



تغییر ژن‌های ESR و IGFBP1 بافت تخمدان موش‌های مدل اندومتریوز متعاقب یک دوره تمرینات منظم ورزشی و مصرف ویتامین E

فاطمه شهیدیان اکبر: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران
پروین فرزنانگی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران (*نویسنده مسئول) parvin.farzanegi@gmail.com
هاجر عباس‌زاده: استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

شنا،

ویتامین E،

ژن IGFBP1،

آندومتریوز

زمینه و هدف: هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی تغییرات بیان ژن ESR و IGFBP1 موش‌های مدل اندومتریوز به دنبال یک دوره تمرین هوازی و مصرف ویتامین E بود.

روش کار: در این تحقیق تجربی ۲۵ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار پس از ایجاد مدل آندومتریوز به صورت تصادفی به ۵ گروه کنترل سالم، آندومتریوز+ویتامین E، آندومتریوز+تمرین، آندومتریوز+تمرین+ویتامین E دسته‌بندی شدند. میزان مصرف ویتامین، ۲۰۰ mg/kg به ازای وزن بدن هر موش بوده و برنامه تمرین شنا به مدت ۸ هفته و هر هفته پنج روز و هر روز به مدت ۳۰ دقیقه بود. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه استفاده گردید.

یافته‌ها: یافته‌ها حاکی از آن بود که بیشترین بیان ژن ESR و IGFBP1 در گروه آندومتریوز+تمرین+ویتامین E و کمترین سطوح آن در گروه آندومتریوز مشاهده شد. مقایسات بین گروهی نشان داد که اختلاف معنی‌داری میان گروه آندومتریوز با گروه‌های آندومتریوز+تمرین، آندومتریوز+ویتامین E و آندومتریوز+تمرین+ویتامین E در بیان ژن ESR وجود دارد ($p=0/006$ ، $p=0/026$ ، $p=0/035$ ، به ترتیب). همچنین اختلاف معنی‌داری میان گروه آندومتریوز با گروه‌های آندومتریوز+تمرین و آندومتریوز+تمرین+ویتامین E و نیز بین گروه‌های آندومتریوز+تمرین+ویتامین E با گروه‌های آندومتریوز+تمرین و آندومتریوز+ویتامین E در بیان ژن IGFBP1 مشاهده شد ($p=0/019$ ، $p=0/046$ ، $p=0/002$ ، $p=0/022$ ، به ترتیب).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که تغییر مولکول‌های کلیدی یا مسیرهای سیگنالی و بیان ژن در فرایند آندومتریوز می‌تواند باعث بهبود سطح این بیماری گردد و انجام فعالیت ورزشی منظم هوازی و نیز مصرف هم‌زمان ویتامین E در مهار این بیماری و بهبود سطح این بیماری کمک شایانی می‌کند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Shahidian Akbar F, Farzanegi P, Abbaszadeh H. Evaluation of ESR and IGFBP1 genes of ovarian tissue of endometriosis model mice after a period of regular exercise and vitamin E intake. Razi J Med Sci. 2020;27(3):38-48.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

Evaluation of ESR and IGFBP1 genes of ovarian tissue of endometriosis model mice after a period of regular exercise and vitamin E intake

Fatemeh Shahidian Akbar, PhD student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Parvin Farzanegi, Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran (*Corresponding author) parvin.farzanegi@gmail.com

Hajar Abbaszadeh, Assistant Associate Professor, Exercise Physiology Department, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Abstract

Background: The aim of this study was to investigate the ESR and IGFBP1 gene expression changes in endometriosis model rats following a period of aerobic exercise and vitamin E intake.

Methods: In this experimental study, 25 adult Wistar rats were randomly divided into 5 groups of healthy control, endometriosis, endometriosis+ exercise, endometriosis+ vitamin E, endometriosis+ vitamin E+ exercise after creating endometriosis model. Vitamin intake was 200 mg/kg per rat body weight and swimming program was 8 weeks, five days a week for 30 minutes each day. One-way ANOVA test were used for data analysis.

Results: The results showed that the highest expression of ESR and IGFBP1 gene was observed in endometriosis+ exercise+ vitamin E group and the lowest levels in endometriosis group. Intergroup comparisons showed that there was a significant difference between endometriosis and endometriosis+exercise, endometriosis+vitamin E and endometriosis+exercise+vitamin E groups in ESR gene expression ($p=0.0016$, $p=0.026$, $p=0.0335$, respectively). There was also a significant difference between endometriosis group with endometriosis+exercise and endometriosis+exercise+vitamin E and also between endometriosis+exercise+ vitamin E groups with endometriosis+exercise and endometriosis+vitamin E groups in IGFBP1 gene expression ($p=0.0019$, $p=0.0446$, $p=0.002$, $p=0.0222$, respectively).

Conclusion: In general, the results of this study indicated that alteration of key molecules or signaling pathways and gene expression in endometriosis can improve the level of this disease and regular aerobic exercise as well as concomitant use of Vitamin E can help prevent and improve this disease.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Keywords

Swimming,
Vitamin E,
Insulin-Like Growth
Factor Binding Protein 1,
Endometriosis

Received: 04/01/2020

Accepted: 25/04/2020

Cite this article as:

Shahidian Akbar F, Farzanegi P, Abbaszadeh H. Evaluation of ESR and IGFBP1 genes of ovarian tissue of endometriosis model mice after a period of regular exercise and vitamin E intake. Razi J Med Sci. 2020;27(3):38-48.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.



