مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۸، شماره ۳، خرداد ۱۴۰۰ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تأثیر تمرین شنا و مصرف ویتامین B6 بر بیان ژن ALDH1A2 در رت‌های مدل اندومتریوز

سپیده قاسمیان لنگرودی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران

پروین فرزانگی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران (* نویسنده مسئول) Parvin.farzanegi@gmail.com

لیدا مرادی: استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: در پاتوژنز بیماری اندومتریوز عوامل مختلفی از ژن‌ها درگیر هستند. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات بیان ژن ALDH1A2 رت‌های مدل اندومتریوز به دنبال یک دوره تمرین شنا و مصرف ویتامین B6 بود.

روش کار: بدین منظور ۲۵ سر رت بالغ نژاد ویستار به‌صورت تصادفی به ۵ گروه کنترل سالم، کنترل بیمار، بیمار+تمرین، بیمار+ ویتامین، بیمار+ ویتامین+ تمرین دسته‌بندی شدند. به منظور ایجاد مدل اندومتریوز، ابتدا رت‌ها بیهوش شده و پس از باز کردن عضله شکمی، بافت تخمدانی و بخشی از بافت لوله رحمی برداشته شد و در داخل ظرف استریل با یک سی‌سی PBS قرار داده شد و قطعه‌قطعه گردیدند و سپس این قطعات به نواحی شکمی و تخمدان پیوند زده شدند. میزان مصرف ویتامین، ۶۰mg/kg به ازای وزن بدن هر رت بوده و برنامه تمرین شنا به مدت ۸ هفته و هر هفته پنج روز و هر روز به مدت ۳۰ دقیقه بود. جهت تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد در گروه کنترل بیمار سطح ALDH1A2 نسبت به گروه کنترل سالم، بیمار+ تمرین و بیمار+ تمرین+ ویتامین کاهش معنادار داشت (به ترتیب P=۰/۰۰۰۷؛ P=۰/۰۰۹ و P=۰/۰۰۸). همچنین در گروه بیمار+ تمرین، بیمار+ ویتامین سطح آن نسبت به گروه سالم کاهش معنادار داشت (به ترتیب P=۰/۰۰۳۸؛ P=۰/۰۰۶). این در حالی بود که بین دیگر گروه‌ها تفاوت معناداری مشاهده نشد.

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 B6 در مهار این بیماری و بهبود سطح این بیماری کمک شایانی می‌کند.

کلیدواژه‌ها

شنا،

ویتامین،

ALDH1A2،

آندومتریوز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۱

تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۰۳/۱۵

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Ghasemian Langrodi S, Farzanegi P, Moradi L. The effect of swimming training and vitamin B6 intake on ALDH1A2 gene expression in endometriosis rat. Razi J Med Sci. 2021;28(3):152-162.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]

Razi Journal of Medical Sciences. 2021;28(3):152-162. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

The effect of swimming training and vitamin B6 intake on ALDH1A2 gene expression in endometriosis rat

Sepideh Ghasemian Langrodi : 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

