

تأثیر هشت هفته مصرف عصاره کندل کوهی و تمرین هوازی روی بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم بافت استخوان در موش‌های مبتلا به کم‌کاری تیروئید

ملیحه بختی^۱، دکتر فرزانه تقیان^۱، دکتر خسرو جلالی دهکردی^۱، دکتر رضوان میرصفایی ریزی^۲

۱) گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران. ۲) گروه آسیب‌شناسی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران. نشانی مکاتبه با نویسنده‌ی مسئول: اصفهان، خیابان جی شرقی، ارغوانیه، بلوار دانشگاه، کدپستی ۸۱۵۵۱-۳۹۹۹۸، دکتر فرزانه تقیان؛
e-mail: ft.taghian@gmail.com

چکیده

مقدمه:

اختلالات متابولیک استخوان ناهنجاری‌های چند عاملی هستند و بنابراین علاوه بر عوامل ژنتیک؛ عوامل محیطی چندگانه‌ای نیز، هم‌چون تغذیه و فعالیت بدنی، در ایجاد آن‌ها نقش دارند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی و عصاره کندل کوهی یا **Dorema Aucheri (DA)**، بر بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم بافت استخوان در شرایط کم‌کاری تیروئید می‌باشد. مواد و روش‌ها: سی سر موش **C57BL/6** ماده (۶-۷ هفته) به پنج گروه تقسیم شدند: ۱. کم‌کاری تیروئید، ۲. کم‌کاری تیروئید همراه با مصرف عصاره **DA** (۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاوآژ و به مدت ۸ هفته)، ۳. کم‌کاری تیروئید همراه با تمرین هوازی، ۴. کم‌کاری تیروئید همراه با مصرف عصاره **DA** و تمرین هوازی، ۵. شاهد. کم‌کاری تیروئید توسط تزریق صفاقی روزانه ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن پروبیل تیوراسیل به مدت یک ماه ایجاد شد. با استفاده از پایگاه‌های داده و روش‌های بررسی بیوانفورماتیک، ژن‌های دخیل در اختلالات متابولیک استخوان که بیانشان از کم‌کاری تیروئید متاثر می‌شود، شناسایی شدند. تمرین هوازی با شدت متوسط تا زیاد (۴۵ دقیقه، شیب صفر، ۲۵ متر در دقیقه) اجرا گردید. بیان ژن با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (**qRT-PCR**) ارزیابی شد. یافته‌ها: بر اساس نتایج بررسی بیوانفورماتیک ژن‌های **MAPK3**، **SIRT1**، **PPAR-γ**، **PGC10SX**، **RUNX2** و **OPG** شناسایی و بررسی شدند. بیان ژن‌های **OPG** و **RUNX2** در گروه کم‌کاری تیروئید نسبت به گروه شاهد افزایش و بیان **OSX** کاهش یافت. بیان **PGC1α**، **SIRT1**، **MAPK3**، **PPAR-γ** در شرایط کم‌کاری تیروئید کاهش یافت ($p < 0/001$). **DA** و تمرین هوازی بطور قابل توجهی سطح بیان **MAPK3**، **SIRT1**، **PPAR-γ**، **PGC1α** را افزایش داد ($p < 0/001$). نتیجه‌گیری: **DA** و تمرین هوازی می‌تواند شبکه ژنتیکی متابولیسم استخوان را تعدیل کرده و باعث تنظیم مثبت آن شود.

واژگان کلیدی: کم‌کاری تیروئید، ناهنجاری متابولیک استخوان، عصاره کندل کوهی، تمرین هوازی، بیوانفورماتیک

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۲ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۲/۱/۲۲ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱/۲۸

مقدمه

تیروئید وجود دارد که ممکن است بر بقای استئوکلاست‌ها^۱ و تشکیل استئوبلاست‌ها^۲ تأثیر بگذارد. علاوه بر این، هورمون‌های تیروئید می‌توانند نقش مهمی در مصرف انرژی، متابولیسم، هموستاز استخوان و رشد ساختار

اختلالات مرتبط با متابولیسم استخوان یک مشکل بهداشتی مهم در سراسر جهان است که منجر به بی‌حرکتی و افزایش خطر شکستگی می‌شود. بر اساس شواهد همه‌گیری شناختی، ارتباطی بین اختلال متابولیک استخوان و کم‌کاری

مصرف داروهای شیمیایی تعریف کردند.^۹ تمرین ورزشی منظم در درازمدت می‌تواند به طور قابل توجهی بر عملکرد بدن، متابولیسم و فعالیت هورمون‌ها تأثیر بگذارد.^{۱۰،۱۱} مطالعات قبلی نشان داده‌اند که در طول تمرین ورزشی سطح هورمون‌های تیروئیدی افزایش یافته است.^{۱۲} تمرین ورزشی منظم در درازمدت می‌تواند به طور قابل توجهی بر عملکرد بدن، متابولیسم و فعالیت هورمون‌ها تأثیر بگذارد.^{۱۰،۱۱}

تغذیه به عنوان یکی از متغیرهای قابل اصلاح در تنظیم متابولیسم و پیشگیری و درمان بیماری‌ها شناخته شده است که می‌تواند رویکردهای درمانی مبتنی بر مواد مغذی و ترکیبات زیست فعال را برای بهبود شرایط فیزیولوژیک در دوره بیماری و درمان ارائه دهد.^{۱۳} کندل کوهی^{viii} (DA) گیاهی است از گونه چتریان که در اواخر بهار در استان‌های جنوبی ایران، به‌ویژه در رشته‌کوه‌های زاگرس شکوفا می‌شود.^{۱۴} DA با نام "بیلهر" نیز شناخته می‌شود. بر اساس یک مطالعه، عصاره اندام هوایی گیاه DA سرشار از فلاونوئیدها^{ix} و ترپنوئیدها^x است و از این رو این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد تومور، ضد افزایش کلسترول و چربی خون، ضد دیابت و ضد التهاب است.^{۱۵} فلاونوئیدها بخشی از گروه بزرگ‌تری از آنتی‌اکسیدان‌ها به نام پلی‌فنول‌ها^{xi} هستند و شواهدی از تأثیر آن‌ها بر پیشگیری یا درمان بیماری‌های مرتبط با التهاب و استرس اکسیداتیو در دست است.^{۱۶} سرطان، بیماری‌های قلبی و زوال عقل مرتبط با سن از جمله‌ی این بیماری‌ها می‌باشند.^{۱۶} از سوی دیگر، شواهد رو به رشد نشان می‌دهند که ترکیبات فیتوشیمیایی DA بر هورمون‌های تیروئید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد.^{۱۶} بر اساس ارتباط بیماری‌های تیروئیدی، به ویژه کم‌کاری تیروئید، با بیماری‌های متابولیک استخوان، اثر مثبت عصاره گیاهی DA بر متابولیسم استخوان در این مطالعه مفروض است. همچنین مطالعات زیادی به بررسی اثر توامان استفاده از ترکیبات زیست فعال گیاهی و تمرین هوازی در بهبود شرایط بیماری و عوارض جانبی ناشی از بیماری پرداخته‌اند و نتایج حاکی از اثر هم‌افزای این برنامه‌ها در بهبود شرایط بیماری دارند.^{۱۳،۱۷} هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی و مصرف مقدار مطمئن عصاره DA بر بهبود کم‌کاری تیروئید و اختلالات متابولیک استخوان

اسکلتی ایفا کنند. از سوی دیگر، هورمون‌های تیروئیدی شامل تری‌یدوتیرونینⁱ (T3) و تیروکسینⁱⁱ (T4)، تولید استئوکلاست و استئوبلاست را از طریق گیرنده هورمون تیروئید-آلفاⁱⁱⁱ تنظیم می‌کنند.^{۲،۳} کم‌کاری تیروئید باعث افزایش افزایش مدت زمان بازسازی استخوان و افزایش فعالیت استئوکلاست می‌شود که می‌تواند به طور قابل توجهی خطر شکستگی استخوان را افزایش دهد.^{۴،۵} مطالعات جمعیتی نشان داده‌اند که کم‌کاری تیروئید با کیفیت پایین بافت استخوان همراه است و ممکن است خطر شکستگی استخوان را افزایش دهد.^{۶،۷} از سوی دیگر، مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که کم‌کاری تیروئید می‌تواند تراکم استخوان را در تورتیغه‌های بافت استخوان^{iv} تحریک کند لیکن ساختار قشر استخوان بدون تغییر باقی می‌ماند^v و باعث می‌شود ساختار استخوان از حالت طبیعی خارج شود. در حالت طبیعی هورمون‌های تیروئیدی توسعه استئوبلاست و تشکیل ماتریکس استخوان را از طریق افزایش بیان استئوکالسین^v (OSX)، کلاژن^{vi}، و آلکالین فسفاتاز^{vii} (ALP)، تحریک می‌کنند.^۱

هورمون درمانی، درمان اولیه برای علائم پرکاری/کم‌کاری تیروئید می‌باشد. برای رسیدن به مقدار داروی مورد نیاز برای درمان کم‌کاری تیروئید، پیگیری‌های مکرر آزمایشگاهی لازم است. از طرفی اگر میزان دریافت هورمون از میزان مورد نیاز بیشتر شود می‌تواند علائم پرکاری تیروئید را ایجاد کند و بنابراین تعیین مقدار مطمئن هورمون از فردی به فرد دیگر، و بر اساس شرایط فیزیولوژیک بیمار، متفاوت است.^۸ با این حال، به دلیل خطرات سلامتی مرتبط با هورمون درمانی، بسیاری ترجیح می‌دهند از طب مکمل همراه با طب تجاری/معارف استفاده کنند. رویکردهای مکمل همراه با داروهای تجاری/معارف می‌تواند در درمان پزشکی موثر باشد. رویکردهای درمانی جایگزین و مکمل (درمان‌های طبیعی)، می‌تواند در حوزه تصحیح سبک زندگی افراد، باعث افزایش کارآمدی درمان‌های مرسوم گردد. رویکردهای درمان طبیعی فعالیت بدنی منظم و تمرین ورزشی را به عنوان راهبردهای درمانی موثر در تعدیل شرایط بیماری و عوارض جانبی ناشی از

