

The interactive effect of resistance training and black grape seed extract nanoliposomes on MTNR1B gene expression, pancreatic cAMP levels, and metabolic indices of insulin resistance in a type 2 diabetic rat model

Sahar Sheikhi¹, Mahdi Kasbparast^{2*}, Mohamad Ali Soleiman Fallah³

1. PhD Student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2. Assistant Professor at Department of Exercise Physiology, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.
3. Assistant Professor at Department of Sport Biomechanics, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Extended Abstract

Background and Aim: Type 2 diabetes mellitus is characterized by chronic hyperglycemia, insulin resistance, and progressive pancreatic beta-cell dysfunction. In addition to oxidative stress, low-grade inflammation, mitochondrial impairment, and endoplasmic-reticulum stress, disruption of intra-islet signaling may contribute to the deterioration of insulin secretion. Melatonin receptor 1B (MTNR1B), which is expressed in pancreatic islets, is coupled to inhibitory G proteins and can suppress adenylyl cyclase, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production, and protein kinase A-dependent insulin secretion. Increased MTNR1B expression or activity may therefore intensify beta-cell dysfunction. Resistance training can reduce peripheral insulin demand by improving skeletal-muscle glucose uptake and insulin sensitivity, whereas the proanthocyanidins in black grape seed extract may protect beta cells by attenuating oxidative and endoplasmic-reticulum stress. Nanoliposomal encapsulation with a chitosan coating may further improve polyphenol stability, controlled release, and intestinal uptake. Whether these interventions interact on the pancreatic MTNR1B–cAMP axis, however, remains uncertain. This study examined the independent and interactive effects of resistance training and chitosan-coated nanoliposomal black grape seed extract on pancreatic MTNR1B gene expression, tissue cAMP, fasting glucose, insulin, homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), and body weight in rats with experimentally induced type 2 diabetes.

Materials & Methods: This experimental study included 35 eight-week-old male Wistar rats with an initial body weight of 270 ± 20 g. Sample size was estimated in G*Power for an analysis of variance of main and interaction effects, using an effect size of 0.53, $\alpha=0.05$, and power of 0.85. Following two weeks of adaptation, animals were randomly assigned to five groups ($n=7$): healthy control (HC), diabetic control (DC), diabetic+resistance training (RT), diabetic+supplement (GSE), and diabetic+resistance training+supplement (RT+GSE). Type 2 diabetes was induced by four weeks of a high-fat diet providing 60% of energy from fat, followed by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (35 mg/kg). Diabetes was confirmed by fasting glucose ≥ 200 mg/dL in two assessments together with evidence of diet-induced insulin resistance. The high-fat diet was continued throughout the intervention. Resistance training was performed on a 110-cm ladder inclined at 85° , five sessions weekly for eight weeks. Training progressed from 6–8 climbs at 50% of maximal voluntary carrying capacity (MVCC) in week 1 to 9–10 climbs at 80% MVCC during weeks 6–8, with 90–120 seconds of recovery between climbs. MVCC was reassessed at the beginning of weeks 4 and 7. The supplement groups received chitosan-coated nanoliposomal black grape seed extract by daily oral gavage at 250 mg/kg body weight, based on the effective encapsulated proanthocyanidin dose; non-supplemented groups received distilled water. Forty-eight hours after the final intervention and following a 10–12-hour overnight fast, blood and pancreatic tissue were collected. Fasting glucose was measured enzymatically, insulin by ELISA, and HOMA-IR was calculated from fasting glucose and insulin. Pancreatic MTNR1B mRNA was quantified by SYBR Green real-time

qPCR, normalized to GAPDH, and expressed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Pancreatic cAMP was measured by competitive ELISA and normalized to total protein. Data were analyzed in SPSS 26. Model induction was assessed by an independent-samples t-test comparing HC and DC, while the main and interaction effects of training and supplementation were evaluated by two-way ANOVA among the four diabetic groups. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

Results: Diabetes induction significantly increased pancreatic MTNR1B expression, fasting glucose, insulin, HOMA-IR, and body weight and reduced pancreatic cAMP compared with HC (all $p \leq 0.001$). Resistance training exerted significant main effects on MTNR1B ($p=0.006$), cAMP, fasting glucose, insulin, HOMA-IR, and body weight (all other $p < 0.001$). Supplementation also significantly improved all outcomes ($p=0.012$ for insulin and $p \leq 0.001$ for the remaining variables). The effect-size profiles differed between interventions: supplementation produced a larger reduction in MTNR1B expression than training (partial $\eta^2=0.69$ vs 0.28), whereas training showed larger effects on insulin (0.49 vs 0.23), HOMA-IR (0.65 vs 0.48), and body weight (0.85 vs 0.57). For cAMP and fasting glucose, the effects of both interventions were substantial, although training remained numerically stronger. Mean values in RT+GSE compared with DC were lower for MTNR1B, fasting glucose, insulin, HOMA-IR, and body weight, while cAMP was higher. Nevertheless, a statistically significant training $\times$ supplement interaction was observed only for body weight ($p=0.009$). Interactions were not significant for MTNR1B, cAMP, fasting glucose, insulin, or HOMA-IR, indicating that the combined intervention did not produce effects beyond the independent contributions of training and supplementation for these outcomes.

Table 1. Results of two-way ANOVA of the main and interactive effects of resistance training and nanoliposomal black grape seed extract in diabetic rats

Statistics	MTNR1B ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	cAMP (pmol/mg total protein)	Fasting glucose (mg/dL)	Insulin (mIU/L)	HOMA-IR	Body weight (g)
Training F	9.26	20.65	30.92	23.41	44.20	138.05
Training p	0.006*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
Training partial η^2	0.28	0.46	0.56	0.49	0.65	0.85
Supplement F	54.15	14.23	26.77	7.35	22.65	32.13
Supplement p	<0.001*	0.001*	<0.001*	0.012*	<0.001*	<0.001*
Supplement partial η^2	0.69	0.37	0.53	0.23	0.48	0.57
Interaction F	0.03	0.01	0.001	0.01	0.14	7.98
Interaction p	0.857	0.934	0.987	0.952	0.713	0.009*
Interaction partial η^2	0.001	0.001	0.001	0.001	0.01	0.25

* Statistically significant at $p \leq 0.05$. MTNR1B: melatonin receptor 1B; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance.

Conclusion: Resistance training and chitosan-coated nanoliposomal black grape seed extract independently improved pancreatic MTNR1B expression, cAMP content, and metabolic indices in rats with high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes. Their differing effect-size profiles suggest complementary rather than uniformly synergistic actions: supplementation more strongly influenced MTNR1B expression, whereas training

exerted greater effects on insulin, HOMA-IR, and body weight. Mechanistically, resistance training may reduce systemic metabolic load through enhanced muscular glucose disposal and improved insulin signaling, thereby lowering secretory pressure on beta cells. Grape-seed proanthocyanidins may primarily improve the intra-islet redox environment through Nrf2-related antioxidant activity, attenuation of endoplasmic-reticulum stress, and protection against ferroptotic injury; nanoliposomal encapsulation and chitosan coating may enhance their stability and bioavailability. The concomitant reduction in MTNR1B expression and elevation of pancreatic cAMP are consistent with reduced inhibitory signaling through the MTNR1B/Gi/adenylyl cyclase pathway, but this mechanism cannot be confirmed because receptor protein, adenylyl cyclase and protein kinase A activities, beta-cell mass, and glucose-stimulated insulin secretion were not measured. The interaction between training and supplementation was limited to body weight, with no significant interaction for the principal molecular or glycemic outcomes. These findings support the two interventions as potentially complementary preclinical strategies, but direct extrapolation to humans is not warranted.

Keywords: Strength Training, Anthocyanidin, Diabetes Mellitus, Melatonin Receptor.

Ethical Considerations: Animal welfare principles were observed throughout the study.

Compliance with Ethical Guideline: The study was conducted according to international bioethical standards and Institutional Animal Care and Use Committee principles and was approved by the Ethics Committee of Islamic Azad University (IR.IAU.K.REC.1404.213).

Funding: The study costs were borne by the researcher. The author also thanks the Physiology Laboratory of the Karaj Branch of Islamic Azad University for their sincere cooperation.

Conflicts of Interest: All authors hereby declare that there are no conflicts of interest in this research.



اثر تعاملی تمرین مقاومتی و نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه بر بیان ژن MTNR1B، سطح cAMP در بافت پانکراس و شاخص‌های متابولیک مقاومت انسولینی در موش‌های

مدل دیابت نوع ۲

سحر شیخی^۱، مهدی کسب پرست^{۲*}، محمدعلی سلیمان فلاح^۳

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

۲. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

۳. استادیار گروه بیومکانیک ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: شواهد تجربی، محور MTNR1B-cAMP پانکراس را با تنظیم ترشح انسولین مرتبط دانسته‌اند، هرچند سهم علی آن در اختلال سلول‌های بتا در دیابت نوع ۲ کاملاً روشن نیست. بر مبنای شواهد، تمرین مقاومتی و عصاره دانه انگور سیاه، هر یک به تنهایی و از مسیرهای متمایز اما همگرا به ترتیب شامل سازگاری‌های سیستمیک-متابولیک و تعدیل ردوکس درون جزیره‌ای، بر شاخص‌های دیابت اثرگذارند؛ این همگرایی، احتمالاً آزمون اثر تعاملی آن‌ها را توجیه می‌کند. لذا هدف، تعیین اثرات اصلی و تعاملی تمرین مقاومتی و نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه بر بیان ژن MTNR1B، cAMP بافتی پانکراس و شاخص‌های متابولیک (گلوکز ناشتا، انسولین، HOMA-IR) در موش‌های دیابتی شده با رژیم پرچرب-استرپتوزوتوسین بود.

روش تحقیق: ۳۵ سر موش صحرایی و بیستار به پنج گروه (هفت نفر موش در هر گروه) شامل کنترل سالم، کنترل دیابتی، دیابتی+تمرین، دیابتی+مکمل، دیابتی+تمرین+مکمل تقسیم شدند. القاء دیابت از طریق چهار هفته رژیم غذایی پرچرب و در انتها با تک‌دوز استرپتوزوتوسین صورت گرفت. تمرین مقاومتی، هشت هفته، پنج جلسه در هفته و با شدت ۵۰ تا ۸۰ درصد MVCC انجام شد؛ مکمل نانولیپوزومال عصاره دانه انگور سیاه با روکش کیتوزان تهیه شده و روزانه ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن، معادل پروآنتوسیانیدین مؤثر کپسوله‌شده در فرمولاسیون و بر مبنای دوز مؤثر پیشین در این مدل، گاوژ شد؛ وزن بدن، غلظت سرمی گلوکز ناشتا به‌روش آنزیمی و غلظت انسولین به‌روش الایزا بررسی شد و مقاومت انسولینی از طریق HOMA-IR محاسبه گردید. بیان ژن MTNR1B در پانکراس به‌روش Real-time qPCR و میزان بافتی cAMP به‌روش الایزا اندازه‌گیری شد. موفقیت مدلسازی با آزمون t-مستقل میان گروه‌های کنترل و اثرات اصلی و تعاملی مداخلات با تحلیل واریانس دوعاملی در چهار گروه دیابتی در سطح $p < 0.05$ بررسی شدند. **یافته‌ها:** القاء دیابت، سطوح MTNR1B، گلوکز، انسولین، HOMA-IR و وزن را افزایش و cAMP را کاهش داد ($p < 0.001$). تمرین به‌طور مستقل سطوح افزایش‌یافته‌ی MTNR1B ($p = 0.006$)، گلوکز، انسولین، HOMA-IR و وزن را معکوس کرد و cAMP را افزایش داد ($p < 0.001$ برای تمامی نشانگرها). مکمل تنها نیز توانست سطوح شاخص‌های مذکور را بهبود بخشد ($p = 0.012$ برای انسولین و $p < 0.001$ برای دیگر نشانگرها). اما اثر تعاملی دو مداخله فقط منجر به کاهش وزن گردید ($p = 0.009$). **نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان می‌دهد تمرین مقاومتی و نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه، هر یک به تنهایی، احتمالاً می‌توانند به بازتنظیم نسبی محور MTNR1B-cAMP پانکراس و بهبود شاخص‌های متابولیک در مدل تجربی دیابت نوع ۲ کمک کنند؛ اثر تعاملی آن‌ها تنها در کاهش وزن آشکار شد و تعمیم این نتایج به شرایط بالینی نیازمند مطالعات تکمیلی است.

