Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Investigating the effect of green coffee and chlorogenic acid on the mechanism of muscle glycogen content in prediabetic C57BL/6 mice

Sayyed Gholamhoseyn Rahimi* [1], **Sayyed Mohammad Marandi** [2], **Milad Abdollahi** [2], **Samaneh Shirkhani** [2], **Mohammad Hosein Nasr Esfahani** [3]

[1] Dept of Physical Education, Faculty of Literature and Humanities, University of Malayer, Malayer, Iran
[2] Dept of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[3] Dept of Biology, Biotechnology Research Institute, Royan Research Institute, Isfahan, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 04 April 2023
Revised: 21 May 2023
Accepted: 01 July 2023
Published Online:04 October 2023

**** Correspondence to:***
Sayyed Gholamhoseyn Rahimi
Dept of Physical Education, Faculty of Literature and Humanities, University of Malayer, Malayer, Iran
Email:
qolale@yahoo.com

A B S T R A C T

Introduction: The increasing prevalence of obesity has affected millions of people across the globe, leading to various diseases, such as prediabetes, diabetes, cardiovascular diseases, cancer, and muscle disorders. One of the therapeutic interventions in the prevention of diabetes is the use of herbal supplements, such as green coffee and its phenolic compounds, including chlorogenic acid, due to its antioxidant, anti-inflammatory, and insulin-sensitive properties. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of green coffee and chlorogenic acid on glycogen content in the muscles of prediabetic mice.

Material & Methods: A total of 20 male C57BL/6 mice were randomly assigned to two groups: normal diet mice (5 mice) and high-fat diet mice (15 mice), which were fed for 12 weeks. After the induction of prediabetes by Fasting blood sugar (FBS) and Glucose tolerance test (GTT) tests, this group was divided into three subgroups: prediabetes mice (5 cases), prediabetes mice with diabetes with green coffee consumption (Prediabetes - Green Coffee, 5 cases) and prediabetes with chlorogenic acid consumption (Prediabetes - Chlorogenic Acid, 5 cases) which were treated for 10 weeks. In the end, the mice were sacrificed, and the relative level of expression of genes involved in the glycogen content of the Gastrocnemius muscle, including PI3K, AKT, GSK3, GYS1, as well as the LRRC8A gene, was measured through the Real-Time PCR technique. The data were analyzed using the one-way analysis of variance test by GraphPad Prism software (version 8).

Findings: The results pointed to a significant increase in the blood glucose level in the HFD group (129.9±5.4 mg/dL) compared to ND (95±3.3 mg/dL) and a significant decrease in the PD-GC group (103.5±8.16 mg/dL) and PD-CA (99±8 mg/dL) compared to the PD group (129.5±9.4 mg/dL) ($P<0.001$). The periodic acid-Schiff (PAS) staining technique demonstrated a significant decrease in the level of glycogen content in the rats of the PD group compared to the ND group. While in the treatment groups, a significant increase was observed in muscle glycogen accumulation compared to the PD group ($P<0.001$). The expression level of PI3K, AKT, LRRC8A, and GYS1 genes decreased, and GSK3 significantly increased in the PD group compared to the ND group ($P<0.001$), indicating a disturbance in the signaling pathway of glycogen content in the PD group. Nonetheless, in the treated groups, a significant increase was observed in the expression level of PI3K, AKT, LRRC8A, and GYS1 genes compared to the PD group ($P<0.001$).

Discussion & Conclusion: Considering the complications caused by prediabetes disease, in addition to early diagnosis of prediabetes, it seems to control weight and increase insulin sensitivity, the consumption of green coffee and chlorogenic acid can improve the prediabetic condition caused by the signaling pathway of glycogen synthesis in the muscle tissue of prediabetic rats.

Keywords: Chlorogenic acid, Coffee, Glycogen Phosphorylase, gdrHigh-fat diet, Prediabetic State

➢ **How to cite this paper**
Rahimi S, Marandi S, Abdollahi M, Shirkhani M, Nasr Esfahani MH. Investigating the effect of green coffee and chlorogenic acid on the mechanism of muscle glycogen content in prediabetic C57BL/6 mice. 2023;31(4): 55-66.

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

بررسی تأثیر قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر سازوکار ذخایر گلیکوژن عضلانی موش‌های C57BL/6 پیش‌دیابتی

سید غلامحسین رحیمی* [۱]، سید محمد مرندی [۲]، میلاد عبداللهی [۲]، سمانه شیرخانی [۲]، محمدحسین نصر اصفهانی [۳]

[۱] گروه تربیت‌بدنی، دانشکدهٔ ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

[۲] گروه علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان تربیت‌بدنی، دانشکدهٔ اصفهان، ایران

[۳] گروه زیست‌شناسی، پژوهشکدهٔ زیست‌فناوری پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۲/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۰

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۱۲

نویسنده مسئول:

سید غلامحسین رحیمی

گروه تربیت‌بدنی، دانشکدهٔ ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

Email:

qolale@yahoo.com

چکیده

مقدمه: شیوع روزافزون چاقی میلیون‌ها نفر در جهان را تحت تأثیر قرار داده است که بیماری‌های مختلفی همچون پیش‌دیابت، دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان و اختلالات عضلانی را به همراه خواهد داشت. یکی از مداخلات درمانی در پیشگیری از دیابت استفاده از مکمل‌های گیاهی مانند قهوهٔ سبز و ترکیبات فنولی آن ازجمله اسیدکلروژنیک، با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و حساس به انسولین است؛ ازاین‌رو، مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی تأثیر قهوهٔ سبز و اسیدکلروژنیک بر ذخایر گلیکوژنی در عضلات موش‌های پیش‌دیابتی انجام شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۰ سر موش نر C57BL/6 به‌طور تصادفی به دو گروه تقسیم گردیدند: موش‌های با رژیم غذایی طبیعی (Normal Diet، ۵ سر) و موش‌های با رژیم غذایی پرچرب (High – Fat Diet، ۱۵ سر) که به مدت ۱۲ هفته تغذیه شدند. پس از تشخیص القای پیش‌دیابت توسط آزمون‌های Fasting blood suger (FBS) و Glucose tolerance test (GTT)، این گروه به سه زیرگروه تقسیم گردیدند: موش‌های پیش‌دیابت (Pre-Diabetes، 5 سر)، پیش‌دیابت همراه مصرف قهوهٔ سبز (Pre-Diabetes -Green Cofee، 5 سر) و پیش‌دیابت همراه مصرف اسیدکلروژنیک (Pre-Diabetes - Cholorogenic Acid، 5 سر) که به مدت ۱۰ هفته تیمار شدند. در انتها موش‌ها کشته شدند و سطح نسبی بیان ژن‌های دخیل در ذخایر گلیکوژن عضلهٔ دوقلو شامل PI3K،AKT، GSK3، GYS1 و همچنین ژن LRRC8A از طریق تکنیک Real-Time PCR اندازه‌گیری گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 8.4.3 تحلیل شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج افزایش معناداری در سطح گلوکز خون در گروه HFD (mg/dL 4/5±9/ 129) نسبت به ND (mg/dL ±3 3/95) و همچنین کاهش معناداری در گروه PD-GC (mg/dL 16/8±5/ 103) و PD-CA (mg/dL 8± 99) نسبت به گروه PD (mg/dL 4/9±5/ 129) نشان داد (P<۰.۰۰۱). با استفاده از فن رنگ‌آمیزی Periodic acid - Schiff (PAS)، کاهش چشمگیری در سطح ذخایر گلیکوژن در موش‌های گروه PD، نسبت به گروه ND مشاهده گردید، درحالی‌که در گروه‌های تیمار، افزایش معنی‌دار در تجمع گلیکوژن عضله، نسبت به گروه PD دیده شد (P<۰.۰۰۱). سطح بیان ژن‌های PI3K، AKT، LRRC8A و GYS1 کاهش و GSK3 افزایش معناداری در گروه PD در مقایسه با گروه ND نشان داد (P<۰.۰۰۱) که نشان‌دهندهٔ اختلال در مسیر پیام‌رسانی ذخایر گلیکوژن در گروه PD است؛ اما در گروه‌های تحت تیمار، افزایش معنی‌داری از سطح بیان ژن‌های PI3K، AKT، LRRC8A و GYS1، در مقایسه با گروهPD مشاهده شد (P<۰.۰۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به عوارض ناشی از بیماری پیش‌دیابت، علاوه بر تشخیص زودهنگام پیش‌دیابت، به نظر می‌رسد به‌منظور کنترل وزن و افزایش حساسیت انسولینی، مصرف قهوهٔ سبز و اسیدکلروژنیک می‌تواند شرایط پیش‌دیابتی ایجادشده بر مسیر پیام‌رسانی سنتز گلیکوژن در بافت عضلهٔ موش‌های پیش‌دیابتی را بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: رژیم پرچرب، قهوهٔ سبز، اسید کلروژنیک، گلیکوژن عضلانی، پیش‌دیابت