- i-Triiodothyronine
- ii-Thyroxine
- iii-Thyroid Hormone Receptor- α
- iv-Trabecular Bone Tissue
- v-Osteocalcin
- vi-Collagen
- vii-Alkaline Phosphatase

viii-Dorema Aucheri
ix-Flavonoid
x-Terpenoid
xi-polyphenol

پس از آخرین تمرین استقامتی و تجویز عصاره DA، دسترسی به غذا برای حیوانات به طور کامل قطع شد و تحت تزریق ترکیبی کتامینⁱⁱ (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازینⁱⁱⁱ (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش و سپس قربانی شدند. نمونه‌های بافت استخوان ران در شرایط سترون جدا و به میکروتیوب‌های عاری از RNase و DNase منتقل شد. نمونه‌ها با استفاده از غوطه‌ورسازی در نیتروژن مایع منجمد شدند. علاوه بر این، نمونه‌های خون در میکروتیوب جمع‌آوری و سرم با استفاده از سانتریفیوژ ۳۱۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه، جدا شد. نمونه‌های بافت استخوان و سرم برای نگه‌داری در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه ژنتیک منتقل شدند.

۱. زیست‌شناسی مولکولی محاسباتی

نزدیک‌ترین مجموعه داده ترانسکریپتوم^{iv} به مطالعات اختلالات متابولیک استخوانی در پایگاه داده جئو^v (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) مرور گردید تا لیستی از ژن‌های مهم با بیان متفاوت در وضعیت کم‌کاری تیروئید و تشکیل و ریزمعماری استخوان مشخص گردد. در این بررسی، GSE56815 را برای تجزیه و تحلیل تفاوت قابل توجه بیان ژن‌ها در متابولیسم استخوان، با توجه به تراکم زیاد استخوان نسبت به تراکم اندک استخوان انتخاب کردیم. از این‌رو، تجزیه و تحلیل مجموعه داده ریزآرایه در نرم‌افزار زبان برنامه‌نویسی آماری R انجام داده و خروجی‌ها در نمودار نقشه حرارتی با نمره بیان معنی‌دار $p < 0.001$ مشخص گردید. علاوه بر این، تنظیم بیان ژن‌های مهم از طریق آستانه $\log_{2}FC \pm 0.5$ و $P\text{-value} \text{ adj} < 0.001$ مشخص گردید.

از سوی دیگر، یک سیاهه از ژن‌های مرتبط با کم‌کاری تیروئید (CUI: C0020676) از پایگاه داده دیسجی نت^{vi} با امتیاز $\text{gda}^{\text{vii}} > 0.01$ جمع‌آوری شد.^{۱۹} با استفاده از نرم‌افزار ونی^{viii}، سیاهه‌ای از ژن‌های مشترک بین کم‌کاری تیروئید و بیماری‌های متابولیک استخوان، به منظور دستیابی به شبکه ژنی مشترک بین دو بیماری، و همچنین تعاملات ژنتیکی از

ناشی از کم‌کاری تیروئید به عنوان طب مکمل و جایگزین در دو سطح بیوانفورماتیک و آزمایشگاهی می‌باشد. لذا در این تحقیق به ارتباط بین کم‌کاری تیروئید و اختلالات متابولیک استخوان بر اساس برهمکنش ژن‌های هاب^۱ و شناسایی مسیرهای پیام‌رسانی و ملکولی پرداخته شد. همچنین، اثربخشی ترکیبات زیست فعال DA بر اساس مطالعات بیوانفورماتیک بر درمان و بهبود کم‌کاری تیروئید و اختلالات متابولیک استخوان ناشی از کم‌کاری تیروئید مورد بررسی قرار گرفته است. هدف نهایی از پژوهش حاضر بررسی تاثیر تمرین هوازی و مصرف مقدار مطمئن عصاره DA بر بهبود کم‌کاری تیروئید و اختلالات متابولیسم استخوان ناشی از کم‌کاری تیروئید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر اساس اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (IR.IAU.KHUISF.REC.1400.2) تنظیم و تأیید شد.

طرح مطالعه

سی سر موش ماده C57BL/6 با سن ۶ تا ۷ هفته و میانگین وزن 24 ± 2 گرم، از موسسه رویان خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) در شرایط استاندارد (23 ± 4 درجه سانتی‌گراد، رطوبت $60 \pm 4\%$)، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگه‌داری شدند. همچنین، میزان آب و غذا بصورت آزادانه در دسترس بود. پس از یک هفته سازگاری، موش‌ها به ۲ گروه به عنوان گروه شاهد (بدون القا بیماری) و موش مبتلا به کم‌کاری تیروئید تقسیم شدند. جهت القای کم‌کاری تیروئید موش‌ها روزانه ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم پروپیل تیوراسیل (PTU) را به مدت یکماه، از راه تزریق صفاقی دریافت کردند.^{۱۸} کم‌کاری تیروئید در تمام موش‌ها با موفقیت نمایان شد و شاهد مرگ و میر حیوانات تحت آزمایش نبودیم. پس از آن، موش‌ها به چهار زیر گروه تقسیم شدند: ۱- مبتلا به کم‌کاری تیروئید. ۲- مبتلا به کم‌کاری تیروئید و تیمار با عصاره DA (دریافت 0.4 میلی‌گرم/کیلوگرم از راه گاوآذ). ۳- مبتلا به کم‌کاری تیروئید و انجام تمرین هوازی. ۴- مبتلا به کم‌کاری تیروئید و تیمار با عصاره DA (0.4 میلی‌گرم/کیلوگرم) همراه با تمرین هوازی.

ii-Ketamine

iii-Xylazine

iv-Transcriptome

v-GEO

vi-DisGeNET

vii-Gene-diseases Associated

viii-Venny

i-Hub genes

زیست فعال توسط نرم‌افزار اوپن بابل^{xii} برای روش داکینگ مولکولی ارائه شد. ابعاد فضای جستجوی وینا^{xiii} برای اتصال مولکولی سطحی پروتئین MAPK3 در نرم‌افزار پایریکس^{xiv} تعریف شد. علاوه بر این، ما آستانه میل اتصال قابل قبول را کمتر از ۵- کیلوکالری بر مول و ۲ < پایداری را در این تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی برای محاسبه کارایی ترکیبات فعال زیستی DA مشخص کردیم.^{۲۴،۲۵}

۳. القای کم‌کاری تیروئید در موش

بر اساس بررسی مطالعات، ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم PTU به عنوان مقدار بهینه برای ایجاد کم‌کاری تیروئید در موش ماده انتخاب شد. در این مطالعه، ما (۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به مدت ۳۰ روز به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق کردیم.^{۱۸} محلول تجویز تزریق صفاقی ابتدا با حل کردن PTU در ۰/۰۱ N NaOH تهیه شد و حجم با آب استریل برای تزریق تکمیل شد، میزان اسیدیته با افزودن اسید فسفریک در ۶/۸-۷/۵ حفظ شد.

۴. روش عصاره‌گیری و مصرف DA

قسمت‌های هوایی گیاه DA برای استخراج ترکیبات فعال زیستی در مکان تاریک خشک شده و توسط یک همزن برقی پودر شد. عصاره‌گیری از پودر گیاه بدست آمده طبق روش تقطیر با آب در مطالعات قبلی انجام گرفت. در این مطالعه از عصاره ۰/۴ میلی‌گرم/کیلوگرم DA به مدت دو ماه/۵ روز در هفته استفاده شد. لازم به ذکر است، بر اساس بررسی مطالعات، ۰/۴ میلی‌گرم/کیلوگرم DA به عنوان مقدار بهینه انتخاب شده است.^{۱۶،۲۶} لازم به ذکر است، کل عصاره بدون فراکشن‌بندی استفاده شده است.

۵. برنامه تمرین هوازی

تمرین هوازی روی تردمیل مخصوص موش به مدت هشت هفته برای موش‌های القا شده با PTU اجرا شد. نوع تمرین هوازی، تمرین تناوبی با شدت متوسط تا زیاد بود. پس از انطباق به مدت یک هفته، زمان، شدت و سرعت برنامه تمرینی به تدریج افزایش یافت تا در نهایت به حداکثر ۷۵٪ مصرف بیشینه اکسیژن (VO₂max) (۴۵ دقیقه، شیب صفر،

طریق مسیرهای پیام‌رسانی مشترک، تعیین شد.^{۲۰} در ادامه، شبکه برهمکنش‌های پروتئین-پروتئینⁱ (PPI) از پروتئین‌های مشترک را در پایگاه داده استرینگⁱⁱ و نرم‌افزار سایتو اسکپⁱⁱⁱ طراحی کردیم.^{۲۱،۲۲} با استفاده از نرم‌افزار سایتو اسکپ در قسمت پارامترهای شبکه میزان درجه^{iv}، مرکزیت^v و مرکزیت نزدیکی^{vi}، مشخص گردید.

