مجله دیابت و متابولیسم ایران. بهمن- اسفند ۱۳۹۴؛ دوره ۱۵ (شماره۳)۱۹۱-۱۸۳

مقاله پژوهشی

سطح سیتوکراتین ۱۸، فعالیت آنزیم پاراکسوناز و پروفایل لیپیدی در بیماران کبد چرب غیرالکلی در ایران

ناهید تیموری[۱]، هاشم نیری[۱*]

چکیده

مقدمه: بیماری کبد چرب غیرالکلی(NAFLD) به‌عنوان یک بیماری رو به افزایش در بزرگسالان و کودکان در جهان مطرح است. چاقی، مقاومت به انسولین و هیپرتری‌گلیسیریدمی نقش اصلی در همه‌گیری این بیماری ایفا می‌کنند. NAFLD در افرادی‌که الکل مصرف نمی‌کنند می‌تواند به‌صورت استئاتوز ساده شروع شده تا استئاتوهپاتیت، فیبروز و سیروز پیشرفت نماید. سیتوکراتین ۱۸ (CK-18) اصلی‌ترین رشته پروتیئنی متوسط در کبد است. در آسیب سلول‌های کبدی و مرگ سلولی در طی آپوپتوز، رشته‌های CK-18 در اثر تاثیر کاسپازها در جریان خون آزاد می‌شود. یکی از این روش‌های غیرتهاجمی تشخیص، بیومارکرهای جدیدی هستند که از بین آن‌ها CK18 اخیراً به عنوان یک مارکر آپوپتوزی و بسیار امیدوارکننده مطرح است. نشان داده شده در مبتلایان به NAFLD، افزایش استرس اکسیداتیو ممکن است به استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) منجر شود. فعالیت آنزیم پاراکسوناز (PON1) می‌تواند برای بررسی پراکسیداسیون لیپیدی و پیگیری بیماران مبتلا به NAFLD در نظر گرفته شود.

هدف پژوهش حاضر، بررسی سطح CK-18 به‌عنوان یک مارکر آپوپتوز سلول‌های کبدی و آنزیم پاراکسوناز به‌عنوان یک مارکر پراکسیداسیون لیپیدی بوده است.

روش‌ها: این یک مطالعه شاهدار تصادفی است که سطح CK-18، آنزیم پاراکسوناز و پروفایل لیپیدی در ۵۱ بیمار مبتلا به NAFLD بررسی شده با سونوگرافی، در مقابل ۳۰ فرد سالم اندازه‌گیری شده است. قطعه M30 با روش الایزا ساندویچ برای تعیین سطوح در گردش اشکال مختلف از CK-18 و به‌عنوان بیومارکر جایگزین مرگ سلول پیشنهادشده است. آنتی‌بادی جهت تشخیص M30، یک اپی‌توپ جدید در موقعیت ۳۸۷-۳۹۶ از CK18، به‌اصطلاح CK18-Asp396 را شناسایی می‌کند که تنها پس از برش پروتئین توسط کاسپاز آشکار می‌شود و به‌عنوان یک نشانگر انتخابی آپوپتوز فرض شده است. فعالیت PON1 با استفاده از یک سوبسترای سنتتیک مورد سنجش قرار گرفت. از سوبسترای پاراکسون (دی اتیل پارا نیترو فنیل فسفات)، برای تعیین فعالیت PON1 نسبت به پاراکسون در طول موج ٤١٢ و دمای ۳۷ درجه استفاده شد.

یافته‌ها: این بررسی نشان می‌دهد سطح سیتوکراتین ۱۸ (p=۰/۰۰۵)، آنزیم پاراکسوناز (p=۰/۰۳)، تری‌گلیسیرید (p=۰/۰٤) و لیپوپروتیئن با چگالی پایین (P=۰/۰٤) در بیماران کبد چرب غیرالکلی در مقایسه با افراد سالم افزایش داشته است، همچنین بین CK-18 و پاراکسوناز با مراحل اولیه بیماری کبد چرب همبستگی وجود دارد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که اندازه‌گیری سطح سیتوکراتین۱۸ می‌تواند در پیش‌بینی بیماران کبد چرب غیرالکلی مفید باشد و فعالیت آنزیم پاراکسوناز (PON1) می‌تواند برای بررسی پراکسیداسیون لیپیدی و پیگیری بیماران مبتلا به NAFLD در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: کبد چرب غیرالکلی (NAFLD)، استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH)، سیتوکراتین ۱۸ (CK-18)، پاراکسوناز

۱- گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

* ***نشانی***: اصفهان، فلاورجان، خیابان بسیج، بلوار دانشگاه آزاد، دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی۸٤٥١٥/١٥٥، تلفن: ۰۳۱-۳۷٤۲۰۱۳٤۲۰۹، داخلی ۳۵، پست الکترونیک: hnaieri@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۱ **تاریخ درخواست اصلاح**: ۱۳۹۴/۱۲/۱۱ **تاریخ پذیرش**: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی [۱](NAFLD) و استئاتوهپاتیت غیرالکلی [۲](NASH) از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی در دنیا است [۱]. با افزایش نرخ چاقی در سطح جهان، NAFLD نگرانی رو به رشد بهداشتی در نظر گرفته شده است. بیماری کبد چرب غیرالکلی زمانی‌که ۵-۱۰ درصد وزن کبد، چربی تجمع پیدا کند، ظهور می‌یابد. در بیماران کبد چرب، سه دسته تغییرات کبدی مشاهده می‌شود، استئاتوز (تجمع چربی)، هپاتیت (الکلی یا استئاتوهپاتیت) و فیبروز [۲]. در حال حاضر، به‌نظر می‌رسد سونوگرافی کبد و اندازه‌گیری آمینوترانسفرازهای سرمی ابزارهای شناخته‌شده، ارزان و دردسترس ولی ناقص در اسکرینینگ افراد NAFLD است [۳]. بیوبسی کبد یک استاندارد طلایی در تشخیص NAFLD است که این امکان را برای ما فراهم می‌کند که بتوانیم برآوردی از شدت نفوذ چربی به سلول‌ها، التهاب لوبولار، بالونینگ سلول‌های کبد و حتی فیبروز داشته باشیم، اما این روش تهاجمی و گران است [٤].