می‌شود (۸). نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات همبستگی ژنوم (Genome Wide Association Study -GWAS) حاکی از وجود ارتباط میان پلی‌مورفیسم‌های متعدد و شانس ابتلا به این بیماری می‌باشد (۹). ESR گیرنده عمده در رحم بزرگسالان است و قسمت بیشتر اثرات استروژن از طریق این گیرنده اعمال می‌شود. قسمت اعظم اثرات استروژن همچون تحریک پرولیفراسیون و همچنین تحریک بیان گیرنده پروژسترون توسط این گیرنده اعمال می‌شوند (۱۰). در پژوهشی توسط ایکسو و همکاران ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن ESR و اندومتريوز مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج حاصل نشان‌دهنده وجود ارتباط معنادار میان این پلی‌مورفیسم و استعداد به اندومتريوز بود (۱۱). از سوی دیگر گزارش شده که در طی پیشرفت آندومتريوز، آندومتر با اختلال در تنظیم تعدادی از ژن‌های پاسخ‌دهنده پروژسترون مانند پروتئین-۱ متصل به عامل رشد انسولینی به عمل پروژسترون مقاوم می‌شود. نشان داده شده که IGFBP-1 یک نشانگر اصلی برای تنظیمات احتمالی تجزیه مجدد (رمزگشایی) سلول استروما در حیوانات می‌باشد. برای مثال، سلول‌های استرومای آندومتر جدا شده از بابون‌ها با آندومتريوز افزایش بیان IGFBP-1 پس از درمان تجزیه مجدد (رمزگشایی) را نشان داده است، و این نشانگر پاسخ بیش از حد به تجزیه مجدد (رمزگشایی) است. در مقابل، سلول‌های استرومای آندومتر انسان از زنان بیمار ترشح IGFBP-1 را کاهش داده است. هر دو این مطالعات نشان می‌دهد که یک پاسخ تجزیه مجدد (رمزگشایی) تغییر یافته در سلول‌های استرومای آندومتر از بیماران آندومتريوم وجود دارد (۱۲). غلظت این پروتئین در زنان بالاتر از مردان است (۱۳). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که بین ESR و سطوح IGFBP1 در وضعیت التهابی ارتباط وجود دارد (۱۴). درمان‌های مختلفی برای بیماری آندومتريوز بررسی شده است. برای مثال، برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که درمان‌های سنتی، می‌تواند پیامدهای فیزیولوژیک و روانی منفی برای مبتلایان به این بیماری همراه داشته

اندومتريوز یک بیماری مزمن و یک علت شایع درد مزمن لگنی است که در ۱۵-۵ درصد زنان سنین باروری رخ می‌دهد (۱). با یک نگاه وسیع‌تر، اندومتريوز یک بیماری سیستمیک اندوکراین، ایمونولوژیک و گوارشی است (۲). هنوز مشخص نیست چرا در برخی زنان، نشانه‌های شدید بیماری بروز می‌کند و برخی دیگر بدون علامت باقی می‌مانند و در ضمن علت بیماری نیز هنوز مشخص نشده است. تشخیص این بیماری حتی با وجود درد شدید ممکن است تا چند سال تأخیر بیفتد (۳). در پاتوژنز بیماری آندومتريوز ژن‌های مختلف و بیان آن‌ها نیز درگیر هستند. تاکنون ژن‌های متعددی در ارتباط با این بیماری شناسایی شده‌اند، و از میان آن‌ها ژن‌های مربوط به گیرنده‌های هورمون‌های جنسی از اهمیت بیشتری در این زمینه برخوردار می‌باشند. از آنجا که زنان به‌طور عمده در سنین باروری به این بیماری مبتلا می‌شوند و بعد از یائسگی و برداشتن تخمدان‌ها میزان ابتلا به آن کاهش می‌یابد؛ از این‌رو به نظر می‌رسد این بیماری با استروژن مرتبط باشد (۴).

تنظیم کننده اصلی عملکرد رحم استروژن‌ها و پروژسترون هستند که از طریق گیرنده‌های هسته‌ای خاص خود عمل می‌کنند (۵). پیام‌رسانی سلولی استروژن‌ها از طریق گیرنده استروژن یعنی گیرنده استروژن آلفا و گیرنده استروژن بتا صورت می‌گیرد. هر دو گیرنده استروژن متعلق به خانواده‌ای از فاکتورهای رونویسی به نام خانواده گیرنده هسته‌ای می‌باشند که در آندومتر بیان می‌شوند ولی میزان بیان آن‌ها در فازهای قاعدگی متفاوت است (۶). با توجه به اینکه پیام‌رسانی سلولی استروژن‌ها توسط گیرنده استروژن یعنی ESR صورت می‌گیرد، از این‌رو می‌توان از این ژن به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندید مرتبط با آندومتريوز نام برد. این ژن بر روی ناحیه کروموزومی 6q25.1 قرار داشته و طول آن حدود ۴۵۰ کیلوباز است (۷). این ژن کدکننده پروتئین گیرنده استروژن آلفا می‌باشد که این محصول ژنی موجب تحریک رشد سلول‌های آندومتر