استناد: رحیمی، سید غلامحسین؛ مرندی، سید محمد؛ عبداللهی، میلاد؛ شیرخانی، سمانه؛ نصر اصفهانی، محمدحسین. بررسی تأثیر قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر سازوکار ذخایر گلیکوژن عضلانی موش‌های C57BL/6 پیش‌دیابتی. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، مهر ۱۴۰۲؛۳۱(۴): ۶۶-۵۵.

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

اضافه‌وزن و چاقی به‌عنوان یک بیماری مزمن قلمداد می‌شود که شیوع آن در سراسر جهان همچنان در حال افزایش است. کم‌تحرکی و مصرف غذاهای پرکالری به افزایش وزن منجر می‌شود. چاقی می‌تواند به بیماری‌های دیگری ازجمله دیابت نوع ۲، بیماری‌های قلبی عروقی، اختلالات اسکلتی عضلانی و برخی سرطان‌ها منجر گردد. دیابت نوع ۲ یکی از مشکلات اصلی چاقی است که با ویژگی‌هایی نظیر نقص در ترشح و فعالیت انسولین، هایپرگلایسمی و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین بروز داده می‌شود(۲، ۱). اپیدمی جهانی دیابت نوع ۲ یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های سازمان بهداشت جهانی است و هزینه‌های انسانی و اقتصادی بسیار بالایی را در پی دارد. پیش‌دیابت به وضعیت قبل از دیابت گفته می‌شود که سطح قند خون بالاتر از حد معمول و پایین‌تر از معیار تشخیصی دیابت نوع ۲ است (mg/dL 125 - 100). پیش‌دیابت یک وضعیت پرخطر برای دیابت است؛ زیرا در این برههٔ زمانی، با اصلاح سبک زندگی از طریق کنترل رژیم غذایی و انجام فعالیت بدنی می‌توان فرد را به سمت زندگی سالم سوق داد (۳).

اختلال در عملکرد سلول و افزایش مقاومت به انسولین، دو آسیب‌شناختی است که به پیش‌دیابت و دیابت نوع ۲ منجر می‌گردد. مقاومت به انسولین سال‌ها پیش از دیابت و حتی در پیش‌دیابت شروع می‌شود (۳). علت اولیه و اصلی پیش‌دیابت مقاومت به انسولین در بافت‌های عضله، کبد و چربی است که با افزایش تولید انسولین توسط پانکراس دنبال می‌گردد. این وضعیت درنهایت به تخریب سلول‌های بتای پانکراس و نقص کامل تولید انسولین و دیابت نوع ۲ منجر می‌شود (۴). مقاومت به انسولین در عضلهٔ اسکلتی علت اصلی اختلال تحمل گلوکز (IGT) است (۶، ۵).

با توجه به سازوکارهای سلولی مولکولی درگیر در روند ابتلا به دیابت، روش‌های درمانی مؤثر بدین منظور و برای درمان چاقی و دیابت باید شناسایی شوند. شواهد اخیر مسیر پیام‌رسانی فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز/ پروتئین کیناز B (PI3K/AKT) به‌عنوان هدف درمانی در چاقی و T2D را شناسایی کرده‌اند، به‌طوری‌که اختلال در مسیر ذکرشده در بافت‌های مختلف بدن، منجر به چاقی و دیابت نوع ۲ و در ادامه، باعث ایجاد مقاومت به انسولین می‌گردد. مقاومت انسولینی به‌نوبهٔ خود، اختلال در مسیر PI3K/AKT را تشدید می‌کند و یک چرخهٔ معیوب را شکل می‌دهد (۸، ۷). درواقع، مسیر پیام‌رسانی فسفاتیدیل اینوزیتول ۳- کیناز/ پروتئین کیناز B/ گلیکوژن سنتاز کیناز ۳/ گلیکوژن سنتاز ۱ (PI3K, AKT, GSK3, GYS1) یکی از مسیرهای مؤثر در برداشت گلوکز در عضله است و نقص در آن به ایجاد مقاومت انسولینی می‌انجامد؛ بنابراین، اختلال در سنتز گلیکوژن تحریک‌شده با انسولین، با اختلال در فعال‌سازی گلیکوژن سنتاز همراه است (۹).

از سویی، عضلات اسکلتی سالم کلید سلامت هستند؛ زیرا فرد را از چاقی و بیماری‌های مرتبط با چاقی مانند T2D یا بیماری کبد چرب غیرالکلی محافظت می‌کنند. عوامل بسیاری ازجمله پیام‌دهی مکانیکی می‌توانند نحوهٔ شکل‌گیری، رشد، حفظ توده و سلامت عضلات اسکلتی را تنظیم نمایند (۱۰). پروتئین حاوی توالی‌های غنی از لوسین ۸ a (Lrrc8a) یکی از اجزای کانال آنیونی تنظیمی با حجم (VRAC) است که به‌طور بالقوه به محرک‌های مکانیکی پاسخ می‌دهد (۱۱). این کانال با بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مانند تکثیر، مهاجرت، رشد و مرگ سلولی مرتبط است (۱۲). کومار و همکاران نشان دادند که Lrrc8a فرایند تمایز را تحت تأثیر هورمون انسولین و همچنین پیام‌های مکانیکی مانند کشش سلول‌های عضلانی، تنظیم می‌کند و برای انتقال این پیام‌ها در سلول‌های عضلانی، به یک مولکول آداپتور به نام پروتئین شمارهٔ ۲ متصل به گیرندهٔ فاکتور رشد (GRB2) متکی است (۱۰)؛ بنابراین، هدف قرار دادنLrrc8a می‌تواند برای یک مطالعهٔ بالینی سودمند باشد.