واژه‌های کلیدی: ورزش قدرتی، آنتوسیانیدین، دیابت ملیتوس، گیرنده ملاتونین.



The interactive effect of resistance training and black grape seed extract nanoliposomes on MTNR1B gene expression, pancreatic cAMP levels, and metabolic indices of insulin resistance in a type 2 diabetic rat model

Abstract

Background and Aim: Experimental evidence has linked the pancreatic MTNR1B-cAMP axis to the regulation of insulin secretion, although its causal role in beta-cell dysfunction in type 2 diabetes remains unclear. Evidence suggests that resistance training and black grape seed extract, acting independently via distinct yet converging pathways involving systemic-metabolic adaptations and intra-islet redox modulation, respectively influence diabetic markers; this convergence provides a rationale for investigating their potential interaction. Therefore, this study aimed to determine the main and interactive effects of resistance training and nanoliposomal black grape seed extract on MTNR1B gene expression, pancreatic tissue cAMP levels, and metabolic markers (fasting glucose, insulin, and HOMA-IR) in diabetic rats via a high-fat diet and streptozotocin. **Materials and Methods:** 35 Wistar rat heads were divided into five groups (seven rats in each group) including healthy control, diabetic control, diabetic+exercise, diabetic+supplement, diabetic+exercise+supplement. Diabetes was induced through a four-week high-fat diet and finally with a single dose of streptozotocin. Resistance training was carried out for eight weeks, five sessions per week, at an intensity of 50 to 80 percent MVCC; the nanoliposomal black grape seed extract supplement coated with chitosan was prepared and administered daily at 250 mg per kilogram of body weight, equivalent to the effective proanthocyanidin encapsulated in the formulation and based on the previously effective dose in this model; body weight, serum fasting glucose concentration were measured enzymatically, and insulin concentration was measured by ELISA, and insulin resistance was calculated via HOMA-IR. MTNR1B gene expression in the pancreas was measured by real-time qPCR, and tissue cAMP levels were measured using ELISA. Modeling success was evaluated with an independent t-test between control groups, and the main and interactive effects of interventions were examined by two-way ANOVA in the four diabetic groups at $p \leq 0.05$. **Findings:** Diabetes induction increased the levels of MTNR1B, glucose, insulin, HOMA-IR, and weight, and decreased cAMP ($p \leq 0.001$). Training independently reversed the increased levels of MTNR1B ($p=0.006$), glucose, insulin, HOMA-IR, and weight, and increased cAMP ($p \leq 0.001$ for all markers). The supplement alone was also able to improve the levels of the aforementioned markers ($p=0.012$ for insulin and $p \leq 0.001$ for other markers). However, the interactive effect of the two interventions only resulted in weight reduction ($p=0.009$). **Conclusion:** These findings suggest that resistance training and black grape seed extract nanoliposome may each independently contribute to partial restoration of the pancreatic MTNR1B-cAMP axis and improvement of metabolic markers in experimental type 2 diabetes; their interaction was limited to weight reduction, and extrapolation to clinical settings requires further studies.

Keywords: Strength Training, Anthocyanidin, Diabetes Mellitus, Melatonin Receptor



دیابت نوع ۱^۲ (T2D) یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیک در جهان محسوب می‌شود که با هایپرگلیسمی مزمن، مقاومت به انسولین و اختلال پیش‌رونده در عملکرد سلول‌های بتای پانکراس مشخص می‌گردد. شواهد موجود نشان می‌دهد که تخریب تدریجی توده و عملکرد سلول‌های بتا، محور اصلی پیشرفت این بیماری از مرحله پیش‌دیابت به دیابت آشکار است؛ به‌طوری‌که کاهش ظرفیت ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز، پیامد نهایی مجموعه‌ای از فرایندهای مولکولی از جمله استرس اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندریایی، التهاب مزمن درجه پایین و استرس شبکه آندوپلاسمی است که در نهایت به آپوپتوز و کاهش توده سلول‌های بتا منجر می‌شوند (۱). در کنار این مکانیزم‌های عمومی، در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به ژن‌ها و مسیرهای پیام‌رسانی درون‌سلولی معطوف شده که در تنظیم ترشح انسولین و بقای سلول‌های بتا نقش دارند و اختلال در بیان آن‌ها ممکن است زمینه‌ساز یا تشدیدکننده تخریب این سلول‌ها در T2D باشد (۲). از جمله این مسیرها، محور گیرنده ملاتونین نوع ۱B^۲ (MTNR1B) و پیام‌رسان ثانویه آدنوزین مونو-فسفات حلقوی^۳ (cAMP) در بافت پانکراس است که به دلیل ارتباط تنگاتنگ با ریتم شبانه‌روزی، هموستاز گلوکز و ترشح انسولین، به یکی از کاندیدهای مهم پژوهش در حوزه فیزیولوژی و ژنتیک دیابت نوع ۲ تبدیل شده است (۲).

ژن MTNR1B رمزکننده یکی از دو گیرنده اصلی ملاتونین (MT2) است که در بافت‌های متعددی از جمله سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس بیان می‌شود و از طریق مهار مسیر آدنیلات سیکلاز/پروتئین کیناز^۴ A (cAMP/PKA)، ترشح انسولین وابسته به گلوکز را تعدیل می‌کند. مطالعات ژنتیکی گسترده نشان داده‌اند که واریانت rs10830963 در این ژن، یکی از قوی‌ترین ارتباط‌های ژنومی شناخته‌شده با افزایش خطر دیابت نوع ۲ است؛ به‌گونه‌ای که آلل خطر این واریانت با افزایش بیان یا فعالیت گیرنده، کاهش ترشح فاز اول انسولین و اختلال در تحمل گلوکز، حتی در افراد غیردیابتیک، همراه است (۳). شواهد حاصل از جمعیت‌های مختلف نیز این ارتباط را تأیید کرده و نشان داده‌اند که این واریانت می‌تواند عملکرد فاز اولیه سلول‌های بتا را در پاسخ به بار گلوکز مختل کند (۴). از سوی دیگر، مطالعات جدیدتر نشان داده‌اند که تغییرات ژنتیکی مرتبط با دیابت در MTNR1B، علاوه بر سلول‌های بتا، می‌تواند از طریق اختلال در عملکرد سلول‌های آلفا نیز با افزایش غلظت گلوکز همراه باشد که نشان‌دهنده نقش گسترده‌تر این گیرنده در تنظیم جزیره‌ای گلوکز است (۵).

فعالیت بدنی منظم از راهبردهای غیردارویی شناخته‌شده برای تعدیل شاخص‌های مرتبط با عملکرد جزیره‌ای و بیان ژن‌های دخیل در هموستاز گلوکز در دیابت نوع ۲ است. از نظر مکانیزمی، تمرین ورزشی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، تعدیل التهاب سیستمیک، بهبود عملکرد میتوکندریایی و تنظیم مسیرهای استرس شبکه آندوپلاسمی، محیط سلولی مطلوب‌تری برای بقای سلول‌های بتا فراهم می‌کند و احتمالاً مسیرهای پیام‌رسانی درون‌سلولی از جمله محور گیرنده‌های ملاتونین را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). با این حال، نوع پروتکل تمرینی نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان و جهت این سازگاری‌ها دارد. تمرین مقاومتی از طریق افزایش توده و کیفیت عضلانی، تقویت برداشت محیطی گلوکز و بهبود حساسیت به انسولین، می‌تواند بار متابولیک وارد بر پانکراس را کاهش دهد و بدین ترتیب تقاضای ترشحی سلول‌های بتا را تعدیل کند (۷). افزون بر

¹ Type-2 diabetes

² Melatonin Receptor 1B

³ Cyclic adenosine mono-phosphate

⁴ Protein kinase A



این، ماهیت متناوب و قابل تنظیم این نوع تمرین امکان کنترل شدت، حجم و زمان ریکآوری را فراهم می‌سازد؛ ویژگی که اجرای ایمن و هدفمند آن را در مدل‌های دیابتی و شرایط بالینی تسهیل می‌کند (۷،۸). در ارتباط مستقیم با محور هدف پژوهش حاضر، سوری و دیگران (۲۰۱۷) گزارش کردند که دوازده هفته تمرین مقاومتی در موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ با تعدیل بیان ژن MTNR1B در پانکراس و کاهش معنادار گلوکز ناشتا همراه بود (۹). در همین راستا، کارکه‌آبادی و دیگران (۲۰۲۶) نیز نشان دادند که ترکیبی از تمرینات مقاومتی و تناوبی با تعدیل معنادار بیان گیرنده‌های ملاتونین (MTNR1A) و (MTNR1B) در بافت پانکراس موش‌های دیابتی همراه است (۶). همچنین، غفرانی و دیگران (۲۰۲۳) گزارش کردند که ترکیب تمرینات هوازی و مقاومتی با بهبود بیان ژن ناقل گلوکز-۲ و افزایش سطح انسولین سرمی در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ همراه است (۸).