باشد. دیده شده که این درمان‌ها کیفیت زندگی، ظرفیت هوازی افراد بیمار را به‌طور کامل تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. پژوهشگران بر این باورند که فعالیت ورزشی ممکن است از طریق سازوکارهایی بتواند درد ناشی از بیماری را کاهش دهد (۱۵). برخی از این سازوکارها به وزن بدن، شاخص توده بدن، عوامل رشد شبه انسولینی و پروتئین‌های متصل به آن، انسولین، هورمون جنسی، استرادیول، استروژن و بهبود سطح رادیکال‌های آزاد و تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه بهبود سطوح عوامل اکسایشی مربوط است (۱۶). آثار فعالیت بدنی بر سطوح استراحتی IGFBP1 و ESR به‌طور کامل مشخص نشده است. مطالعات نشان داده است که فعالیت بدنی، افزایش در سطوح IGFBP1 را تحریک می‌کند (۱۶ و ۱۷). اگرچه در تعدادی از مطالعات این افزایش در سطوح IGFBP1 به دنبال فعالیت بدنی مشاهده نشده است (۱۸ و ۱۹)، ولیکن باید توجه داشت که اثر فعالیت بدنی بر این دو پروتئین در وضعیت بیماری اندومتريوز تاکنون صورت نگرفته و مکانیسم تغییرات آن‌ها نیز به‌طور کامل مشخص نیست. نتایج تحقیقات ورزشی بیانگر آن است که تغییرات سطوح IGF در گردش خون با مجموعه‌ای پروتئین‌های اتصال‌ی IGFBP1 تا ۶ پیوند می‌خورد و فعالیت زیستی و دسترسی زیستی آن را تنظیم می‌کنند. IGFBP1 یک تنظیم‌کننده موضعی فعالیت IGF با تنظیم پویایی سریع است و توسط انسولین تنظیم کاهشی می‌یابد (۱۵). با این وجود تغییرات سطوح IGFBP1 و ESR در وضعیت التهابی به‌طور کامل مشخص نیست. از سوی دیگر، شواهد نشان می‌دهد که بیماران مبتلا به اندومتريوز دارای سطوح بالاتر استرس اکسایشی و سایتوکین‌های التهابی و پیش‌التهابی می‌باشند (۲۰). محققان جهت کاهش این علائم، افزایش روند بهبودی و کیفیت زندگی بیماران، مطالعات انجام مداخلات مناسب را مورد تأکید قرار دارند. مطالعات نشان دادند مصرف مکمل‌های غذایی و ویتامین‌هایی نظیر ویتامین E مقدار استروژن را در بدن کنترل می‌کنند و به کاهش علائم اندومتريوز کمک می‌کنند (۲۱). اگرچه به‌تازگی پژوهش‌هایی فعالیت ورزشی و مکمل‌های ویتامینی در وضعیت بیماری‌های التهابی انجام شده است، اما پژوهشی که آثار فعالیت ورزشی و مصرف ویتامین E را بر تغییرات ژن‌های ESR

روش کار

در این تحقیق تجربی تعداد ۲۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار ۶ تا ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی $202/85 \pm 15/62$ گرم از انستیتو پاستور خریداری شدند. حیوانات در محیطی با میانگین دمای $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات نگهداری شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین‌المللی سلامت و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد (۲۲).

حیوانات از غذای پلت و آب که به صورت آزاد در اختیار قرار می‌گرفت، تیمار شدند. غذای مصرفی حیوانات با توجه به وزن کشتی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داشت. به منظور ایجاد مدل اندومتريوز، ابتدا رت‌های بالغ با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش شدند. پس از آن، ناحیه شکمی در طرف راست با بتادین تمیز شد. سپس با استفاده از تیغ بیستوری شکافی در پوست ناحیه پهلو در بخش لگنی داده شد. پس از باز کردن عضله شکمی و ناحیه صفاق، ابتدا، بافت تخمدانی به همراه بخشی از بافت لوله رحمی برداشته شد. سپس در داخل ظرف استریل با یک سی‌سی (Phosphate) PBS (Buffer Solution) قرار داده شد. سپس هر بافت به یک قطعه یک در یک در یک میلی‌متر بریده شد. قطعات بافتی که برای هر موش ۴ قطعه بود به ناحیه دیواره عضلانی لگنی سمت راست، به ناحیه صفاق شکمی، به ناحیه عضله قدامی دیواره شکمی و چربی اطراف تخمدان پیوند زده شدند. سپس ناحیه جراحی شده بخیه شدند و موش‌ها به قفس مربوطه انتقال داده

جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase Ifermentas قرار گرفت. علاوه بر این، جهت ارزیابی یکپارچگی RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز استفاده گردید. جهت استخراج RNA ابتدا به بافت بیضه ۲۰۰-۳۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در کرایوتیوب را در حالت نیمه انجماد توسط سرسمپلر خرد کرده، سپس کمی آن را پیپتاژ گردید. سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفورم اضافه شد تا سلول‌ها لیز شود. این محلول حدود ۱ دقیقه باید با سلول‌ها در تماس بود. پس از ۱ دقیقه محلول را با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول به سه فاز تقسیم شد: قسمت بالایی لوله که شفاف و حاوی RNA بود. قسمت وسطی لوله که سفید رنگ و محتوی بافت لیز شده بود. قسمت پایینی لوله که صورتی و حاوی کیازول بود. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده، قرار داده شد. پس ۱ سی سی ایزوپروپانول را بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. ایزوپروپانول شفاف بوده و RNA نیز شفاف می‌باشد اما وقتی این دو با هم مخلوط شوند مایع کدری را به وجود می‌آورند. پس از افزودن ایزوپروپانول نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سی سی الکل ۷۰ اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرسمپلر پیپتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار داده شد. همچنین جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر OligodtMWG-Biotech, Germany و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (شرکت فرمنتاز Fermentas) استفاده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. هر واکنش PCR با استفاده از SYBER PCR master mix Applied Biosystems و SYBER