دربارهٔ پیشگیری از ابتلا به بیماری دیابت، اصلاح سبک زندگی در قالب تغذیهٔ صحیح یک امر ضروری است. قهوهٔ سبز (GC) گرماندیده حاوی عناصر فعال زیستی بیشتری نسبت به دانه‌های قهوهٔ گرمادیده است (۱۳). اسید کلروژنیک (CGA) در دانه‌های قهوهٔ سبز فراوان است که در برخی از

منابع به‌عنوان استر اسیدهای کافئیک و کوینیک نیز شناخته می‌شود و یک ترکیب شیمیایی طبیعی است. CGA دسته‌ای از ترکیبات فنولی هستند که به‌طور گسترده در منابع مختلف گیاهی مانند میوه‌ها، سبزی‌ها، دانه‌های قهوه، چای و سیب دیده می‌شوند. طبق تحقیقات، CGA حاوی فعالیت‌های ضدسرطانی، ضدالتهاب، ضدچربی، ضد فشارخون و ضددیابت است. فرضیه‌های مختلفی برای سازوکارهای اثرگذار ارائه‌شده است؛ اما سازوکارهای اثرگذار واقعی هنوز ناشناخته است (۱۷-۱۴).

با توجه به اینکه بسیاری از مسیرهای درگیر در سطح سلولی و مولکولی در این زمینه ناشناخته هستند و همچنین نتایج ضدونقیض تحقیقات صورت‌گرفته بر مسیر IRS1, PI3K, AKT و به‌ویژه مارکرهای ذخایر گلیکوژن عضلانی (۱۸) و آثار مخرب افزایش قند خون و میزان انسولین، در تحقیق حاضر تأثیر رژیم غذایی پرچرب، مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر مسیر پیام‌رسانی سنتز گلیکوژن بررسی و شرایط پیش‌دیابت با توجه به مصرف قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک همراه با رعایت نکردن رژیم غذایی سالم و مصرف رژیم پرچرب ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه: پژوهش حاضر از نوع تجربی حقیقی با طرح چندگروهه پس‌آزمون است. برای انجام این تحقیق، از ۲۰ سر موش نر نژاد C57BL/6 چهارهفته‌ای با وزن متوسط ۱۲ تا ۱۴ گرم استفاده گردید که تحت شرایط استاندارد چرخهٔ روشنایی_تاریکی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و میزان رطوبت ۶۰-۵۰ درصد و درجهٔ حرارت ۲±۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. موش‌ها در طول تحقیق، دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. همهٔ آزمایش‌ها در آزمایشگاه پژوهشکدهٔ زیست‌فناوری رویان اصفهان در سال ۱۴۰۱ انجام گردید. این مطالعه به تأیید کمیتهٔ اخلاق دانشگاه اصفهان با شناسهٔ اخلاق IR.UI.1401019 رسید.

این تحقیق در دو مرحله انجام گردید. در فاز اول تحقیق که هدف ایجاد پیش‌دیابت بود، به مدت ۳ ماه از رژیم غذایی پرچرب ۶۰ درصد استفاده شد (۱۷). بدین منظور، موش‌های همسان در این تحقیق، به‌طور تصادفی به دو گروه تقسیم گردیدند. گروه اول شامل ۵ سر موش بود که با رژیم غذایی طبیعی (ND) حاوی ۱۰ درصد چربی، ۷۰ درصد کربوهیدرات، ۲۰ درصد پروتئین تغذیه شدند. گروه دوم شامل ۱۵ سر موش بود که رژیم غذایی پرچرب (HFD) حاوی ۶۰ درصد چربی، ۲۵ درصد کربوهیدرات و ۱۵ درصد پروتئین را دریافت کردند. پس از پایان مرحلهٔ اول، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های تشخیصی، القای پیش‌دیابت در گروه HFD در مقایسه با گروه ND به اثبات رسید. در مرحلهٔ دوم تحقیق که ۱۰ هفته به طول انجامید، به‌منظور بررسی اثربخشی مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر وضعیت پیش‌دیابتی، موش‌های دریافت‌کنندهٔ رژیم پرچرب به‌طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول همان رژیم غذایی پرچرب را ادامه داد که به‌عنوان گروه پیشدیابتی (PD) نام‌گذاری گردیدند. گروه دوم علاوه بر رژیم پرچرب، ۳ روز در هفته به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، تحت تیمار قهوهٔ سبز (PD-GC) قرار گرفت. گروه سوم نیز علاوه بر رژیم پرچرب، ۳ روز در هفته و به میزان ۱۰۰ ملی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، تحت تیمار اسید کلروژنیک (PD-CA) قرار گرفتند. در پایان مرحلهٔ دوم، برای بررسی تفاوت میان گروه‌ها، سه گروه مقایسه شدند (۱۹, ۲۰).

تجزیه‌وتحلیل‌های بیوشیمیایی: در پایان مرحلهٔ اول، به‌منظور تأیید ایجاد پیش‌دیابت، نسبت به گروه نرمال (گروه دریافت‌کنندهٔ رژیم غذایی طبیعی) و در پایان مرحلهٔ دوم، برای بررسی و ارزیابی اثربخشی قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک، فاکتورهای بیوشیمیایی ارزیابی گردیدند. سنجش گلوکز خون ناشتا (FBS) با استفاده از دستگاه سنجش گلوکز خون (Sannuo GA-3 Blood Glucose Meter, Changsha Sinocare Inc) از طریق خراش دم موش‌ها صورت گرفت. سطح انسولین پلاسما با کیت الایزا انسولین فوق حساس موش (ALPCO 80-INSMS-E01، Keewaydin Drive، USA)، طبق دستورالعمل سازنده تعیین شد. در پایان تحقیق، پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین گاواژ، موش‌ها پس از ۱۲ ساعت

ناشتایی، با تزریق درون‌صفاقی مادهٔ بیهوشی ترکیبی از کتامین (50-30 mg/kg) و زایلازین (3- 5 mg/kg) بیهوش گردیدند. پس از تأیید بیهوشی (توسط عقب نکشیدن پا) و یوتانایزی، بافت عضلهٔ دوقلوی همهٔ موش‌ها جدا گردید و از طریق ترازوی دیجیتالی، وزن کل عضله اندازه‌گیری شد. در ادامه، بافت‌ها به نیتروژن مایع منتقل گردید و درنهایت، بافت‌های منجمدشده برای استخراج mRNA و ارزیابی‌های هیستولوژی و بافتی در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. همهٔ فرایند هیستولوژی توسط متخصص این حوزه صورت پذیرفت.

