

بررسی اثر مصرف شکلات تلخ بر پروفایل لیپیدی، آپولیپوپروتئین B، آپولیپوپروتئین A-1 و التهاب در بیماران مبتلا به دیابت نوع 2: کارآزمایی بالینی تصادفی

ندا حقیقت¹، علی رستمی¹، شهریار اقتصادی²، فرزاد شیدفر³، ایرج حیدری⁴، آغا فاطمه حسینی⁵

- 1- کارشناس ارشد تغذیه، دانشکده تغذیه و رژیم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- 2- نویسنده مسئول: استاد گروه تغذیه، دانشکده تغذیه و رژیم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، پست الکترونیکی: eghtesadi@tums.ac.ir
- 3- استاد گروه تغذیه، دانشکده تغذیه و رژیم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- 4- استادیار، مرکز تحقیقات غدد (فیروزگر)، انستیتو غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- 5- مربی گروه آمار، دانشکده مدیریت آمار زیستی، دانشکده مدیریت و اطلاع رسانی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: 91/10/11

تاریخ پذیرش: 92/2/15

چکیده

سابقه و هدف: شکلات تلخ به علت اثرات حفاظتی در بیماری‌های قلبی عروقی توجه محققان را به خود جلب کرده است. این مطالعه با هدف تعیین اثرات 8 هفته مصرف شکلات تلخ بر پروفایل لیپیدی، آپولیپوپروتئین B، آپولیپوپروتئین A-1 و hs-CRP در بیماران مبتلا به دیابت نوع 2 انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این کارآزمایی بالینی 69 بیمار مبتلا به دیابت نوع 2 به طور تصادفی به دو گروه (مداخله و کنترل) تقسیم شدند. گروه مداخله (n=32) روزانه 25 گرم شکلات تلخ (450 mg/day پلی‌فنل) و گروه کنترل (n=28) همان میزان شکلات سفید دریافت کردند. نمونه‌های خون در ابتدا و بعد از 8 هفته مداخله جمع‌آوری شد و سطوح hs-CRP، کلسترول تام، LDL-C، HDL-C، TG و آپولیپوپروتئین A-1، آپولیپوپروتئین B خون اندازه‌گیری شد. در ابتدا و انتهای مطالعه، فشار خون، وضعیت تن‌سنجی، سطوح فعالیت بدنی و دریافت مواد غذایی برآورد و بین دو گروه مقایسه شد.

یافته‌ها: در گروه شکلات تلخ، میزان TG به طرز چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود ($p=0/007$). در مقایسه با ابتدای مطالعه در گروه شکلات تلخ میزان آپولیپوپروتئین A-1 ($p=0/045$) افزایش و مقدار آپولیپوپروتئین B ($p=0/01$) و hs-CRP ($p=0/005$) سرم کاهش یافت. در میزان غلظت کلسترول تام، LDL-C، HDL-C سرم در هر دو گروه نسبت به ابتدای مطالعه و بین دو گروه، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: شکلات تلخ غنی از پلی‌فنل hs-CRP، TG، آپولیپوپروتئین B، آپولیپوپروتئین A-1 را در بیماران دیابتی بهبود می‌بخشد اما بر کلسترول تام، LDL-C، HDL-C اثری نشان نداشت.

واژگان کلیدی: شکلات تلخ، پروفایل لیپیدی، وضعیت التهابی، آپولیپوپروتئین‌ها، دیابت نوع 2

• مقدمه

طبق آمار WHO شیوع جهانی دیابت به صورت نگران‌کننده‌ای رو به افزایش است و بر اساس پیش‌بینی‌ها تا سال 2025 تعداد افراد مبتلا به بیش از 300 میلیون نفر خواهد رسید (1). در کشور ما بر اساس نتایج نخستین بررسی عوامل خطر بیماری‌های غیر واگیر در سال 1384 مشخص شد که 7/8% از جمعیت بزرگسالان 25 تا 64 ساله یا در حدود دو میلیون نفر به دیابت مبتلا هستند

(2). بیماری‌های قلبی عروقی علت اصلی مرگ و میر در بیماران دیابت نوع 2 است (3) و خطر ابتلا به این دسته بیماری‌ها در افراد دیابتی 2 تا 4 برابر بیشتر از افراد دیگر است (4). مطالعات نشان می‌دهد که افزایش بروز عوارض ماکروواسکولار دیابت تنها با عوامل خطرهای متداول قلبی عروقی قابل توجیه نیست. مطالعات گسترده روی عوامل خطر بیماری‌های عروقی کرونر نشان داده است که عوامل