سطح سیتوکراتین-۱۸، یکی از امیدوارکننده‌ترین نشانگرهای سرمی است که می‌تواند به‌تنهایی یا در ترکیب با سایر پارامترها، بسیار دقیق در تشخیص بیماران مبتلا به NASH به‌کارگیری شود [٤].

سیتوکراتین ۱۸ اصلی‌ترین رشته پروتیئنی متوسط در کبد است [۵ ،۱]. در آسیب سلول‌های کبدی و مرگ سلولی در طی آپوپتوز، رشته‌های CK18 در اثر تاثیر کاسپازها در جریان خون آزاد می‌شود [۷ ،٦ ،۱] . سیتوکراتین ۱۸ به‌وسیله کاسپازهای ۳ و٦ در دو سایت (ASP238 و ASP396) در طی آپوپتوز شکسته می‌شود. قطعات CK18 شکسته شده پایدار هستند و مقاوم به پروتئولیز بوده و در سرم و پلاسما قابل اندازه‌گیری هستند [۸]. M30 یک پپتید جدید است که حاصل تجزیه سیتوکراتین ۱۸ در موقعیت آسپارتات ۲۳۸ و ۳۹٦ است و به‌وسیله یک آنتی‌بادی منوکلونال علیه آن قابل شناسایی است [۸] (شکل ۱).

سطح سرمی M30 با روش الایزا ساندویچ قابل اندازه‌گیری است. در بیماران NAFLD با سطوح طبیعی آمینوترانسفرازها، قطعات CK18 برای تشخیص NASH از استئاتوزیس در کودکان و بزرگسالان سودمند است که نیاز به اعتبارسنجی بیشتری دارد [۸].

بیماری کبد چرب غیرالکلی یک بیماری مرتبط با چاقی است که به‌عنوان تظاهر کبدی سندرم متابولیک مطرح است [۹]. افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب نقش اساسی در شروع و پیشرفت بیماری کبد ایفا می‌کند. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پاراکسوناز یک بیومارکر نشان‌دهنده اختلال کبدی است [۱۰]. پاراکسوناز انسانی یک پروتیئن با ۳٥٤ اسیدآمینه بوده و یک استراز متصل به HDL وابسته به کلسیم است که باعث خواص ضدالتهابی و ضدآتروژنیک HDL می‌شود [۱۲ ،۱۱].

خانواده پروتیئن پاراکسوناز(PON) از سه آنزیم تشکیل شده PON1, PON2,PON3 که ژن‌های کدکننده آن‌ها برروی بازوی بلند کروموزوم ۷ (7q21-22) قرار دارد [۱۰]. PON1 می‌تواند ارگانوفسفات‌هایی مانند پاراکسون را هیدرولیز نماید. توانایی در هیدرولیز پاراکسون فعالیت پارکسونازی نامیده می‌شود [١٤ ،۱۳]. PON1 یک آنزیم آنتی اکسیدانت است و باعث کاهش استرس اکسیداتیو با هیدرولیز لیپوپراکسید می‌شود [۱۰]. مطالعات متعددی تغییرات غیرطبیعی در عملکرد و مورفولوژی میتوکندری در افراد NASH را نشان داده‌اند. افزایش β اکسیداسیون اسیدچرب باعث تولید پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه استرس اکسیداتیو در NASH خواهد بود [۱۰]. اندازه‌گیری پاراکسوناز یک آزمون برای ارزیابی درجه اختلال کبدی است [۱۰]. هدف ما در این مطالعه اندازه‌گیری سیتوکراتین ۱۸ به‌عنوان یک مارکر آپوپتوزی و آنزیم پاراکسوناز به‌عنوان یک مارکر پراکسیداسیون لیپیدی در بیماران کبدچرب غیرالکلی است.

روش‌ها

روش نمونه‌گیری و حجم نمونه

این مطالعه یک آزمون شاهدار تصادفی است که باید برروی حداقل ۳۲ بیمار (جمعاً ٦٤ نفر) انجام می‌شد.

---

[۱] Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)
[۲] non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

معیارهای انتخاب گروه آزمون و گروه کنترل

از میان افراد مراجعه کننده به بیمارستان شهید صدوقی اصفهان از بهمن‌ماه ۱۳۹۲ تا آبان ماه ۱۳۹۳، افراد با میانگین سنی ۳۷/۵ سال دارای BMI در محدوده ۲/۸±۲۸/۵، افرادی که تظاهر بارزی از بیماری کبدی، سابقه‌ای از هپاتیت B وC، مصرف استروئید، الکل، دیابت، حاملگی، هیپوتیروئیدی، نارسائی کلیوی، فشارخون، بیماری‌های قلبی عروقی و مصرف دخانیات نداشتند و قبلاً مورد درمان برا ی کبد چرب قرار نگرفته بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند.

جهت رعایت موازین اخلاقی، در تمامی موارد، افراد در جریان چگونگی انجام کار و دلایل آن به‌صورت شفاهی قرار گرفتند و در صورت داشتن رضایت کامل برای هر فرد پرسشنامه عمومی و پزشکی شامل سابقه بیماری، مصرف دارو و غیره تکمیل شد. سپس جهت انجام سونوگرافی کبد و مجاری صفراوی معرفی شدند. از ۵۱ بیمار زن و مرد که سونوگرافی آن‌ها وجود کبد چرب را تایید نمود، نمونه خون با رعایت ۱۲ تا ۱٤ ساعت ناشتایی جهت انجام تست‌های بیوشیمی و شمارش پلاکت گرفته شد.