در کنار فعالیت بدنی، استفاده از ترکیبات طبیعی آنتی‌اکسیدانی به عنوان مکمل درمانی در مدیریت دیابت نوع ۲ مورد توجه فزاینده‌ای قرار گرفته است. عصاره دانه انگور سیاه به دلیل غنی بودن از پروآنتوسیانیدین‌ها و ترکیبات پلی‌فنولی، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی است که می‌تواند از سلول‌های بتای پانکراس در برابر آسیب اکسیداتیو و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده محافظت کند. از نظر مکانیزمی، پروآنتوسیانیدین‌های دانه انگور با فعال‌سازی مسیر عامل تنفس هسته‌ای-۱۲ (Nrf2) و مهار فرایند فروپتوز، توانسته‌اند از تخریب سلول‌های بتا در مدل‌های تجربی دیابت نوع ۲ جلوگیری کنند (۱۰)، مکانیزمی که می‌تواند به‌طور بالقوه بر بیان ژن‌های مرتبط با گیرنده ملاتونین و مسیر cAMP نیز اثرگذار باشد. با این حال، فراهمی‌زیستی پایین و ناپایداری این ترکیبات پلی‌فنولی در دستگاه گوارش، کارایی بالینی فرم‌های ساده و متعارف عصاره را محدود کرده است. در این راستا، فرمولاسیون نانولیپوزومی به عنوان یک سامانه نوین حامل دارو، با محصور کردن ترکیبات فعال درون وزیکول‌های لیپیدی نانومقیاس، سبب افزایش پایداری، بهبود رهایش کنترل شده و ارتقای چشمگیر فراهمی‌زیستی و جذب سلولی این ترکیبات نسبت به فرم‌های ساده یا سایر روش‌های کپسوله‌سازی می‌شود (۱۱). شواهد پیشینه پژوهش نیز از اثربخشی عصاره دانه انگور سیاه بر شاخص‌های ژنی مرتبط با دیابت حمایت می‌کند؛ برای نمونه، لی^۲ و دیگران (۲۰۲۴) نشان دادند که پروآنتوسیانیدین دانه انگور از طریق مسیر Nrf2 سلول‌های بتای پانکراس را در برابر فروپتوز ناشی از دیابت نوع ۲ محافظت می‌کند (۱۰)، و شیرانی‌بیدآبادی و دیگران (۲۰۲۱) گزارش کردند که مصرف عصاره دانه انگور سیاه به همراه فعالیت ورزشی می‌تواند بیان miRNAهای دخیل در مسیرهای متابولیک را در موش‌های صحرایی دیابتی تعدیل نماید (۱۲).

بررسی مجموع این شواهد، زنجیره استدلالی مشخصی را برای طراحی پژوهش حاضر فراهم می‌کند. نخست، اختلال در محور MTNR1B-cAMP پانکراس با پاتوفیزیولوژی دیابت نوع ۲ پیوند خورده است (۲،۳). دوم، تمرین مقاومتی عمدتاً از مسیر سازگاری‌های سیستمیک و عضلانی-متابولیک، بار گلوکوتوکسیک وارد بر جزایر را کاهش می‌دهد و اثر آن بر بیان MTNR1B پانکراس به‌طور مستقل نشان داده شده است (۷،۹). سوم، پروآنتوسیانیدین‌های دانه انگور، به‌ویژه در فرم نانولیپوزومال با فراهمی‌زیستی بهبودیافته، عمدتاً از مسیر تعدیل ردوکس درون‌جزیره‌ای عمل می‌کنند (۱۰،۱۲). همگرایی این دو مداخله بر پیام‌رسانی درون‌جزیره‌ای از دو ورودی متفاوت، این فرض را مطرح می‌سازد که همراه‌سازی آن‌ها ممکن است پاسخی متفاوت از جمع صرف اثرهای منفرد ایجاد کند؛ فرضی که شواهد مقدماتی از همراهی فعالیت ورزشی و عصاره دانه انگور سیاه بر شاخص‌های مولکولی در مدل‌های دیابتی نیز آن را تقویت می‌کند (۱۲). با این حال، مطالعه‌ای که اثر تعاملی این دو مداخله را

¹ Nuclear respiratory factor-2

² Li



بر محور MTNR1B-cAMP پانکراس در مدل تجربی دیابت نوع ۲ آزموده باشد، یافت نشد. بر این اساس، پژوهش حاضر با دو فرضیه صریح و آزمون پذیر انجام شد: نخست اینکه هر یک از مداخله‌ها به تنهایی (اثرات اصلی) بیان ژن MTNR1B، مقادیر بافتی cAMP پانکراس و شاخص‌های متابولیک (گلوکز ناشتا، انسولین، HOMA-IR و وزن بدن) را در موش‌های دیابتی شده با رژیم پرچرب و استرپتوزوتوسین تغییر می‌دهند یا خیر و دوم اینکه ممکن است میان دو مداخله اثر تعاملی آماری وجود داشته باشد؛ آزمون این فرضیه‌ها می‌تواند دانش موجود درباره مکانیزم‌های مولکولی محافظت از سلول‌های بتای پانکراس را گسترش داده و زمینه را برای طراحی راهبردهای درمانی ترکیبی و کم‌تهاجم در دیابت نوع ۲ فراهم سازد.

روش تحقیق

نمونه‌های پژوهش: پژوهش حاضر در جهت بررسی اثر مستقل و تعاملی تمرین مقاومتی همراه با نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه^۱ (GSE) با روکش کیتوزان بر شاخص‌های مولکولی و متابولیک مذکور در پانکراس موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ ناشی از رژیم غذایی پرچرب^۲ (HFD) و استرپتوزوتوسین^۳ (STZ) طراحی شد. این مطالعه مطابق با دستورالعمل‌های بین المللی اخلاق زیستی و اصول کمیته نظارت بر مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی^۴ (IACUC) دانشگاه آزاد انجام شد و مجوز اخلاقی با کد IR.IAU.K.REC.1404.213 را دریافت نموده است.

در این مطالعه تجربی و بنیادی، جهت تعیین حجم نمونه پیش از شروع مطالعه، از نرم‌افزار آماری G Power استفاده گردید. در این نرم‌افزار با انتخاب آزمون‌های F، تحلیل واریانس (اثرات اصلی و تعاملی)، اندازه اثر بزرگ معادل ۰/۵۳، خطای آلفا معادل ۰/۰۵ و توان آماری ۰/۸۵ انتخاب شد و در نهایت نرم‌افزار، حجم نمونه ۳۵ موش در پنج گروه را همراه با توان واقعی معادل ۰/۸۶ و میزان F بحرانی معادل ۴/۱۷۰ محاسبه نمود. تعداد ۳۵ موش صحرایی بالغ نر ویستار هشت هفته‌ای با میانگین وزن اولیه 20 ± 270 گرم (تهیه شده از انستیتو پاستور تهران)، در محیطی با میانگین دمای $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد، رطوبت 4 ± 55 درصد و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی کربنات با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. وزن کشی حیوانات با ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۱ گرم به صورت هفتگی انجام گرفت تا روند تغییرات وزن بدن و اثربخشی رژیم غذایی پرچرب در القای چاقی و دیابت نوع ۲ ارزیابی گردد.

روش اجرای پژوهش: موش‌های صحرایی پس از دو هفته سازگاری با محیط جدید، به صورت تصادفی به پنج گروه (هفت سر موش در هر گروه) شامل کنترل سالم، کنترل دیابتی، دیابتی + تمرین، دیابتی + مکمل، دیابتی + تمرین + مکمل تقسیم شدند.

القاء دیابت نوع ۲ برای پژوهش حاضر، با الگوی پیشنهادی پژوهش‌های اخیر شامل ایجاد مقاومت به انسولین با رژیم غذایی پرچرب و سپس ایجاد اختلال نسبی، نه تخریب کامل، سلول‌های بتای پانکراس با دوز پایین STZ می‌باشد (۱۳). بر اساس مرور تلفیقی سال ۲۰۲۵ در رت‌های ویستار و دستورالعمل عملی STZ سال ۲۰۲۳، طول دوره رژیم، درصد انرژی حاصل از

¹ Grape seed extract

² High-fat diet

³ Streptozotocin

⁴ Institutional Animal Care and Use Committee



چربی، سن حیوان، زمان ناشتایی و دوز STZ همگی بر شدت هایپرگلیسمی، بقای سلول‌های بتا و شباهت مدل به دیابت نوع ۲ اثر می‌گذارند (۱۳، ۱۴). برای این منظور، موش‌های صحرایی گروه‌های دیابتی به مدت چهار هفته از رژیم غذایی پرچرب تجاری با کد D12492 تغذیه شدند. این رژیم دارای چگالی انرژی ۲۴/۵ کیلوکالری بر گرم بود و ۶۰ درصد انرژی آن از چربی (عمدتاً کره حیوانی به همراه روغن سویا)، ۲۰ درصد از کربوهیدرات و ۲۰ درصد از پروتئین تأمین می‌شد و حاوی مقادیر استاندارد سلولز، مخلوط ویتامینی و مخلوط معدنی بود (۱۳). گروه کنترل سالم در همان دوره چو استاندارد جوندگان (پلت استاندارد آزمایشگاهی) دریافت کرد که دارای چگالی انرژی حدود ۲/۹ کیلوکالری بر گرم بود و تقریباً ۲۳ درصد انرژی آن از پروتئین، ۶۷ درصد از کربوهیدرات و ۱۰ درصد از چربی (با منبع عمدتاً گیاهی) تأمین می‌شد. دسترسی به غذا و آب در تمام گروه‌ها آزادانه بود و مصرف روزانه غذا در محدوده متعارف گزارش شده برای مدل‌های مشابه (حدود ۱۵ تا ۲۰ گرم برای هر موش در روز) قرار داشت (۱۳، ۱۴). در پایان دوره رژیم و پس از ۶ تا ۸ ساعت ناشتایی، گلوکز و انسولین ناشتا اندازه‌گیری و مقاومت به انسولین با مدل هومئوستازی شاخص مقاومت به انسولین^۱ (HOMA-IR) ارزیابی شد. سپس STZ تازه آماده‌شده در بافر سیترات سرد با pH برابر ۴/۵، به صورت تک‌دوز ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل‌صفاقی تزریق شد؛ حیوانات گروه کنترل سالم در همان زمان، حجم مساوی از همان بافر سیترات سرد را به عنوان کنترل حلال به صورت داخل‌صفاقی دریافت کردند تا اثر احتمالی خود حلال و استرس ناشی از تزریق میان گروه‌ها هم‌تراز شود. برای کاهش خطر افت قند اولیه، طی ۲۴ ساعت پس از تزریق محلول گلوکز ۵٪ در اختیار حیوانات قرار گرفت. گلوکز ناشتا ۷۲ ساعت و مجدداً ۵ تا ۷ روز پس از تزریق اندازه‌گیری شد. حیواناتی با گلوکز ناشتای حداقل ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در دو ارزیابی، همراه با شواهد مقاومت به انسولین ناشی از HFD، دیابتی محسوب و وارد مداخله شدند (۱۳). رژیم پرچرب در طول دوره تثبیت و مداخله ادامه یافت. همچنین قابل ذکر است که فرد اندازه‌گیر گلوکز و تحلیل‌گر نمونه‌ها، از تخصیص گروهی بی‌اطلاع بود و حیوانات بر اساس مقادیر پایه و پس از مدل‌سازی به صورت بلوکی تصادفی شدند تا میانگین گلوکز ناشتا و وزن گروه‌های مداخله نزدیک باشد. شایان ذکر است که تمامی حیوانات دریافت‌کننده HFD و STZ به معیار دیابت رسیدند و وارد مطالعه شدند و هیچ حیوانی در طول دوره القای مدل و مداخله حذف یا تلف نشد؛ این ویژگی را می‌توان به ماهیت روش مدل‌سازی نسبت داد، زیرا در این الگو، برخلاف مدل‌های مبتنی بر دوزهای بالای STZ که با تخریب گسترده سلول‌های بتا، هایپرگلیسمی شدید و مرگ‌ومیر حیوانات همراه‌اند، تنها اختلال نسبی سلول‌های بتا بر پس‌زمینه مقاومت انسولینی ناشی از رژیم پرچرب ایجاد می‌شود و شدت بیماری در محدوده کنترل‌شده‌ای باقی می‌ماند (۱۳، ۱۴).