ما یک شبکه تعاملات پروتئین-پروتئین از ژن‌های هاب مشترک بین کم‌کاری تیروئید و بیماری‌های متابولیک استخوان ایجاد کردیم تا ژن‌های حیاتی و پروتئین نقطه برش را در مرحله بعدی مشخص کنیم. بر اساس داده کاوی و بررسی مطالعات، ژن‌هایی با بالاترین مرکزیت بین و بیشترین درجه در این شبکه را به عنوان پروتئین هدف برای رویکردهای درمانی مشخص کردیم.

۲. غربالگری اتصال ترکیبات شیمی دارویی گیاه

DA روی پروتئین نقطه برش^{vii}

بر اساس خروجی‌های غنی‌سازی و مرور مسیرهای پیام‌رسانی مولکولی، MAPK3 ممکن است پروتئین هدف به عنوان یک رویکرد درمانی جدید برای کم‌کاری تیروئید و بیماری‌های متابولیک استخوان باشد. بنابراین، بهترین ساختار کریستالوگرافی اشعه ایکس^{viii} این پروتئین در پایگاه داده بانک داده پروتئین^{ix} (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) انتخاب شد.^{۲۳} برای تهیه و بهینه‌سازی ساختار پروتئین از نرم‌افزار کایمر^x نسخه ۱،۸،۱ استفاده کردیم.^{۲۳}

کندل کوهی یک گیاه دارویی موثر به عنوان ضد دیابت، کاهش‌دهنده طبیعی گلوکزول و تنظیم‌کننده هورمون‌های تیروئید است. از این رو ما شواهدی را برای شناسایی ترکیبات زیست فعال خاص در عصاره DA بررسی کردیم. در ادامه، پایگاه داده پاب کم^{xi} (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) را برای به دست آوردن ساختارهای سه بعدی (3D) این ترکیبات زیست فعال در پایگاه داده پاب کم مرور شد. در مرحله بعد، کتابخانه‌ای شامل ساختارهای سه بعدی ترکیبات

i-Protein-protein Interaction

ii-STRING

iii-CytoScape

iv-Degree

v-Betweenness

vi-Closness

vii-Cut Point

viii-X-ray Crystallography

ix-Protein Data Bank

x-Chimera

xi-PubChem

xii-OpenBable

xiii-Vina

xiv-PyRx

۷. استخراج RNA و سنجش تغییرات بیان ژن

نمونه‌های RNA بافت استخوان ران پس از هموژن کردن بافت با استفاده از دستگاه هموژنایزر (هرکو ون لب سیستمⁱⁱⁱ، انگلستان) انجام شد. ۰/۲ گرم از بافت استخوان فمور را برداشته و روی آن معرف ترایزول^{iv} ریخته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به کمک دستگاه هموژنایزر، هموژن شده و پس از آن RNA بر اساس روش ترایزول جدا شد (ترموساینترفیک^v، آمریکا). کیفیت و کمیت RNA با اسپکتروفتومتری نانودراپ^{vi} اندازه‌گیری شد. سنتز cDNA بر اساس روش سازنده انجام شد (تا کا را^{viii}، ژاپن). برای ارزیابی میزان بیان ژن‌های PGC1 α ، PPAR- γ ، SIRT1، MAPK3، RUNX2، OSX، OPG، توالی پرایمرها در نرم‌افزارهای اولیگو^{viii} طراحی شدند (جدول ۱).

۲۵ متر در دقیقه) رسید. شدت و سرعت تمرین با سرعت ۳ متر در دقیقه و حداکثر ۵ درصد VO₂max، از ۱۰ متر در دقیقه و حداکثر ۲۰ درصد VO₂max به ۲۵ متر در دقیقه افزایش یافت و به حداکثر ۷۵ درصد VO₂ max رسید.^{۱۷}

۶. سنجش هورمون‌های تیروئیدی

نمونه سرم توسط سانتریفیوژ (۳۱۰۰ g، ۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) از نمونه‌های خون جدا شد. سطح T3 با میزان حساسیت کمتر از ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (مای بیوسرسⁱ، کانادا)، سطح T4 (مای بیوسرس، کانادا) با میزان حساسیت ۰/۰۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر و سطح هورمون محرک تیروئیدⁱⁱ (TSH) با میزان حساسیت ۱۷/۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر (مای بیوسرس، کانادا)، برای تأیید کم‌کاری تیروئید توسط روش الایزا اندازه‌گیری شد. شایان ذکر است که ضریب تغییرات در این کیت‌ها بین ۱۵-۱۲ درصد است.

جدول ۱- توالی پرایمر

GENE	NCBI ID	FORWARD PRIMER (5'-3')	REVERSE PRIMER (5'-3')	TEMPERATURE (°C)	PRODUCT LENGTH
Ppar- γ	NM_011146.4	CTGTTATGGGTGAAACTCTGG	GTGGTAAAGGGCTTGATGTC	۵۸	۲۰۵
Sirt1	NM_001159589.2	GGCAGTAACAGTGACAGT	CTCTCCGTATCATCTTCCAA	۶۰	۱۱۰
Mapk3	NM_011952	GGCTTCTGACGGAGTATGTGG	GTTGGAGAGCATCTCAGCCAGA	۶۰	۱۲۹
Pgc1 α	NM_001402988.1	CCCTGCCATTGTTAAGACC	TGCTGCTGTTCTGTTTTC	۶۰	۱۶۱
Opg	NM_008764.3	AATGCCGAGAGTGTAGAG	GAGGTCAATGTCTTGGATG	۶۰	۱۲۲
Osx	NM_130458.4	ATGGCGTCTCTCTGGTTG	TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT	۶۰	۱۵۶
Runx2	NM_009820	CCTGAACTCTGCACCAAGTCTT	TCATCTGGCTCAGATAGGAGGG	۶۰	۱۲۵
18s rRNA	NR_003278.1	CGGACACGGACAGGATTG	TCGCTCCACCAACTAAGAAC	۶۰	۸۵

لازم به ذکر است که تأیید تغییرات متابولیسم استخوان در موش‌های مبتلا به کم‌کاری تیروئید با سنجش نشانگرهای استخوانی در این بافت پس از قربانی کردن بوده است. در این مطالعه تغییرات بیان نشانگرهای مولکولی توسط روش qRT-PCR تأیید گردید.^{۲۷}

علاوه بر این، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (qRT-PCR) با استفاده از دستگاه روتور جین ۶۰۰۰^{ix} (کوربت لایف ساینس^x، استرالیا) انجام شد. در این مطالعه از 18S rRNA به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی بیان ژن‌ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس مقایسه چرخه آستانه (CT) انجام شد. منحنی تکثیر هر واکنش PCR با منحنی تکثیر ژن مرجع مربوطه نرمالیز شد. در این مطالعه، اختلاف CT به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش و نمونه‌های مرجع محاسبه و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع اندازه‌گیری شد.

i-MYBIOSOURCE

ii-Thyroid Stimulating Hormone

iii-Hercuvan Lab Systems

iv-Trizol

v-Thermo Scientific

vi-NanoDrop

vii-TaKaRa

viii-Oligo 7

ix-Rotor-Gene 6000

x-Corbett Life Science

۸. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل واریانس توسط نرم‌افزار گراف پد پریم^۱ (نسخه ۹) انجام شد. همچنین در این مطالعه از آزمون شاپیرو ویلک^۲ برای نرمال‌سازی توزیع استفاده شد. بر این اساس، داده‌های مربوط به بیان ژن و متغیرهای T3، T4 و TSH طبیعی بوده‌اند. تمامی داده‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (آنووا^۳) با آزمون تعقیبی توکی^۴ محاسبه گردید. نتایج به عنوان میانگین \pm انحراف استاندارد (SD) نشان داده شد، و تفاوت در $p < 0.001$ نشان‌دهنده معنی‌داری در تمام تحلیل‌ها بود.

یافته‌ها

۱. شناسایی ژن‌ها، عوامل تنظیمی و مسیرهای

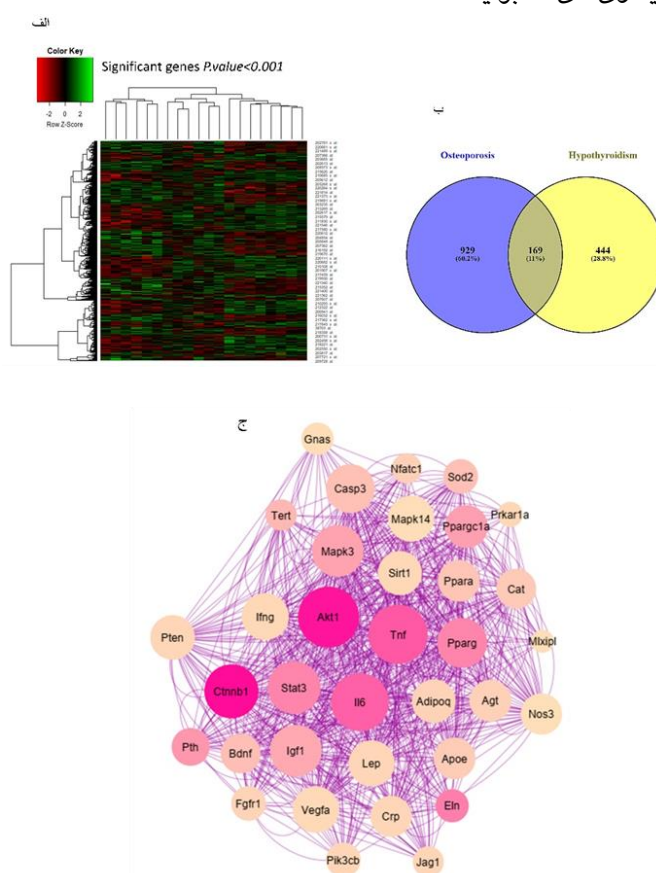
پیام‌رسانی مولکولی بر اساس زیست‌شناسی

مولکولی محاسباتی

بر اساس خروجی نرم‌افزار برنامه‌نویسی آماری R، از تجزیه و تحلیل مجموعه داده ریزآرایه بیماری‌های متابولیک

استخوان، ۱۲۸۲ ژن با بیان تفاوت معنی‌داری با در نظر گرفتن $p < 0.05$ بین تراکم زیاد استخوان نسبت به تراکم اندک استخوان پیدا شد. از این‌رو، ژن‌های با بیان متفاوت قابل توجه، با در نظر گرفتن حد آستانه معنی‌داری $p < 0.001$ در نمودار نقشه حرارتی نشان داده شده است (شکل ۱ الف).