Lida Moradi : Assistant Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: Endometriosis means the presence of endometrial glands and uterine stroma outside the endometrium and uterine muscle, which is a chronic benign disease of women, which is mainly seen in the pelvic peritoneum with the ectopic formation of stroma and endometrial glands. Endometriosis is associated with a range of symptoms, the most common of which are chronic pelvic pain and infertility. The pathogenesis of this disease is influenced by various factors such as reverse transfer of endometrial cells, immunodeficiency, genetics, metaplasia, hormones, and environmental conditions. A widely accepted mechanism is Simpson's theory of recurrent menstruation, in which stem/progenitor cells flow into the pelvis and attach to the peritoneal mesothelium, where endometrial tissue grows abnormally. Recently, treatment goals have focused on inhibiting stem cell flow and the onset and proliferation of endometriosis. In this regard, studies have shown that an issue that may increase the risk of endometriosis is oxidative stress. Oxidative stress means that the body's balance is disturbed by an increase in oxidizing agents that cause oxidation of vital substances and tissues in the body. Recent studies have shown the role of stem cells and oxidative stress in the progression and control, as well as their role in the pharmacological treatment of infertility diseases, in which the role of the enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH1A2) is recognized as an indicator in stem cells. This factor plays a role in the oxidation of aldehydes and the early differentiation of stem cells. Cells that are highly active in this enzyme have the ability to regenerate themselves. Under normal conditions (normal oxygen level), this enzyme effectively catalyzes the conversion of organic nitrate compounds, such as nitroglycerin, to nitric oxide. This factor plays a role in the oxidation of aldehydes and the early differentiation of stem cells. Studies have shown that the use of exercise interventions is effective in patients with endometriosis. Aerobic exercise is one of the most common training methods to improve infertility and gynecological diseases. B vitamins play an important role in the prevention and treatment of cancer by modulating cell signaling pathways. For example, vitamin B6 is known to be a potent anti-inflammatory, mutant, and nerve-enhancing agent that inhibits progression by activating tumor suppressor genes, inactivating angiogenesis, and activating anti-inflammatory genes, and inducing apoptosis. Cancerous tumors prevent many pathological changes that occur in response to the penetration of inflammatory cells. Endometriosis is a multifactorial disease that has complex pathophysiology and most of the details of this disease are still unknown; therefore, extensive

Keywords

Swimming,

Vitamin,

ALDH1A2,

Endometriosis

Received: 01/03/2021

Published: 05/06/2021

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]

research is needed to obtain information on the pathophysiology of this disease. Therefore, due to limited trial studies, inconsistencies and ambiguities in the results of the effectiveness of dietary and sports interventions, limited research on the preference of each of these methods with appropriate comparison, and the lack of a similar study in this community, The question is, does a low-intensity swimming training session with vitamin B6 affect the expression of ovarian tissue ALDH1A2 gene in rats of the endometriosis model?

Methods: The research method was experimental with a post-test design. In determining the sample size, according to the sample size formula for continuous scores, if the expected differences are equal to 1.5, with a test power of 80% at a significance level of $\alpha = 0.05$, the number of subjects per the group is equal to five. For this purpose, 25 adult Wistar 6- to 8-week-old rats with a mean weight and mean weight of 202.85 ± 15.62 g were purchased from Pasteur Institute and transferred to the research center. The animals were kept in special polycarbonate cages in an environment with an average temperature of 22 ± 1.4 ° C, humidity of 55%, and a dark light cycle of 12:12 hours. The care of the animals was carried out by the guidelines of the International Institute of Health and the protocols of this study, in compliance with the principles of the Helsinki Declaration and the rules of medical ethics. The animals were treated with free pellet food and water. The food consumed by the animals was given to the animal at the rate of 10 grams per 100 grams of body weight according to the weekly weight gain. The protocol of this research was performed according to the international laws on laboratory animals with the code of ethics IR.IAU.SARI.REC.1398.152 and was approved by the ethics committee of the Islamic Azad University of Sari. Twenty-five adult Wistar rats were randomly divided into 5 groups: healthy control, patient control, patient + exercise, patient + vitamin, patient + vitamin + exercise. To model endometriosis, the rats were first anesthetized and after opening the abdominal muscle, ovarian tissue and part of the uterine tube tissue were removed and placed in a sterile container with a PBS cc and cut into pieces. These pieces were then transplanted into the abdominal and ovarian areas. Vitamin intake was 60 mg/kg per rat body weight and the swimming training program was for 8 weeks and five days each week for 30 minutes each day. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used to analyze the data.

Results: The results showed that in the patient control group ALDH1A2 level was significantly reduced compared to the healthy control group, patient + training and patient + training + vitamin ($P = 0.0007$; $P = 0.009$ and 0.008, respectively P). Also in the patient + exercise group, the patient + vitamin level was significantly reduced compared to the healthy group ($P = 0.0038$; $P = 0.006$, respectively). This was while there was no significant difference between the other groups.