شدند. پس از القا مدل در هر گروه موش‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه کنترل سالم (۵ سر)، اندومتريوز (۵ سر)، اندومتريوز + ویتامین E (۵ سر)، اندومتريوز + تمرین (۵ سر)، اندومتريوز + تمرین + ویتامین E (۵ سر) تقسیم شدند. گروه کنترل اندومتريوز، دو هفته بعد از ایجاد مدل تا پایان مطالعه (مدت ۸ هفته) باقی ماندند و گروه کنترل سالم به مدت ۸ هفته نگهداری شدند و گروه کنترل اندومتريوز + مکمل ویتامین E دو هفته بعد از ایجاد مدل شروع به دریافت مکمل به صورت روزانه و به شکل گاوژ به میزان ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش تا پایان مطالعه به مدت ۸ هفته نگهداری شدند. موش‌های صحرایی گروه‌های اندومتريوز + تمرین هم، دو هفته بعد از ایجاد مدل، قبل از شروع پروتکل اصلی، به مدت یک هفته (۵ روز) هر بار به مدت مدت ۲۰ دقیقه به منظور آشنایی‌ها با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، در داخل استخر آب قرار می‌گرفتند. سپس ۵ روز در هفته تا پایان دوره تحقیق در یک مخزن آب به ابعاد ۵۰×۵۰×۱۰ سانتی‌متری با درجه حرارت ۳۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد در طی ۸ هفته به شنا پرداختند. مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود. جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه‌برداری از حیوانات پس از ۴۸ ساعت بعد از آخرین برنامه تمرینی شنا انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۳۰-۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵-۳ میلی گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش و سپس کشته شدند و پس از کشتار بافت تخمدان جهت بررسی مطالعات ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱). برای این منظور نمونه‌های بافتی به فرمالین ۱۰ درصد و نمونه‌های مربوط به بررسی بیان ژن به تانک ازت منتقل شدند. برای بررسی بیان ژن‌های ESR و IGFBP1 در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از تکنیک RT-qPCR جهت تایید بیان ژن‌های مورد مطالعه به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیازول، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن (CinnaGen) استخراج شد و

توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک و برای تعیین تجانس واریانس از آزمون لون استفاده شد. سپس با توجه به طبیعی بودن نحوه توزیع داده‌ها از آزمون پارامتریک شامل آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری $p \leq 0.05$ برای بررسی تغییرات بیان ژن ESR و IGFBP1 استفاده شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 8 انجام شد.

یافته‌ها

نتایج جدول ۱ بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بیان ژن ESR در بین گروه‌های مختلف پژوهش است ($p < 0.0001$). مقایسات بین گروهی نیز نشان داد که بین گروه اندومتريوز+تمرین، با گروه‌های اندومتريوز+ویتامین E و اندومتريوز+تمرین+ویتامین E ($p = 0.1914$, $p = 0.9094$ ، به ترتیب) و نیز بین گروه اندومتريوز+ویتامین E با اندومتريوز+تمرین+ویتامین E ($p = 0.2325$) تفاوت معنی‌داری در بیان ژن ESR نبود (شکل ۱). اما اختلاف معنی‌داری میان گروه اندومتريوز با گروه‌های اندومتريوز+تمرین، اندومتريوز+ویتامین E و اندومتريوز+تمرین+ویتامین E مشاهده گردید ($p = 0.0016$ ، $p = 0.026$ ، $p = 0.0335$ ، به ترتیب، شکل ۱). همچنین نتایج جدول ۱ تفاوت معنی‌داری در بیان ژن IGFBP1 در گروه‌های مختلف نشان داده شده است ($p < 0.0001$). تفاوت معنی‌داری در بیان ژن IGFBP1 بین گروه اندومتريوز+ویتامین E با گروه‌های اندومتريوز و اندومتريوز+تمرین نبود ($p = 0.1697$ ، $p = 0.3044$ ، به ترتیب، شکل ۲). اما اختلاف معنی‌داری میان گروه اندومتريوز با گروه‌های اندومتريوز+تمرین و اندومتريوز+تمرین+ویتامین E و نیز بین گروه‌های اندومتريوز+تمرین+ویتامین E با گروه‌های اندومتريوز+تمرین و اندومتريوز+ویتامین E مشاهده گردید ($p = 0.0019$ ،

Applied Biosystems, Sequences در دستگاہ Green ABI Step) Detection Systems. Foster City, CA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول زیر:

$$R = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}})_{\text{Time X}} - (CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}})_{\text{Time 0}}$$

منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن با استفاده از حداقل ۵ غلظت لگاریتمی به ترتیب رقیق شونده از کنترل مثبت هر ژن رسم گردید. میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target}}}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta CT_{\text{reference}}}}$$

$$(\Delta CT_{\text{reference}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treatment}}, \Delta CT_{\text{target}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treatment}})$$

در فرمول فوق E معرف Efficiency است و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای ژن به دست می‌آید (۲۳). بعد از تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌های بافتی، برای توصیف کمی داده‌ها از شاخص‌های آمار

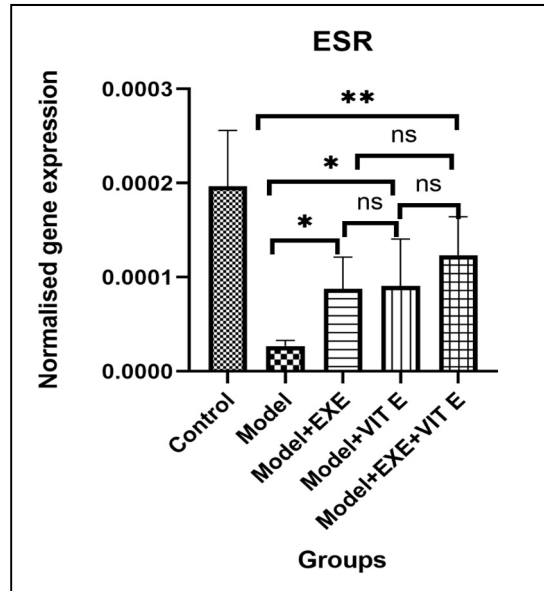
جدول ۱- نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه برای میزان بیان ژن‌های ESR و IGFBP1