آزمایش‌های FBS, Chol, TG, HDL, LDL, AST, ALT, ALK, GGT, α-Amylase, Alb با کیت‌های شرکت پارس آزمون در همان روز با دستگاه اتوآنالایزر Biotechnica, BT3500 در آزمایشگاه واحدی انجام شد. غربال‌گری از نظر HBS-Ag و HCV antibody انجام شد و سرم بیماران پس از سانتریفوژ جهت انجام CK-18 و آنزیم پاراکسوناز تا انجام آزمایش در ۳۲- درجه نگه‌داری شد. نمایه توده بدنی با استفاده از فرمول (تقسیم وزن به کیلوگرم بر مجذور قد به متر مربع) به‌دست آمد.

گروه شاهد: گروه شاهد نیز از میان افراد همسان‌سازی شده از نظر سن و جنس با گروه آزمون، انتخاب شدند. افراد سالم از جمعیت با AST، ALT نرمال، فشار خون نرمال، تری‌گلیسرید نرمال،کلسترول نرمال، قند خون طبیعی، دور کمر طبیعی و بدون سابقه دیابت انتخاب شدند.

اندازه‌گیری سیتوکراتین ۱۸ فراگمنت: سیتوکراتین ۱۸ فراگمنت ۳۰ با استفاده از روش الایزا، کیت تجاری M30-apoptosense ELISA kit شرکت PEVIVA از کشور سوئد اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری آنزیم پاراکسوناز: فعالیت PON1 با استفاده از یک سوبسترای سنتتیک مورد سنجش قرار گرفت. از سوبسترای پاراکسون (دی اتیل پارا نیترو فنیل فسفات)، برای تعیین فعالیت PON1 نسبت به پاراکسون استفاده شد. اندازه‌گیری میزان هیدرولیز سوبسترای اولیه نسبت به p-nitrophenol، با اندازه‌گیری میزان جذب در ٤۱۲ نانومتر در مخلوط سنجش (۹۰۰ میکرولیتر که حاوی ۲ میلی‌مول پاراکسون، ۲ میلی‌مول $CaCl_2$ در ۱۰۰ میکرولیتر بافر تریس HCL (با pH 8.0) و ۱۰۰ میکرولیتر از سرم انجام شد. نمونه بلانک حاوی مخلوط انکوبه شده بدون سرم به‌طور هم‌زمان استفاده شد. فعالیت آنزیم E_{412} پارانیتروفنل per(M/cm) در هر U/ml با استفاده از فرمول محاسبه شد. یک واحد آنزیم مقدار آنزیمی است که ۱ نانومول پاراکسون را در دقیقه هیدرولیز می‌نماید. ضریب خاموشی $M^{-1}Cm^{-1}$ ۰/۰۰۱۸۲۹۰ در نظر گرفته شد [۱٦، ۱۵].

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۰ انجام گرفت. تمام متغیرهای کمی به‌صورت میانگین و خطای استاندارد و متغیرهای کیفی به‌صورت تعداد و درصد بیان گردیدند. برای مقایسه میانگین متغیرهای کمی در دو گروه از آزمون تی و برای بررسی ارتباط بین متغیرهای کمی از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. سطح معناداری از نظر آماری P<۰/۰۵ تعریف گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه ۵۱ بیمار مبتلا به NAFLD گرید یک یا دو با میانگین سنی ۱۰/۲±۳۷/۵ که ۸ نفر ازآن‌ها زن بودند و بقیه مرد و ۳۰ نفر از افراد سالم با میانگین سنی ۱۱/۲±۳٦/۵ که٦ نفرآن‌ها زن بودند مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون کای اسکوئر نشان داد که توزیع فراوانی جنس بین دو گروه اختلاف معناداری نداشت (P=۰/٦۲). نمایه توده بدن (BMI) (p=۰/۰۰۲) در افراد مبتلا به کبد چرب غیرالکلی به‌طور معناداری بیشتر از افراد سالم بود (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین متغیرهای سن، جنس، وزن و BMI در دو گروه کبد چرب غیرالکلی و افراد سالم

متغیر	NAFLD	شاهد
جنس(مرد/زن)	۸/۴۳	٦/۲٤
سن(سال)	۳۷/۵±۱۰/۲	۳٦/۵±۱۱/۲
وزن(کیلوگرم)	٭۸۵/۹±۱۰/۳	۷۷/۹±۱۲/۳
BMI(**kg/m²**)	٭۲۸/۵۳±۲/۸۱	۲٦/۳٦±۳/۱

* تفاوت معنادار در دو گروه در سطح (P= ۰/۰۰۲) وزن و (P=۰/۰۰۲) BMI با استفاده از آزمون کای اسکوئر (حجم نمونه ۵۱ بیمار در مقابل ۳۱ نفر سالم)

میانگین گلوکز خون ناشتا به‌طور معناداری بالاتر از افراد سالم بود (P=۰/۰۱) ولی در هر دو گروه در محدوده طبیعی قرار داشت. میانگین تری‌گلیسیرید (P=۰/۰٤)، و نسبت HDL/LDL (P=۰/۰۳) در گروه کبدچرب به‌طور معناداری بالاتر از افراد سالم بود، میانگین HDL (P=۰/۰٤) در گروه کبدچرب به‌طور معناداری پایین‌تر از افراد سالم بود، و میانگین کلسترول (P=۰/۲۹) در گروه کبد چرب غیرالکلی بالاتر از افراد سالم بود ولی این اختلاف معنادار نبود. میانگین LDL (P=۰/٤۱)، تفاوت معناداری در دو گروه نداشت (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین قند و پروفایل لیپیدی در دو گروه کبد چرب غیرالکلی و افراد سالم

متغیر	NAFLD	شاهد
Fasting Blood glucose(mg/dL)	٭ ۹۲/۵±۹/۹	۸٦/٤±۱۰/۳
Total cholesterol(mg/dL)	۱۸٦/۹±۳۱/۷	۱۸۲/۹±۲۵/۹
Trigricide(mg/dL)	٭۱۵۷/۷±۵۰/۵	۱۳۰/۲±۲۲/۰
LDL-C (mg/dL)	۱۱۰/۳±۲۲/۷	۱۱۲/۰±۲۲/۰
HDL-C(mg/dL)	٭٤۲/۹±۱۱/۷	۵۱/۵±۲۵/۵
HDL/LDL	٭۰/۳۹۱±۰/۷۷	۰/۵٤±۰/۱۰۷