از سوی دیگر، ۶۱۳ با امتیاز > 0.1 ارتباط ژن با بیماری^۵ در لیست ژن‌های مرتبط با کم‌کاری تیروئید قرار گرفت. از ابزار نمودار ون^۶ برای تعیین ژن‌های مشترک بین کم‌کاری تیروئید و بیماری‌های متابولیک استخوان استفاده گردید و نشان داده شد ۱۶۹ ژن بین شرایط اختلالات متابولیکی استخوان و کم‌کاری تیروئید مشترک هستند (شکل ۱ ب). یک شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین برای ژن‌های مشترک طراحی و پس از اعمال پارامترهای شبکه در سایتواسکیپ، ۳۵ ژن به عنوان ژن‌های هاب مشخص شد (شکل ۱ ج).



شکل ۱- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

i-GraphPad Prism

ii-Shapiro-Wilk

iii-ANOVA

iv-Tukey's Post Hoc

v-Gene Disease Associated

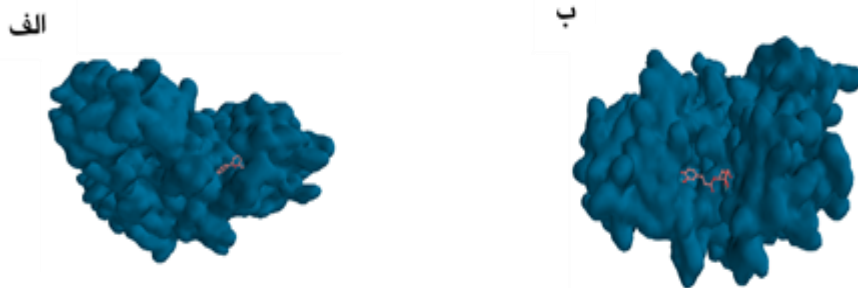
vi-VEEN Diagram

۲. نتایج میل ترکیبی دارویی بر اساس مدل‌سازی فارماکوفور و اتصال مولکولی

بر اساس غربالگری *in-silico* و تجزیه و تحلیل نتایج طراحی دارو و داکینگ مولکولی، میل ترکیبی ترکیبات فعال زیستی عصاره گیاهی DA بر روی MAPK3 به عنوان پروتئین با توانایی تاثیر بر شبکه پروتئینی درگیر در متابولیسم بافت استخوان تخمین زده شد.

در این مطالعه، بر اساس شواهد، ۲۱ ترکیب فعال زیستی موثر یافت شد. محاسبات اتصال مولکولی تخمین زد که آنتوسیانینⁱⁱ و کلروژنیک اسیدⁱⁱⁱ قدر به اتصال پایدار با بالاترین امتیاز میل اتصال به ترتیب ۸/۴- کیلوکالری بر مول و ۷/۹- کیلوکالری بر مول بر روی پروتئین MAPK3 را دارد (شکل ۲. الف و ب). داده کاوی در مورد اثرات ترکیب کلروژنیک اسید نشان داده است که این فرمول فیتوشیمیایی نقش محوری به عنوان آنتی‌اکسیدان بالقوه در از بین بردن رادیکال‌های آزاد دارد. همچنین، آنتوسیانین‌ها گروهی از آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که در میوه‌ها و سبزیجات قرمز، بنفش و آبی یافت می‌شوند. آنتوسیانین‌ها به خانواده فلاونوئیدها تعلق دارند. شایان ذکر است که کل ترکیبات فعال زیستی در این تجزیه و تحلیل شیمی محاسباتی به پروتئین MAPK3 با یک امتیاز میل اتصال قابل قبول متصل شد.

به دلیل مشترک بودن ژن‌های هاب در دو بیماری، احتمال وجود ارتباط مولکولی بین دو بیماری در مسیرهای مشترک و از طریق ژن‌های مشترک مفروض است. غنی‌سازی و داده کاوی ژن‌های مشترک کم‌کاری تیروئید و بیماری‌های متابولیک استخوان نشان می‌دهد که مسیر پیام‌رسانی AMPK، مسیر پیام‌رسانی PPAR، مسیر پیام‌رسانی متابولیک و تمایز استئوکلاست‌ها، مسیرهای پیام‌رسانی مولکولی حیاتی مرتبط با این ژن‌های هستند. براساس خروجی‌های غنی‌سازی و مرور مسیرهای پیام‌رسانی مولکولی دریافتیم که MAPK3 با بیشترین مرکزیت در شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین، یکی از نقاط برش بالقوه است و ممکن است پروتئین هدف به عنوان رویکرد درمانی جدید در کم‌کاری تیروئید و بیماری‌های متابولیک استخوان باشد. در این مطالعه ژن‌های با بالاترین درجه و مرکزیت بینابینی در شبکه ژنی حاصل از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی شامل PGC1 α ، PPAR- γ ، SIRT1، MAPK3، به عنوان ژن‌های کلیدی در ارتباط متقابل کم‌کاری تیروئید و متابولیک استخوان مورد ارزیابی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی^۱ قرار داده شدند. همچنین، شاخص‌های اختصاصی استخوان (OPG، OSX، RUNX2) را برای نظارت کردن بر وضعیت استخوان مورد ارزیابی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی قرار دادیم.



شکل ۲- محاسبات اتصال مولکولی. الف، Anthocyanin (Flavylium) با امتیاز میل اتصال ۸/۴- کیلوکالری بر مول با پروتئین MAPK3 اتصال پایدار ایجاد می‌کند. ب، Chlorogenic Acid با امتیاز میل اتصال ۷/۹- کیلوکالری بر مول با پروتئین MAPK3 اتصال پایدار ایجاد می‌کند

i-Real Time PCR

ii-Anthocyanin

iii-Chlorogenic Acid

۳. تمرین هوازی و مصرف عصاره DA سبب بهبود عملکرد هورمون تیروئید و تغییرات وزن گردید. غلظت هورمون‌های T3، T4 و TSH در موش‌های کم‌کاری تیروئید در مقایسه با گروه شاهد به طور قابل توجهی تغییر کرده و سطح هورمون‌های T3 و T4 در مقایسه با گروه شاهد کاهش قابل توجهی داشته است (جدول ۲، $p < 0.001$). علاوه بر این، مشاهده شد که غلظت هورمون‌های T3، T4 و TSH در گروه‌های کم‌کاری تیروئید-DA و کم‌کاری تیروئید-تمرین هوازی نسبت به گروه کم‌کاری تیروئید بهبود یافته است و سطح هورمون‌های T3 و

T4 افزایش یافته است (جدول ۲، $p < 0.001$). همچنین، غلظت T3 و T4 به طور قابل توجهی در گروه کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA بهبود یافت و میزان غلظت TSH در گروه کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA کاهش قابل توجهی را نشان داد (جدول ۲، $p < 0.001$). از سویی، میزان تغییرات وزن در موش‌های هیپوتیروئید در مقایسه با گروه نرمال به طور قابل توجهی تغییر کرده است (جدول ۲، $p < 0.001$). میزان وزن در گروه‌های کم‌کاری تیروئید-DA و کم‌کاری تیروئید-تمرین هوازی نسبت به گروه کم‌کاری تیروئید بهبود یافته است (جدول ۲، $p < 0.001$).

جدول ۲- میزان تغییرات وزن و هورمون‌های در ارتباط با تیروئید

متغیرها	شاهد	کم‌کاری تیروئید	کم‌کاری تیروئید-DA	کم‌کاری تیروئید-تمرین هوازی	کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA	p-value
وزن بدن (گرم)	۳۱/۵±۲/۱	۱۹/۵±۱/۹*	۲۳/۶±۰/۸*†	۲۴/۲±۱/۲*†‡	۲۹/۲±۰/۶†‡§	$p < 0.001$
TSH (پیکوگرم/میلی‌لیتر)	۱۰۰۰/۲۷±۶/۵	۴۴۳۰/۶±۵/۳*	۳۰۲۳/۶±۷۳/۳*†	۳۰۳/۴۳±۲۶/۴*†‡	۲۲۸۹/۵±۴۸/۹۸*†‡§	$p < 0.001$
T4 (نانوگرم/میلی‌لیتر)	۹۰/۲۳±۵/۱	۳۵/۴±۱/۳*	۵۵/۳±۰/۹*†	۶۲/۶۷±۱/۵*†‡	۷۶/۴۳±۱/۳*†‡§	$p < 0.001$
T3 (نانوگرم/میلی‌لیتر)	۸/۲۴±۰/۵	۱/۴۵±۰/۳*	۲/۳±۰/۲۳*†	۲/۶۷±۰/۱۹*†‡	۴/۴۳±۰/۳*†‡§	$p < 0.001$