Conclusion: In general, the results of the present study indicate that changes in key molecules or signaling pathways and gene expression in the process of endometriosis can improve the level of the disease and regular aerobic exercise and concomitant use. Vitamin B6 helps to control this disease and improve the level of this disease.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Ghasemian Langrodi S, Farzanegi P, Moradi L. The effect of swimming training and vitamin B6 intake on ALDH1A2 gene expression in endometriosis rat. Razi J Med Sci. 2021;28(3):152-162.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]

مقدمه

اندومتریوز (Endometriosis) به معنی وجود غدد آندومتریال و استرومای رحم در بیرون از آندومتر و عضله رحم است که یک بیماری مزمن خوش‌خیم زنان است که با شکل‌گیری نابجا از استروما و غدد آندومتر عمدتاً در صفاق لگن دیده می‌شود (۱). اندومتریوز با طیفی از علائم همراه است که شایع‌ترین آن‌ها درد مزمن لگنی و ناباروری است (۲). در پاتوژنز این بیماری عوامل مختلفی مانند انتقال معکوس سلول‌های آندومتر، نقص ایمنی، ژنتیک، متاپلازی (Metaplasia)، هورمون‌ها و شرایط محیطی تأثیر دارند. مکانیسمی که به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده، تئوری قاعدگی بازگشتی سمپسون می‌باشد که در آن سلول‌های بنیادی/پیش ساز به لگن جریان پیدا می‌کنند و به مزوتلیوم صفاق متصل می‌شود و در آن مکان بافت آندومتر به‌صورت نابجا رشد می‌کند (۳). اخیراً اهداف درمانی بر روی مهار جریان سلول بنیادی و آغاز و تکثیر آندومتریوز تمرکز پیدا کرده است. در این راستا مطالعات نشان داده است مسئله‌ای که احتمالاً خطر بیماری اندومتریوز را افزایش می‌دهد، استرس اکسیداتیو است. استرس اکسیداتیو یعنی به هم خوردن تعادل بدن با افزایش عوامل اکسیدکننده که موجب اکسید شدن مواد حیاتی و بافت‌های بدن می‌شود (۴). مطالعات اخیر نشان‌دهنده نقش سلول‌های بنیادی و استرس اکسایشی در پیشروی و کنترل و همچنین نقش آن‌ها در درمان‌های دارویی بیماری‌های ناباروری است که نقش آنزیم آلدهید دهیدروژناز (ALDH1A2) به عنوان یک شاخص در سلول‌های بنیادی شناخته شده است (۵). این فاکتور در اکسیداسیون آلدهیدها و تمایز اولیه سلول‌های بنیادی نقش ایفا می‌کند. سلول‌های که فعالیت بالای این آنزیم را داشته باشید، دارای قابلیت خودنوزایی است. این آنزیم تحت شرایط نرمواکسیژنی (سطح نرمال اکسیژن) به‌طور مؤثری تبدیل ترکیبات نیترات آلی، مانند نیتروگلیسرین را به نیتریک اکسید کاتالیز می‌کند. ALDH1A2 یک آنزیم سم‌زدا، کاتالیزور واکنش اکسیداسیون آلدهیدهای داخل سلولی است (۶). اکسیداسیون رتینول و تبدیل آن به رتینوئیک اسید توسط می‌تواند در تمایز اولیه سلول‌های بنیادی نقش داشته باشد و فعالیت این آنزیم در سلول‌های نرمال و بدخیم وجود دارد، اما افزایش فعالیت در در تورموهای بدخیم مانند کارسینوم‌های پستان به‌عنوان یک مارکر سلول سرطانی شناخته شده است (۷). این فاکتور در اکسیداسیون آلدهیدها و تمایز اولیه سلول‌های بنیادی نقش ایفا می‌کند. برخی مطالعات ضرورت تنظیم سیستم دفاعی سریع و کارآمد در برابر تغییر این فاکتورها را ضروری دانسته‌اند. باتوجه اینکه اندومتریوز از جمله شایع‌ترین در بیماری زنان به شمار می‌رود، با این حال از آن دسته بیماری‌هایی است که اگر زود تشخیص داده شود قابل درمان می‌باشد (۸)؛ بنابراین پزشکان و محققان نیاز به یافتن استراتژی‌های بدیع برای روش‌های درمانی مؤثر دارند. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که تغییر مولکول‌های کلیدی یا مسیرهای سیگنالی، از طریق تأثیر روی تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلولی می‌تواند بر میزان آسیب اکسایشی و التهاب و در نتیجه وقوع و پیشرفت این بیماری مؤثر باشد (۹). با این حال، عوامل قابل اصلاحی مانند تغذیه و فعالیت بدنی وجود دارند که به پیشگیری و درمان را از طریق تنظیم و تعدیل این بیماری کمک می‌کنند. فعالیت بدنی می‌تواند تأثیرات مختلفی روی این بیماری بسته به ذخیره انرژی، قدرت و تناوب ورزش و همچنین میزان استرس اکسایشی ناشی از ورزش داشته باشند (۱۰). چندین مکانیسم محتمل وجود دارند که نشان می‌دهند فعالیت بدنی می‌تواند خطر ابتلا به این بیماری را در زنان کاهش دهد. برخی سازوکارهای احتمالی معرفی شده دراین زمینه شامل مواردی مانند کاهش استرس اکسایشی، تقویت سیستم ایمنی، تعدیل عوامل هورمونی است. اگر چه این مکانیسم‌های محتملی پیشنهاد شده است اما نتایج مطالعات در مورد ارتباط بین فعالیت بدنی و اندومتریوز متناقض است (۱۱).