پروتکل تمرین مقاومتی با اقتباس از دستورالعمل غدیری و دیگران (۲۰۲۴) انجام شد؛ به منظور آشناسازی حیوانات با پروتکل تمرین مقاومتی، موش‌ها به مدت ۵ روز، روزانه ۳ تا ۵ بار بدون بار خارجی از نردبان مقاومتی به ارتفاع ۱۱۰ سانتی‌متر با شیب ۸۵ درجه بالا رفتند؛ برای تعیین حداکثر ظرفیت حمل ارادی^۲ (MVCC) برای هر حیوان، باری معادل ۷۵٪ وزن بدن با محفظه مناسب به قاعده دم متصل شد. پس از هر صعود موفق، ۳۰ گرم به بار افزوده و بین تلاش‌ها ۲ دقیقه استراحت داده شد. پس از سه شکست متوالی، آخرین بار صعود موفق به عنوان MVCC ثبت گردید. این آزمون همچنین در ابتدای هفته‌های ۴ و ۷ تکرار شد. محل اتصال بار باید هر روز از نظر التهاب یا آسیب پوستی نیز بررسی گردید. پروتکل اصلی تمرین مقاومتی ۵ جلسه در هفته و به مدت ۸ هفته بود که هر جلسه از شش-هشت الی ۹-۱۰ صعود، بار تمرین از ۵۰٪ MVCC در هفته نخست به

¹ Homeostatic model assessment of insulin resistance

² Maximal voluntary carrying capacity



علوم زیستی در ورزش

مطالعات کاربردی



۸۰٪ MVCC در هفته‌های ششم تا هشتم افزایش یافت و میان صعودها ۹۰ تا ۱۲۰ ثانیه استراحت داده شد. برای سازگاری ایمن حیوان دیابتی، شدت در دو هفته نخست کمتر در نظر گرفته شده و سپس تا ۸۰٪ MVCC افزایش یافت (۱۵). در صورتی که موش نمی‌توانست حداقل ۸ صعود را کامل کند، بار همان جلسه ۱۰٪ کاهش می‌یافت. در صورت مشاهده زخم دم، لنگش، افت شدید وزن، دهیدراتاسیون یا بی‌حالی، تمرین متوقف و حیوان طبق معیارهای رفاه حیوانی ارزیابی می‌گردید. تمامی جلسات تمرین زیر نظارت مستقیم مجری پژوهش برگزار شد و تعداد صعودهای هر حیوان در هر جلسه با مقادیر هدف پروتکل کنترل می‌گردید؛ همه حیوانات برنامه هشت‌هفته‌ای را به‌طور کامل به پایان رساندند و هیچ حیوانی به علت ناتوانی در اجرای تمرین از مطالعه خارج نشد. مجموعه اقدامات آشناسازی بدون بار، افزایش تدریجی شدت، کاهش شدت در دو هفته نخست، استراحت کافی میان صعودها و پایش روزانه سلامت حیوان با هدف به حداقل رساندن استرس ناشی از تمرین اعمال شد؛ ضمن اینکه صعود از نردبان برخلاف پروتکل‌های مبتنی بر تحریک اجبارآور، مدلی ارادی و کم‌استرس محسوب می‌شود (۱۵). همچنین چون بار تمرینی در تمام دوره به‌صورت نسبتی از MVCC هر حیوان تعیین شد، شدت نسبی گزارش‌شده در جدول ۱ بار واقعی دریافت‌شده توسط حیوانات را منعکس می‌کند.

جدول ۱. جزئیات پروتکل تمرین مقاومتی اجراشده

هفته	بار تمرینی (MVCC)	تعداد صعود در جلسه	استراحت بین صعودها
۱	۵۰٪	۶-۸	۱۲۰ ثانیه
۲	۶۰٪	۸	۱۲۰ ثانیه
۳	۷۰٪	۸-۹	۱۲۰ ثانیه
۴	۷۰٪	۸-۹	۹۰-۱۲۰ ثانیه
۵	۷۵٪	۹-۱۰	۹۰-۱۲۰ ثانیه
۶	۸۰٪	۹-۱۰	۹۰-۱۲۰ ثانیه
۷	۸۰٪	۹-۱۰	۹۰-۱۲۰ ثانیه
۸	۸۰٪	۹-۱۰	۹۰-۱۲۰ ثانیه

دانه‌های انگور سیاه پس از جداسازی، شست‌وشو و خشک‌شدن، آسیاب و با خلال هیدروالکلی (اتانول ۷۰٪) در محیط آزمایشگاه و توسط تکنسین عصاره‌گیری شد؛ عصاره حاصل در روتاری (۴۰°C، تحت خلأ) تغلیظ، فریز خشک و از نظر محتوای فنول کل، پروآنتوسیانیدین کل و دیگر ترکیبات نشانگر با کروماتوگرافی محلول با عملکرد بالا^۱ (HPLC) استانداردسازی گردید. نانولیپوزوم اولیه با پراکنده‌سازی لسیته سوپا (۱٪ w/w) و عصاره دانه انگور (۱٪ w/w) در بافر استات ۰/۱ مولار (pH = ۳) و اعمال هموژنیزاسیون در فشار بالا تهیه شد؛ فیلم نازک لیپیدی (فسفاتیدیل‌کولین/کلسترول) پس از تبخیر حلال، با محلول آبی عصاره هیدراته شده و اندازه و زیکول‌ها با چرخه‌های کنترل‌شده اولتراسوند و خالص‌سازی از غشای پلی‌کربنات ۱۰۰ نانومتری یکنواخت گردید. سپس نانولیپوزوم ثانویه (کیتوزوم) با افزودن قطره‌قطره محلول کیتوزان ۰/۱٪ (w/w) وزن مولکولی ≈ 200 کیلودالتون، حل‌شده در بافر استات (pH = ۳) به سوسپانسیون لیپوزومی تحت هم‌زدن ملایم و بر پایه سازوکار رسوبدهی الکترواستاتیک لایه‌به‌لایه تهیه شد و موفقیت روکش‌دهی از طریق معکوس‌شدن بار سطحی از مقادیر منفی به مثبت تأیید گردید (۱۶). فرمولاسیون‌ها از نظر قطر هیدرودینامیکی و شاخص پراکندگی (PDI < ۰/۳)،

¹ High-performance liquid chromatography



پتانسیل زتا، ریخت‌شناسی، برهم‌کنش‌های مولکولی و بازده کپسوله‌سازی (جداسازی ترکیب آزاد با اولتراسانتریفیوژ و سنجش با HPLC) مشخصه‌یابی شدند؛ دسته‌های تولیدی تنها در صورت انطباق با معیارهای پذیرش از پیش تعیین‌شده، شامل قطر هیدرودینامیکی در محدوده تعیین‌شده با اکستروژن از غشای ۱۰۰ نانومتری، PDI کمتر از ۰/۳ و پتانسیل زتای مثبت پس از روکش‌دهی کیتوزان، برای مصرف آزادسازی شدند؛ این معیارها بر مبنای مقادیر بهینه گزارش‌شده برای نانولیپوزوم‌های حامل ترکیبات پلی‌فنولی در روش‌های مرجع تعیین شده بود (۱۲، ۱۶). برای تضمین پایداری در طول دوره مداخله، فرمولاسیون به‌جای نگهداری بلندمدت، به‌صورت دسته‌های هفتگی تازه تهیه و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور از نور نگهداری شد و هر دسته پیش از استفاده از نظر معیارهای مذکور کنترل کیفیت گردید؛ سپس بر مبنای معادل پروآنتوسیانیدین مؤثر، روزانه از طریق گاوآژ خوراکی به حیوانات تجویز شد.

گاوآژ مکمل نانولیپوزومال شده‌ی عصاره دانه انگور سیاه با روکش کیتوزان به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن/روز مطابق با دستورالعمل دینگ^۱ و دیگران (۲۰۱۳) انجام شد (۱۷)؛ دوز مؤثر بر پایه معادل پروآنتوسیانیدین ۲۵۰ میلی‌گرم انتخاب شد که در مطالعات پیشین روی موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ القاء‌شده با STZ کم‌دوز و رژیم پرچرب، به‌عنوان دوز میانی مؤثر بر عملکرد سلول بتای پانکراس گزارش شده است (۱۷). در گروه‌هایی که مداخله مکملی را دریافت نکردند، از حلال آب مقطر به عنوان دارونما استفاده گردید.

در پایان دوره مداخلات پژوهشی، ۴۸ ساعت پس از آخرین مداخله و متعاقب ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه، خون‌گیری در ساعت شبانه‌روزی یکسان انجام شد؛ نمونه‌ها پس از لخته‌شدن به مدت ۳۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با نیروی $3000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سرم تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. گلوکز سرم با کیت تجاری گلوکز پارس‌آزمون و به روش رنگ‌سنجی آنزیمی گلوکز اکسیداز-پراکسیداز مطابق دستورالعمل سازنده، در دو تکرار اندازه‌گیری شد. جذب محصول در طول موج ۵۰۰ تا ۵۰۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر یا اتوآنالایزر بیوشیمی قرائت و غلظت گلوکز بر اساس استاندارد کیت به‌صورت میلی‌گرم/دسی‌لیتر گزارش شد.

انسولین سرم ناشتا با کیت الایزا^۲ اختصاصی انسولین موش صحرایی (ZellBio GmbH، آلمان؛ Cat. No. ZB-10707G-R9648) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، در دو تکرار سنجیده شد. پس از انجام مراحل انکوباسیون، شست‌وشو و واکنش TMB، جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر با میکروپلیت‌ریدر الایزا قرائت و غلظت انسولین از منحنی استاندارد محاسبه شد. مقادیر خارج از محدوده سنجش پس از رقیق‌سازی مناسب دوباره اندازه‌گیری شدند و ضرایب تغییرات درون‌آزمون و بین‌آزمون کمتر از ۱۰٪ پذیرفته شد. نتیجه برای محاسبه HOMA-IR به‌صورت میکرو واحد در لیتر ($\mu IU/L$) گزارش شد.