* تفاوت معنا دار در دو گروه در سطح (P= ۰/۰۱) FBS، (P=۰/۰٤) TG, (P= ۰/۰٤) HDL و (P= ۰/۰۳) HDL/LDL ratio با استفاده از آزمون ANOVA (حجم نمونه ۵۱ بیمار در مقابل ۳۱ نفر سالم)

میانگین آسپارتات آمینوترانسفراز (P=۰/۰٤)، آلانین آمینوترانسفراز (P=۰/۰۰۲)، AST/ALT (P<۰/۰۰۱)، گاما گلوتامین ترانسفراز (P<۰/۰۰۱) در مبتلایان به کبد چرب به‌طور معناداری بیشتر از افراد سالم بود. اما میانگین آلبومین (P=۰/۸۱)، آلکالن فسفاتاز (P=۰/۱٦) و آمیلاز (P=۰/۰۷) بین دو گروه اختلاف معناداری نداشت. ۳۱ نفر از این افراد دارای سطح ALT غیرنرمال بودند (جدول ۳).

جدول شماره۳- مقایسه میانگین آنزیم های کبد در دو گروه کبد چرب غیرالکلی و افراد سالم

متغیر	NAFLD	شاهد
AST(IU/L)	٭۳۱/٤±۱۵/۵	۲۵/۳±۱۵/۹
ALT(IU/L)	٭۵۲/٤±٤۱/۹	۲۷/۹±۱۲/۱
GGT(IU/L)	٭٤۳/۳±۲۰/۸	۲۱/۱±۱۱/۹
Amylase(IU/L)	٦۲/۷±۲۰/۷	۷۲/٤±۲٦/۷
ALK(IU/L)	۲٤۵/۳±۲۰۲/٤	۲۰۵/۵±۱۱۷/۵
ALB(mg/dL)	٤/۷۲±۰/۳۳	٤/۷۳±۰/۲۸
*AST/ALT ratio	۰/٦۸±۰/۲۹	۰/۸۸±۰/٤۸

* تفاوت معنادار در دو گروه در سطح (P= ۰/۰٤) AST، (P=۰/۰۰۲) ALT, (P< ۰/۰۰۱) GGT و (P< ۰/۰۰۱) AST/ALT ratio با استفاده از آزمون ANOVA (حجم نمونه ۵۱ بیمار در مقابل ۳۱ نفر سالم)

میزان سیتوکراتین ۱۸ به‌عنوان مارکر آپوپتوز، به‌طور معناداری بالاتر از افراد سالم بود(P=۰/۰۰۵) و میزان فعالیت آنزیم پاراکسوناز به‌عنوان آنزیم آنتی اکسیدان خاص که سبب کاهش محصولات پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود، به‌طور معناداری بالاتر از افراد سالم بود (جدول ٤).

جدول ۴- مقایسه میانگین CK18 و PON1 در دو گروه کبدچرب غیرالکلی و افراد سالم

متغیر	NAFLD	شاهد	OR
CK18(U/L)	×۲۴۳/۵±۱۴۰/۴	۱۴۷/۳±۳۳/۶	۱/۰۰۹
PON1(U/L)	×۱۶۹/۶±۱۲۴/۷	۱۲۸/۹±۹۹/۲	۱/۱۴۴
PON/HDL	×۴۱/۲±۳۰/۲	۲۶/۸±۲۰/۲	۱/۳۷۰

×تفاوت معنی دار در دو گروه در سطح (P= ۰/۰۰۵) CK18، PON1(P=۰/۰۳), PON/HDL (P=۰/۰۲)

با استفاده از آزمون ANOVA (حجم نمونه ۵۱ بیمار در مقابل ۳۱ نفر سالم)

مقادیر OR با آزمون Regression logistic محاسبه شده است

بحث و نتیجه‌گیری

NAFLD یک اپیدمی مهم و چالش برانگیز است. سیر طبیعی بیماری در طولانی مدت نشان می‌دهد که بیماران مبتلا به کبد چرب ساده یک دوره نسبتاً خوش خیم بالینی دارند، در حالی که مبتلایان به NASH در معرض خطر برای پیشرفت بیماری به سیروز و سرطان هپاتوسلولار هستند [۱۷]. در حال حاضر، آزمون غیرتهاجمی در دسترس برای ارزیابی شدت بیماری کبد چرب غیرالکلی شامل علائم بالینی و آزمایشگاهی، آزمایش‌های روتین، تصویربرداری و ترکیب نتایج آزمون بالینی و خون است. متاسفانه، استفاده از این آزمون‌ها محدود هستند و نمونه برداری از کبد تنها ابزار قابل اعتماد جهت تشخیص NASH و درجه بندی شدت آسیب کبدی باقی مانده است [۱۷]. اگر چه این روش دارای محدودیت‌های از جمله گران و تهاجمی بودن می‌باشد، دارای خطاهای مربوط به نمونه‌برداری نیز بوده و انجام آن با برخی از عوارض و به‌طور نادر خطر مرگ‌ومیر همراه است [۳٦]