تجزیه‌وتحلیل RT-qPCR: استخراج کل RNA از عضلهٔ دوقلو طبق دستورالعمل ترایزول (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) انجام گردید (۱۹)؛ سپس غلظت همهٔ RNAها توسط دستگاه Nano Drop خوانده شد و فرایند سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (biotechrabbit™ cDNA Synthesis Kit)، طبق دستورالعمل سازنده صورت گرفت. RT-qPCR با تکنیک SYBR Green (TaKaRa, Japan) و با استفاده از دستگاه Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) انجام شد (۱۹). در جدول شمارهٔ ۱ توالی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های دخیل در ذخیرهٔ گلیکوژن عضلهٔ اسکلتی (PI3K, AKT, GSK3, GYS1) و همچنین ژن LRRC8A ارائه گردیده است؛ همچنین از پرایمر اختصاصی GAPDH برای کنترل تکثیر ژن داخلی استفاده شد.

جدول شماره ۱. آغازگرهای اختصاصی (رفت و برگشت) مربوط به هر ژن

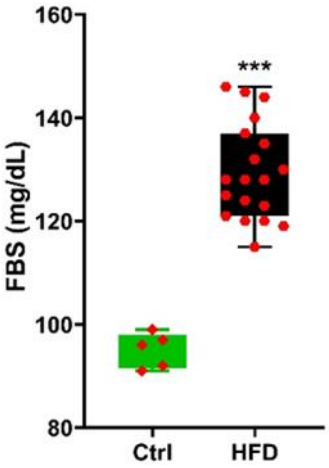
Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Annealing temperature (°C)
PI3K	CAGATACTCAGATGCCACACCAA	CGCTCTTCATAACGATGCTCCC	58
AKT	CTTACAGCCCTCAAGTATGCC	TCCGTGAAGACTCGCTCCC	56
GSK3	AGTTATTTGACCGCATAGTTCC	GACTCTAGCACGCACACC	50
GYS1	GTCTTCACTACCGTATCCCA	TCTTCACATTCAGCCCGTTG	54
LRCC8a	TCCTCGCCTTAGATCAATCACA	GACGCAGAAAACACAAATGGAC	56
GAPDH	TGTCACCAACTGGGACGATA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	60

تجزیه‌وتحلیل هیستوپاتولوژی: برای ارزیابی بافت‌شناسی، پس از کشتار موش‌ها، ابتدا بخشی از عضلهٔ دوقلو در مایع فرمالین با غلظت چهار درصد تثبیت گردید. در ادامه، برای پردازش بافتی، نمونه‌ها در الکل غوطه‌ور شدند تا آب سلول‌ها حذف شود. در مرحلهٔ بعد، برای قالب‌گیری کمی پارافین در قالب‌های بافت ریخته و اجازه داده شد تا پارافین در لایه‌های زیرین قالب‌ها تشکیل گردد. پس از قرار دادن کاست‌های پلاستیکی روی قالب‌ها، به‌منظور خنک‌سازی به صفحهٔ سرد منتقل شدند. به‌منظور تهیهٔ اسلاید، با دستگاه میکروتوم بخش‌های بافتی با ضخامت ۵ میکرومتر برش داده و پیش از قرار دادن روی لام، به‌منظور کاهش کشش سطحی و همچنین صاف شدن اسلایدها، در حمام آب قرار داده شدند (۱۷). برای بررسی و رنگ‌آمیزی گلیکوژن از تکنیک رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیفت (PAS) استفاده گردید؛ سپس ارزیابی‌های کمّی رنگ‌آمیزی در عضلهٔ دوقلو را یک پاتولوژیست باتجربه انجام داد و تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نوری تهیه شدند.

تحلیل آماری: تجزیه‌وتحلیل‌های داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) صورت گرفت. آزمون t-test (Student independent t-test) برای ارزیابی گروه پیشدیابتی در مقایسه با گروه کنترل انجام گردید و همچنین به‌منظور بررسی تأثیر قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک، به‌عنوان فاکتور پیشگیری‌کننده، در مقایسه با گروه پیش‌دیابت نیز از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه (ANOVA) استفاده شد؛ همچنین به‌منظور تشخیص تفاوت بین گروه‌های پژوهش از آزمون تعقیبی توکی و برای تجزیه‌وتحلیل اطلاعات از نرم‌افزار SPSS vol.25 استفاده گردید. سطح معناداری $P<0.05$ در نظر گرفته شد. همهٔ نتایج تجربی به‌صورت میانگین و استاندارد خطای میانگین ارائه گردید.

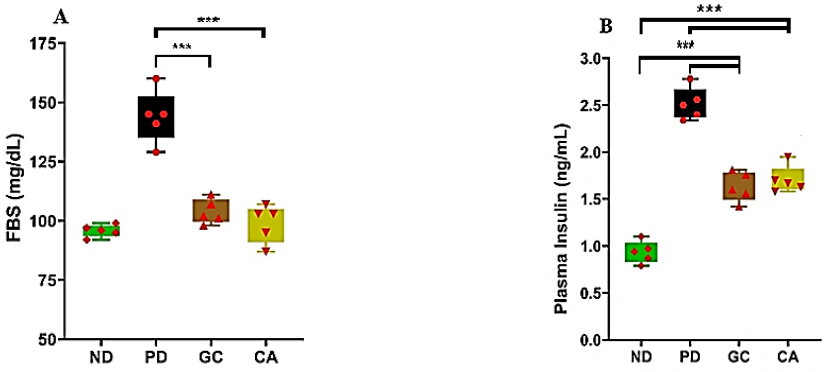
یافته های پژوهش

دربارهٔ تأثیر ۱۲ هفته رژیم غذایی پرچرب بر گلوکز خون، افزایش معناداری در گلوکز خون ناشتا (mg/dL 4/5±9/129) در موش‌های دریافت‌کنندهٔ رژیم پرچرب، در مقایسه با موش‌های دریافت‌کنندهٔ رژیم طبیعی (mg/dL 3±3/95) مشاهده شد (P<۰.۰۰۱) (نمودار شمارهٔ ۱). این یافته القای پیش‌دیابت را تأیید کرد.



نمودار شماره ۱. تأثیر رژیم غذایی پرچرب بر گلوکز خون. مقایسهٔ سطح گلوکز خون ناشتا (FBS) میان گروه دریافت‌کنندهٔ رژیم پرچرب (HFD) و گروه دریافت‌کنندهٔ رژیم نرمال (Ctrl). همهٔ نمودارها بر اساس (میانگین±خطای استاندارد) ارائه‌شده‌اند (Ctrl vs. HFD: *** P<0.001)

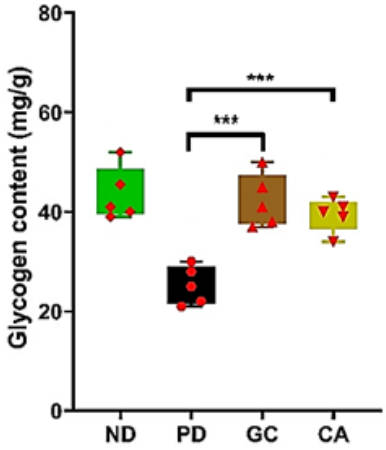
پس از مصرف مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک، کاهش معناداری در گلوکز خون ناشتا در گروه PD-GC (mg/dL 16/8±5/103) و PD-CA (mg/dL ±8/99)، نسبت به گروه PD (mg/dL 4/5±9/129) به‌عنوان گروه کنترل مشاهده شد (P<۰.۰۰۱) و علی‌رغم استفاده از رژیم غذایی پرچرب، گلوکز خون ناشتا در محدودهٔ طبیعی قرار گرفت (نمودار شمارهٔ ۲_A). در ارتباط با داده‌های انسولین پلاسما در پایان مداخلهٔ دوم، گروه PD-GC و PD-CA (به‌ترتیب با ng/mL 15/63±0/1 و ng/mL 14/7±0/1) کاهش معناداری از میزان سطح انسولین، در مقایسه با گروه PD نشان داد (P<۰.۰۰۱) که علی‌رغم استفاده از رژیم غذایی پرچرب، انسولین بهبود پیدا کرد (نمودار شمارهٔ ۲_B).