شاخص مقاومت به انسولین با استفاده از مقادیر گلوکز و انسولین حاصل از همان نمونه ناشتای سرمی و از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$HOMA-IR = \frac{405}{[انسولین ناشتا (\mu IU/L) \times گلوکز ناشتا (mg/dL)]}$$

¹ Ding

² ELISA

به منظور ارزیابی بیان ژن MTNR1B به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کیفی در زمان واقعی^۱ (Real-time qPCR)، بخش ثابتی از پانکراس برداشت شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. حدود ۳۰ میلی‌گرم بافت در ۷۰۰ میکرولیتر معرف QIAzol (QIAGEN، آلمان؛ Cat. 79306) همگن و ریبونوکلیک اسید^۲ (RNA) کل با کیت RNeasy Mini (QIAGEN؛ Cat. 74104) استخراج و با RNase-Free DNase Set (QIAGEN؛ Cat. 79254) تیمار شد. سپس از RNA حاصل شده، در حجم ۲۰ میکرولیتر، دئوکسی نوکلئیک اسید مکمل^۳ (cDNA) تهیه شد؛ برنامه شامل ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۴۲ درجه برای ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه برای ۵ دقیقه بود. آغازگرهای Mtnr1b بر پایه RefSeq: NM_001100641.1 انتخاب و همراه با آغازگر GAPDH، پس از بازبینی اختصاصیت با Primer-BLAST، توسط سیناکلون (تهران، ایران) سنتز شدند.

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Genes	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Amplicon size
MTNR1B	TTGCTGTGGTGTCTTTTGC	GCAAGGCCAATACAGTTGAG	۱۸۱ جفت‌باز
GAPDH	CAAGTTCAACGGCACAGTCAAG	ACATACTCAGCACCAGCATCAC	۱۲۳ جفت‌باز

فرایند RT-qPCR با مستر میکس SYBR Green PCR (سیستم‌های زیستی کاربردی، ایالات متحده؛ Cat. 4309155) و دستگاه StepOne انجام شد. واکنش ۲۰ میکرولیتری شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس ۲×، از هر آغازگر ۰/۴ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۲ میکرولیتر cDNA رقیق‌شده و ۷/۲ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود. برنامه حرارتی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه و ۴۰ چرخه ۹۵ درجه برای ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه برای ۶۰ ثانیه بود؛ سپس منحنی ذوب ۶۰ تا ۹۵ درجه ثبت شد. نمونه‌ها در دو تکرار فنی و همراه با کنترل‌های لازم سنجیده شدند. اختصاصیت تکثیر با یک پیک منفرد منحنی ذوب و باند مورد انتظار در ژل آغاز ۲٪ تأیید شد. پس از تأیید ثبات Cq ژن GAPDH میان گروه‌ها، بیان Mtnr1b نسبت به GAPDH نرمال و تغییرات نسبی آن در مقایسه بین‌گروهی با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

برای سنجش cAMP بافتی، بخش ثابت و یکسانی از پانکراس (ناحیه آناتومیک یکسان در تمام حیوانات) بلافاصله پس از برداشت در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و زمان میان برداشت بافت تا انجماد به حداقل رسید تا تخریب cAMP به حداقل برسد. مقدار مشخصی از بافت در محلول اسید کلریدریک ۰/۱ مولار سرد توصیه‌شده در کیت، روی یخ و در کوتاه‌ترین زمان ممکن همگن شد؛ محیط اسیدی سرد، علاوه بر مهار فعالیت فسفودی‌استراز، با رسوب پروتئین‌ها موجب استخراج cAMP در فاز مایع می‌شود. سپس هموژنات در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و cAMP موجود در سوپرناتانت با کیت الایزا رقابتی اختصاصی cAMP (Elabscience، چین؛ Cat. No. E-EL-0056) حساسیت ۰/۹۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده تشخیص ۱/۵۶ تا ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، در دو تکرار اندازه‌گیری شد و تمامی مقادیر در محدوده خطی منحنی استاندارد قرار گرفتند. جذب نوری در طول موج تعیین‌شده توسط کیت قرائت و غلظت cAMP با برازش منحنی استاندارد محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری پروتئین کل، از

¹ Real-time quantitative polymerase chain reaction

² Ribonucleic acid

³ Complementary deoxy nucleic acid

قطعه جداگانه همان نمونه که در بافر لیز سرد و فاقد اسید همگن شده بود، استفاده و غلظت پروتئین با روش BCA تعیین شد. مقدار نهایی cAMP با لحاظ ضریب رقت و حجم عصاره، بر مقدار پروتئین کل همان نمونه تقسیم و به صورت پیکومول در میلی گرم از پروتئین کل (pmol/mg) گزارش شد.

تحلیل آماری: داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ تحلیل شدند. قبل از تجزیه و تحلیل آماری، همه متغیرها از نظر توزیع طبیعی با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک^۱ و از نظر همگنی واریانس‌ها با آزمون لون^۲ بررسی شدند. جهت تجزیه و تحلیل استنباطی داده‌ها از آزمون‌های t-مستقل و تحلیل واریانس دوعاملی در سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$ استفاده شد.

یافته‌ها

یافته‌های توصیفی متغیرهای مورد مطالعه در پس‌آزمون نمونه‌های پژوهش حاضر در جدول سه نشان داده شده است.

جدول ۳. توصیف شاخص‌های اندازه‌گیری شده پس از هشت هفته مداخله با رعایت HFD در نمونه‌های دیابتی به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد

گروه‌ها	کنترل سالم	کنترل دیابتی	دیابتی + تمرین	دیابتی + مکمل	دیابتی + تمرین + مکمل
MTNR1B (2 ^{ΔΔCT})	۰/۹۹۷ $\pm$ ۰/۱۵۸	۲/۸۵۷ $\pm$ ۰/۲۹۱	۲/۵۳۶ $\pm$ ۰/۲۶۲	۲/۱۰۷ $\pm$ ۰/۲۵۳	۱/۸۲۲ $\pm$ ۰/۲۴۴
cAMP (pmol/mg total protein)	۱۴/۸۶ $\pm$ ۱/۳۲	۷/۱۶ $\pm$ ۰/۹۷	۸/۹۹ $\pm$ ۱/۰۸	۸/۶۸ $\pm$ ۰/۹۷	۱۰/۴۴ $\pm$ ۱/۱۴
گلوکز (mg/dL)	۹۵/۵۴ $\pm$ ۷/۳۹	۳۲۸/۰۵ $\pm$ ۱۶/۹۰	۲۹۵/۲۴ $\pm$ ۱۵/۲۹	۲۹۷/۵۱ $\pm$ ۱۵/۸۱	۲۶۴/۹۰ $\pm$ ۱۳/۰۶۷
انسولین (mIU/L)	۱۱/۳۵ $\pm$ ۱/۴۲	۳۰/۱۴ $\pm$ ۲/۴۱	۲۶/۰۱ $\pm$ ۲/۲۲	۲۷/۸۰ $\pm$ ۲/۲۰	۲۳/۷۸ $\pm$ ۲/۰۵
HOMA-IR	۲/۷۰ $\pm$ ۰/۳۶	۲۴/۴۷ $\pm$ ۲/۸۸	۱۸/۹۶ $\pm$ ۱/۸۷	۲۰/۴۴ $\pm$ ۲/۰۸	۱۵/۵۱ $\pm$ ۱/۰۷
وزن (g)	۳۹۹/۲ $\pm$ ۱۴/۰	۴۸۶/۳ $\pm$ ۱۴/۲	۴۳۹/۶ $\pm$ ۱۳/۴	۴۷۱/۵ $\pm$ ۱۴/۴	۳۹۵/۲ $\pm$ ۱۳/۳

MTNR1B: گیرنده ملاتونین نوع B۱؛ cAMP: آدنوزین مونو-فسفات حل‌قوی؛ HOMA-IR: مدل هومئوستازی ارزیابی مقاومت به انسولین.

پیش فرض این مطالعه، بررسی تاثیر ابتلا به دیابت نوع ۲ بر سطوح MTNR1B، cAMP، وزن، گلوکز، انسولین و HOMA-IR در موش‌های مدل رژیم پرچرب+STZ بود. از آنجا که این نوع هدف در پژوهش‌های پیشین به انجام رسیده است، تنها مطلوب این پیش فرض، اطمینان از مدل‌سازی دیابت و تاثیر آن بر شاخص‌های مورد مطالعه ما در نمونه‌های مدل می‌باشد. جهت بررسی

¹ Shapiro-wilk

² Levene

این پیش فرض و تعیین تفاوت بین دو گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی از روش آماری t-مستقل استفاده شد که نتایج آن در جدول چهار ارائه شده است:

جدول ۴. نتایج آزمون t-مستقل جهت تعیین تفاوت بین دو گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی

متغیر	Sig.	df	t
MTNR1B ($2^{\Delta\Delta CT}$)	$\leq 0.001^*$	۱۲	-۱۴/۸۰
cAMP (pmol/mg total protein)	$\leq 0.001^*$	۱۲	۱۲/۴۳
گلوکز (mg/dL)	$\leq 0.001^*$	۱۲	-۳۳/۲۲
انسولین (mIU/L)	$\leq 0.001^*$	۱۲	-۱۷/۷۱
HOMA-IR	$\leq 0.001^*$	۱۲	-۱۹/۸۴
وزن (g)	$\leq 0.001^*$	۱۲	-۱۱/۵۶

* نشانه اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم ($p \leq 0.05$): MTNR1B؛ گیرنده ملاتونین نوع B1؛ cAMP: آدنوزین مونو-فسفات حلقوی؛ HOMA-IR: مدل هومئوستازی ارزیابی مقاومت به انسولین.

نتایج آزمون t-مستقل در بررسی تفاوت‌های بین گروهی نشان داد که سطوح MTNR1B، cAMP، وزن، گلوکز، انسولین و HOMA-IR در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معناداری تغییر کرده است ($p \leq 0.001$)؛ به طوری که چاقی منجر به افزایش معنی دار سطوح MTNR1B، وزن، گلوکز، انسولین و HOMA-IR و هم‌چنین کاهش معنی دار cAMP شد.