مطالعات نشان داد استفاده مداخله‌های ورزشی در بیماران مبتلا به اندومتریوز اثربخش می‌باشد. بهره‌وری از فعالیت هوازی به‌عنوان یک روش درمانی برای مقابله با بیماری و دیگر تغییرات پرتنش مورد توجه می‌باشد. هر جلسه از ورزش منجر به تولید و آزادسازی آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود (۱۲). در رویکرد ورزش‌درمانی به بیمار کمک می‌شود تا با سرعت بهبودی بیشتر همراه گردد. تمرینات هوازی یکی از متداول‌ترین روش‌های تمرینی برای بهبود عملکرد ناباروری و بیماری‌های زنان

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]

می‌باشد. تاکنون تحقیقات زیادی، تأثیر تمرین ورزشی بر میزان عوامل التهابی را مورد بررسی قرار داده‌اند. اما اینکه چه نوع فعالیت ورزشی و از طریق چه مکانیسم‌های سلولی و مولکولی می‌تواند بهترین اثربخشی را داشته باشد، هنوز به طور کامل و دقیق شناخته نشده است. مطالعات نشان می‌دهد که تمرین هوازی با شدت پایین می‌تواند با ایجاد مکانیسم حفاظتی منجر به کاهش بیان سایتوکین‌های التهابی، استرس اکسیداتیو در باقت رحم، التهاب سیستمیک و در نتیجه بهبود پاسخ‌های ایمنی گردد (۱۳). کروپا (Krupa) و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه خود بیان کردند که، از جمله روش‌های درمانی در زنان مبتلا به آندومتریوز را درمان دارویی و جراحی و فعالیت ورزشی هوازی و مصرف انتی اکسیدان‌ها می‌باشد (۱۴). از میان تمرین‌های هوازی، تمرین هوازی شنا با شدت پایین از جمله تمریناتی است که در شرایط مختلف فیزیولوژیک، ایمن و قابل استفاده بوده و به دلیل عدم تحمل وزن در آب نسبت به ورزش‌های غیرآبی در اکثر مطالعات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و واکنش‌های مولکولی به کار می‌رود. فعالیت ورزشی آرام تا متوسط به علت افزایش جریان خون به‌تدریج سبب بهبود فعالیت متابولیکی می‌شود اما فعالیت شدید به دلیل تغییر جهت جریان خون به سمت عضلات فعال سبب کاهش آن می‌شود (۱۵).