مطالعات متعددی نشان داده که کاکائو باعث افزایش HDL-C (12)، کاهش LDL و کلسترول تام (13) می‌شود. برعکس، در برخی مطالعات کاهش معنی‌دار کلسترول تام و LDL-C در افراد مصرف کننده‌ی شکلات تلخ غنی از فلاونوئید مشاهده نشده است (14). شکلات علاوه بر فلاونوئیدها حاوی اسید لینولئیک و اسید اولئیک است که می‌توانند متابولیسم کلسترول را تحت تأثیر قرار دهند (15). بنابراین، می‌توان گفت با وجود برخی مطالعاتی که اثرات مفیدی را گزارش نکرده‌اند، اما در اکثر بررسی‌ها اثرات مثبتی بر پروفایل لیپیدی خون توسط مصرف شکلات دارای فلاونوئید نشان داده شده است. همچنین، شکلات دارای مقادیر بالای Trans-Resveratrol است (16). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که Resveratrol اثرات محافظت از قلب (17)، ضد سرطانی (18) ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی (19) دارد و در مدل‌های حیوانی، باعث کاهش چربی احشایی نیز می‌شود (20). پس این احتمال وجود دارد که برخی اثرات مفید شکلات در حفاظت از سیستم قلبی عروقی به وجود این ترکیب در مقادیر قابل ملاحظه در شکلات مربوط باشد. بر اساس جستجوی انجام شده، اغلب مطالعات اثرات مفید شکلات را تأیید کرده‌اند. با وجود این بیشتر این مطالعات به صورت کوتاه مدت بوده‌اند و اغلب روی افراد سالم انجام شده‌اند و کمبود مطالعات بلند مدت به ویژه روی بیماران دیابتی کاملاً ملموس است. در بررسی قبلی ما مصرف روزانه 25 گرم شکلات تلخ به مدت 8 هفته توانست نسبت به ابتدای مطالعه قند خون ناشتا را به صورت چشمگیری در بیماران مبتلا به دیابت نوع 2 کاهش دهد (21). در مطالعه‌ی حاضر، اثرات مصرف 25 گرم شکلات تلخ حاوی فلاونول را بر التهاب و پروفایل لیپیدی بیماران دیابتی نوع 2 بررسی کردیم.

• مواد و روش‌ها

شرکت کنندگان: 69 بیمار مبتلا به دیابت ملیتوس نوع 2 در این مطالعه‌ی تصادفی شرکت کردند. حجم نمونه‌ی مورد نیاز پژوهش با استفاده از معیار HDL-C سرم، طبق مطالعه‌ی Mellor و همکاران (26) و با استفاده از فرمول، با اطمینان 95 %، توان آزمون 90 % و با پیش‌بینی 10 % افت نمونه، در مجموع دو گروه مداخله و شاهد 70 نفر تخمین زده شد. افراد انتخاب شده بر مبنای معیارهای ورود به مطالعه به طور تصادفی در یکی از دو گروه مداخله

مؤثر در ظهور و پیشرفت آترواسکلروز فراتر از کلسترول تام و تری‌گلیسیریدها است.

در حال حاضر، نقش مقادیر پایین HDL-C پلاسما به عنوان یکی از عوامل خطرزای آترواسکلروز روشن شده است و به نظر می‌رسد اندازه‌گیری آپولیپوپروتئین A-1 به عنوان پروتئین اصلی HDL در ارزیابی احتمال بروز CVD برتر از اندازه‌گیری HDL-C به تنهایی باشد. همچنین آپولیپوپروتئین B پروتئین ساختاری ذرات لیپوپروتئین آتروژنیک است (شامل LDL، بقایای VLDL یا IDL و بقایای شیلومیکرون) که با تعیین مقدار آن می‌توان به پیش‌بینی‌های ارزشمندی در احتمال بروز بیماری‌های عروق کرونر دست یافت (5). به علاوه، التهاب یک مکانیسم مستقل در بیماری‌زایی آترواسکلروز در نظر گرفته می‌شود و نشان داده شده که بیشتر شاخص‌های التهابی می‌توانند خطر بروز وقایع قلبی عروقی را پیش‌بینی کنند (6). اخیراً فلاوانول‌ها (flavan-3-ols) که زیرمجموعه‌ای از فیتوکمیکال‌ها موسوم به فلاونوئیدها هستند، به دنبال انتشار نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک مبنی بر ارتباط معکوس دریافت فلاوانول‌ها و مرگ و میر بیماری‌های قلبی (7) توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند. منابع غذایی این ترکیبات برای انسان‌ها عبارتند از: میوه‌ها، سبزی‌ها، چای، شراب (8)، کاکائو و محصولات مشتق از کاکائو (9). نشان داده شده که پلی‌فنل‌های کاکائو علاوه بر اثرات ضدالتهابی در مسیر لیپوکسیژناز، از طریق مکانیسم‌های دیگر نیز باعث کاهش التهاب می‌شوند که عبارتند از: جلوگیری از فعال شدن میتوژنی سلول‌های T، فعال شدن پلی‌کلونال سلول‌های B، کاهش بیان mRNA اینترلوکین 2، کاهش ترشح اینترلوکین 2 توسط سلول‌های T (10)، کاهش سیتوکین‌های التهابی (IL5, TNF- α , TGF- β) و کاهش خاصیت التهابی آن‌ها (11). hs-CRP یک پروتئین فاز حاد است که سطح آن در پاسخ به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد. با وجود این، شکلات غنی از فلاونوئید نتوانست مقدار ICAM_1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1) و hs-CRP (12) را در برخی مطالعات کاهش دهد. البته، ممکن است عدم مشاهده‌ی اثر معنی‌دار روی ICAM_1 و hs-CRP به دلیل دز و مدت مداخله‌ی ناکافی در این مطالعات بوده است. از این رو، مطالعات طولانی مدت‌تری برای پاسخ‌گویی بهتر به این پرسش مورد نیاز است.

حاوی تقریباً 143 کیلوکالری بود، با این تفاوت که گروه مداخله در هر بار مصرف 450 میلی گرم پلی فنل مصرف کرد. این شکلات‌ها توسط فردی غیر از نمونه‌گیر در بسته‌بندی‌های هم رنگ و هم شکل قرار داده شد.