نمودار شمارهٔ ۲. تأثیر مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر گلوکز خون و انسولین. A: سطح قند خون ناشتا (FBS)؛ B: سطح انسولین پلاسما (Insulin). همهٔ نمودارها بر اساس میانگین±خطای استاندارد ارائه شده‌اند. ND: گروه دریافت‌کنندهٔ رژیم نرمال؛ PD: گروه پیش‌دیابت؛ GC: گروه دریافت‌کنندهٔ مکمل قهوهٔ سبز؛ CA: گروه دریافت‌کنندهٔ مکمل اسیدکلروژنیک (ND vs. PD: *** P<0.001؛ PD vs. GC: *** P<0.001؛ PD vs. CA: *** P<0.001).

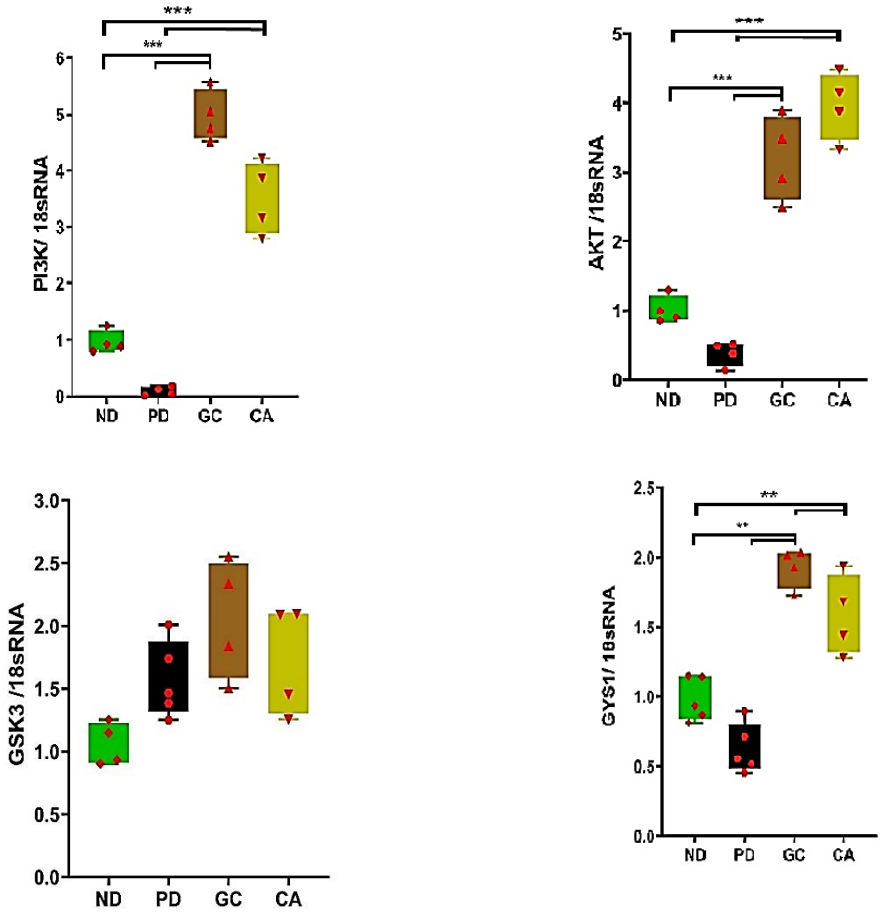
داده‌ها حاکی از آن است که رژیم غذایی پرچرب به کاهش تجمع سطح گلیکوژن در عضلات اسکلتی منجر شده است، درحالی‌که مصرف مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک، هر دو در گروه PD-GC و PD-CA، افزایش معناداری از

سطح تجمع‌یافتهٔ گلیکوژن در بافت عضلهٔ اسکلتی در مقایسه با گروه PD نشان داد (P<۰.۰۰۱) (نمودار شمارهٔ ۳).



نمودار شمارهٔ ۳. تأثیر مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر محتوای گلیکوژن بافت عضلهٔ اسکلتی. همهٔ نمودارها بر اساس میانگین±میانگین خطای استاندارد ارائه‌شده‌اند. ND: گروه دریافت‌کنندهٔ رژیم نرمال؛ PD: گروه پیش‌دیابت؛ GC: گروه دریافت‌کنندهٔ مکمل قهوهٔ سبز؛ CA: گروه دریافت‌کنندهٔ مکمل اسیدکلروژنیک (ND vs. PD: *** P<0.001؛ PD vs. GC: *** P<0.001؛ PD vs. CA: *** P<0.001).

دربارهٔ ژن‌های دخیل در ذخایر گلیکوژن، افزایش معناداری از بیان PI3K، AKT و GYS1 در گروه PD-GC و PD-CA در مقایسه با گروه PD مشاهده شد (P<۰.۰۰۱). در بیان ژن PI3K و GYS1، گروه PD-GC و PD-CA افزایش معناداری نسبت به گروه ND داشت. از سویی، گروه PD-GC نسبت به گروه PD-CA افزایش نشان داد که معنادار نبود؛ اما دربارهٔ ژن AKT، گروه PD-CA نسبت به گروه PD-GC افزایش نشان داد که در مورد این ژن معنادار نبود. دربارهٔ ژن GSK3، بیان این ژن در گروه‌های PD-GC و PD-CA در مقایسه با گروه PD افزایش داشت؛ اما این افزایش از لحاظ آماری معنادار نبود (P>۰.۰۵) (نمودار شمارهٔ ۴).