آماره	F	df	p
بیان ژن ESR	۱۰/۸۷	(۴، ۲۰)	* < 0.0001
بیان ژن IGFBP1	۱۰/۳۴	(۴، ۲۰)	* < 0.0001

بحث و نتیجه گیری

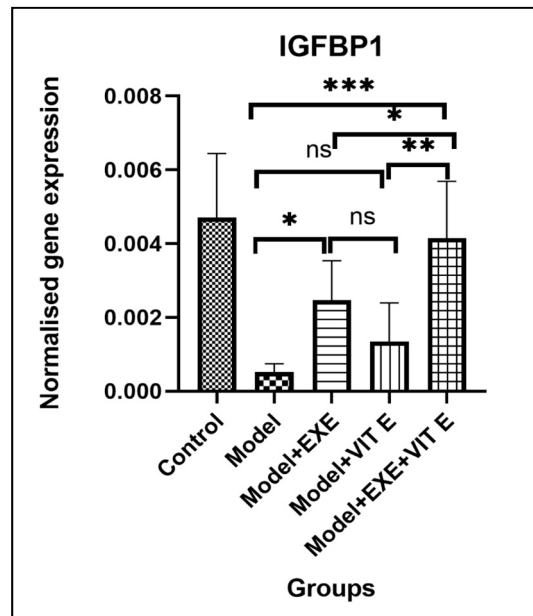
در تحقیق حاضر تأثیر یک دوره برنامه تمرین شنا با شدت پایین به همراه مصرف ویتامین E بر بیان ژن ESR و IGFBP1 در موش‌های مدل اندومتريوز مورد

شکل ۱- مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن ESR که به وسیله Real time PCR مشخص شد. گروه کنترل-سالم (Control)، گروه اندومتريوز (Model)، گروه اندومتريوز+ تمرین (Model+EXE)، گروه اندومتريوز+ ویتامین E (Model+VIT E)، اندومتريوز+ تمرین+ ویتامین E (Model+EXE+VIT E). تفاوت معنی‌داری در سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن ESR در گروه‌های با علامت * وجود داشت (***: $p < 0.0001$; **: $0.0001 < p < 0.05$; ns: no significant).



شکل ۱- مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن ESR که به وسیله Real time PCR مشخص شد.

گروه کنترل-سالم (Control)، گروه اندومتريوز (Model)، گروه اندومتريوز+ تمرین (Model+EXE)، گروه اندومتريوز+ ویتامین E (Model+VIT E)، اندومتريوز+ تمرین+ ویتامین E (Model+EXE+VIT E). تفاوت معنی‌داری در سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن ESR در گروه‌های با علامت * وجود داشت (***: $p < 0.0001$; **: $0.0001 < p < 0.05$; ns: no significant).



شکل ۲- مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن IGFBP1 که به وسیله Real time PCR مشخص شد.

گروه کنترل-سالم (Control)، گروه اندومتريوز (Model)، گروه اندومتريوز+ تمرین (Model+EXE)، گروه اندومتريوز+ ویتامین E (Model+VIT E)، اندومتريوز+ تمرین+ ویتامین E (Model+EXE+VIT E). تفاوت معنی‌داری در سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن ESR در گروه‌های با علامت * وجود داشت (***: $p < 0.0001$; **: $0.0001 < p < 0.05$; ns: no significant).

تحریک شده است (۱۳). بنابراین غلظت IGFBP1 در گردش منعکس‌کننده ترکیب اثر مهارکنندگی انسولین، درجه حساسیت به انسولین کبدی و عملکردهای تحریکی مختلف است (۱۵). افزایش IGFBP1 در اثر ورزش، ممکن است در پاسخ به کاهش سطح انسولین و گلوکز خون باشد. هاپکینز و همکاران در مطالعات خود نقش IGFBP1 را در زمان ورزش و واکنش آن در پاسخ به ورزش طولانی‌مدت مورد بررسی قرار دادند. برخلاف انتظار، اگر چه سرعت افزایش IGFBP1 کاهش یافت، اما افزایش معنی‌داری در حدود ۵ برابر در مقدار IGFBP1 مشاهده شد. آن‌ها چنین استنباط کردند که ورزش به تنهایی و جدا از انسولین و گلوکز، قادر است ترشح IGFBP1 را تنظیم کند (۲۹). به علاوه این فرض نیز وجود دارد که زمان ورزش، IGFBP1 ممکن است قبل از آنکه فعالیت IGF-I متوقف سازد، با عمل خود حمل IGF-I را به عضله تسهیل کند و این کار موجب افزایش تحریک IGF-I برای دریافت گلوکز گردد. به هر حال، نتایج چندین مطالعه در شرایط آزمایشگاهی نشان داده که IGFBP1 می‌تواند فعالیت IGF-I را در سطح سلولی افزایش دهد (۳۰). طی فعالیت ورزشی، به نظر می‌رسد عامل بازدارنده ترشح IGFBP1 به دلیل کاهش سطح انسولین و گلوکز از بین می‌رود و این مسئله موجب افزایش سطح IGFBP1 می‌شود (۱۹). تغییر در سطوح در گردش IGFBP1 نیز ممکن است در تغییرات دسترسی IGFs در طول تمرین و فعالیت ورزشی دخیل باشد (۱۸). تصور می‌شود IGFBP1 تعدیل‌کننده‌ی عمده‌ی دسترسی زیستی IGF-I در دوره‌های کوتاه باشد و به‌وسیله چندین عامل شامل انسولین، گلوکوکورتیکوئیدها، عوامل دارای اثرات موافق cAMP و GH تنظیم می‌شود (۳۰). IGFBP1 در پاسخ به فعالیت هوازی زیاد دور از انتظار نبود، چرا که این جزء از دستگاه IGF-I بیشتر به واسطه بهم‌ریختگی‌های سوخت و سازی که جریان یا تعادل انرژی را دگرگون می‌سازند، تحت تأثیر قرار می‌گیرد. گاهی فعالیت‌های طولانی چند ساعته یا دوره‌های چند روزه از فعالیت، نیاز است تا پاسخ IGFBP1 ظاهر شود. با این حال تغییر در غلظت‌های این پروتئین در پاسخ به فعالیت ورزشی گزارش شده است (۲۵). از سوی دیگر اغلب تحقیقاتی که نوسانات سطوح IGFBP1 را به دنبال فعالیت ورزشی