روش کار: شرکت‌کنندگان به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه مداخله روزانه 25 گرم شکلات تلخ 83% (450 میلی گرم پلی فنل) و گروه کنترل همان مقدار شکلات سفید به مدت 8 هفته دریافت کردند. برای جلوگیری از تغییرات وزنی حین مطالعه به افراد آموزش داده شد که انرژی رژیمی معمول خود را کاهش دهند و شکلات‌ها را جایگزین کالری کاهش یافته کنند. به این ترتیب، شکلات‌ها جایگزین قند، شکر و شیرینی جات مصرفی روزانه آن‌ها شد. از افراد خواسته شد رژیم غذایی و فعالیت بدنی معمول خود را طی این مطالعه حفظ کنند. میزان پذیرش (compliance) افراد، از روی نسبت تعداد بسته شکلات مصرف شده به تعداد کل شکلات‌ها محاسبه شد. بیمارانی که پذیرش زیر 80% داشتند، از مطالعه حذف شدند.

ویژگی‌های زمینه‌ای و تن‌سنجی شامل سن، وزن، قد، مدت ابتلا و دز داروی مصرفی بیماران ثبت شد. قد با استفاده از قدسنج متصل به ترازو و با دقت 0/5 سانتی‌متر بدون کفش اندازه‌گیری شد. وزن با ترازوی Seca و با دقت 0/5 کیلوگرم در حالت ناشتا با حداقل لباس و بدون کفش در ابتدا و انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد. BMI از تقسیم وزن بر مجذور قد به دست آمد. در شروع و پایان مطالعه پرسشنامه‌ی بین‌المللی فعالیت بدنی، پرسشنامه‌ی 24 ساعته یاد آمد خوراک سه روز ابتدایی مطالعه (یک روز تعطیل و دو روز عادی) و سه روز انتهایی مطالعه توسط هر دو گروه مداخله و شاهد تکمیل شد. پرسشنامه‌ی 24 ساعته یادآمد خوراک با استفاده از نرم افزار Nut4 (N4) تجزیه و تحلیل و وضعیت دریافت روزانه‌ی کالری، کربوهیدرات، چربی، پروتئین، فیبر، ویتامین‌های A، C و E و روی (Zn) و سلیوم از رژیم غذایی مشخص شد.

(دریافت‌کننده‌ی شکلات تلخ 83%) و گروه کنترل (دریافت‌کننده‌ی شکلات سفید) تقسیم شدند. این افراد از مرکز غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انتخاب شدند. بیماران در صورت تمایل به همکاری، داشتن سنین 35 تا 70 سال، سپری شدن حداقل یک سال از تشخیص دیابت بر اساس $FBS > 126 \text{ mg/dl}$ یا $200 \text{ mg/dl} < 2 \text{ HPG}$ ، $HbA1C < 9\%$ ، $BMI < 40$ و عدم ابتلا به بیماری‌های تیروئیدی، کلیوی و کبدی، آریتمی، فیبریلاسیون دهلیزی و سایر بیماری‌های قلبی، عدم بارداری و شیردهی می‌توانستند در این مطالعه شرکت کنند. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: آلرژی به شکلات، مصرف انسولین، استعمال سیگار، الکل یا مواد مخدر، مصرف مکمل تغذیه‌ای شامل مولتی‌ویتامین و آنتی‌اکسیدان، تغییر دز دارو یا میزان فعالیت بدنی در طول مطالعه یا 2 ماه پیش از مطالعه، پیروی از رژیم غذایی خاص مانند کاهش یا افزایش وزن یا گیاهخواری 2 ماه پیش از شروع یا در حین مطالعه. کلیه‌ی شرکت‌کنندگان حداقل یک ماه قبل از مطالعه و در طول مطالعه نباید هیچ گونه مولتی ویتامین و مواد معدنی مصرف می‌کردند یا به صورت افراطی غذاهای غنی از فلاونوئید مانند شکلات و چای سبز مصرف می‌کردند. هدف مطالعه برای شرکت‌کنندگان توضیح داده شد و رضایت‌نامه‌ی کتبی آگاهانه از آن‌ها اخذ شد. این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد تأیید قرار گرفت (مجوز شماره‌ی 1420 در تاریخ 1389/4/27) و در مرکز ثبت کارآزمایی بالینی با شماره شناسه IRCT138812222602N3 ثبت شد.

ترکیبات شکلات‌ها: شکلات‌ها در دو نمونه از شرکت پرند به صورت هدیه دریافت شد. شکلات تلخ 83% (Bitter chocolate) برای گروه مداخله و شکلات سفید برای گروه کنترل تهیه شد که ترکیبات هر کدام در جدول 1 آمده است. شکلات‌ها از همه لحاظ بجز میزان درصد کاکائو (میزان پلی فنل) مشابه بودند. هر بار شکلات (25 گرم)

جدول 1. ترکیبات شکلات‌های مورد استفاده در 25 گرم

ترکیبات در 25 گرم	پروتئین	چربی	کربوهیدرات	کاکائو	میزان فلاونوئید	انرژی
نوع شکلات	(gr)	(gr)	(gr)	(%)	(mg)	(Kcal)
شکلات تلخ	2	11	9	83%	450	143
شکلات سفید	3	9	13	0%	0	145

• یافته‌ها

از بین 69 فرد شرکت‌کننده در ابتدای طرح 60 نفر توانستند مطالعه را به پایان ببرند (32 نفر در گروه شکلات تلخ و 28 نفر در گروه شکلات سفید) و 9 نفر از ادامه‌ی مطالعه انصراف دادند یا به دلیل معیارهای خروج از مطالعه کنار گذاشته شدند. از این تعداد 6 نفر (2 نفر بنا به دلایل شخصی، 2 نفر به علت تصادف، یک نفر به علت عفونت و یک نفر به دلیل تغییر دز دارو) در گروه شکلات سفید و 3 نفر (یک نفر به علت مسافرت و 2 نفر به دلایل شخصی) در گروه شکلات تلخ بودند. طبق جدول 2 هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو گروه با در نظر گرفتن سن، جنس، وزن، قد، BMI، طول مدت بیماری، نوع مصرف دارو و فعالیت بدنی مشاهده نشد. به همین ترتیب، هیچ تغییر قابل توجهی در وزن، BMI و سطح فعالیت بدنی در طول مطالعه مشاهده نشد. در مقدار، کالری، کربوهیدرات، چربی، پروتئین، فیبر، ویتامین‌های A، C، E، روی (Zn) و سلنیوم هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو گروه قبل و بعد از مداخله مشاهده نشد (جدول نشان داده نشده است).