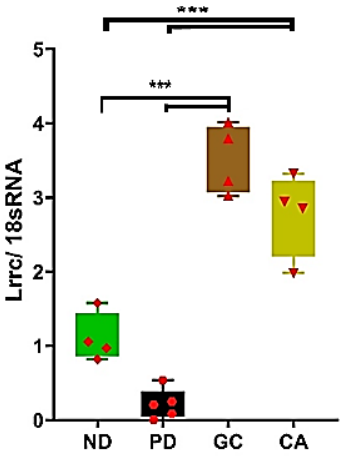
نمودار شمارهٔ ٤. تأثیر مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر ژن‌های PI3K، AKT، GSK3 و GYS1 دخیل در ذخایر گلیکوژن. همهٔ نمودارها بر اساس میانگین±میانگین خطای استاندارد ارائه‌شده‌اند. ND: گروه دریافت‌کنندهٔ رژیم نرمال؛ PD: گروه پیش‌دیابت؛ GC: گروه دریافت‌کنندهٔ مکمل قهوهٔ سبز؛ CA: گروه دریافت‌کنندهٔ مکمل اسیدکلروژنیک

الف. ND vs. PD: *P<0.05؛ PD vs. GC: ***P<0.001؛ PD vs. CA: ***P<0.001

ب. ND vs. PD: *P<0.05؛ PD vs. GC: ***P<0.001؛ PD vs. CA: ***P<0.001

د. ND vs. PD: *P<0.05؛ PD vs. GC: **P<0.01؛ PD vs. CA: **P<0.01

در ارتباط با اثر مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر ژن دخیل در حجم عضلهٔ اسکلتی، بررسی داده‌های بیان ژن LRRC8A نشان داد که مصرف قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک، هر دو به افزایش معناداری از تجمع ژن LRRC8A در عضلات اسکلتی موش‌ها منجر شده است (P<۰.۰۰۱) (نمودار شمارهٔ ۵).



نمودار شمارهٔ ۵. تأثیر مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر ژن LRRC8A دخیل در حجم عضلهٔ اسکلتی. همهٔ نمودارها بر اساس میانگین±میانگین خطای استاندارد ارائه شده‌اند. ND: گروه دریافت‌کنندهٔ رژیم نرمال؛ PD: گروه پیش‌دیابت؛ GC: گروه دریافت‌کنندهٔ مکمل قهوهٔ سبز؛ CA: گروه دریافت‌کنندهٔ مکمل اسید کلروژنیک (ND vs. PD: *P<0.05؛ PD vs. GC: ***P<0.001؛ PD vs. CA: ***P<0.001).

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر که اولین مطالعه در ایران با هدف بررسی و ارزیابی ذخایر گلیکوژن عضلانی در موش‌های پیش‌دیابتی است، تأثیر قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک در موش‌های پیش‌دیابتی بررسی و ارزیابی شد. شواهد حاکی از آن است که پیش‌دیابت مرحلهٔ حساسی از دیابت است و با مقاومت انسولینی، اختلال در آزمون تحمل گلوکز و کاهش حساسیت به انسولین در بافت‌های هدف همراه است (۲۱). مصرف رژیم غذایی پرچرب منجر به چاقی و درنتیجه، ایجاد سندرم متابولیک شامل افزایش FBS، انسولین و شاخص مقاومت به انسولین می‌شود که می‌تواند باعث اختلال در مسیرهای سلولی مولکولی، به‌ویژه آبشارهای پیام‌رسانی انسولین گردند (۲۴-۲۲). کربوهیدرات مصرفی به شکل گلیکوژن در پستانداران ذخیره می‌شود که در انسان‌ها بیشترین مقدار آن در عضلات و کبد است. پس از مصرف غذا، غلظت گلوکز خون افزایش می‌یابد؛ اما برای حفظ سلامتی، گلوکز خون باید همیشه در محدودهٔ مشخصی قرار داشته باشد که در افراد پیش‌دیابتی به سبب ایجاد مقاومت انسولینی، فرایند برداشت گلوکز از خون به بافت‌ها مختل میشود (۱۹).

عضلهٔ اسکلتی بزرگ‌ترین بافت برداشت‌کنندهٔ گلوکز خون توسط انسولین است. انسولین با اتصال به گیرندهٔ خود و فعال کردن مسیر PI3K-AKT، به مهار GSK3 و درنتیجه فعال شدن GYS1 منجر می‌گردد که سنتز گلیکوژن را به همراه دارد (۲۵). مطالعهٔ حاضر کاهش معناداری در میزان ذخایر گلیکوژن در عضلات موش‌های پیش‌دیابتی، نسبت به گروه نرمال را نشان داد. مطالعات دیگر نشان دادند که در افراد با اضافه‌وزن و دیابتی، ذخیرهٔ گلیکوژن عضلانی کاهش می‌یابد و فرایند سنتز گلیکوژن مختل می‌شود (۲۷-۲۶). مطالعهٔ حاضر نشان داد که رژیم پرچرب باعث اختلال در مسیر پیام‌رسانی PI3K-AKT– انسولین می‌گردد که نتایج بیان ژن مسیر سنتز گلیکوژن در عضلهٔ اسکلتی، این موضوع را تأیید می‌کند. دیگر مطالعات نیز نشان دادند که سنتز گلیکوژن از طریق انسولین در عضلات اسکلتی افراد پیش‌دیابتی که مقاومت انسولینی دارند، کاهش می‌یابد و این اختلال از تنظیم گلوکز خون جلوگیری می‌کند (۲۸) و باعث کاهش پیام‌رسانی انسولین در مسیر GSY1 - GSK3 - AKT - PI3K در عضلات می‌شود (۳۰, ۲۹).

در ارتباط با حجم عضلانی، ژن LRRC8A در انتقال فشار مکانیکی به محور پیام‌رسانی PI3K/AKT تأثیر دارد (۳۱) مطالعات دیگر نشان دادند که انسولین و تمایز سلول‌های عضلانی و همچنین مسیر پیام‌رسانی PI3K-AKT، به‌واسطهٔ بیان LRRC8A تنظیم می‌گردد (۱۱). مطالعهٔ حاضر کاهش معنادار بیان LRRC8A در گروه رژیم غذایی پرچرب، در مقایسه با گروه نرمال را نشان داده است. نتایج تحقیق کومار و

همکاران نیز به این نکته اشاره داشت که کمپلکس LRRC8 مسیر پیام‌رسانی PI3K-AKT – انسولین را در عضله تنظیم می‌کند تا بر تمایز عضلات در شرایط آزمایشگاهی و اندازهٔ میوفیبراسکلتی، عملکرد عضلانی، چاقی و متابولیسم سیستمیک در داخل بدن تأثیر بگذارد (۱۱).

امروزه داروهای بسیاری برای بهبود شرایط دیابتی نظیر متفورمین، آکاریوز، روزیگلیتازون و غیره در بازار وجود دارند؛ اما این داروهای صناعی عوارض جانبی خاص خود را به همراه دارند؛ ازاین‌رو، بهتر است عوامل ضددیابتی و پیشگیری ایمن‌تر و مؤثرتری برای دیابت کشف و معرفی شوند. در ارتباط با مداخلهٔ مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک نشان داده‌شده است که خواص درمانی قهوهٔ سبز با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی اسید کلروژنیک مرتبط است و این نوع مکمل می‌تواند آثار ضدسرطانی، ضددیابتی و ضدچاقی داشته باشد (۳۲).