بررسی قرار گرفت. از نتایج مهم تحقیق حاضر کاهش معنادار سطوح ESR و IGFBP1 موش‌های مدل اندومتريوز نسبت به گروه سالم می‌باشد که مداخله ورزش سطح آن افزایش معنادار نسبت به گروه بیمار داشت. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه برخی از محققین که در تحقیق خود اظهار داشتند بیماری آندومتريوز منجر به تغییر بیان ژن خانواده ESR و IGFBP1 می‌گردد، همسو است (۲۴ و ۲۵). همچنین برخی از مطالعات که نشان دادند که انجام فعالیت بدنی منجر به افزایش سطح بیان ژن ESR و IGFBP1 می‌شود، هم‌راستا می‌باشد (۲۴ و ۲۶).

ژن ESR روی بازوی بلند کروموزوم ۶ قرار دارد و حاوی ۸ اگزون است. محصول این ژن، ایزوفرم α از ایزوفرم‌های معروف گیرنده‌های استروژن است. این گیرنده به عنوان فاکتورهای رونویسی داخل هسته‌ای از طریق تنظیم بیان انواعی از ژن‌ها از جمله ژن‌های دخیل در بلوغ و تکامل اندام‌های تولید مثلی در کنترل فرایند مسیر پیچیده زیستی نقش ایفا می‌کند (۲۴). این ژن به عنوان یکی از پلی‌مورفیک‌ترین ژن‌ها شناخته شده است، به طوری که در مطالعات انجام شده بیش از ۲۲۰۰ پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی از این ژن گزارش شده است (۲۷). مطالعه این ژن و گیرنده‌های استروژن موضوع مهمی است که به ایجاد روش‌های درمانی کارآمد برای بیماری‌های رحمی کمک می‌کند. اسمیت و همکاران نقش پلی‌مورفیسم ژن ESR در ایجاد مقاومت به استروژن و کاهش تراکم استخوان را گزارش کردند و اظهار داشتند که تغییر در کیفیت زندگی از جمله پرداختن فعالیت‌های بدنی، کنترل تغذیه بر روی این ژن اثرگذار است (۲۸)؛ چرا که دیگر محققان مانند لیو و همکاران این ژن را به عنوان یک فاکتور مهم در استعداد به بیماری‌های التهابی و ناباروری معرفی کردند (۲۴). ایزوفرم α این گیرنده در اکثر بافت‌های بدن حضور دارد و بیان بیشتر آن در بافت‌های تولید مثلی پس فعالیت بدنی نشانگر بهبود وضعیت بیماری‌های مرتبط با رحم دارد (۲۷). از سوی دیگر، IGFBP1 در درجه اول از سلول‌های کبدی ترشح می‌شود جایی که سنتز توسط انسولین مهار شده و توسط چند تنظیم‌کننده از جمله گلوکاگن، استروژن، گلوکوکورتیکوئیدها و سایتوکین‌های پیش‌التهابی

گزارش کرده‌اند از فعالیت‌های طولانی یا تلفیق شده با فشارهای سوخت‌وسازی (مثل محدودیت یا محرومیت غذایی) استفاده نموده‌اند (۲۶). بر این اساس، می‌توان استنباط کرد که وضع تغذیه‌ی و شرایط سوخت‌وسازی بیان IGFBP1 را مستقل از فعالیت ورزشی تنظیم می‌کنند. احتمالاً IGFBP1 از برهم کنش IGF-I با گیرنده‌های نوع I در عضله پس از فعالیت ورزشی جلوگیری می‌کند و از این طریق در تنظیم قندی درگیر است (۱۸). فعالیت ورزشی هوازی به پاسخ اجزای ترکیبی دستگاه IGF-I منجر می‌شود که به شکل تغییر در غلظت‌های آن قابل اندازه‌گیری و مشاهده است؛ اما این پاسخ بسته به سطح آمادگی می‌تواند هم در جهت و هم در اندازه بین افراد مختلف متفاوت باشد. به علاوه، شدت فعالیت ورزشی عامل تعیین‌کننده‌ای برای تحریک پاسخ جزء‌جزء این شبکه و بزرگی آن است. مضاف بر این که گاهی برای رؤیت تغییرات قابل توجه برخی از اجزای این دستگاه (مثل IGFBP1) لازم است فعالیت ورزشی به اندازه کافی طولانی باشد تا پاسخ فیزیولوژیک تحریک گردد (۱۸).