جدول 2. مشخصات عمومی افراد در گروه‌های مورد مطالعه در ابتدای مطالعه

P	شکلات سفید (n=28)	شکلات تلخ (n=32)	متغیر
0/484	57/17 ± 7/86	58/71 ± 9/07	سن
0/673	42/9 (n=12) 57/1 (n=16)	37/5 (n=12) 62/5 (n=20)	جنس مرد (%) زن (%)
0/726	76/58 ± 11/33	77/62 ± 11/40	وزن (kg)
0/544	29/42 ± 4/58	30/12 ± 4/18	BMI (kg/m ²)
0/678	3/92 ± 7/92	4/62 ± 7/46	طول مدت ابتلا

داده‌ها در جدول فوق به صورت (میانگین ± انحراف معیار) یا تعداد (%) بیان شده است.

P-value مقایسه‌ی بین گروه‌ها (آزمون T مستقل یا کای اسکوتر)

ارزیابی آزمایشگاهی: نمونه‌های خون در شروع و پایان مطالعه بعد از 10 تا 12 ساعت ناشتا بودن و قبل از مصرف قرص‌های کاهنده قند خون جمع‌آوری شد. سرم توسط سانتریفوژ در دور 3000 تا 4000 به مدت 10 دقیقه بعد از خون‌گیری به دست آمد. قند خون ناشتا با روش گلوکز اکسیداز با کیت تجاری شرکت پارس‌آزمون با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر Liasys، HbA1c با روش کروماتوگرافی و با استفاده از دستگاه DS-S، انسولین با روش IRMA (Immunoradiometric assay) و با استفاده از کیت شرکت Immunotech، تری‌گلیسیرید با استفاده از روش GOP-PAP و کیت تشخیصی شرکت پارس‌آزمون، کلسترول تام با روش Chol-Ox با کیت تجاری شرکت پارس‌آزمون و با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر Liasys، HDL-C با روش رسوبی و کیت تشخیصی شرکت پارس‌آزمون اندازه‌گیری شد. مقدار LDL-C سرم به طور غیرمستقیم با استفاده از فرمول فریدوالد (Friede Wald) به این صورت محاسبه شد:

$$LDL-C = TC - HDL-C - TG/5$$

آپولیپوپروتئین‌های A-I و B به روش ایمونوتوربیدومتری توسط اتوآنالایزر Cobas و با استفاده از کیت تجاری شرکت پارس‌آزمون اندازه‌گیری شد. محدوده‌ی نرمال آپولیپوپروتئین A-1 برای آقایان 104-225 mg/dl و برای خانم‌ها 108-202 mg/dl بود. محدوده‌ی نرمال آپولیپوپروتئین B برای آقایان 60-117 mg/dl و برای خانم‌ها 66-133 mg/dl بود. hs-CRP به روش particle enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) توسط دستگاه Roshe آلمان (با حساسیت 1pg/ml) اندازه‌گیری شد و محدوده‌ی نرمال آن تا 47/6 Pg/ml بود.

روش‌های آماری: برای تعیین تبعیت داده‌ها از توزیع نرمال، آزمون کولموگراف-اسمیرنوف انجام شد. در این مطالعه، مقایسه‌ی متغیرهای کمی بین دو گروه با آزمون T مستقل یا من‌ویتنی و مقایسه‌ی تغییرات در هر گروه در طول مطالعه با استفاده از آزمون t زوج یا ویلکاکسون انجام شد. به منظور ارزیابی ارتباط بین متغیرهای کیفی از آزمون کای 2 (کای اسکوتر) به کار رفت. همه‌ی مقادیر بر اساس انحراف معیار ± میانگین گزارش شد. سطح 0/05 به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

آپولیپوپروتئین B و hs-CRP در مقایسه با گروه کنترل تفاوت چشمگیری نداشت. در گروه شکلات تلخ، در مقایسه با ابتدای مطالعه میزان آپولیپوپروتئین A-1 ($p<0/045$) افزایش، آپولیپوپروتئین B ($p<0/01$) و hs-CRP ($p=0/005$) سرم کاهش یافت. در میزان تغییرات غلظت کلسترول تام، LDL-C، HDL-C سرم در هر دو گروه مداخله و کنترل نسبت به ابتدای مطالعه و بین دو گروه هیچ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).