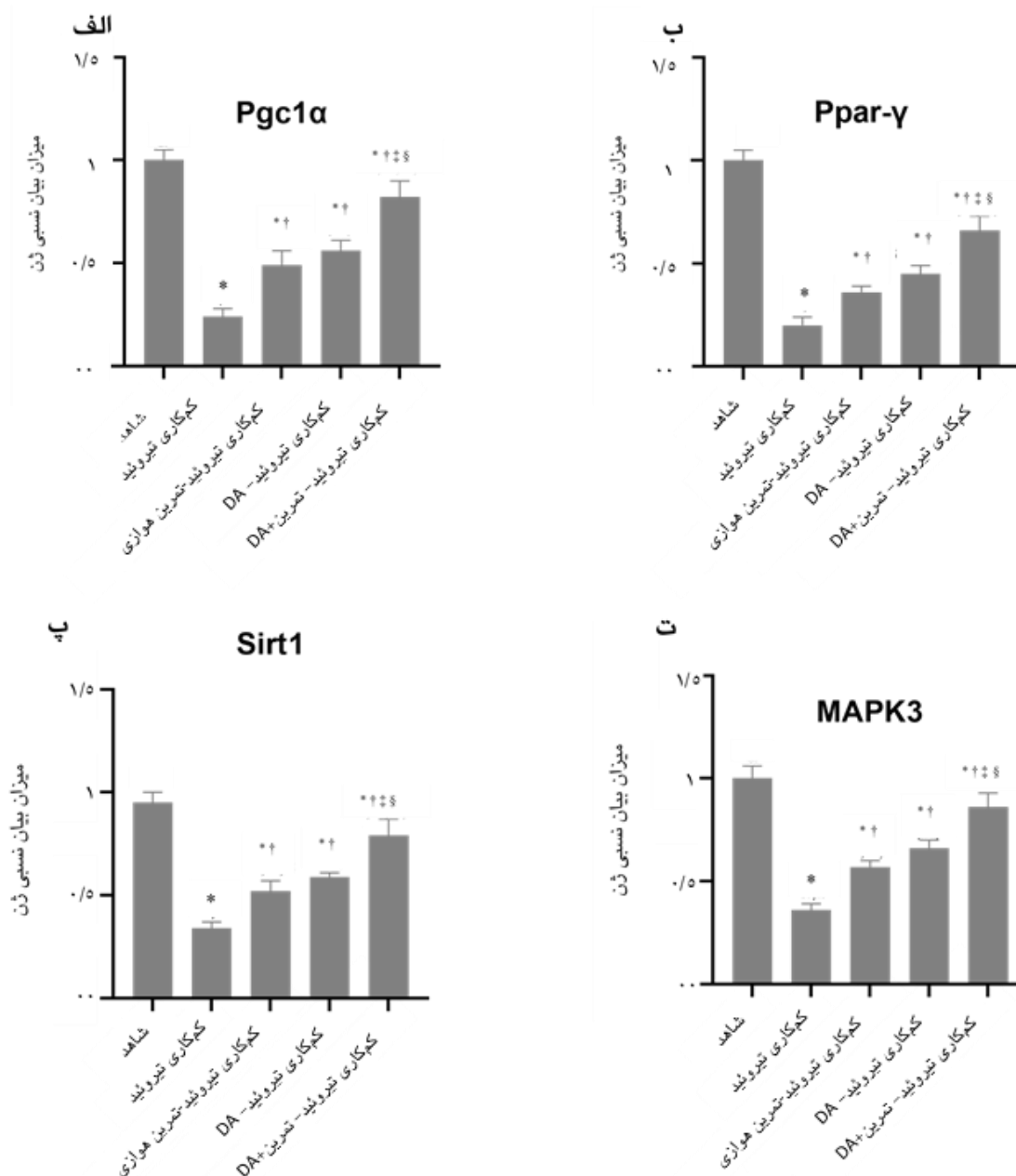
* نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها می‌باشد. † نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه کم‌کاری تیروئید و سایر گروه‌ها می‌باشد. ‡ نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه کم‌کاری تیروئید-DA با گروه‌های کم‌کاری تیروئید-تمرین هوازی و کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA می‌باشد. § نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA و گروه کم‌کاری تیروئید-تمرین هوازی می‌باشد.

۱. تمرین هوازی و DA باعث تنظیم متابولیسم

استخوان در شرایط کم‌کاری تیروئید می‌شود.

ما نشان دادیم که ژن‌های هاب PGC1 α ، PPAR- γ ، SIRT1، MAPK3 بین بیماری متابولیک استخوان و کم‌کاری تیروئید بر اساس هوش مصنوعی مشترک هستند. علاوه بر این، ما دریافتیم که بیان نسبی PGC1 α ، PPAR- γ ، SIRT1، MAPK3 در شرایط کم‌کاری تیروئید دچار تنظیم منفی نسبت به گروه شاهد می‌شود (شکل ۳، الف-ت، $p < 0.001$). داده‌های ما نشان داد که بیان نسبی ژن‌های PGC1 α ، PPAR- γ ، SIRT1، MAPK3 در گروه کم‌کاری تیروئید در مقایسه با گروه نرمال کاهش یافته است (شکل ۳، الف-ت، $p < 0.001$).

علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که تمرین هوازی و مصرف ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه دارویی DA (گروه‌های کم‌کاری تیروئید-DA، کم‌کاری تیروئید-تمرین هوازی) می‌تواند سطح بیان PGC1 α ، PPAR- γ ، SIRT1، MAPK3 را بطور معنی‌داری افزایش دهد (شکل ۳، الف-ت، $p < 0.001$). قابل ذکر است که ما یک اثر هم‌افزایی تمرین هوازی همراه با میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره DA را در متابولیسم استخوان در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان دادیم (شکل ۳، الف-ت، $p < 0.001$). بر اساس این نتایج، کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA به طور قابل توجهی ژن‌های PGC1 α ، PPAR- γ ، SIRT1، MAPK3 را در مقابل گروه‌های کم‌کاری تیروئید-DA، کم‌کاری تیروئید-تمرین هوازی و کم‌کاری تیروئید افزایش داد (شکل ۳، الف-ت).



شکل ۳- میزان تغییرات بیان mRNA در استخوان. الف، میزان بیان نسبی ژن *Pgc1α*. ب، میزان بیان نسبی ژن *Pparγ*. میزان بیان نسبی ژن *Pgc1α*. میزان بیان نسبی ژن *Sirt1*. میزان بیان نسبی ژن *MAPK3*. * نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها می‌باشد. † نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه کم کاری تیروئید و سایر گروه‌ها می‌باشد. ‡ نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه کم کاری تیروئید-تمرین هوازی با گروه کم کاری تیروئید-تمرین هوازی می‌باشد. § نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه کم کاری تیروئید-تمرین هوازی و گروه کم کاری تیروئید-تمرین هوازی می‌باشد.

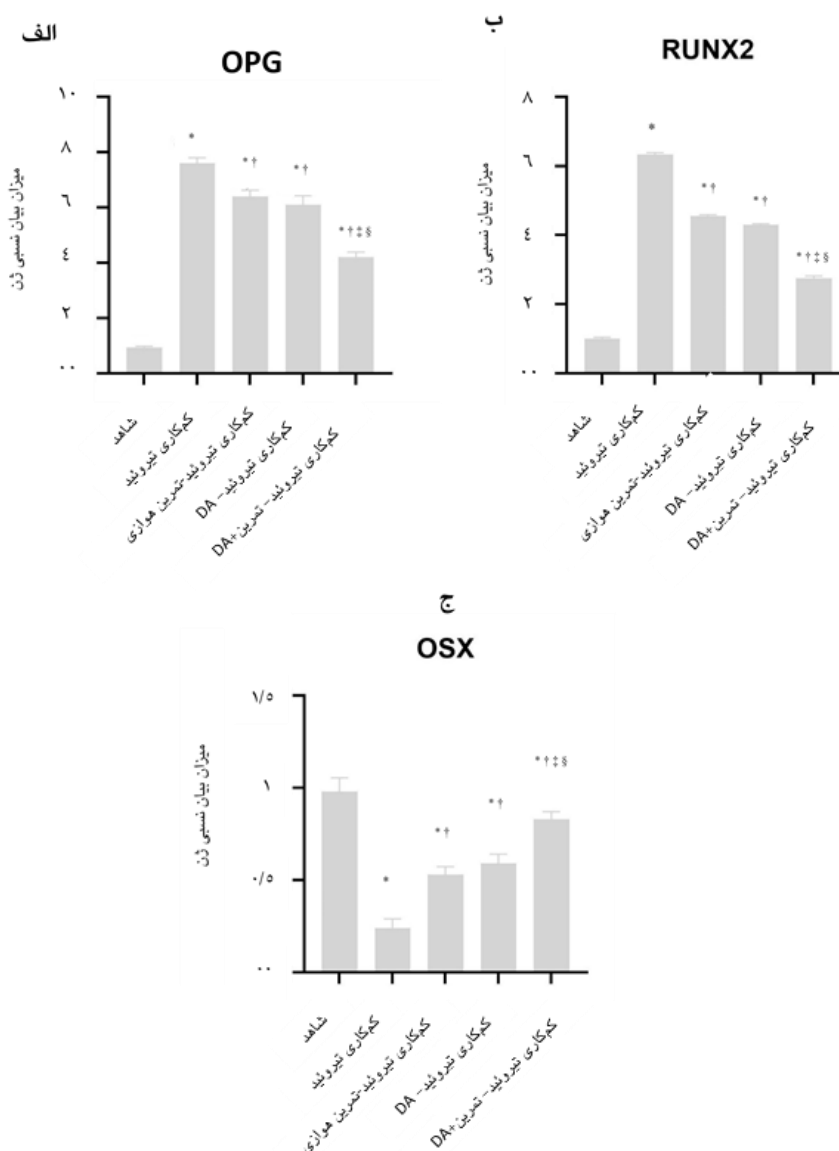
پلیمرز کمی تایید گردید. ^{۲۷} برای ارزیابی بازسازی و متابولیسم استخوان، بیان نسبی رونوشت‌های *OSX*، *OPG* و *RUNX2* اندازه‌گیری شد (شکل ۴ الف-ج، $p < 0.001$). نتایج نشان داد که سطح بیان *OSX* در موش‌های مبتلا به کم کاری تیروئید در مقابل گروه شاهد کاهش یافته است (شکل ۴ الف، $p < 0.001$). علاوه بر این، بیان نسبی *OSX* در گروه‌های کم کاری تیروئید-تمرین هوازی و کم کاری تیروئید-تمرین

۲. تمرین هوازی و مصرف DA باعث بهبود اختلال در بازسازی استخوان در موش‌های کم کاری تیروئید شد.