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که یک دوره برنامه‌تربینی شنا با شدت پایین به همراه مصرف ویتامین E منجر به افزایش سطح ESR و IGFBP1 نسبت به گروه بیمار گردید. گیامپولینو و همکاران در یک مطالعه مروری به بررسی ارتباط بین ویتامین‌ها و بیماری اندومتریوز پرداختند و نشان دادند که بین گروه ویتامین‌ها و بهبودی بیماری اندومتریوز رابطه مستقیمی برقرار است و ویتامین خانواده گروه E منجر به تسکین درد و بهبود ضایعه آندومتریوتیک در مدل‌های آزمایشگاهی و کاهش علائم این بیماری می‌شود (۳۱). تحقیقات نشان دادند که رژیم غذایی سرشار از میوه‌ها، سبزیجات و دانه غلات در پیشگیری از رشد و متاستاز اندومتریوز نقش دارند (۳۲). ویتامین گروه E نقش مهمی در پیشگیری و درمان آن از طریق تعدیل مسیرهای سیگنالی سلولی دارد (۳۳). ویتامین E عامل ضد التهابی قوی و ضد جهش و تقویت‌کننده عصب شناخته شده است (۳۱) که از طریق فعال‌سازی ژن سرکوب‌کننده تومور، غیرفعال‌سازی رگ‌زایی و فعال‌سازی ژن ضد التهابی و القاء آپوپتوز موجب مهار پیشرفت تومورهای این بیماری و مانع بسیاری از

تغییرات پاتولوژیکی می‌شود که در پاسخ به نفوذ سلول‌های التهابی ایجاد می‌شود (۳۲). ویتامین E چون خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد بعد از تمرینات ورزشی باعث بازسازی سریع سلول‌های تخریب شده از ورزش می‌شود و باعث می‌شود که بدن انسان بتواند مواد مغذی حل شده در چربی را جذب کند و باعث گشادی رگ‌ها شده و منجر به روان کردن جریان خون گردد. این تصور وجود دارد که افزایش در ESR و IGFBP1

پس از فعالیت ورزشی به همراه مصرف ویتامین E ممکن است به واسطه اتصال به IGF-I آزاد پلازما باشد (۳۴). برای همین، این فرضیه که افزایش سطوح این ژن‌ها در طول فعالیت ورزشی به همراه مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش در محتوای گلیکوژن کبدی مرتبط است را مطرح ساختند، زیرا این ویتامین دارای آنتی‌اکسیدان‌هایی است که با تقویت سیستم ایمنی بدن انسان، مقاومت در برابر بیماری‌های التهابی را افزایش می‌دهند. این فرضیه توضیح می‌دهد که چرا علی‌رغم حفظ سطوح قندخون و عدم تغییر در مقادیر انسولین متعاقب فعالیت ورزشی و مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها سطوح برخی ژن‌ها مانند IGFBP1 افزایش می‌یابد (۲۴). با توضیحاتی که گذشت، تغییر در بیان این ژن‌ها که پس از فعالیت هوازی شنا به همراه مصرف ویتامین E مشاهده شد، قابل توجه به نظر می‌رسد. با این وجود تناقض در یافته‌ها می‌تواند ریشه در تفاوت‌های گروه مطالعه، طول دوره تمرین، شدت، مدت و نوع تمرین و نیز دوز مصرفی و نوع ویتامین داشته باشد. مطالعات نشان می‌دهند که عواملی مثل تغذیه، مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها، استرس، بیماری‌ها، شرایط محیطی بر اندومتریوز تأثیر فراوان دارند (۹، ۱۰ و ۳۳). لذا با توجه به اینکه بررسی مسیرهای مولکولی متعدد در این پژوهش امکانپذیر نبود، برای نتیجه‌گیری قاطع درباره‌ی آثار تمرین و ویتامین E بر این شاخص‌ها انجام مطالعات بیشتر ضروری است.

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که تغییر مولکول‌های کلیدی یا مسیرهای سیگنالی و بیان ژن در فرایند آندومتریوز می‌تواند باعث بهبود سطح این بیماری گردد و انجام فعالیت ورزشی منظم هوازی و نیز مصرف هم‌زمان ویتامین E در مهار این بیماری و بهبود سطح این بیماری کمک شایانی می‌کند.

Kubo M, Akahane T, et al. A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet*. 2010 Aug;42(8):707.

10. Razzi S, Fava A, Sartini A, De Simone S, Cobellis L, Petraglia F. Treatment of severe recurrent endometriosis with an aromatase inhibitor in a young ovariectomised woman. *Int J Obstet Gynecol*. 2004 Feb;111(2):182-4.

11. Xie J, Wang S, He B, Pan Y, Li Y, Zeng Q, et al. Association of estrogen receptor alpha and interleukin-10 gene polymorphisms with endometriosis in a Chinese population. *Fertil Steril*. 2009 Jul 1;92(1):54-60.

12. Braundmeier AG, Fazleabas AT. The non-human primate model of endometriosis: research and implications for fecundity. *Mol Hum Reprod*. 2009 Jul 24;15(10):577-86.

13. Lewitt MS, Hilding A, Brismar K, Efendic S, Östenson CG, Hall K. IGF-binding protein 1 and abdominal obesity in the development of type 2 diabetes in women. *Eur J Endocrinol*. 2010 Aug 1;163(2):233-42.

14. Lewitt MS, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-1: a role in glucose counterregulation? *Mol Cell Endocrinol*. 1991 Aug 1;79(1-3):C147-52.

15. Hamon GA, Hunt TK, Spencer EM. In vivo effects of systemic insulin-like growth factor-I alone and complexed with insulin-like growth factor binding protein-3 on corticosteroid suppressed wounds. *Growth Regul*. 1993 Mar;3(1):53-6.