در جدول 3 اثرات شکلات تلخ بر روی پروفایل لیپیدی، آپولیپوپروتئین A-1، آپولیپوپروتئین B و hs-CRP آورده شده است. پروفایل لیپیدی شامل تری‌گلیسرید، کلسترول تام، HDL-C، LDL-C، آپولیپوپروتئین A-1، آپولیپوپروتئین B و hs-CRP سرم در آغاز مطالعه بین دو گروه متفاوت نبود. در گروه شکلات تلخ میزان تری‌گلیسرید به طرز چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود ($p<0/05$) ولی غلظت کلسترول تام، HDL-C، LDL-C، آپولیپوپروتئین A-1،

جدول 3. میانگین و انحراف معیار متغیرها در گروه‌های مورد مطالعه در شروع و پایان مطالعه

گروه شکلات سفید (n=28)					گروه شکلات تلخ (n=32)				
P2	P1	میانگین تغییرات	بعد از مداخله	قبل از مداخله	P1	میانگین تغییرات	بعد از مداخله	قبل از مداخله	
0/08 0/007 0/057	0/38	3/00±17/82	143/57±44/07	140/57±47/94	0/07	-6/46±19/91	112/37±41/6*	118/84±46/02	تری‌گلیسرید** (mg/dL)
0/763 0/935 0/433	0/103	-6/21±19/49	152/42±37/49	158/64±40/33	0/37	-2/50±15/55	153/15±31/35	155/65±35/23	کلسترول کل (mg/dL)
0/623 0/381 0/56	0/70	-0/67±9/52	94/35±35/02	95/03±38/75	0/40	-3/06±20/56	87/53±22/44	90/59±29/31	LDL-کلسترول (mg/dL)
0/158 0/106 0/85	0/96	0/03±4/63	38/57±8/00	38/53±9/24	0/80	0/34±7/66	42/21±9/17	41/87±8/73	HDL-کلسترول (mg/dL)
0/681 0/489 0/054	0/47	-1/67±12/19	150/46±25/56	152/14±25/61	0/045	4/56±12/36	149/81±17/98*	145/37±16/0	آپولیپوپروتئین A1 (mg/dL)
0/804 0/507 0/48	0/26	-2/50±11/70	85/46±21/05	87/96±23/79	0/01	-4/46±9/44	82/06±17/94*	86/53±20/11	آپولیپوپروتئین B (mg/dL)
0/269 0/753 0/13	0/785	-1/38±14/90	17/21±15/53	18/59±20/70	0/005	-7/88±17/68	18/82±23/71*	26/71±34/66	hsCRP (Pg/ml)

Abbreviations: HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein, BMI, body mass index; hsCRP, highly sensitive C-reactive protein; داده‌ها در جدول فوق به صورت (میانگین±انحراف معیار) بیان شده است.

P1-values تفاوت در مقایسه با شروع مطالعه در داخل هر گروه (آزمون T زوج یا ویلکاکسون)

P2-values تفاوت میانگین تغییرات بین گروه‌های مورد مطالعه (آزمون T مستقل یا من‌ویتنی)

• بحث

دیابت به طور معمول با دیس لیپیدمی آتروژنیک مرتبط است و بیماران مبتلا به آن در معرض خطر بالای آتروسکلروزیس و بیماری‌های قلبی عروقی قرار دارند. مقاومت انسولینی نقص اساسی بیماران دیابتی است. مقاومت انسولینی به تولید بیش از حد VLDLs و کاهش فعالیت لیپوپروتئین لیپاز منجر می‌شود که در نهایت باعث پدیدار شدن یک دیس لیپیدمی مرکب شامل هیپرتری‌گلیسریدمی، کاهش HDL-C و افزایش ذرات LDL-C و هیپرلیپیدمی بعد از صرف غذا می‌شود (22). آپولیپوپروتئین‌های B و A1 نسبت به HDL و LDL پیشگویی کننده‌های قوی تری برای بیماری‌های قلبی عروقی هستند (23). در پژوهش حاضر مصرف 25 گرم شکلات تلخ به مدت 8 هفته در بیماران دیابتی نوع 2 موجب کاهش آپولیپوپروتئین B و افزایش آپولیپوپروتئین A1 نسبت به ابتدای مطالعه شد، اما تأثیری بر LDL و HDL نداشت. بر اساس جستجوی انجام شده، این مطالعه اولین پژوهشی است که ارتباط بین دریافت شکلات تلخ با آپولیپوپروتئین‌ها را بررسی کرد و اثرات مثبت شکلات تلخ را بر سطوح آپولیپوپروتئین‌ها نشان داد. در مطالعه‌ی Allen (24) در افراد دارای فشار خون نرمال با کلسترول بالا با مصرف 22 گرم شکلات تلخ (2 قالب شکلات حاوی 2/2 گرم استرول) یا همان مقدار شکلات بدون استرول به مدت 4 هفته، LDL-C کاهش یافت، اما کاهش معنی‌داری در مقادیر TG گزارش نشد. در مطالعه‌ی Grassi نیز مصرف شکلات تلخ (100 گرم شکلات حاوی 88 میلی‌گرم فلاوانول) به مدت 15 روز به طرز معنی‌داری کلسترول تام را 6/5% و LDL-C را 7/5% کاهش داد، ولی تغییری در مقادیر HDL-C و TG مشاهده نشد (25). از سوی دیگر، مطالعه‌ی Mellor که روی بیماران دیابتی انجام شد (26) و بیشترین شباهت را به مطالعه حاضر داشت، نشان داد که پس از مصرف 45 گرم شکلات تلخ با یا بدون فلاوانول به مدت 8 هفته HDL-C بیماران مصرف‌کننده‌ی شکلات دارای فلاوانول به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($1/16 \pm 0/08$ در برابر $1/26 \pm 0/08$ میلی‌مول در لیتر، $p < 0/05$) و نسبت کلسترول تام سرم به HDL-C کاهش یافت ($4/4 \pm 0/4$ در برابر $4/1 \pm 0/4$ میلی‌مول در لیتر، $p = 0/04$). در حالی که تغییر معنی‌داری در میزان TG، LDL-C و کلسترول تام مشاهده نشد. در یک متا آنالیز مصرف کوتاه مدت شکلات به صورت وابسته به دوز توسط افراد بیمار میزان LDL-C را به مقدار 5/87 میلی‌گرم در