نتایج روش آماری تحلیل واریانس دوعاملی در سطح معنی داری $p \leq 0.05$ برای تعیین اثربخشی مستقل تمرین مقاومتی، مکمل نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه و هم‌چنین اثر تعاملی هر دو بر متغیرهای مورد مطالعه در جدول پنج قابل مشاهده است:

جدول ۵. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوعاملی در بررسی اثربخشی مداخلات پژوهشی بر نشانگرهای تحقیق

متغیرها	منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	F	p	اندازه اثر (η^2)
MTNR1B	تمرین	۰/۶۴	۱	۹/۲۶	0.006^*	۰/۲۸
	مکمل	۳/۷۵	۱	۵۴/۱۵	$< 0.001^{**}$	۰/۶۹
	تمرین×مکمل	۰/۰۲	۱	۰/۰۳	۰/۸۵۷	۰/۰۰۱
cAMP	تمرین	۲۲/۵۳	۱	۲۰/۶۵	$< 0.001^*$	۰/۴۶
	مکمل	۱۵/۵۴	۱	۱۴/۲۳	0.001^{**}	۰/۳۷
	تمرین×مکمل	۰/۰۱	۱	۰/۰۱	۰/۹۳۴	۰/۰۰۱

۰/۵۶	<۰/۰۰۱*	۳۰/۹۲	۱	۷۴۹۱/۵۷	تمرین	گلوکز
۰/۵۳	<۰/۰۰۱**	۲۶/۷۷	۱	۶۴۸۷/۳۷	مکمل	
۰/۰۰۱	۰/۹۸۷	۰/۰۰۱	۱	۰/۰۷	تمرین+مکمل	
۰/۴۹	<۰/۰۰۱*	۲۳/۴۱	۱	۱۱۶/۲۰	تمرین	انسولین
۰/۲۳	۰/۰۱۲**	۷/۳۵	۱	۳۶/۴۸	مکمل	
۰/۰۰۱	۰/۹۵۲	۰/۰۱	۱	۰/۰۲	تمرین+مکمل	
۰/۶۵	<۰/۰۰۱*	۴۴/۲۰	۱	۱۹۰/۳۰	تمرین	HOMA-IR
۰/۴۸	<۰/۰۰۱**	۲۲/۶۵	۱	۹۷/۹۱	مکمل	
۰/۰۱	۰/۷۱۳	۰/۱۴	۱	۰/۵۹	تمرین+مکمل	
۰/۸۵	<۰/۰۰۱*	۱۳۸/۰۵	۱	۲۶۴۲۶/۵۸	تمرین	وزن
۰/۵۷	<۰/۰۰۱**	۳۲/۱۳	۱	۶۱۵۰/۸۹	مکمل	
۰/۲۵	۰/۰۰۹***	۷/۹۸	۱	۱۵۲۷/۳۶	تمرین+مکمل	

* نشانه اثر معنی‌دار تمرین مقاومتی بر شاخص‌های تحقیق؛ ** نشانه اثر معنی‌دار مکمل نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه بر شاخص‌های تحقیق؛ *** نشانه اثر تعاملی معنی‌دار تمرین مقاومتی و مکمل نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه بر شاخص‌های تحقیق؛ سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$. MTNR1B: گیرنده ملاتونین نوع B؛ cAMP: آدنوزین مونیو-فسفات حلقوی؛ HOMA-IR: مدل هومئوستازی ارزیابی مقاومت به انسولین.

با عنایت به جدول پنج، به‌طور کلی نتایج آزمون تحلیل واریانس دوعاملی نشان می‌دهد که یک دوره تمرین مقاومتی در تعامل با مکمل نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه فقط باعث کاهش معنی‌دار وزن بدن ($p=0.009$ ، اندازه اثر، $F=7.98$) در موش‌های دیابتی می‌شود. در حالی که مداخله همزمان تمرین و مکمل تاثیر تعاملی معنی‌داری بر سطوح MTNR1B ($p=0.001$ ، اندازه اثر، $F=0.03$)، cAMP ($p=0.934$ ، اندازه اثر، $F=0.01$)، گلوکز ($p=0.987$ ، اندازه اثر، $F=0.01$)، انسولین ($p=0.952$ ، اندازه اثر، $F=0.01$) و HOMA-IR ($p=0.713$ ، اندازه اثر، $F=0.14$) ندارد.

با بررسی اندازه‌های اثر، به نظر می‌رسد که اثر جداگانه تمرین مقاومتی در قیاس با اثر جداگانه مکمل نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه در کاهش معنی‌دار انسولین ($p=0.49$ ، اندازه اثر برای تمرین و $p=0.23$ ، اندازه اثر برای مکمل)، HOMA-IR ($p=0.65$)، اثر برای تمرین و $p=0.48$ ، اندازه اثر برای مکمل) و وزن ($p=0.85$ ، اندازه اثر برای تمرین و $p=0.57$ ، اندازه اثر برای مکمل) به مراتب بیشتر باشد؛ از طرفی اثر مکمل تنها نسبت به تمرین تنها در کاهش معنی‌دار MTNR1B به‌طور قابل‌توجهی بیشتر بود ($p=0.28$ ، اندازه اثر برای تمرین و $p=0.69$ ، اندازه اثر برای مکمل).



با توجه به معنادار شدن اثر تعاملی دو مداخله بر وزن بدن، نتایج تکمیلی آزمون تحلیل واریانس دو عاملی در این خصوص نشان داد که اثر ساده تمرین بر وزن ($p < 0/001$)، اندازه اثر، $0/82 = \Delta$ (اختلاف میانگین‌ها) در سطح دریافت مکمل معنی‌دار است؛ در واقع، تمرین در صورت دریافت مکمل، منجر به کاهش معنی‌دار وزن می‌شود؛ هم‌چنین، اثر ساده تمرین بر وزن ($p < 0/001$)، $0/62 = \Delta$ (اختلاف اثر، $46/67 = \Delta$ (اختلاف میانگین‌ها) در سطح بدون مکمل نیز معنی‌دار است. در واقع، تمرین در حالت بدون مکمل هم منجر به کاهش معنی‌دار وزن می‌شود.

به علاوه، نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عاملی در مورد اثر تعاملی تمرین و مکمل بر تغییرات وزن نشان داد که اثر ساده مکمل بر وزن ($p < 0/001$)، $0/60 = \Delta$ (اختلاف اثر، $44/41 = \Delta$ (اختلاف میانگین‌ها) در سطح تمرین‌کرده معنی‌دار است؛ در واقع، مکمل در حالت تمرین‌کرده منجر به کاهش معنی‌دار وزن می‌شود؛ در حالی که اثر ساده مکمل بر وزن ($p = 0/056$)، $0/14 = \Delta$ (اختلاف اثر، $14/87 = \Delta$ (اختلاف میانگین‌ها) در سطح بدون تمرین معنی‌دار نبود؛ به عبارت دیگر، مکمل در حالت بدون تمرین، تغییر آماری معنی‌داری بر وزن ایجاد نمی‌کند.

بحث

دیابت نوع ۲ با اختلال پیش‌رونده سلول‌های بتای پانکراس، مقاومت انسولینی و به‌هم‌ریختگی مسیرهای پیام‌رسانی درون‌جزیره‌ای از جمله محور MTNR1B-cAMP همراه است (۱،۳). بر مبنای شواهد علمی موجود، تمرین مقاومتی و مکمل‌یاری با عصاره دانه انگور سیاه هر یک به‌تنهایی شواهدی از بهبود کنترل متابولیک و حمایت از سلول‌های بتا ارائه کرده‌اند (۶-۱۱)؛ با این حال، اثر تعاملی این دو مداخله به‌ویژه با فرم نانولیپوزومال روکش‌شده با کیتوزان بر بیان MTNR1B، cAMP بافتی پانکراس و شاخص‌های مقاومت انسولینی در مدل رژیم پرچرب-استریتوزوتوسین به‌روشنی مشخص نبود. پژوهش حاضر با هدف پرکردن این خلأ و ارزیابی نوآوری اثر همزمان تمرین مقاومتی و نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه طراحی شد.

یافته‌های پژوهش نشان داد القای دیابت بیان MTNR1B، گلوکز ناشتا، انسولین، HOMA-IR و وزن را افزایش و cAMP پانکراس را کاهش داد؛ در مقابل، تمرین مقاومتی به‌طور مستقل این الگوی نامطلوب را معکوس کرد. این نتیجه با شواهدی همسو است که تمرین مقاومتی را مداخله‌ای مؤثر بر عملکرد جزیره‌ای و حساسیت انسولینی معرفی می‌کنند. کارکه‌بادی و دیگران (۲۰۲۶) نشان دادند تمرین مقاومتی، به‌تنهایی یا همراه با تمرین تناوبی، بیان گیرنده‌های ملاتونین (MTNR1A و MTNR1B) را در پانکراس موش‌های دیابتی تعدیل می‌کند (۶). غفرانی و دیگران (۲۰۲۳) نیز گزارش کردند تمرین مقاومتی بیان GLUT2 پانکراس و سطح انسولین را در مدل دیابت نوع ۲ بهبود می‌بخشد (۸). در همین راستا، برونزک^۱ و دیگران (۲۰۲۲) نشان دادند سرم حیوانات تمرین‌کرده، حساسیت به گلوکز و بقای سلول‌های بتا را از طریق افزایش GLUT2 و گلوکوکیناز تقویت می‌کند (۱۸). هم‌چنین هال و جانسون^۲ (۲۰۲۳) تمرین را تعدیل‌گر مهم عملکرد سلول بتا و خطر دیابت نوع ۲ دانستند (۷) و لیو^۳ و دیگران (۲۰۱۹) کاهش مقاومت انسولینی متعاقب ورزش را از مسیرهای مولکولی مرتبط با رزیستین گزارش کردند

¹ Bronczek

² Hall & Johnson

³ Liu



(۱۹). هم‌راستایی جهت تغییرات گلوکز، انسولین و HOMA-IR در مطالعه ما با این پیشینه‌ها نشان می‌دهد پروتکل تمرینی به‌کاررفته بر شاخص‌های متابولیک مورد مطالعه اثر داشته است؛ هرچند این هم‌راستایی ممکن است به‌معنای اشتراک مکانیسم در سطح سلول بتای پانکراس نباشد.

از دیدگاه مکانیسمی، شواهد فعلی نشان داده‌اند که گیرنده MTNR1B به پروتئین G مهاری^۱ (Gi) متصل است و فعال‌شدن آن می‌تواند آدنیلات‌سیکلاز را مهار و تولید cAMP را از مسیر آدنیلات‌سیکلاز/cAMP/PKA کاهش دهد (۳،۲۰). بر این اساس، کاهش بیان mRNA گیرنده همراه با افزایش cAMP بافت پانکراس در گروه‌های مداخله، با فرضیه کاهش تون مهاری این مسیر سازگار است؛ اما باید تصریح شود که در این مطالعه نه فعالیت گیرنده در سطح پروتئین، نه فعالیت آدنیلات‌سیکلاز یا PKA اندازه‌گیری نشده و cAMP نیز در بافت کامل پانکراس سنجیده شده است؛ بنابراین این هم‌خوانی، صرفاً سازگاری داده‌ها با یک فرضیه است و اثبات مکانیسم محسوب نمی‌شود. همچنین تمرین مقاومتی از مسیرهای متعدد به این سازگاری کمک می‌کند: افزایش توده و کیفیت عضلانی و تقویت برداشت محیطی گلوکز، تقاضای جبرانی انسولین را کم می‌کند و فشار ترشحی بر سلول‌های بتا را کاهش می‌دهد (۷،۱۸). افزون بر این، ورزش از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، التهاب درجه‌پایین و استرس شبکه آندوپلاسمی، محیط هورون‌جیره‌ای مطلوب‌تری برای بقا و عملکرد سلول بتا فراهم می‌آورد (۲). شواهد نشان می‌دهد عوامل هومورال ناشی از عضله تمرین‌کرده می‌توانند بیان پروتئین‌های حسگر گلوکز و مسیرهای ضدآپوپتوزی را در سلول بتا بالا ببرند (۱۸). در سطح سیستمیک نیز بهبود سیگنال‌دهی انسولین و کاهش میانجی‌های مقاومت انسولینی به افت نسبی HOMA-IR و گلوکز ناشتا می‌انجامد (۱۹،۲۰).