سونوگرافی یک روش غیرتهاجمی، ارزان و به‌طور گسترده‌ای در دسترس، برای تشخیص استئاتوز کبدی با حساسیت مفید از ۹٤-٦۰ درصد و اختصاصیت از ۹۵-٦٦ درصد است؛ همچنین منجر به برآورد ذهنی از نفوذ چربی در کبد در یک سیستم نمره دهی سه‌نقطه‌ای یا بیشتر (خفیف، متوسط و شدید) می‌شود. این روش دارای محدودیت‌هایی است، از جمله حساسیت کم برای استئاتوز خفیف، ناتوانی برای افتراق فیبروز خفیف از استئاتوز و عدم تعیین دقیق کمیت نفوذ چربی و وابستگی آن به اپراتور و نظر مشاهده‌گر تا ۷۲ درصد و همچنین کاربرد کم برای بیماران چاق و کسانی که با بیش از حد در روده گاز دارند [۱۹، ٤]. طیف کبد چرب وسیع‌تر از آن است که توسط غربال‌گری آمینوترانسفرازهای غیرطبیعی سرم به‌تنهایی تشخیص داده شود. اختلالات در ALT سرم به‌طور انحصاری در موارد شدید کبد چرب رخ می‌دهد [۱۸]. کبد چرب غیرالکلی شایع‌ترین علت بالا بودن مداوم سطح سرمی ALT در میان جمعیت عمومی ایران است [۱۹]. افزایش فعالیت آمینوترانسفرازها شایع‌ترین اختلال گزارش‌شده در بیماران مبتلابه NASH هستند، بااین‌حال سطح ALT در نزدیک به ۸۰ درصد از بیماران مبتلابه کبد چرب در محدوده طبیعی است و هیچ سطحی از ALT برای پیش‌بینی بهینه NASH و فیبروز پیشرفته وجود ندارد [۲۱، ۲۰] کبد چرب غیرالکلی و NASH از بیماری‌های کبدی و به‌عنوان عامل مرگ‌ومیر مرتبط به کبد، به رسمیت شناخته‌شده است. هدف پژوهش حاضر، بررسی سطح CK-18 به‌عنوان یک مارکر آپوپتوز سلول‌های کبدی و آنزیم پاراکسوناز به‌عنوان یک مارکر بیوشیمیایی برای پراکسیداسیون لیپیدی بوده است. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که سیتوکراتین-۱۸ فراگمنت M30 در بیماران با اضافه‌وزن و نه چاقی مفرط و درجات پایین کبد چرب (گرید I) می‌تواند ابزار مناسبی برای غربال‌گری افراد NAFLD باشد.

در مطالعه حاضر GGT در بین تست‌های کبدی بیشترین همبستگی را با کبد چرب نشان می‌دهد (OR =۱/۰۸۵) و در ۸۰ تا ۹۵ درصد از بیماری‌های کبدی صرف نظر از علت آن افزایش می‌یابد. GGT اختصاصیت کمتر و حساسیت بیشتری دارد. نیمه‌عمر آن ۱۰ روز بوده که در فاز بهبود از سوءمصرف الکل نیمه‌عمر آن به ۲۸ روز نیز می‌رسد [۲۲] . در میان پارامترهای بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در این مطالعه POX/HDL و سپس POX بیشترین همبستگی را با کبد چرب غیرالکلی دارند و می‌توانند پیشگوئی بهتری برای NAFLD باشند (به‌ترتیب OR=۱/۳۷۰ و OR=۱/۱٤٤).

ما با بررسی پروفایل لیپیدی و آنزیم‌های کبدی در مبتلایان به NAFLD به سطوح اختلاف معناداری در سطوح AST، ALT، GGT، HDL و تری‌گلیسیرید دست‌یافتیم. در مطالعه حاضر سطوح کلسترول، LDL، Amylase و آلبومین تفاوت معناداری نداشت که مشابه یافته‌های Pagano و همکاران(۲۰۰۱) بود [۲۳].

همچنین بین CK-18 با AST، ALT، GGT، ALK رابطه مستقیم و قوی وجود دارد (P<۰/۰۰۱). به علاوه میان CK-18 و آمیلاز و AST/ALT رابطه معکوس وجود دارد. کشف اهمیت افزایش مرگ سلولی، به‌عنوان یک نتیجه از لیپوتوکسی، در توسعه و پیشرفت NASH منجر به این فرضیه شده است که اندازه‌گیری سطوح در حال گردش CK-18 محلول، ما را در تعیین کمیت مرگ سلول‌های کبدی و در نتیجه تشخیص غیر تهاجمی NASH کمک می‌نماید [٢٤].

Kälsch و همکاران در سال ۲۰۱۱ نقش سیتوکراتین-۱۸ تجزیه شده توسط کاسپاز در تشخیص فیبروز در گروهی از ۱۲۷ بیمار چاق را مورد مطالعه دادند. آن‌ها متوجه شدند که سیتوکراتین-۱۸ تجزیه شده توسط کاسپاز با استئاتوز کبدی و آسیب کبدی که با سطح ترانس آمیناز سرم مورد ارزیابی قرار گرفته، در ارتباط است [۲۵].

یافته‌های اصلی مطالعه فلدستین و همکاران در سال ۲۰۱۳ مربوط به یافته‌هایی است که از اندازه‌گیری سطح قطعه CK-18 در خون، به‌عنوان یک مارکر آپوپتوز سلول‌های کبدی و یک تست قابل اعتماد برای تشخیص NASH در کودکان مشکوک به NAFLD، به‌دست آمده است. نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که سطح سیتوکراتین-۱۸ پلاسما به‌مقدار فراوانی در کودکان مبتلا به NASH در مقایسه با استئاتوز کبدی بالاتر است، CK-18 دارای دقت بسیار عالی برای تشخیص NASH در بیوپسی بوده، سطح CK-18 با ویژگی‌های اصلی بافت‌شناسی از NASH، NAS و مرحله فیبروز مرتبط می‌باشد. چند گروه دقت و صحت قطعات CK-18 برای پیش‌بینی حضور NASH در افراد بزرگ‌سال را مورد بررسی قرار داده است همگی نتیجه گرفتند، سطح CK-18 به‌عنوان تنها آزمون غیرتهاجمی و امیدوار کننده‌ترین تست برای تشخیص NASH بزرگ‌سالان توسط دستورالعمل‌های تازه منتشرشده برای تشخیص و مدیریت کبد چرب غیرالکلی به رسمیت شناخته‌شده است [۲۷، ۲٦، ۱۷، ۸، ۷].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت PON1 در بیماران مبتلابه کبد چرب غیرالکلی به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از افراد نرمال بود.