دسی لیتر و کلسترول تام را به مقدار 5/82 میلی‌گرم در دسی لیتر کاهش داد (27). در متاآنالیز دیگری هم مکمل یاری با شکلات تلخ، میزان LDL-C سرم را به میزان $5/90 \text{ mg/dl}$ و میزان کلسترول تام را $6/23 \text{ mg/dl}$ کاهش داد اما تفاوت معنی‌داری بر تغییرات تری‌گلیسرید و HDL-C نداشت (28). در مطالعه‌ی حاضر، تغییرات در میزان LDL-C و HDL-C بیماران مصرف‌کننده‌ی شکلات تلخ نسبت به ابتدای مطالعه و همین طور نسبت به گروه شکلات سفید معنی‌دار نبود. این موضوع می‌تواند به علت حجم کم نمونه در هر گروه باشد. از طرف دیگر در انتهای مطالعه در گروه مصرف‌کننده‌ی شکلات تلخ مقادیر تری‌گلیسرید سرم در گروه مداخله با میانگین تغییرات $-6/46 \pm 19/91 \text{ mg/dl}$ کاهش یافت، ولی در محدوده‌ی تفاوت معنی‌دار قرار نگرفت. با وجود این، مقایسه‌ی دو گروه در انتهای مطالعه نشان داد که تری‌گلیسرید سرم بیماران مصرف‌کننده‌ی از شکلات تلخ نسبت به شکلات سفید به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p = 0/007$).

در پژوهشی اثر شکلات تلخ و بادام به عنوان بخشی از رژیم کم‌چرب بر شاخص‌های لیپیدی سرمی به مدت 6 هفته و در 4 گروه بررسی شد (29). در پایان مطالعه، تری‌گلیسرید در گروه‌های مختلف به ترتیب 21% (شکلات)، 19% (شکلات و بادام) و 13% (بادام) کاهش یافت. البته افراد شرکت‌کننده در این مطالعه زنان سالم دارای کلسترول نرمال بودند و بیشترین کاهش تری‌گلیسرید سرم در مصرف‌کنندگان شکلات تلخ مشاهده شد. در مطالعه‌ی Taubert (30) با مصرف 6/3 گرم شکلات تلخ (30mg پلی‌فنل) و همین مقدار شکلات سفید در بیماران مبتلا به فشار خون به مدت 18 هفته میانگین تری‌گلیسرید سرم افراد در گروه شکلات تلخ ($100 \pm 14 \text{ mg/dl}$) و در گروه شکلات سفید ($96 \pm 16 \text{ mg/dl}$) به مراتب پایین‌تر از بیماران گروه کنترل بود. البته، این تغییرات در میزان تری‌گلیسرید سرم در حد معنی‌دار نبود. بنابراین، نتایج در این خصوص هم‌چنان متناقض است. این عدم همبستگی می‌تواند به مقادیر و ترکیب‌های مختلف استفاده شده در شکلات‌ها و گروه‌های هدف متنوع مربوط شود. با توجه به مطالعات پیشین، تغییرات مشاهده شده در افراد دارای عوامل خطر بیماری‌های قلبی عروقی بیشتر بود. از طرف دیگر با توجه به انتخاب بیماران دیابتی با پروفایل لیپیدی نرمال در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که مداخله‌ی مذکور در بیماران دیابتی

تفاوت اثرات شکلات‌های متفاوت است و شاید به سایر ترکیبات موجود در آن‌ها مانند منیزیم یا اثرات برهم‌کنشی ترکیبات موجود در کاکائو مربوط شود (34). از طرف دیگر، تاکنون در مطالعات مختلف میزان کلی پلی‌فنل‌ها بیان شده و اثر ترکیبات متفاوت پلی‌فنل‌ها ارزیابی نشده است. بررسی اثر منحصر به فرد ترکیبات مختلف پلی‌فنل‌ها بر وضعیت گلیسمی، فشار خون، پروفایل لیپیدی و سایر شاخص‌های متابولیک می‌تواند توجیه‌کننده این تناقض‌ها باشد. از این رو به نظر می‌رسد بررسی اثر ترکیبات موجود در شکلات تلخ به تنهایی بر گروه‌های مختلف افراد ضروری است. نکته‌ی مهم این است که دانش ما در مورد مکانیسم عمل ترکیبات مؤثر شکلات مانند فلاوانوئیدها همچنان ناقص است.

یکی از محدودیت‌های این کارآزمایی بالینی غیرعملی بودن استفاده از پلاسبوی مناسب در مداخله با شکلات بود. با این که فرد پرسشگر از محتویات بسته‌ی شکلات‌ها اطلاعی نداشت، اما به علت تفاوت رنگ شکلات‌های دو گروه ابهاماتی در گروه مصرف‌کننده‌ی شکلات سفید به وجود آمده بود. از طرف دیگر با این که در استفاده شده در این مطالعات برگرفته از دز مؤثر در مطالعات پیشین بود، اما ضروری است که اثر وابسته به دز شکلات در بهبود پروفایل چربی و التهاب در مطالعات آینده بررسی شود. با توجه به نتیجه‌ی پژوهش حاضر و مطالعات پیشین انجام مطالعات آینده با حجم نمونه‌ی بیشتر و دز مناسب شکلات و مدت زمان بیشتر ضروری است.