تایید تغییرات متابولیسم استخوان در موش‌های مبتلا به کم کاری تیروئید با سنجش نشانگرهای استخوانی در این بافت پس از قربانی کردن بوده است. در این مطالعه تغییرات بیان نشانگرهای مولکولی توسط روش واکنش زنجیره‌ای

هوازی در مقایسه با گروه کم‌کاری تیروئید بهبود یافت (شکل ۴ الف ر، $p < 0.001$). هم‌چنین سطح بیان OSX در گروه کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA در مقایسه با گروه‌های کم‌کاری تیروئید-تمرین، کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA و کم‌کاری تیروئید افزایش داد؛ این یافته حاکی از اثر هم افزایی تجویز هشت هفته مصرف عصاره DA و تمرین هوازی بر متابولیسم استخوان می‌باشد (شکل ۴ الف، $p < 0.001$). بیان ژن‌های OPG و RUNX2 به عنوان نشانگرهای استخوان در این مطالعه ارزیابی شد (شکل ۴ ب و ج، $p < 0.001$). بیان نسبی رونوشت‌های OPG و RUNX2 در گروه کم‌کاری تیروئید در مقایسه با گروه نرمال به طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۴ ب و ج، $p < 0.001$). علاوه بر این، ما دریافتیم که تمرین هوازی و تجویز عصاره DA بیان نسبی شاخص‌های OPG و RUNX2 را کاهش می‌دهد (شکل ۴ ب و ج، $p < 0.001$). علاوه بر این، تمرین هوازی همراه با تجویز DA (کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA) به طور معنی‌داری بیان OPG و RUNX2 را کاهش داد (شکل ۴ ب و ج، $p < 0.001$).

هوازی در مقایسه با گروه کم‌کاری تیروئید بهبود یافت (شکل ۴ الف ر، $p < 0.001$). هم‌چنین سطح بیان OSX در گروه کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA در مقایسه با گروه‌های کم‌کاری تیروئید-تمرین، کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA و کم‌کاری تیروئید افزایش داد؛ این یافته حاکی از اثر هم افزایی تجویز هشت هفته مصرف عصاره DA و تمرین هوازی بر متابولیسم استخوان می‌باشد (شکل ۴ الف، $p < 0.001$). بیان ژن‌های OPG و RUNX2 به عنوان نشانگرهای استخوان در این مطالعه ارزیابی شد (شکل ۴ ب و ج، $p < 0.001$).



شکل ۴- میزان تغییرات بیان mRNA در استخوان. الف، میزان بیان نسبی ژن OPG. ب، میزان بیان نسبی ژن RUNX2. میزان بیان نسبی ژن OSX. * نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها می‌باشد. † نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه کم‌کاری تیروئید و سایر گروه‌ها می‌باشد. ‡ نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA و سایر گروه‌ها می‌باشد. § نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه کم‌کاری تیروئید-تمرین+DA+تمرین هوازی و سایر گروه‌ها می‌باشد.

بحث

در این مطالعه بر اساس تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک مشخص گردید که ژن‌های $PGC1\alpha$ ، $PPAR-\gamma$ ، $SIRT1$ ، $MAPK3$ دارای نقش مهمی در کم کاری تیروئید و اختلالات متابولیک استخوان دارند. میزان بیان ژن‌های $PGC1\alpha$ ، $PPAR-\gamma$ ، $SIRT1$ ، $MAPK3$ در شرایط کم کاری تیروئید در بافت استخوان کاهش یافته است. از سویی، تمرین هوازی و مصرف DA به مدت هشت هفته سبب افزایش قابل توجهی در سطح بیان $PGC1\alpha$ ، $PPAR-\gamma$ ، $SIRT1$ ، $MAPK3$ شده است. بر اساس این نتایج، کم کاری تیروئید سبب افزایش بیان ژن‌های OPG و $RUNX2$ و کاهش بیان ژن OSX شده است. انجام تمرین هوازی و مصرف DA به مدت هشت هفته سبب بهبود و تنظیم میزان بیان ژن‌های OSX ، $RUNX2$ ، OPG شده است.

بر اساس تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک مجموعه داده‌های ریزآرایه، دریافتیم که متابولیسم استخوان در وضعیت کم کاری تیروئید تغییر می‌کند. $PPAR-\gamma$ ، $PGC1\alpha$ ، $SIRT1$ ، $MAPK3$ به عنوان ژن‌های هاب در شبکه متابولیسم استخوان بر اساس تجزیه و تحلیل *in-silico* علامت‌گذاری گردید. غنی‌سازی ژن‌های هاب، آدیپوسیتوکین، مسیر تنظیم طول عمر، مسیر پیام‌رسانی $AMPK$ ، مسیر پیام‌رسانی $AGE-RAGE$ ، مسیر پیام‌رسانی $VEGF$ ، مقاومت در برابر مهارکننده تیروزین-کیناز $EGFR$ ، مسیر پیام‌رسانی $PPAR$ ، آپوپتوز، مسیر پیام‌رسانی متابولیک، سرطان تیروئید، مسیر پیام‌رسانی $FOXO$ و تمایز استئوکلاست‌ها، را به عنوان مسیرهای پیام‌رسانی مولکولی مهم مرتبط با ژن‌های هاب در متابولیسم استخوان مشخص کرد. متن کاوی در مورد مسیرهای پیام‌رسانی مولکولی، استراتژی‌های جدیدی را برای حفظ هموستاز متابولیسم استخوان ایجاد کرد.

استانس^۱ و همکاران نشان دادند که فعال شدن $PPAR-\alpha$ با افزایش توده استخوانی مرتبط است و تأثیر مثبتی بر عملکرد اسکلتی دارد.^{۲۸} $SIRT1$ یا $Sirtuin 1$ یکی از اعضای خانواده $Sirtuins$ ، به عنوان حفاظت شده‌ترین داستیلاز در پستانداران با عملکرد عامل رونویسی در چندین فرآیند فیزیولوژیکی مانند سازوکار اکسیداتیو و آنتی‌اکسیداتیو، متابولیسم، بیورنژ میتوکندری، اتوفاژی، آپوپتوز و وضعیت

پاتولوژیک شناسایی شده است.^{۲۹} شواهد رو به رشد ثابت کرده است که $SIRT1$ با عملکرد ضدالتهابی می‌تواند التهاب را در چندین بافت سرکوب کند.^{۲۹} از سوی دیگر، $NF-\kappa B$ به عنوان عامل اصلی رونویسی در تولید سیتوکین‌ها شناخته شده است. فاکتور رونویسی $NF-\kappa B$ در پاسخ به استرس اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد، تولید سیتوکین، پراکسیداسیون لیپوپروتئین فعال می‌شود و منجر به تولید عوامل التهابی می‌شود.^{۳۰} با توجه به این‌که جابجایی و فعال‌سازی عامل $NF-\kappa B$ بر استیلایسون متکی است، فعالیت $SIRT1$ از فعالیت رونویسی $NF-\kappa B$ جلوگیری می‌کند و التهاب را سرکوب می‌کند. علاوه بر این، $SIRT1$ تکثیر سلولی را تحریک می‌کند و تمایز سلولی را توسط داستیلایسون‌های β -catenin تنظیم می‌کند.^{۳۱} مهار مسیر پیام‌رسانی Wnt منجر به تجمع پروتئین، تولید سلول‌های اولیه و تجمع اجسام خارج سلولی غیر طبیعی می‌شود.^۳ علاوه بر این، آدیپونکتین^{۳۲} ارتباط نزدیکی با متابولیسم استخوان دارد و شواهد نشان می‌دهد که این هورمون تنظیم متابولیسم استخوان را از طریق سه مسیر: مسیرهای پیام‌رسانی اتوکرین، پاراکرین و انسولین واسطه‌گری می‌کند.^{۳۳}

هورمون‌های تیروئید (THs) بازیگران آنابولیک در رشد سلول‌های اسکلتی، حفظ توده استخوانی، بهبود موثر شکستگی استخوان و فرآیند متابولیسم استخوان هستند. بر اساس شواهد رو به رشد، TH ها می‌توانند گردش استخوان، استئوبلاستوژنز و استئوکلاستوژنز را مدیریت کنند.^{۳۳،۳۴} بر این اساس، T3 نشانگرهای تمایز سلول‌های غضروفی هیپرتروفیک، از جمله بیان آلکالین فسفاتاز و کلاژن X در کشت سلول‌های کندروسیت صفحه رشد اولیه، و معدنی‌سازی ماتریکس غضروف را القا کرد. داده کاوی در مورد اثرات ترکیب اسید کلروژنیک نشان داده است که این فرمول فیتوشیمیایی نقش محوری به عنوان آنتی‌اکسیدان بالقوه در از بین بردن رادیکال‌های آزاد دارد. با توجه به تجزیه و تحلیل تجربی، ما نشان دادیم که تجویز DA و تمرین هوازی می‌تواند غلظت T3، T4 و TSH را تغییر دهد، که منجر به تعدیل بازسازی استخوان شد.^{۱۱}