مکمل نانولیپوزومال عصاره دانه انگور سیاه نیز به‌تنهایی توانست بیان MTNR1B، گلوکز، انسولین، HOMA-IR و وزن را بهبود بخشد و cAMP بافتی را افزایش دهد. این یافته با شواهد رو به رشد درباره اثر محافظتی پروآنتوسیانیدین‌های دانه انگور بر سلول بتا و مقاومت انسولینی همسو است. لی^۲ و دیگران (۲۰۲۴) نشان دادند پروآنتوسیانیدین دانه انگور از مسیر Nrf2 سلول‌های بتا را در برابر فروپتوز ناشی از دیابت نوع ۲ محافظت می‌کند (۱۰). دینگ و دیگران نیز پیش‌تر گزارش کرده بودند عصاره پروآنتوسیانیدینی دانه انگور اختلال عملکرد و مرگ سلول بتا را در مدل رژیم پرکربوهیدرات/پرچرب همراه با استرپتوزوتوسین، تا حدی از طریق تنظیم استرس شبکه آندوپلاسمی، بهبود می‌بخشد (۱۷). در مطالعه‌ای مرتبط، شیرانی‌بیدآبادی و دیگران (۲۰۲۱) نشان دادند مصرف عصاره دانه انگور سیاه همراه با فعالیت ورزشی بیان miRNAهای دخیل در مسیرهای متابولیک را در موش‌های دیابتی تعدیل می‌کند (۱۲). افزون بر این، بررسی‌های مرتبط با آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها حاکی از بهبود حساسیت انسولینی از مسیرهای پروتئین کیناز فعال‌شده با AMP^۳ (AMPK)، فسفو اینوزیتید-۳ کیناز^۴ Akt/(PI3K) و کاهش استرس اکسیداتیو است (۲۱). اثر نسبتاً قوی‌تر مکمل بر کاهش بیان MTNR1B در مطالعه حاضر، دست‌کم از نظر جهت اثر، با این پیشینه سازگار است؛ با این حال باید توجه داشت که مطالعات مذکور عمدتاً فرم‌های ساده و غیرنانوفرموله عصاره را بررسی کرده‌اند و انتظار از برتری فرم نانولیپوزومال روکش‌شده با کیتوزان، بر اساس شواهد ادبیات موجود درباره پایداری و فراهمی‌زیستی بهبودیافته این فرمولاسیون بنا شده است (۱۱،۱۶،۲۲،۲۳) و فراهمی‌زیستی این نوع مکمل در پژوهش حاضر مستقیماً اندازه‌گیری نشده که از محدودیت‌های این پژوهش به‌شمار می‌رود.

¹ G protein inhibitory

² Li

³ AMP-activated protein kinase

⁴ Phosphoinositide 3-kinase



مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش



مکانیزم اثر عصاره دانه انگور سیاه چندلایه است. مبانی تئوری پیشینه‌های موجود نشان داده‌اند که پروآنتوسیانیدین‌ها با فعال‌سازی Nrf2 و تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی، می‌توانند بار گونه‌های فعال اکسیژن را در سلول‌ها کم کنند و احتمالاً از فروپتوز و آسیب غشایی جلوگیری می‌نمایند (۹). کاهش استرس اکسیداتیو و استرس شبکه آندوپلاسمی به حفظ ماشین ترشحی انسولین و احتمالاً بازتنظیم بیان گیرنده‌هایی مانند MTNR1B کمک می‌کند (۱۷)؛ هر چند که این نوع گیرنده در تحقیق حاضر اندازه‌گیری نشد و نمی‌توان آن را به‌عنوان مکانیزم اثر قطعی تلقی نمود. از سوی دیگر، پلی‌فنول‌های دانه انگور می‌توانند مسیرهای AMPK و سیگنال‌دهی انسولین را فعال کنند و برداشت محیطی گلوکز را بهبود بخشند؛ پیامدی که به کاهش گلوکز ناشتا، افت نیاز جبرانی به انسولین و نهایتاً کاهش HOMA-IR می‌انجامد (۲۲). نوآوری کلیدی پژوهش حاضر، استفاده از نانولیپوزوم با روکش کیتوزان است. کپسوله‌سازی نانولیپوزومی پایداری و رهایش کنترل‌شده پلی‌فنول‌ها را افزایش می‌دهد و فراهمی‌زیستی آن‌ها را نسبت به فرم آزاد بهبود می‌بخشد (۱۶، ۱۲). روکش کیتوزان نیز با ایجاد بار سطحی مثبت، پایداری وزیکول و تعامل با مخاط روده را تقویت می‌کند و می‌تواند جذب سلولی ترکیبات فعال را ارتقا دهد (۲۴، ۲۳). در نتیجه، غلظت مؤثرتر پروآنتوسیانیدین در سطح جزیره شاید بتواند سیگنال‌های استرس‌محور را که بیان بیش‌ازحد MTNR1B را القا می‌کنند تضعیف کند و احتمالاً با کاهش مهار Gi-وابسته بر آدنیلات‌سیکلاز، سطح cAMP را بالا ببرد. البته باید خاطرنشان کرد که این مسیرها در مطالعه حاضر مستقیماً ارزیابی نشده‌اند و صرفاً به‌عنوان ورودی‌های احتمالی برای تغییرات مشاهده‌شده مطرح می‌شوند. این ویژگی‌ها ممکن است توضیح‌دهنده اندازه اثر بزرگ‌تر مکمل در کاهش MTNR1B نسبت به تمرین باشد؛ چرا که بر مبنای ادبیات علمی در دسترس، اثر پروآنتوسیانیدین‌ها بیشتر درون‌جزیره‌ای و ردوکس-محور است (۱۲، ۱۰)، در حالی که اثر تمرین بیشتر از مسیر سازگاری‌های محیطی و عضلانی-متابولیک اعمال می‌شود (۲۰، ۱۸، ۷).

مقایسه اندازه اثر دو مداخله، نیم‌رخ متفاوت و مکمل‌گونه آن‌ها را آشکار کرد. اندازه اثر مکمل در کاهش MTNR1B به‌مراتب بزرگ‌تر از تمرین بود (۰/۶۹ در برابر ۰/۲۸)، حال آن‌که تمرین در کاهش انسولین (۰/۴۹ در برابر ۰/۲۳)، HOMA-IR (۰/۶۵ در برابر ۰/۴۸) و وزن (۰/۸۵ در برابر ۰/۵۷) برتری داشت. این الگو را می‌توان چنین خواند که دو مداخله احتمالاً از ورودی‌های متفاوتی عمل می‌کنند؛ اما از آنجا که این ورودی‌ها در مطالعه مستقیماً سنجیده نشده‌اند، این تفکیک در حد یک چارچوب تفسیری باقی می‌ماند. این الگوی فرضی از نظر فیزیولوژیک قابل تفسیر است: تمرین مقاومتی با افزایش هزینه انرژی، بهبود توده و کیفیت عضلانی، و تقویت سیگنال‌دهی انسولین در بافت‌های محیطی، عمدتاً بر فنوتیپ مقاومت انسولینی و ترکیب بدنی اثر می‌گذارد (۲۰، ۱۸، ۷). در مقابل، نانولیپوزوم عصاره دانه انگور با افزایش غلظت مؤثر پروآنتوسیانیدین در سطح سلولی، مسیرهای ردوکس و رونویسی مرتبط با گیرنده ملاتونین را قوی‌تر هدف قرار می‌دهد (۱۲، ۱۰). به بیان دیگر، تمرین «بار متابولیک سیستمیک» را کم می‌کند و مکمل «محیط مولکولی درون‌جزیره‌ای» را اصلاح می‌نماید؛ موضوعی که با شواهد پیشین نیز هم‌راستا می‌باشد. افزایش cAMP در هر دو مداخله نشان می‌دهد که احتمالاً در یک نقطه پایانی مشترک، رفع مهار مسیر cAMP از دو ورودی متفاوت حاصل شده است: یکی از مسیر کاهش نسبی سیگنال MTNR1B و دیگری از مسیر بهبود کلی هموستاز انرژی و کاهش استرس سلولی؛ اگرچه این فقط یک تفسیر احتمالی مکانیزمی است. از منظر کاربردی در پژوهش‌های تجربی، چنین تفکیکی از تفسیر یکنواخت «برتری مطلق یک مداخله» جلوگیری می‌کند و نشان می‌دهد دو راهبرد می‌توانند نقش‌های مکمل، اما نه لزوماً هم‌افزا، ایفا کنند.



اثر تعاملی دو مداخله تنها در کاهش وزن از نظر آماری معنادار بود و برای MTNR1B، cAMP، گلوکز، انسولین و HOMA-IR تعامل معناداری مشاهده نشد. نبود تعامل معنادار بر نشانگرهای مولکولی و متابولیک اصلی، به معنای بی‌اثر بودن ترکیب نیست؛ بلکه نشان می‌دهد پاسخی فراتر از جمع اثرهای مستقل به‌دست نیامده و احتمالاً هر دو مداخله بخش بزرگی از ظرفیت قابل‌بهبود همان مسیرها را به‌تنهایی اشغال کرده‌اند. در این زمینه، باداوی^۱ و دیگران (۲۰۱۳) نشان دادند تجویز همزمان تمرین و عصاره دانه انگور بر نمایه لیپیدی، وزن و برخی شاخص‌های قلبی-عروقی موش‌های دیابتی اثر بهبود دهنده دارد و در برخی پیامدها بر هر مداخله به‌تنهایی برتری نسبی نشان می‌دهد (۲۵). شیرانی‌بیدآبادی و دیگران (۲۰۲۱) نیز همراهی فعالیت ورزشی و عصاره دانه انگور سیاه را بر بیان miRNAهای متابولیک مؤثر گزارش کردند (۱۲). رحیمی و دیگران (۲۰۲۵) در زنان پائمه مبتلا به دیابت نوع ۲ دریافتند عصاره دانه انگور در کاهش استرس اکسیداتیو حتی از تمرین ترکیبی مؤثرتر است و همراهی دو مداخله لزوماً هم‌افزایی خطی ایجاد نمی‌کند (۲۶).

از نظر مکانیزمی، هم تمرین مقاومتی و هم پروآنتوسیانیدین‌ها در نهایت به کاهش گونه‌های فعال اکسیژن، بهبود سیگنال انسولین، کاهش التهاب و حمایت از مسیر cAMP/PKA می‌انجامند (۲۰، ۲۷، ۲۸). وقتی ظرفیت قابل‌بهبود یک مسیر مشترک نزدیک به اشباع باشد، افزودن مداخله دوم ممکن است اثر افزایشی معنادار ایجاد نکند، هرچند هر مداخله به‌تنهایی مؤثر است؛ پدیده‌ای که در ادبیات روش‌شناسی به‌عنوان اثر سقفی شناخته می‌شود. اگرچه یک تبیین ممکن، اشباع نسبی مسیرهای مشترک یا اثر سقفی است، اما داده‌های مطالعه حاضر برای پشتیبانی مستقیم از این تبیین کافی نیست و بدیل‌هایی مانند تفاوت مقیاس زمانی پاسخ دو مداخله، سطح اندازه‌گیری (mRNA در برابر پروتئین یا فعالیت) و دوز انتخاب‌شده نیز قابل‌طرح‌اند؛ بنابراین اثر سقفی در اینجا صرفاً فرضیه‌ای برای آزمون در مطالعات آتی است. در مقابل، معنادار بودن تعامل در وزن بدن نشان می‌دهد که در سطح فنوتیپ ترکیب بدنی، هم‌افزایی واقعی بین دو مداخله وجود داشته است (۲۵، ۲۲)؛ پژوهش‌های حاضر گزارش کرده‌اند که تمرین ورزشی با افزایش مصرف انرژی و حفظ یا افزایش توده بدون چربی و مکمل با بهبود اکسیداسیون سوپسترا و سیگنال‌های ضدچاقی پلی‌فنولی، اثر همگرا بر تعادل انرژی اعمال می‌کنند (۲۲، ۲۵).