درنهایت، تجویز 25 گرم شکلات تلخ حاوی 450 میلی گرم پلی‌فنل به مدت 8 هفته توانست در افراد دیابتی مبتلا به فشار خون، سطح تری‌گلیسرید را بهبود بخشد و تا حدودی بر شاخص‌های پیش‌بینی کننده‌ی بیماری‌های قلبی عروقی، آپولیپوپروتئین A-1 و آپولیپوپروتئین B اثر مثبت داشته باشد؛ اما اثر آن در کنترل سایر شاخص‌های پروفایل چربی مانند HDL-C، LDL-C، و کلسترول به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

هزینه‌ی این پژوهش از محل اعتبارات حوزه‌ی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران (طرح پژوهشی کد 989) تأمین شد که به این وسیله قدردانی می‌شود. از مدیریت محترم شرکت صنایع غذایی پرند (شکلات فرمند) به خصوص جناب آقای مهندس مصدق که در تهیه‌ی شکلات‌ها ما را یاری دادند و کارکنان مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم (بیمارستان فیروزگر) سپاسگزاری می‌شود.

دچار هایپرلیپیدمی می‌تواند اثرات مفید و معنی‌داری نشان دهد. به طور کلی، نتایج در این خصوص هنوز به جمع‌بندی کامل نرسیده است و ارائه‌ی نظر قطعی مستلزم مطالعات با حجم نمونه‌ی بزرگ‌تر و با کنترل دقیق همه‌ی ترکیبات شکلات‌های مورد استفاده است.

شواهد حمایت‌کننده از نقش اساسی التهاب در شروع و پیشروی بیماری‌های قلبی عروقی به سرعت در حال افزایش است. مطالعات متعددی پیشنهاد کرده‌اند که خاصیت ضد التهابی رژیم‌های غنی از پلی‌فنل می‌تواند به وسیله مکانیسم‌های جلوگیری از عملکرد و تولید ملکول‌های پیش‌التهابی مانند CRP، IL-6 و TNF- α باشد (31). اطلاعات حاصل از NHANES 1999 ارتباط معکوسی بین فلاوانوئیدهای خاص (مانند کوثرستین و کامپفرول) و CRP را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ی Giuseppe روی افراد سالم در مصرف‌کنندگان محصولات کاکائو که حداقل یک سروینگ (20 گرم کاکائو) هر 3 روز یک بار مصرف می‌کردند، میزان CRP سرم به طور معنی‌داری از هر دو گروه افرادی که فراورده‌های کاکائو را زیاد مصرف می‌کردند یا اصلاً مصرف نداشتند، کمتر بود (32). در حالی که در اولین مطالعه‌ی Grassi با مصرف 100 گرم شکلات حاوی 88 میلی گرم فلاونول میزان تغییرات hs-CRP که از $0/39 \pm 0/37$ mg/dl تا $0/33 \pm 0/39$ mg/dl بود، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (24). در مطالعه‌ی Balzer که روی بیماران دیابتی با استفاده از نوشیدنی کاکائو انجام شد با مصرف روزانه 3 سروینگ کاکائوی غنی از فلاونول (هر سروینگ حاوی 321 میلی گرم فلاونول) یا همان مقدار دارونما (پلاسبو) حاوی 25 میلی گرم فلاونول به مدت 30 روز تفاوت معنی‌داری در میزان hs-CRP دو گروه مداخله و شاهد مشاهده نشد (33). در مطالعه‌ی کنونی نیز با مصرف 25 گرم شکلات تلخ حاوی 450 میلی گرم پلی‌فنل میزان hs-CRP به طور معنی‌داری نسبت به ابتدای مطالعه کاهش پیدا کرد ($P=0/005$) ولی مصرف همان میزان شکلات سفید چنین کاهشی را نشان نداد ($P=0/785$). با وجود این با مقایسه‌ی دو گروه در انتهای مطالعه تفاوت معنی‌داری در میزان hs-CRP بیماران مصرف‌کننده‌ی شکلات سفید و تلخ مشاهده نشد ($p=0/48$). ممکن است با افزایش طول مدت مطالعه، تفاوت بین دو گروه نیز معنی‌دار شود. یکی از عوامل این تناقض‌ها در نتایج مطالعات به تفاوت در مدت و دز استفاده شده فلاوانول‌ها مربوط می‌شود شاید پاسخ وضعیت گلیسمی به صورت وابسته به دز فلاوانول مصرفی باشد. احتمال دیگر،

• References

1. Organization WH. The world health report 1997:conquering suffering enriching humanity. Geneva: World Health Oorganization; 1997.
2. Esteghamati A, Gouya MM, Abbasi M, Delavari A, Alikhani S, Alaedini F, et al. prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in the adult population of Iran: national survey of risk factors for non-communicable disease of Iran. *Diabetes Care* 2004; 97(8):537-48.
3. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia* 2001;44:14-21.
4. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in non diabetic subjects with or without prior myocardial infarction. *N Eng J Med* 1998;339:229-34.
5. Rahmani M, Raeszade F, Allahverdian S, Azizi F. [The association between Apolipoprotein A-1, B and paraoxonase activity in patients with coronary artery disease in diabetic and non-diabetic]. *Iranian J Endocrinol Metab* 2000; 30:1-19[in Persian].
6. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005, 352(1):20-8.
7. Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 1997;342:1007-11.
8. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* 2004;134:613-7.
9. Lazarus SA, Hammerstone JF, Schmitz HH. Chocolate contains additional flavonoids not found in tea. *Lancet* 1999;354:1825.
10. Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T. Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cell Immunol* 1997; 177(2):129-36.
11. Mao TK, Powell J, Van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Hammerstone JF, et al. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 beta in peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci* 2000, 66(15):1377-86.
12. Mathur S, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr* 2002, 132(12):3663-7.
13. Fraga CG, Actis-Goretti L, Ottaviani JJ, Carrasquedo F, Lotito SB, Lazarus S, et al. Regular consumption of a flavanol- rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clin Dev Immunol* 2005, 12(1):11-7.
14. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, et al. Dark chocolate consumption increases HDL-C concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radic Biol Med* 2004;37: 1351-9.
15. Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men. cohort follow up study in the United States. *BMJ* 1996;313:84 -90.
16. Counet Ch, Callemien D, Collin S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chem* 2006; 98:649-57.
17. Das S, Alagappan VK, Bagchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK. Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: a potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascular Pharmacol* 2005;42(5-6):281-9.
18. El-Mowafy AM, Alkhalaf M. Resveratrol activates adenylyl-cyclase in human breast cancer cells: a novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism. *Carcinogenesis* 2003; 24: 869-73.
19. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007;35(5):1156-60.
20. Shang J, Chen LL, Xiao FX. Resveratrol improves high-fat induced nonalcoholic fatty liver in rats. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2008;16(8):616-9.
21. Haghighat N, Rostami A, Eghtesadi Sh, Shidfar F, Heidari I, Hosseini A. The effects of Dark chocolate on glycemic control and Blood pressure in hypertensive diabetic patients: a randomized clinical trial. *Razi Journal of Medical Sciences* [in press] [in Persian].
22. Ziegenfuss TN, Hofheins JE, Mendel RW, Landis J, Anderson RA. Effects of a water-soluble cinnamon extract on body composition and features of the metabolic syndrome in pre-diabetic men and women. *J Int Soc Sports Nutr* 2006;3(2):45-53.
23. Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis C, Ashwood E, editors, *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3 rd ed: Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999.