داده‌های ما نشان داد که بیان نسبی نشانگرهای بازسازی استخوان شامل OPG ، $RUNX2$ با کاهش بیان و OSX با افزایش بیان در گروه $DA +$ تمرین تنظیم شده‌اند.

ii-Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κB)
iii-Adiponectin

i-Stunes

را برای تقویت رشد استئوبلاست در کلسیفیکاسیون دریچه آئورت با تنظیم کردن RUNX2 حذف کند.^{۳۹} علاوه بر این، TUG1 با تأثیر مثبت بر CTNNB1 می‌تواند پیشرفت سرطان را از طریق تعامل با مسیر پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin تنظیم کند.^{۴۰} از سوی دیگر، تائو ژیانگ سانگ^{iv} و همکاران نشان داده‌اند که DNMT1 می‌تواند HOTAIR را هدف قرار دهد و از طریق ساز و کار تعامل با پروتئین، تأثیر مثبتی بر رشد سلول و تأثیر منفی بر فرآیند آپوپتوز دارد.^{۴۱} این در حالی است که تنظیم مثبت HOTAIR بر CTNNB1 تأثیر منفی می‌گذارد و فرآیندهای مرگ سلولی را از طریق غیرفعال کردن β -catenin در سلول‌های سرطان ریه افزایش می‌دهد.^{۴۲} RNA طولانی غیرکدکننده H19 با اتصال رقابتی به miR-200a و مهار بیان β -catenin، تکثیر سلولی را در سرطان کولورکتال تشویق می‌کند.^{۴۳،۴۴} همچنین، بینگ لی^v و همکاران نشان دادند که بیان بیش از حد DNMT1 باعث هیپرمتیلاسیون پروموتور H19 و مهار مسیر پیام‌رسانی Erk در موش صحرایی با از دست دادن تراکم استخوان می‌شود. بیان بیش از حد H19 با تمایز استخوانی و تشکیل استخوان همراه است.^{۴۵}

به کارگیری تمرین هوازی با شدت، مدت و تکرارهای مختلف و مقایسه اثرات آن‌ها با یکدیگر و از سویی استفاده از داروی لووتیروکسین به عنوان استاندارد طلایی درمان کم‌کاری تیروئید در کنار استفاده از عصاره DA می‌تواند از محدودیت‌های این مطالعه نام برد. همچنین، ارزیابی اختلالات استخوان بر اساس میکرو سی‌تی‌اسکن و ارزیابی سایر نشانگرهای زیستی جهت سنجش کیفیت استخوان از دیگر محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد.

بر اساس این مقاله، ما توصیه می‌کنیم که تجویز فعالیت بدنی روزانه و منظم، و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره DA منجر به یک سازوکار جبران‌کننده در اختلالات متابولیسم استخوان ناشی از کم‌کاری تیروئید شود.

نتیجه‌گیری

بنابراین، تعامل تمرین هوازی همراه با ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره DA به مدت هشت هفته می‌تواند تغییرات بیان شبکه ژنی دخیل در متابولیسم بافت استخوان موش‌های مبتلا به کم‌کاری تیروئید را از طریق ژن‌های هاب و نقطه

رسولی وانی و همکاریانش نشان دادند که مصرف DA ممکن است وضعیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشد و ایسکمی مغزی را کاهش دهد.^{۱۱} بر اساس این نتایج، آن‌ها دریافتند که فعالیت‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و سطوح گلوکاتایون توسط عصاره DA افزایش یافته است. علاوه بر این، مصطفوی و همکاران نشان دادند که مقدار ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم DA در مقایسه با ۰/۸ میلی‌لیتر بر کیلوگرم، ۱/۶ میلی‌لیتر بر کیلوگرم و ۲/۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم در مدل موش، اثر محافظتی بر عملکرد کبد دارد.^{۳۶} از سوی دیگر، ژانگⁱ و همکاران نشان دادند که دو هفته تمرین دویدن بر روی چرخ گردان، ترابکولار استخوان، قشر استخوان، صفحه رشد و غضروف مفصلی را تعدیل می‌کند.^{۳۵} علاوه بر این، تمرین دویدن بر روی چرخ گردان، شاخص‌های زیستی استخوانی را اصلاح کرده و بیان نسبی PGC1 α را به عنوان یک گیرنده فعال شده با کوفاکتور فعال‌کننده تکثیر که می‌تواند نقش کلیدی در تنظیم متابولیسم داشته باشد، افزایش داد. جالب توجه است که کیمⁱⁱ و همکاریانش نشان دادند که فعالیت بدنی ممکن است جذب استخوان را افزایش دهد، اما پس از آن، نشانگر زیستی استئوکلاست کاهش یافته و بازسازی استخوان متعادل می‌شود.^{۳۶}

علاوه بر این، ما نشان دادیم که سطح بیان ژن‌های PGC1 α ، PPAR- γ ، SIRT1، MAPK3 توسط DA و تمرین هوازی افزایش یافته است. علاوه بر این، نشان داده‌ایم که تجویز فعالیت بدنی و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره DA می‌تواند توزیع استئوبلاست‌ها و استئوکلاست‌ها را بهبود بخشد و متابولیسم استخوان را در کم‌کاری تیروئید در موش از طریق مسیر آدیپوسیتوکین، مسیر تنظیم طول عمر، مسیر پیام‌رسانی AMPK، مسیر پیام‌رسانی AGE-RAGE، مسیر پیام‌رسانی VEGF، مقاومت در برابر مهارکننده تیروزین-کیناز EGFR، مسیر پیام‌رسانی PPAR، آپوپتوز، مسیر پیام‌رسانی متابولیک، سرطان تیروئید، مسیر پیام‌رسانی FOXO و تمایز استئوکلاست‌ها، جبران کند. تغییرات اپی‌ژنتیک ممکن است عامل مهمی در پاتوژنز اختلالات و بیماری‌ها باشد و ممکن است به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه در پیش‌آگهی و تشخیص ظاهر گردد.^{۳۷،۳۸} کونگ یوⁱⁱⁱ و همکاریانش گزارش کردند که TUG1 می‌تواند miR-204-5p

تعارض منافع (conflict of interest): نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

i- Cut Point

References

- Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology* 2000; 141: 3887-97.
- Govindan R, El-Sherbiny M, Ibraheem KMM, Narasimhan S, Salama ME-DM, Ahmad F, et al. Thyroid-Stimulating Hormone Favors Runx2-Mediated Matrix Mineralization in HOS and SaOS2 Cells: An In Vitro and In Silico Approach. *Molecules* 2022; 27: 613.
- Varga F, Rumpler M, Zoehrer R, Turecek C, Spitzer S, Thaler R, et al. T3 affects expression of collagen I and collagen cross-linking in bone cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402:180-5.
- Tsourdi E, Rijntjes E, Köhrle J, Hofbauer LC, Rauner M. Hyperthyroidism and hypothyroidism in male mice and their effects on bone mass, bone turnover, and the Wnt inhibitors sclerostin and dickkopf-1. *Endocrinology* 2015; 156: 3517-27.
- Harvey CB, O'Shea PJ, Scott AJ, Robson H, Siebler T, Shalet SM, et al. Molecular mechanisms of thyroid hormone effects on bone growth and function. *Mol Genet Metab* 2002; 75: 17-30.
- Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990; 19: 35-63.
- Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Influence of hyper- and hypothyroidism, and the effects of treatment with antithyroid drugs and levothyroxine on fracture risk. *Calcif Tissue Int* 2005; 77: 139-44.
- Biondi B, Wartofsky L. Treatment with thyroid hormone. *Endocr Rev* 2014; 35: 433-512.
- Nahin RL, Dahlhamer JM, Taylor BL, Barnes PM, Stussman BJ, Simile CM, et al. Health behaviors and risk factors in those who use complementary and alternative medicine. *BMC Public Health* 2007; 7: 1-9.
- Ahn N, Kim HS, Kim K. Exercise training-induced changes in metabolic syndrome parameters, carotid wall thickness, and thyroid function in middle-aged women with subclinical hypothyroidism. *Pflügers Arch* 2019; 471: 479-89.
- Abedpoor N, Taghian F, Hajibabaie F. Physical activity ameliorates the function of organs via adipose tissue in metabolic diseases. *Acta Histochem* 2022; 124: 151844.
- Fisher DA. Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations. *Clin Chem* 1996; 42: 135-9.
- Hajibabaie F, Abedpoor N, Taghian F, Safavi K. A Cocktail of Polyherbal Bioactive Compounds and Regular Mobility Training as Senolytic Approaches in Age-dependent Alzheimer's: the In Silico Analysis, Lifestyle Intervention in Old Age. *J Mol Neurosci* 2023; 73: 1-14.
- Mianabadi M, Hoshani M, Salmanian S. Antimicrobial and Anti-oxidative Effects of Methanolic Extract of *Dorema aucheri* Boiss. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2015; 17: 623-34.
- Hossiniyan SA, Ghalamfarsa F, Rostami-Yasuj S, Salehpour Z, Latifpour M, Hasanzadeh S, et al. Chemical composition and cytotoxic activity of the essential oil from the aerial parts of *Dorema aucheri*. *Journal of Herbm Pharm* 2021; 10: 344-50.
- Rasouli Vani J, Taghi Mohammadi M, Sarami Foroshani M, Rezazade E. Evaluation of the neuroprotective and antioxidant effects of *Dorema aucheri* extract on cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats. *Pharm Biol* 2019; 57: 255-62.
- Abedpoor N, Taghian F, Ghaedi K, Niktab I, Safaiejad Z, Rabiee F, et al. PPAR γ /Pgc-1 α -Fndc5 pathway up-regulation in gastrocnemius and heart muscle of exercised, branched chain amino acid diet fed mice. *Nutr Metab* 2018; 15: 1-15.
- Singh S, Panda V, Sudhamani S, Dande P. Protective effect of a polyherbal bioactive fraction in propylthiouracil-induced thyroid toxicity in rats by modulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid and hypothalamic-pituitary-adrenal axes. *Toxicol Rep* 2020; 7: 730-42.
- Piñero J, Saüch J, Sanz F, Furlong LI. The DisGeNET cytoscape app: Exploring and visualizing disease genomics data. *Comput Struct Biotechnol J* 2021; 19: 297-60.
- Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. Available form: URL: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> 2007.
- Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res* 2023; 51: D638-D46.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13: 2498-504.
- Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chao H, Chen L, et al. RCSB Protein Data Bank (RCSB.org): delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. *Nucleic Acids Res* 2023; 51: D488-D508.
- Hajibabaie F, Abedpoor N, Safavi K, Taghian F. Natural remedies medicine derived from flaxseed (secoisolaricresinol diglucoside, lignans, and α -linolenic acid) improve network targeting efficiency of diabetic heart conditions based on computational chemistry techniques and pharmacophore modeling. *J Food Biochem* 2022; e14480.
- Abedpoor N, Taghian F, Hajibabaie F. Cross Brain-Gut Analysis Highlighted Hub Genes and LncRNA Networks Differentially Modified During Leucine Consumption and Endurance Exercise in Mice with Depression-Like Behaviors. *Mol Neurobiol* 2022; 59: 1-18.
- Mostafavi SH, Fazilati M, Mostafavi S-A, Vahhabi MR, Mostafavi F, Omidvarinia S, et al. Hepatotoxicity of *Dorema aucheri* (Bilhar) in albino mice. *Arch Iran Med* 2013; 16: 530-2.
- Delitala AP, Scuteri A, Doria C. Thyroid hormone diseases and osteoporosis. *J Clin Med* 2020; 9: 1034.
- Stunes AK, Westbroek I, Gustafsson BI, Fossmark R, Waarsing JH, Eriksen EF, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha agonist fenofibric acid increases bone mass and bone strength in mice from the aerial parts of *Dorema aucheri*. *Journal of Herbm Pharm* 2021; 10: 344-50.

