and coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111(19): e289-e93.