24. Allen RR, Carson L, Kwik-Urbe C, Evans EM, Erdman JW Jr. Daily consumption of a dark chocolate containing flavanols and added sterol esters affects cardiovascular risk factors in a normotensive population with elevated cholesterol. *J Nutr* 2008; 138: 725-31.
25. Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Shortterm administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 611-14.
26. Mellor DD, Sathyapalan T, Kilpatrick ES, Beckett S, Atkin SL. High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in type 2 diabetes patients. *Diabet Med* 2010;27:1318-21.
27. Jia L, Liu X, Bai YY, Li SH, Sun K, He C, Hui R. Short-term effect of cocoa product consumption on lipid profile: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2010;92:218-25.
28. Tokede OA, Gaziano JM, Djousse L. Effects of cocoa products/ dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 2011, In press.
29. Kurlandsky SB, Stote KS. Cardioprotective effects of chocolate and almond consumption in healthy women. *Nutr Res* 26 (2006) 509-16.
30. Dirk Taubert, Renate Roesen, Clara Lehmann, Norma Jung, Edgar Schomig. Blood Pressure and Bioactive Nitric Oxide A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2007; 298(1):49-60.
31. Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardevol A, Blade C, et al. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 2009;20:210e8.
32. di Giuseppe R, Di Castelnuovo A, Centritto F, Zito F, De Curtis A, Costanzo S, Vohnout B et al. Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-reactive protein in a healthy Italian population. *J Nutr* 2008;138:1939-45.
33. Balzer J, Rassaf T, Heiss C, Kleinbongard P, Lauer T, Merx M et al. Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:2141-9.
34. Meisel P. Hypertension, diabetes: chocolate with a single remedy? *Hypertension* 2005;46:e17.

The effects of dark chocolate on lipid profile, apo-lipoprotein A-1, apo-lipoprotein B and inflammation in type-2 diabetic patients: A randomized clinical trial

Haghighat N¹, Rostami A¹, Eghtesadi Sh^{*2}, Shidfar F³, Heidari I⁴, Hoseini AF⁵

1- MS.c in in Nutrition, Faculty of Nutritional Sciences and Dietetics, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- *Corresponding author: Prof, Dept. of Nutrition, Faculty of Nutritional Sciences and Dietetics, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Email: eghtesadi@tums.ac.ir

3- Prof, Dept. of Nutrition, Faculty of Nutritional Sciences and Dietetics, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Associate Prof, Endocrine Research Center (Firouzgar), Institute of Endocrinology and Metabolism, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Lecturer, Dept. of Biostatistics, Faculty of Management and Medical Information Science, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 30 Jan, 2013

Accepted 5 May, 2013

Background and objective: Dark chocolate has received the attention of researchers due to its cardiovascular protective effects. The purpose of this study was to determine the effects of 8 weeks consumption of dark chocolate on the lipid profile, apo-lipoprotein A-1 (Apo A1), apo-lipoprotein B (Apo B), and hs-CRP in type-2 diabetic patients.

Materials and methods: This clinical trial was conducted on 69 diabetic patients randomly assigned to one of two (intervention and control) groups. The intervention (n=32) and control (n=28) groups received daily, for 8 weeks, 25 gr dark chocolate (containing 450mg polyphenols) and a similar amount of white chocolate, respectively. At the beginning and at the end of the period, blood samples were collected to measure total cholesterol, LDL-c, HDL-c, TG, Apo A1, Apo B, and hs-CRP. In addition, anthropometric measurements were made and data were gathered on physical activity, blood pressure and food intake and compared between the 2 groups

Results: The intervention brought about statistically significant reductions in the blood levels of TG (p=0.007), apo-lipoprotein A-1 (p=0.045), apo-lipoprotein B (p=0.01) and hs-CRP (p=0.005). There were no significant differences in either group with regard to serum total cholesterol, LDL-c or HDL-c levels at the end of the period; neither were observed any intergroup differences.

Conclusion: The findings suggest that polyphenol-rich dark chocolate may have desirable effects on the blood triglyceride, apo-lipoproteins A-1 and B and hs-CRP levels in diabetic patients, with no effect on the lipid profile.

Keywords: Dark chocolate, Lipid profile, Inflammation, Apolipoprotein, Type-2 diabetes