اختلال اکسیداسیون چربی در میتوکندری یکی از سازوکارهای مسوؤل برای تجمع چربی کبدی است. همان‌طور که قبلاً ذکر شد آسیب کبدی می‌تواند با استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی همراه باشد و PON1 می‌تواند نقش موثر در توسعه و پیشرفت آسیب کبدی از استئاتوز ساده تا مراحل پیشرفته داشته باشد. استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیماری‌های مختلف مانند چربی خون، دیابت و فشارخون بالا که همگی با چاقی و سندرم متابولیک همراه‌اند درگیر می‌شود. کبد چرب غیرالکلی بیماری است که با چاقی همراه است. با این‌حال، در مورد دخالت آسیب اکسیداتیو در کبد چرب غیرالکلی مرتبط با چاقی اطلاعات کمی وجود دارد. اختلال در مهار رادیکال آزاد اکسیژن به‌عنوان یک سازوکار در پیشرفت هپاتواستئاتوز مطرح‌شده است. آنزیم پاراکسوناز، آنتی‌اکسیدان است و سبب کاهش محصولات پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود [۹].

مطالعات اولیه در سال ۱۹۷۰ برای اولین بار کاهش قابل‌توجهی در فعالیت PON1 سرم در گروه کوچکی از بیماران مبتلا به سیروز کبدی را نشان داد [۲۸]. این نتایج در یک گروه بزرگ‌تر از بیماران مبتلابه درجات مختلف آسیب مزمن کبدی تایید شد [١٤].

نتایج حاصل از مطالعه Jaganntha و همکاران (۲۰۱۳) نشان می‌دهد که در بیماران مبتلا به سیروز و هپاتیت مزمن ویروسی، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیشتر و فعالیت PON1 کمتر است، افزایش استرس اکسیداتیو در این بیماران وجود دارد و کاهش فعالیت PON1 که از کاهش سم‌زدایی در سیروز پشتیبانی می‌نماید، دیده می‌شود [۲۹].

در مطالعه Hashemi و همکاران (۲۰۱۲)، هرچند فعالیت پاراکسونازی PON1 در بیماران NAFLD افزایش نشان داد ولی این افزایش معنادار نبود [۱٦].

سنتز PON1 توسط PPAR[۳] تنظیم مثبت می‌شود. چند ترکیب دارویی (به‌عنوان مثال آنتی‌اکسیدان) سبب تحریک فعالیت PPAR و بیان PON1 هر دو می‌شود. شواهد اخیر نشان می‌دهد که PON1 و پروتئین ۱ جذب کننده مونوسیت (MCP-1) در هماهنگی پاسخ التهابی در بافت آسیب‌دیده دخیل است [۱۰].

تحقیقات بالینی و تجربی نشان دهنده افزایش سطح DNA میتوکندریایی (mtDNA) سلول‌های کبد در طی کبد چرب است، اگرچه برخی از مطالعات دیگر نشان دهنده کاهش محتوای mtDNA بودند. سطح mtDNA کبدی به شدت بار اضافی چربی و یا استرس اکسیداتیو بستگی دارد در مورد فعالیت mitochondrial respiratory chain (MRC) (به‌عنوان مثال، انتقال الکترون)، تنفس میتوکندری (به‌عنوان مثال، مصرف اکسیژن) و بازده فسفریلاسیون اکسیداتیو تفاوت‌های نیز وجود دارد [۳۰].

گیرنده‌های هسته‌ای یک گروه بزرگی از عوامل رونویسی هستند که به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی ژن‌های درگیر در کنترل متابولیک، دفاع در برابر سموم، استرس اکسیداتیو و التهاب عمل می‌کنند. یکی از این گیرنده‌ها، رسپتور فعال کننده پرولیفراتیو پراکسی زوم (PPARs) هستند. هنگامی که این گیرنده کلون شد، PPARα نامیده شد [۱۰]. از سوی دیگر وقتی مقاومت به انسولین در بافت چربی سفید رخ می‌دهد، با افزایش سطح اسیدهای چرب غیراستری در پلاسما میزان mtFAO (mitochondrial fatty acid oxidation) در کبد تقویت می‌شود. افزایش FA در کبد همچنین می‌تواند باعث فعال شدن PPARa شده [۳۰]. که یکی از اثرات آن تحرک تولید PON1 است. بنابراین به‌نظر می‌رسد شدت تجمع چربی در کبد و میزان پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از آن بر توازن ذکرشده در بالا تاثیر گذار است.

پلی‌مورفیسم‌های گزارش‌شده در توالی کدینگ PON1 شامل تعویض گلوتامین (Q) /آرژینین (R) در موقعیت ۱۹۲ و تعویض لوسین (L)/متیونین (M) در موقعیت ۵۵ است. پلی‌مورفیسم Q/R در موقعیت۱۹۲ فعالیت کاتالیزوری PON1 را بسیار تحت تأثیر قرار می‌دهد. مقدار و فعالیت کاتالیزوری PON1 به‌طور مؤثر تحت تأثیر پلی‌مورفیسم دو منطقه مشترک برنامه‌نویسی (L55M و Q192R) و پلی‌مورفیسم در پروموتر ویژه در T/C– ۱۰۷ است [۱٦].

Torun و همکاران، ۲۰۱۳ فعالیت پاراکسونازی PON1 را در کودکان و نوجوانان چاق و غیر چاق سالم و چاق مبتلا به کبد چرب در گریدهای مختلف اندازه‌گیری نمودند و مشاهده نمودند که فعالیت آنزیم با افزایش استئاتوز افزایش می‌یابد [۹].