- brate maintains bone mass, while the PPAR gamma agonist pioglitazone exaggerates bone loss, in ovariectomized rats. *BMC Endocr Disord* 2011; 11: 1-13.
29. Iyer S, Han L, Bartell SM, Kim H-N, Gubrij I, de Cabo R, et al. Sirtuin1 (Sirt1) promotes cortical bone formation by preventing β -catenin sequestration by FoxO transcription factors in osteoblast progenitors. *J Biol Chem* 2014; 289: 24069-78.
 30. Sergi C, Shen F, Liu S-M. Insulin/IGF-1R, SIRT1, and FOXOs pathways—an intriguing interaction platform for bone and osteosarcoma. *Front Endocrinol* 2019; 10: 93.
 31. Demory ML, Boerner JL, Davidson R, Faust W, Miyake T, Lee I, et al. Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 36592-604.
 32. Zhou M, Ning N, Jiang Y, Aschner M, Huang X, Bin X, et al. Correlation of ADIPOQ Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Bone Strength Index in Middle-Aged and the Elderly of Guangxi Mulam Ethnic Group. *Intl J Environ Res Public Health* 2021; 18:13034.
 33. Weiss RE, Refetoff S. Effect of thyroid hormone on growth: lessons from the syndrome of resistance to thyroid hormone. *Endocrinol Metab Clin* 1996; 25: 719-30.
 34. Williams GR. Thyroid hormone actions in cartilage and bone. *Eur Thyroid Journal* 2013; 2: 3-13.
 35. Zhang J, Valverde P, Zhu X, Murray D, Wu Y, Yu L, et al. Exercise-induced irisin in bone and systemic irisin administration reveal new regulatory mechanisms of bone metabolism. *Bone Res* 2017; 5: 1-14.
 36. Kim H, Wrann CD, Jedrychowski M, Vidoni S, Kitase Y, Nagano K, et al. Irisin mediates effects on bone and fat via αV integrin receptors. *Cell* 2019; 178: 507-8.
 37. Hajibabaie F, Abedpoor N, Assareh N, Tabatabaiefar MA, Shariati L, Zarrabi A. The importance of SNPs at miRNA binding sites as biomarkers of gastric and colorectal cancers: a systematic review. *J Pers Med* 2022; 12: 456.
 38. Hajibabaie F, Kouhpayeh S, Mirian M, Rahimmanesh I, Boshtam M, Sadeghian L, et al. MicroRNAs as the actors in the atherosclerosis scenario. *J Physiol Biochem* 2020; 76: 1-12.
 39. Yu C, Li L, Xie F, Guo S, Liu F, Dong N, et al. LncRNA TUG1 sponges miR-204-5p to promote osteoblast differentiation through upregulating Runx2 in aortic valve calcification. *Cardiovasc Res* 2018; 114: 168-79.
 40. Liang S, Zhang S, Wang P, Yang C, Shang C, Yang J, et al. LncRNA, TUG1 regulates the oral squamous cell carcinoma progression possibly via interacting with Wnt/ β -catenin signaling. *Gene* 2017; 608: 49-57.
 41. Xiang S, Zou P, Tang Q, Zheng F, Wu J, Chen Z, et al. HOTAIR-mediated reciprocal regulation of EZH2 and DNMT1 contribute to polyphyllin I-inhibited growth of castration-resistant prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2018; 1862: 589-99.
 42. Chen J, Shen Z, Zheng Y, Wang S, Mao W. Radiotherapy induced Lewis lung cancer cell apoptosis via inactivating β -catenin mediated by upregulated HOTAIR. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 7878-86.
 43. Yang W, Ning N, Jin X. The lncRNA H19 promotes cell proliferation by competitively binding to miR-200a and derepressing β -catenin expression in colorectal cancer. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 2767484.
 44. Ohtsuka M, Ling H, Ivan C, Pichler M, Matsushita D, Goblirsch M, et al. H19 noncoding RNA, an independent prognostic factor, regulates essential Rb-E2F and CDK8- β -catenin signaling in colorectal cancer. *EBio-Medicine* 2016; 13: 113-24.
 45. Li B, Zhao J, Ma J-x, Li G-m, Zhang Y, Xing G-s, et al. Overexpression of DNMT1 leads to hypermethylation of H19 promoter and inhibition of Erk signaling pathway in disuse osteoporosis. *Bone* 2018; 111: 82-91.

Original Article

The Effect of Eight Weeks of Dorema Aucheri Extract Consumption and Aerobic Exercise on the Expression of Genes Involved in Bone Tissue Metabolism in Hypothyroid Mice

Bakhti M¹ , Taghian F¹ , Jalali Dehkordi Kh¹ , Mirsafaei Rizi R² 

¹Department of Sports Physiology, Faculty of Sports Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. ²Department of Sports Injuries, Faculty of Sports Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, I.R. Iran.

e-mail: ft.taghian@gmail.com

Received: 22/01/2023 Accepted: 17/04/2023

Abstract

Introduction: Bone metabolic disorders are complex abnormalities that result from multiple factors, including genetic and environmental factors such as nutrition and physical activity. This study aimed to investigate the effects of aerobic exercise and Dorema Aucheri (DA) extract on the expression of genes involved in bone tissue metabolism under hypothyroid conditions. **Materials and Methods:** Thirty female C57BL/6 mice, aged 6-7 weeks, were divided into five groups: 1. Hypothyroidism, 2. Hypothyroid with DA extract (0.4 mg/kg administered by gavage for eight weeks), 3. Hypothyroidism with aerobic exercise, 4. Hypothyroidism with DA extract and aerobic exercise, 5. Control. Hypothyroidism was induced by intraperitoneal injection of propylthiouracil (8 mg/kg) for one month. The genes involved in bone metabolic disorders affected by hypothyroidism were identified using bioinformatics databases and analysis. Aerobic exercise was performed at a moderate to high intensity (45 minutes, zero inclines, 25 meters per minute). Gene expression was assessed using the quantitative Real-Time PCR method. **Results:** Based on the results of the bioinformatics analysis, the genes RUNX2, PGC1OSX, PPAR- γ , SIRT1, MAPK3, and OPG were identified and investigated. In the hypothyroidism group compared to the control group, the expression of OPG and RUNX2 increased, while the expression of OSX decreased. Also, the expression of PGC1 α , SIRT1, MAPK3, and PPAR- γ decreased under hypothyroid conditions ($p < 0.001$). Treatment with DA extract and aerobic exercise significantly increased the expression levels of SIRT1, MAPK3, PGC1 α , and PPAR- γ ($p < 0.001$). **Conclusion:** DA extract and aerobic exercise have the potential to modulate the genetic network of bone metabolism and exert a positive regulatory effect on it.

Keywords: Hypothyroidism, Bone metabolic diseases, Dorema Aucheri extract, Aerobic exercise, Bioinformatics