داده‌های تحقیق حاضر نشان داد که مصرف قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک، باعث بهبود شرایط پیش‌دیابتی شد. سطح گلوکز خون ناشتا و انسولین در گروه‌های مداخلات، کاهش چشمگیری را نشان داد که با داده‌های مطالعات دیگر مبنی بر تأثیر قهوهٔ سبز بر بهبود سندرم متابولیک و دیابت، همسو است (۳۴، ۳۳، ۱۴). مطالعاتی نیز به بررسی تأثیر قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر دیابت پرداختند که داده‌های آن‌ها گواه این بود که قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک منجر به کاهش قند خون ناشتا از طریق سازوکار احتمالی کاهش روند جذب گلوکز روده، با تنظیم سطح پلی‌پپتید انسولین وابسته به گلوکز گردید که ترشح انسولین را پس از مصرف گلوکز بالا می‌برد و همچنین اسید کلروژنیک با کاهش فعالیت آنزیم گلوکز ۶ فسفاتاز، فرایند گلوکونئوژنز و گلیکوژنولیز را کاهش داد. از سویی، یکی از سازوکارهای دخیل می‌تواند اثر قهوهٔ سبز بر هورمون‌های گوارشی باشد. قهوهٔ سبز از طریق ایجاد تغییر در ترشح هورمون‌های دستگاه گوارش، منجر به کاهش جذب گلوکز در روده می‌شود و بر غلظت گلوکز خون و چربی خون، پس از خوردن غذا تأثیر می‌گذارد و باعث کاهش قند خون می‌گردد. از سوی دیگر، اسید کلروژنیک با تنظیم متابولیسم گلوکز و لیپید از طریق فعال‌سازی پروتئین کیناز وابسته به آدنوزین مونوفسفات (AMPK) که یک حسگر و تنظیم‌کنندهٔ تعادل انرژی سلولی است، می‌تواند سنتز اسیدهای چرب و تولید گلوکز کبدی را مهار کند و با افزایش انتقال GLUT4 به غشای پلاسما، باعث افزایش برداشت گلوکز به داخل سلول شود و به برداشت گلوکز محیطی و کاهش قند خون منجر گردد (۳۶، ۳۵). با توجه به آثار مخرب رژیم غذایی پرچرب، داده‌های ما نشان داد که قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک، هر دو منجر به تنظیم مسیر پیام‌رسانی PI3K, AKT, GSK3, GYS1 شده است. این نتایج با نتایج مطالعات دیگری که تأثیر قهوهٔ و یا اسید کلروژنیک را به‌صورت مجزا و نه در یک تحقیق، بر روی مسیر متابولیسم گلوکز بررسی کرده بودند، همسو بود و افزایش گلیکوژن عضلانی را گزارش کردند (۳۹–۳۷).

مطالعات نقش LRRC8 را در کنترل و تنظیم مسیر پیام‌رسانی PI3K-AKT عضلانی نشان داده‌اند؛ اما دربارهٔ تأثیر قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک بر بیان LRRC8، مطالعهٔ مشخصی وجود ندارد (۳۱). از سویی، تمایز میوژنیک و پیام‌رسانی PI3K-AKT–انسولین، ERK1/2 و mTOR در میوتوب‌ها از طریق پیام‌رسانی با واسطهٔ ژن GRB2، توسط بیان LRRC8A (که اخیراً شناخته‌شده است) تنظیم می‌شود. استفاده از قهوهٔ سبز و مادهٔ مؤثر قهوهٔ سبز، یعنی اسید کلروژنیک، این امکان را به این پژوهش می‌دهد تا تأثیر هریک از این ماده‌ها را بررسی کند تا مشخص شود که تأثیر کدام ماده بیشتر خواهد بود (۱۰)؛ بنابراین، علاوه بر تشخیص زودهنگام پیش‌دیابت، به‌منظور کنترل وزن، کاهش گلوکز خون و افزایش حساسیت انسولینی، به‌نظر می‌رسد مصرف قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک با تأثیر مثبت بر مسیر PI3K-AKT- GSK3- GYS1 و بیان LRRC8، از یک‌سو منجر به بهبود ذخایر گلیکوژن عضلانی در موش‌های دریافت‌کننده رژیم غذایی پرچرب می‌گردد و از سوی دیگر، به بهبود شرایط مقاومت انسولینی در عضلات اسکلتی کمک می‌کند. پیشنهاد می‌شود که از مکمل قهوهٔ سبز و اسید کلروژنیک که در برخی از میوه‌ها نیز وجود دارد، به‌صورت روزانه استفاده گردد تا شاهد نتیجه‌های مؤثر این

ماده در ارتباط با بیماری پیش‌دیابت باشیم.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مراتب تشکر صمیمانهٔ خود را از پژوهشکدهٔ زیست‌فناوری رویان اصفهان و همچنین دانشکدهٔ تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه اصفهان که در انجام این پژوهش ما را یاری دادند، اعلام می‌کنند.

تعارض منافع

بدین‌وسیله همهٔ نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ تعارض منافعی دربارهٔ این تحقیق وجود ندارد. تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخشهای پژوهش حاضر مشارکت داشته اند.

حمایت مالی

این پژوهش هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

سهم نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر، مشارکت داشته‌اند.

کد اخلاق: موازین اخلاقی کار با حیوانات مطابق کمیته اخلاق دانشگاه اصفهان رعایت و با کد اخلاق IR.UI.1401019 تأیید شد

References

1. Melo LC, Dativo-Medeiros J, Menezes-Silva CE, Barbosa FT, de Sousa-Rodrigues CF, Rabelo LA. Physical Exercise on Inflammatory Markers in Type 2 Diabetes Patients: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. Oxid Med Cell Longev 2017;2017:8523728. doi: 10.1155/2017/8523728.
2. Krug EG. Trends in diabetes: sounding the alarm. Lancet 2016;387:1485-86. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30163-5.
3. Khan RMM, Chua ZJY, Tan JC, Yang Y, Liao Z, Zhao Y. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. Medicina (Kaunas) 2019;55:546. doi: 10.3390/medicina55090546.
4. Cherrington AD, Edgerton D, Sindelar DK. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. Diabetologi 1998;41:987-96. doi: 10.1007/s001250051021.
5. Schmitz O, Rungby J, Edge L, Juhl CB. On high-frequency insulin oscillations. Ageing Res Rev 2008;7:301-5. doi: 10.1016/j.arr.2008.04.002.
6. Mao CS, Berman N, Roberts K, Ipp E. Glucose entrainment of high-frequency plasma insulin oscillations in control and type 2 diabetic subjects. Diabetes 1999;48:714-21. doi: 10.2337/diabetes.48.4.714.
7. Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. Int J Biol Sci 2018;14:1483-96. doi: 10.7150/ijbs.27173.
8. Højlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. Dan Med J 2014;61:B4890.
9. Orho-Melander M, Almgren P, Kanninen T, Forsblom C, Groop LC. A paired-sibling analysis of the XbaI polymorphism in the muscle glycogen synthase gene. Diabetologia 1999;42:1138-45. doi: 10.1007/s001250051282.
10. Kumar L, Chou J, Yee CS, Borzutzky A, Vollmann EH, von Andrian UH, et al. Leucine-rich repeat containing 8A (LRRC8A) is essential for T lymphocyte development and function. J Exp Med 2014;211:929-42. doi: 10.1084/jem.20131379.
11. Kumar A, Xie L, Ta CM, Hinton AO, Gunasekar SK, Minerath RA, et al. SWELL1 regulates skeletal muscle cell size, intracellular signaling, adiposity and glucose metabolism. Elife 2020;9:e58941. doi: 10.7554/eLife.58941.
12. Gunasekar SK, Xie L, Kumar A, Hong J, Chheda PR, Kang C, et al. Small molecule SWELL1 complex induction improves glycemic control and nonalcoholic fatty liver disease in murine Type 2 diabetes. Nat Commun 2022;13:784. doi: 10.1038/s41467-022-28435-0.
13. Morvaridi M, Rayyani E, Jaafari M, Khiabani A, Rahimlou M. The effect of green coffee extract supplementation on cardio metabolic risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. J Diabetes Metab Disord 2020;19:645-60. doi: 10.1007/s40200-020-00536-x.
14. Abdel Mohsen D, Akabawy A, Abdemoneim A, Amin HK. The possible effects of green coffee bean extract on progression of experimental diabetes in different organs; A review article. J Adv Pharm Res 2021;5:297-304. doi: 10.21608/APRH.2021.77827.1133.
15. Vats A. Pharmacological properties of Green coffee: a review. J Adv Pharm Technol Res 2022;11:2970-6.
16. Rojas-González A, Figueroa-Hernández CY, González-Rios O, Suárez-Quiroz ML, González-Amaro RM, Hernández-Estrada ZJ, et al. Coffee Chlorogenic Acids Incorporation for Bioactivity Enhancement of Foods: A Review. Molecules 2022;27:3400. doi: 10.3390/molecules27113400.
17. Soviguidi DRJ, Pan R, Liu Y,Rao L, Zhang W, Yang X. Chlorogenic acid metabolism: the