متغیرهای زیست‌محیطی دموگرافیک از ٦-۱ درصد بر فعالیت PON1 تأثیر گذارند. استفاده از هورمون‌های پیشگیری از بارداری (اثر مثبت)، سن (اثر منفی) و وضعیت سیگار کشیدن (اثر منفی) بر فعالیت آنزیم دارد. اثرات قابل‌توجهی از مواد غذایی مختلف بر فعالیت PON1 نشان داده‌اند. این احتمال وجود دارد که تأثیر بر فعالیت PON1 با واسطه متابولیسم لیپوپروتئین‌ها باشد. با این‌وجود، این امکان وجود دارد که برخی از واریانس‌های غیرقابل توضیح PON1 ناشی از تفاوت در رژیم غذایی در میان شرکت‌کنندگان باشد [۳۱]. ترکیب اسید چرب در HDL می‌تواند در فعالیت آنزیم مرتبط با آن (PON1) تاثیر گذار باشد. به‌عنوان مثال اسید استئاریک و دی هومو-گاما لینولنیک اسید با فعالیت PON1 ارتباط مستقیم دارد [۳۲]. یافته‌ها نشان می‌دهد که اطلاعات ما از سطح آنزیم با استفاده از یک متد تک، مانند غلظت یا فعالیت آنزیم علیه یک سوبسترای واحد، ممکن است یک تصویر کامل فیزیولوژیکی از فعالیت آنزیم در داخل بدن ارائه ننماید. تنوع فنوتیپی۹۲- ٦۵ درصد از فعالیت PON1 را

[۳] peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).

به خود اختصاص می‌دهد. اثرات ژنتیکی می‌تواند بر غلظت آنزیم (بیان) و یا فعالیت خاص آنزیم یا هر دو تأثیرگذار باشد. علاوه بر این PON3 در مقایسه با PON1، فعالیت بسیار پایین‌تری برای سوبستراهای پاراکسون و فنیل استات دارد بنابراین، هرچند PON1 آنزیم پاراکسوناز غالب در سرم است ولی ممکن است که PON3 کمک غیرقابل اغماضی در فعالیت لاکتونازی PON سرم داشته باشد. PON1 در درجه اول با تغییر در ژن ساختاری کنترل می‌شود، اما تغییر در چند ژن ناشناس دیگر نیز فعالیت آن را کنترل می‌نمایند [۳۱]. هر چند برخی از محققین معتقدند که PON3 در برابر سوبستراهای مصنوعی مانند پاراکسون و phenylacetate فعال نیست [۳۳].

در یک جمعیت معین با پلی‌مورفیسم در موقعیت ۱۹۲ و ۱۰۸ می‌تواند فعالیت PON1 سرم ٤٠ برابر متفاوت است [٣٤]. محدودیت ما در این مطالعه عدم استفاده از بیوبسی کبد به‌عنوان روش استاندارد و نتیجتاً عدم توانایی تشخیص بین کبد چرب غیرالکلی و NASH بود. تشخیص کبد چرب غیرالکلی توسط سونوگرافی داده شد. محدودیت دیگر بررسی تعداد کم بیماران به‌علت هزینه‌ها بود.

نتیجه‌گیری

این بررسی نشان می‌دهد سطح سیتوکراتین ۱۸، آنزیم پاراکسوناز، آنزیم‌های کبد و تری‌گلیسرید در بیماران کبد چرب غیرالکلی در مقایسه با افراد سالم افزایش ولی میزان HDL کاهش داشته است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله، بدین‌وسیله از مسوؤلین دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، سرکار خانم دکتر رازی و مدیریت و پرسنل آزمایشگاه شهید صدوقی اصفهان که نهایت همکاری در انجام این پروژه را داشتند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

مآخذ

1. Feldstein AlE. Wieckowska A, Lopez AR, Liu Yao-C, Zein NN.Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology*; 2009; 50(4): 1072-1078.
2. Monteiro PA. Mota J, Silveira L S, Cayres S U, Antunes B, Fernandes R A, Freitas I F. Morphological and metabolic determinants of nonalcoholic fatty liver disease in obese youth: a pilot study. *BMC research notes* 2013; 6(89).
3. Koot Bart GP, Van der Baan-Slootweg OH, Bohte AE, Nederveen AJ, van Werven JR, Merkus MP, Tamminga-Smeulders CLJ, Schaap FG, Jansen PLM Stoker J. Accuracy of prediction scores and novel biomarkers for predicting nonalcoholic fatty liver disease in obese children. *Obesity* 2013; (21): 3:583-590.
4. Festi D, Schiumerini R, Marzi L, Di Biase AR, Mandolesi D, Montrone L, Scaioli E, Bonato, G, Marchesini-Reggiani G, Colecchia A. Review article: the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease–availability and accuracy of non-invasive methods. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2013; 37(4): 392-400.
5. Feldstein AE, Alkhouri N, De Vito R, Alisi A, Lopez R, Nobili V. Serum Cytokeratin-18 Fragment Levels Are Useful Biomarkers for Nonalcoholic Steatohepatitis in Children. *The American iournal of gastroenterology* 2013; 108, 1526-1531.
6. Cusi K, Chang Zhi Harrison S, Lomonaco R, Bril F, Orsak B, Ortiz-Lopez C, Hecht J, Feldstein A, Webb A. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* 2014; 60(1): 167-174.
7. Diab DL, Yerian L, Schauer P, Kashyap SR, Lopez R, Hazen SL, et al. Cytokeratin 18 fragment levels as a noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2008; 6(11):1249-54.
8. Yilmaz Y. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18–the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2009; 30(11-12): 1103-1109.
9. Torun E, Gökçe S, Aydın S, Cesur Y. Serum paraoxonase activity and oxidative stress and their relationship with obesity-related metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2014; 27(7-8): 667–675.
10. Camps J, García-Heredia A, Rull A, Alonso-Villaverde C, Aragones G, Beltrán-Debón R, et al. 2012. PPARs in regulation of paraoxonases: control of oxidative stress and inflammation pathways. *PPAR research* 2012; (2012).