نکته حائز اهمیت، محدودیت شواهد مکانیزمی این مطالعه است. در پژوهش حاضر تنها بیان mRNA گیرنده MTNR1B و سطح cAMP بافت کامل پانکراس اندازه‌گیری شد؛ پروتئین گیرنده، فعالیت آدنیلات‌سیکلاز یا PKA، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و فروپتوز، و سنجش‌های مستقیم توده یا آپوپتوز سلول بتا ارزیابی نشدند. همچنین عملکرد سلول بتا به‌صورت مستقیم (مانند ترشح انسولین وابسته به گلوکز، C-peptide یا بافت‌شناسی جزایر) سنجیده نشد و سطح انسولین سرم به‌تنهایی، به دلیل تأثیرپذیری از عواملی مانند برداشت محیطی و کلیانس، نمی‌تواند اثبات‌کننده بهبود عملکرد سلول بتا باشد. از دیگر محدودیت‌های این پژوهش، تعداد نمونه نسبتاً محدود در هر گروه بود که شاید توان آماری برای کشف تعامل‌های کوچک‌تر را کاهش دهد؛ ترکیب دقیق لیپیدی نانولیپوزوم پس از عبور گوارشی و شاخص‌های مستقیم توده و آپوپتوز سلول بتا نیز بررسی نشدند. مدل HFD-STZ نیز با وجود شباهت به دیابت نوع ۲ انسانی، تمام پیچیدگی‌های بیماری انسان را بازتاب نمی‌دهد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، یافته‌های پژوهش حاضر از کارآمدی احتمالی مستقل تمرین مقاومتی و نانولیپوزوم عصاره دانه انگور سیاه با روکش کیتوزان در تنظیم بیان ژن MTNR1B و میزان cAMP پانکراس و بهبود نسبی شاخص‌های مقاومت انسولینی در مدل تجربی دیابت نوع ۲ حمایت می‌کند. نیم‌رخ اندازه اثر دو مداخله نشان می‌دهد مکمل در اصلاح بیان ژن MTNR1B و

¹ Badavi



تمرین در بهبود انسولین، HOMA-IR و وزن ممکن است قوی‌تر عمل کنند؛ در حالی که اثر تعاملی آن‌ها عمدتاً در سطح کاهش وزن متجلی می‌شود. بر این اساس، به‌کارگیری مستقل این دو راهبرد کم‌عارضه به‌عنوان گزینه‌های مکمل و نه لزوماً وابسته به هم‌افزایی در طراحی مداخلات پیش‌بالینی و تجربی دیابت نوع ۲ منطقی به‌نظر می‌رسد. با توجه به محدودیت‌های مطالعه، پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های آتی سطح پروتئین MTNR1B، فعالیت آدنیلات سیکلاز و شاخص‌های بافت‌شناسی جزایر را هم‌زمان با اندازه‌گیری‌های رونویسی بررسی کنند. همچنین مقایسه دوز-پاسخ فرم نانولیپوزومال با فرم آزاد عصاره، در کنار پروتکل‌های تمرینی با حجم و شدت متفاوت، می‌تواند مرزهای هم‌افزایی و اثر مستقل دو مداخله را دقیق‌تر روشن سازد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منفعتی در رابطه با انتشار این مطالعه وجود ندارد.

قدردانی و تشکر

این مقاله بر اساس پایان‌نامه دکتری تخصصی که در دانشگاه آزاد اسلامی ثبت شده است، می‌باشد. هزینه‌های مطالعه بر عهده محقق بوده و نویسنده همچنین از آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه آزاد واحد کرج بخاطر همکاری صمیمانه تشکر می‌کند.

منابع

1. Khin PP, Lee JH, Jun HS. Pancreatic beta-cell dysfunction in type 2 diabetes. Eur J Inflamm. 2023;21:1721727X231154152. <https://doi.org/10.1177/1721727X231154152>
2. Chen Q, Zhao X, Xu Z, Liu Y. Endoplasmic reticulum stress mechanisms and exercise intervention in type 2 diabetes mellitus. Biomed Pharmacother. 2024;177:117122. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117122>
3. Zhu H, Zhao ZJ, Liu HY, Cai J, Lu QK, et al. The melatonin receptor 1B gene links circadian rhythms and type 2 diabetes mellitus: an evolutionary story. Ann Med. 2023;55(1):2202326. <https://doi.org/10.1080/07853890.2023.2191218>
4. Vejrazkova D, Vankova M, Vcelak J, Bendlova B, Dvorakova H, et al. The rs10830963 polymorphism of the MTNR1B gene: association with abnormal glucose, insulin and C-peptide kinetics. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:868364. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.868364>
5. Vella M, Mohan S, Christie H, Bailey KR, Cobelli C, et al. Diabetes-associated genetic variation in MTNR1B and its effect on islet function. J Endocr Soc. 2024;8(8):bvae130. <https://doi.org/10.1210/endo/bvae130>
6. Karkehabadi S, Matinhomae H, Dehghan Ghahfarokhi S. Effect of resistance and interval training on serum melatonin and expression of its receptors (MTNR1A and MTNR1B) in the pancreas tissue of diabetic rats. Iran J Diabetes Obes. 2026;18(2):88-97. <https://doi.org/10.18502/ijdo.v18i2.21646>
7. Hall LG, Johnson JD. Exercise and inactivity as modifiers of beta-cell function and type 2 diabetes risk. J Appl Physiol (1985). 2023;134(4):823-39. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00472.2022>

8. Ghofrani MH, Rahimi A, Alijani E, Feizolahi F. Effect of aerobic and resistance exercises on GLUT2 expression in pancreatic tissue and serum insulin of type II diabetic male rats. *Thrita*. 2023;12(2):e141725. <https://doi.org/10.5812/thrita-141725>
9. Soori R, Rashidi M, Choobineh S, Ravasi AA, Baesi K, et al. Effects of 12 weeks resistant training on MTNR1B gene expression in the pancreas and glucose and insulin levels in type 2 diabetic rats. *Koomesh*. 2017;19(1):e151108. <https://brieflands.com/journals/koomesh/articles/151108>
10. Li H, Zhang H, Wang T, Zhang L, Wang H, et al. Grape seed proanthocyanidins protect pancreatic beta cells against ferroptosis via the Nrf2 pathway in type 2 diabetes. *Biol Trace Elem Res*. 2024;202(9):4130-41. <https://doi.org/10.1007/s12011-024-04093-9>
11. Morales CF, Zamorano M, Brossard N, Rosenkranz A, Osorio FA. Depolymerization and nanoliposomal encapsulation of grape seed condensed tannins: physicochemical characterization, stability, in vitro release and bioaccessibility. *Antioxidants (Basel)*. 2025;14(9):1123. <https://doi.org/10.3390/antiox14091123>
12. Shirani Bidabadi M, Banaei Borojeni J, Keshavarz S, Karimi M. Effect of black grape seed (*Vitis vinifera*) extract consumption with moderate-intensity aerobic training on the expression of microRNAs in type 1 diabetic cardiac tissue rats. *Iran J Diabetes Obes*. 2021;13(4):233-40. <https://doi.org/10.18502/ijdo.v13i4.8003>
13. Brito AKS, Mendes AVS, Timah Acha B, Santos Oliveira ASS, Lopes Macedo J, et al. Experimental models of type 2 diabetes mellitus induced by combining hyperlipidemic diet and streptozotocin administration in rats: an integrative review. *Biomedicines*. 2025;13(5):1158. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13051158>
14. Ghasemi A, Jeddi S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: a practical guide. *EXCLI J*. 2023;22:274-94. <https://doi.org/10.17179/excli2022-5720>
15. Ghadiri N, Gorgin Karaji Z, Farsani ZH, Akbarzadeh H. The combined effects of resistance and endurance training with ursolic acid supplementation on some Alzheimer's disease-related biomarkers in a rat model of type 2 diabetes. *Bull Natl Res Cent*. 2024;48(1):85. <https://doi.org/10.1186/s42269-024-01240-z>
16. Montagner GE, Ribeiro MF, Cadoná FC, Franco C, Gomes P. Liposomes loading grape seed extract: a nanotechnological solution to reduce wine-making waste and obtain health-promoting products. *Future Foods*. 2022;5:100144. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100144>
17. Ding Y, Zhang Z, Dai X, Jiang Y, Bao L, et al. Grape seed proanthocyanidins ameliorate pancreatic beta-cell dysfunction and death in low-dose streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats partially by regulating endoplasmic reticulum stress. *Nutr Metab (Lond)*. 2013;10:51. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-51>
18. Bronczek GA, Soares GM, Marmentini C, Boschero AC, Costa-Júnior JM. Resistance training improves beta-cell glucose sensing and survival in diabetic models. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):9427. <https://doi.org/10.3390/ijms23169427>

19. Liu SX, Zheng F, Xie KL, Xie MR, Jiang LJ, et al. Exercise reduces insulin resistance in type 2 diabetes mellitus via mediating the lncRNA MALAT1/microRNA-382-3p/resistin axis. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;18:34-44. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.08.002>
20. Zhang T, Liu Y, Yang Y, Luo J, Hao C. The effect and mechanism of regular exercise on improving insulin resistance: based on the perspective of cellular and molecular levels. *Int J Mol Sci*. 2025;26(9):4199. <https://doi.org/10.3390/ijms26094199>
21. Tuomi T, Nagorny CLF, Singh P, Bennet H, Yu Q, et al. Increased melatonin signaling is a risk factor for type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2016;23(6):1067-77. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.009>
22. Ghorbani A, Rashidi R, Shafiee-Nick R. Flavonoids for preserving pancreatic beta-cell survival and function: a mechanistic review. *Biomed Pharmacother*. 2019;111:947-57. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.127>
23. Gibis M, Rahn N, Weiss J. Physical and oxidative stability of uncoated and chitosan-coated liposomes containing grape seed extract. *Pharmaceutics*. 2013;5(3):421-33. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5030421>
24. Gibis M, Ruedt C, Weiss J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Res Int*. 2016;88(Pt A):105-13. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.010>
25. Badavi M, Abedi HA, Dianat M, Sarkaki AR. Exercise training and grape seed extract co-administration improves lipid profile, weight loss, bradycardia, and hypotension of STZ-induced diabetic rats. *Int Cardiovasc Res J*. 2013;7(4):111-7. PMID: [24757634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24757634/).
26. Rahim Z, Shamlou Kazemi S, Hemati Afif A. The effect of combined exercises and grape seed extract on some factors of oxidative stress and antioxidant in postmenopausal women with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Iran J Diabetes Metab*. 2025;25(4). <https://doi.org/10.18502/ijdl.v25i4.20239>