evolution and roles in plant response to abiotic stress. Phyton 2022;91:239. doi: 10.32604/phyton.2022.018284.
18. Kang C-W, Park M, Lee H-J. Mulberry (Morus alba L.) leaf extract and 1-Deoxynojirimycin improve skeletal muscle insulin resistance via the activation of IRS-1/PI3K/Akt pathway in db/db mice. Life 2022;12:1630. doi: 10.3390/life12101630.
19. Abdollahi M, Marandi SM, Ghaedi K, Safaeinejad Z, Kazeminasab F, Shirkhani S, et al. Insulin-Related Liver Pathways and the Therapeutic Effects of Aerobic Training, Green Coffee, and Chlorogenic Acid Supplementation in Prediabetic Mice. Oxid Med Cell Longev 2022;2022:5318245. doi: 10.1155/2022/5318245.
20. Choi BK, Park SB, Lee DR, Lee HJ, Jin YY, Yang SH, Suh JW. Green coffee bean extract improves obesity by decreasing body fat in high-fat diet-induced obese mice. Asian Pac J Trop Med 2016;9:635-43. doi: 0.1016/j.apjtm.2016.05.017.
21. Li X, Wang G, Xu Y, Wang Y, Hao R, Ma X. Xiao Ke Qing improves glycometabolism and ameliorates insulin resistance by regulating the PI3K/Akt pathway in KKAy mice. Front Med 2018;12:688-96. doi: 10.1007/s11684-018-0662-8.
22. Grundy SM. Prediabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. J Am Coll Cardiol 2012;59:635-43. doi: 10.1016/j.jacc.2011.08.080.
23. Preguiça I, Alves A, Nunes S, Fernandes R, Gomes P, Viana SD, et al. Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders-A guide to a translational perspective. Obes Rev 2020;21:e13081. doi: 10.1111/obr.13081.
24. Brouns F. Overweight and diabetes prevention: is a low-carbohydrate-high-fat diet recommendable?. Eur J Nutr 2018;57:1301-12. doi: 10.1007/s00394-018-1636-y.
25. Jensen J, Lai Y-C. Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance. Arch Physiol Biochem 2009;115:13-21. doi: 10.1080/13813450902778171.
26. Damsbo P, Vaag A, Hother-Nielsen O, Beck-Nielsen H. Reduced glycogen synthase activity in skeletal muscle from obese patients with and without type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 1991;34:239-45. doi: 10.1007/BF00405082.
27. Johnson A, Webster J, Sum C-F, Heseltine L, Argyraki M, Cooper B, et al. The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type II diabetic patients. Metabolism 1993;42:1217-22. doi: 10.1016/0026-0495(93)90284-u.
28. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy. N Engl J Med 1990;322:223-8. doi: 10.1056/NEJM199001253220403.
29. Kim Y-B, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. J Clin Invest1999;104:733-41. doi: 10.1172/JCI6928.
30. Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. J Clin Invest 2005;115:3587-93. doi: 10.1172/JCI25151.
31. Kumar A, Xie L, Ta CM, Hinton AO, Gunasekar SK, Minerath RA, et al. SWELL1 regulates skeletal muscle cell size, intracellular signaling, adiposity and glucose metabolism. Elife 2020;9:e58941. doi: 10.7554/eLife.58941.
32. Huang L, Fang Y, Tang L. Comparisons of different exercise interventions on glycemic control and insulin resistance in prediabetes: a network meta-analysis. BMC Endocr Disord 2021;21:181. doi: 10.1186/s12902-021-00846-y.
33. Al-Brakati A, Albarakati AJA, Daabo H, Baty RS, Salem FEH, Habotta OA, et al. Neuromodulatory effects of green coffee bean extract against brain damage in male albino rats with experimentally induced diabetes. Metab Brain Dis 2020;35:1175-87. doi: 10.1007/s11011-020-00583-6.
34. Pimpley V, Patil S, Srinivasan K, Desai N, Murthy PS. The chemistry of chlorogenic acid from green coffee and its role in attenuation of obesity and diabetes. Prep Biochem Biotechnol 2020;50:969-978. doi: 10.1080/10826068.2020.1786699.
35. Beam JR, Gibson AL, Kerksick CM, Conn CA, White AC, Mermier CM. Effect of post-exercise caffeine and green coffee bean extract consumption on blood glucose and insulin concentrations. Nutrition 2015;31:292-7. doi: 10.1016/j.nut.2014.07.012.
36. Peng BJ, Qi Z, Zhong YL, Xu SH, Zheng W. Chlorogenic acid maintains glucose homeostasis through modulating the expression of SGLT-1, GLUT-2, and PLG in different intestinal segments of Sprague-Dawley rats fed a high-fat diet. Biomed Environ Sci 2015;28:894-903. doi: 10.3967/bes2015.123.
37. Chen L, Teng H, Cao H. Chlorogenic acid and caffeic acid from Sonchus oleraceus Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. Food Chem Toxicol 2019;127:182-87. doi: 10.1016/j.fct.2019.03.038.

38. Ramos LV, da Costa THM, Arruda SF. The effect of coffee consumption on glucose homeostasis and redox-inflammatory responses in high-fat diet-induced obese rats. J Nutr Biochem 2022;100:108881. doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108881.
39. Zamani-Garmsiri F, Ghasempour G, Aliabadi M, Hashemnia SMR, Emamgholipour S, Meshkani R. Combination of metformin and chlorogenic acid attenuates hepatic steatosis and inflammation in high-fat diet fed mice. IUBMB life 2021;73:252-63. doi: 10.1002/iub.2424.