11. Gupta N, Gill KD, Singh S. Paraoxonase 1 (PON1) activity, polymorphisms and coronary artery disease. *Coronary Artery disease–new Insights and Novel Approaches* 2012; 4:115.
12. Bełtowski J, Wójcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 2003; 170(1):21-9.
13. Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. Indian J Med Res. 2009; 130(4):361-8.
14. Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G. The paraoxonases: their role in disease development and xenobiotic metabolism. *Springer* 2008; 6, 323 page.
15. Bantel H, John K, Schulze-Osthoff K. Robust Detection of Liver Steatosis and Staging of NAFLD by an Improved ELISA for Serum Cytokeratin-18 Fragments. Am J Gastroenterol. *American College of Gastroenterology* 2014. 109(1): 140-141.
16. Hashemi M, Bahari A, Hashemzehi N, Moazeni-Roodi A, Shafieipour S, Bakhshipour A, et al. Serum paraoxonase and arylesterase activities in Iranian patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Pathophysiology* 2012; 19(2):115-9.
17. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44(1):27-33.
18. Fishbein M, Miner M, Mogren C, Chalekson J. The spectrum of fatty liver in obese children and the relationship of serum aminotransferases to severity of steatosis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2003; 36(1):54-61.
19. Jamali R, Merat S, Khoshnia M, Jafari E, Kalhori A, Abolghasemi H et al. Persistent alanine aminotransferase elevation among the general Iranian population: prevalence and causes. World journal of Gastroenterology: *WJG* 2008; 14(18):2867
20. Adams LA, Feldstein AE. Non-invasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. *J Dig Dis* 2011; 12: 10 – 6.
21. Verma S, Jensen D, Hart J, Mohanty SD. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Liver Int* 2013; 33(9):1398-405.
22. McPherson RA, Pincus MR. *Henry s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methodes*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011; 2:299-311.
23. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002; 35(2):367-372
24. Eguchi A, Wree A, Feldstein AE. Biomarkers of liver cell death. *Journal of hepatology* 2014; 60 (5):1063–1074.
25. Kälsch J, Bechmann L P, Kälsch H, Schlattjan M, Erhard J, Gerken G, Canbay A. Evaluation of biomarkers of NAFLD in a cohort of morbidly obese patients. *Journal of nutrition and Metabolism* 2011; 2011: 369168.
26. Cao W, Zhao C, Shen C, Wang Y. Cytokeratin 18, Alanine Aminotransferase, Platelets and Triglycerides Predict the Presence of Nonalcoholic Steatohepatitis. *PloS one* 2013; 8(12):e82092.
27. Younossi ZM, Stepanova M, Rafiq N, et al. Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. *Hepatology* 2011; 53: 1874–82
28. Ferré N, Camps J, Prats E, Vilella E, Paul A, Figuera L, et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clinical chemistry* 2002; 48(2):261-8
29. Jagantha B, Nagarajappa K, Mallikarjuna CR, 2013. Serum paraoxonase activity, oxidative stress & lipid profile in patients with choronic liver disease. *IJPBS* 2013; 3(1):01-06.
30. Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013; 58(4): 1497-507..
31. Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, VandeBerg JL, et al. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity* 2008; 102(2):147-54.
32. Boshtam M, Emami Razavi A, Pourfarzam M, Ani M, Naderi GA, Basati G, et al. Serum Paraoxonase 1 Activity Is Associated with Fatty Acid Composition of High Density Lipoprotein. *Disease markers* 2013; 35(4):273-80.
33. Reddy S. The Paraoxonase Gene Family at the Intersection of Toxicology, Inflammation, Infection and Cancer. Fielding School of Public Health, December 11, 2014
34. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical pharmacology* 2005; 69(4):541-50.
35. Fuhrman B. Regulation of hepatic paraoxonase-1 expression. *Journal of lipids* 2012; 2012: 5 pages.
36. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. 2012. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55(6):2005-23.

SERUM CYTOKERATIN-18 FRAGMENT LEVELS, PARAOXONASE ACTIVITY AND LIPID PROFILE OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER IN IRAN

Nahid Teimouri[1], Hashem Nayeri[1*]

1. *Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran*

ABSTRACT

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic liver disease is increasing in adults and children worldwide. Obesity, insulin resistance or diabetes type II, hyperlipidemia and hypertriglyceridemia plays a major role in the epidemiology of this disease. Cytokeratin 18 (CK-18) the major intermediate filament protein in the liver is a marker of increased hepatocyte apoptosis. The aim of this study was to determinate CK-18 level as a marker of hepatocyte apoptosis and paraoxonase as a biochemical marker for lipid peroxidation.
Methods: This case–control study was done on 51 subjects with confirmed NAFLD by ultrasound and 30 healthy individuals. CK-18 is proposed as a biomarker alternative cell death. The serum was used for measurement of the apoptosis-associated neo-epitope in the C-terminal domain of CK-18 by the M30-Apoptosense ELISA kit. The M30 detection antibody recognizes a neo-epitope mapped to positions 387 to 396 of CK18, so called CK18-Asp396 that is only revealed after caspase cleavage of the protein and is postulated as a selective biomarker of apoptosis. Serum PON1 activity was assayed using a synthetic substrate. Paraoxon substrate (diethyl-p nitrophenylphosphate), was deliberated using the increase of absorbance at 412 nm at 37 ◦C.
Results: There were significant differences regarding serum cytokeratin 18 (p=0.005), paraoxonase activity (p=0.03), triglycerides (p=0.04) and low-density lipoprotein (p=0.04) between NAFLD and healthy subjects. Between CK-18 and paraoxonase with the early stages of fatty liver disease are associated.
Conclusion: This study suggests that serum levels of cytokeratin 18 can be useful in predicting non-alcoholic fatty liver disease. Paraoxonase activity (PON1) should be considered a biochemical marker of lipid peroxidation and the need for follow-up in patients with NAFLD

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH), Cytokeratin 18 (CK-18), Paraoxonases

[*] Basig St., Azad University Blu , falavarjan, Esfahan, Islamic Azad University, Postal Code: 84515155, Tell: 03137420134209, Email: hnaieri@gmail.com