16. Koziris LP, Hickson RC, Chatterton Jr RT, Groseth RT, Christie JM, Goldflies DG, et al. Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. *J Appl Physiol*. 1999;86(4):1436-42.

17. Manetta J, Brun JF, Maïmoun L, Fédou C, Préfaut C, Mercier J. The effects of intensive training on insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding proteins 1 and 3 in competitive cyclists: relationships with glucose disposal. *J Sports Sci*. 2003 Jan 1;21(3):147-54.

18. Poehlman ET, Rosen CJ, Copeland KC. The influence of endurance training on insulin-like growth factor-1 in older individuals. *Metabolism*. 1994;43(11):1401-5.

19. Rosendal L, Langberg H, Flyvbjerg A, Frystyk J, Ørskov H, Kjær M. Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. *J Appl Physiol*. 2002;93(5):1669-75.

20. Vercellini P, Eskenazi B, Consonni D, Somigliana E, Parazzini F, Abbiati A, et al. Oral contraceptives and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010 Sep 10;17(2):159-70.

21. Kiani K, Movahedin M, Malekafzali H,

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از رساله دوره دکتری فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان تشکر خود را از تمامی کسانی که در پیشبرد اهداف رساله یاری نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

تأییدیه اخلاقی

پژوهشگران کلیه قوانین اخلاقی مرتبط با تحقیقات بر روی حیوانات را رعایت نمودند.

References

1. Nisenblat V, Bossuyt PM, Farquhar C, Johnson N, Hull ML. Imaging modalities for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2.
2. Fang J, Piessens S. A step by step guide to sonographic evaluation of deep infiltrating endometriosis. *Sonography*. 2018 Jun;5(2):67-75.
3. Hirsch M, Duffy JM, Davis CJ, Nieves Plana M, Khan KS. Diagnostic accuracy of cancer antigen 125 for endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obstet Gynaecol*. 2016 Oct;123(11):1761-8.
4. Clarkson J. Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty. *Front Neuroendocrinol*. 2013 Apr 1;34(2):120-31.
5. Astessiano AL, Carriquiry M, Mattiauda DA, Adrien ML, Chilbroste P, Meikle A. Endometrial gene expression in primiparous dairy cows at the end of the voluntary waiting period is affected by nutrition: Total mixed ration vs increasing levels of herbage allowance. *Reprod Domest Anim*. 2017 Oct;52(5):798-805.
6. Darabi M, Ani M, Panjehpour M, Rabbani M, Movahedian A, Zarean E. Effect of estrogen receptor β A1730G polymorphism on ABCA1 gene expression response to postmenopausal hormone replacement therapy. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011 Jan 1;15(1-2):11-5.
7. Hewitt KN, Boon WC, Murata Y, Jones ME, Simpson ER. The aromatase knockout mouse presents with a sexually dimorphic disruption to cholesterol homeostasis. *Endocrinology*. 2003 Sep 1;144(9):3895-903.
8. Danilovich N, Babu PS, Xing W, Gerdes M, Krishnamurthy H, Sairam MR. Estrogen deficiency, obesity, and skeletal abnormalities in follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) female mice. *Endocrinology*. 2000 Nov 1;141(11):4295-308.
9. Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, Takahashi A,

- Mirfasihi F, Sadati SN, Moini A, et al. Effect of the estrus cycle stage on the establishment of murine endometriosis lesions. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2018;16(5):305-14.
22. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, editors. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993.
23. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res*. 2001 May 1;29(9):e45-.
24. Liu L, Tan R, Cui Y, Liu J, Wu J. Estrogen receptor α gene (ESR1) polymorphisms associated with idiopathic premature ovarian failure in Chinese women. *Gynecol Endocrinol*. 2013 Feb 1;29(2):182-5.
25. Eliakim A, Nemet D, Zaldivar F, McMurray RG, Culler FL, Galassetti P, et al. Reduced exercise-associated response of the GH-IGF-I axis and catecholamines in obese children and adolescents. *J Appl Physiol*. 2006 May;100(5):1630-7.
26. Manetta J, Brun JF, Maïmoun L, Fédou C, Préfaut C, Mercier J. The effects of intensive training on insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding proteins 1 and 3 in competitive cyclists: relationships with glucose disposal. *J Sports Sci*. 2003 Jan 1;21(3):147-54.
27. Anousha N, Hossein-Nezhad A, Biramijamal F, Rahmani A, Maghbooli Z, Aghababaei E, et al. Association study of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with spontaneous abortion: is this a possible reason for unexplained spontaneous abortion?. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
28. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*. 1994 Oct 20;331(16):1056-61.
29. Hopkins NJ, Jakeman PM, Hughes SC, Holly JM. Changes in circulating insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) during prolonged exercise: effect of carbohydrate feeding. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Dec 1;79(6):1887-90.
30. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: a review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*. 2000 Feb 4;86(2):125-30.
31. Giampaolino P, Corte LD, Foreste V, Bifulco G. Is there a relationship between Vitamin D and endometriosis? An Overview of the Literature. *Curr Pharm Des*. 2019 Jun 1;25(22):2421-7.
32. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, et al. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA*. 1986 Apr 11;255(14):1904-8.
33. Dhillon PK, Holt VL. Recreational physical activity and endometrioma risk. *Am J Epidemiol*. 2003 Jul 15;158(2):156-64.
34. Anthony TG, Anthony JC, Lewitt MS, Donovan SM, Layman DK. Time course changes in IGFBP-1 after treadmill exercise and postexercise food intake in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Apr 1;280(4):E650-6.