از سوی دیگر تحقیقات نشان دادند که رژیم غذایی سرشار از میوه‌ها، سبزیجات و دانه غلات در پیشگیری از رشد و متاستاز اندومتریوز نقش دارند. ویتامین گروه B نقش مهمی در پیشگیری و درمان سرطان از طریق تعدیل مسیرهای سیگنالی سلولی دارد (۱۶). به عنوان مثال ویتامین B6 عامل ضد التهابی قوی و ضد جهش و تقویت‌کننده عصب شناخته شده است که از طریق فعال‌سازی ژن سرکوب‌کننده تومور، غیر فعال‌سازی رگ‌زایی و فعال‌سازی ژن ضد التهابی و القاء آپوپتوز موجب مهار پیشرفت تومورهای سرطانی و مانع بسیاری از تغییرات پاتولوژیکی می‌شود که در پاسخ به نفوذ سلول‌های التهابی ایجاد می‌شود (۱۷). مطالعات نشان دادند مصرف مکمل‌های غذایی، ویتامین‌ها نظیر ویتامین‌های گروه B مانند B6 مقدار استروژن را در بدن کنترل می‌کنند و به کاهش علائم اندومتریوز کمک می‌کنند، لذا به کنترل‌کننده سطح استروژن معروفند، مخصوصاً B6، B2، B1 از پیشرفت اندومتریوز جلوگیری می‌کنند (۱۸). گیامپولینو (Giampaolino) و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه خود گزارش کردند که ویتامین D نقش مستقیمی در بهبود این بیماری دارد و ویتامین خانواده گروه B منجر به تسکین درد و بهبود ضایعه آندومتریوتیک و کاهش علایم این بیماری می‌شود (۱۹). با این حال، تحقیقی به‌صورت متمرکز بر روی اثرگذاری ویتامین B6 بر روی بیماری اندومتریوز انجام نشده است.

اندومتریوز یک بیماری چند عاملی است که پاتوفیزیولوژی پیچیده‌ای دارد و بیشتر جزییات این بیماری هنوز ناشناخته است؛ بنابراین نیاز به تحقیقات وسیع برای بدست آوردن اطلاعات برای پاتوفیزیولوژی این بیماری ضروری است. لذا با توجه به مطالعات محدود کارآزمایی، وجود تناقض و ابهام در نتایج اثربخشی مداخلات غذایی و ورزشی، تحقیقات محدود در خصوص ارجحیت هر یک از روش‌های مذکور با مقایسه مناسب و موجود نبودن مطالعه مشابه در این جامعه، مطالعه حاضر با هدف پاسخ به این سؤال گه آیا یک دوره تمرین شنا با شدت پایین با مصرف ویتامین B6 بر بیان ژن ALDH1A2 بافت تخمدان در رت‌های مدل اندومتریوز تأثیر دارد؟

روش کار

روش پژوهش از نوع تجربی با طرح پس آزمون بود. در تعیین حجم نمونه، با توجه به فرمول حجم نمونه برای نمره‌های پیوسته، درصورتی که تفاوت‌های مورد انتظار برابر با ۱/۵باشد، با توان آزمون ۸۰ درصد در سطح معنی داری ۰/۰۵ =α، تعداد آزمودنی‌های هر گروه برابر پنج می‌باشد (۲۰). بدین منظور تعداد ۲۵ سر رت بالغ نژاد ویستار ۶ تا ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۱۵/۶۲±۲۰۲/۸۵ گرم از انستیتو پاستور خریداری و به مرکز پژوهش منتقل شدند. حیوانات در محیطی با میانگین دمای ۱/۴±۲۲ 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]

اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد (۲۱). حیوانات از غذای پلت و آب که به صورت آزاد در اختیار قرار می‌گرفت، تیمار شدند. غذای مصرفی حیوانات با توجه به وزن‌کشی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داشت. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1398.152 انجام و در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری به تصویب رسید.

سپس بصورت تصادفی به پنج گروه (۵ سر موش در هر گروه) شامل گروه کنترل سالم (۵ سر)، بیمار (۵ سر)، بیمار+ ویتامین (۵ سر)، بیمار+ تمرین (۵ سر)، بیمار+ ویتامین+ تمرین (۵ سر) تقسیم شدند. به‌منظور ایجاد مدل اندومتریوز، ابتدا رت‌های بالغ با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش شدند. پس از آن، ناحیه شکمی در طرف راست یا 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 PBS (Phosphate 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 شدند (۲۲).

ویتامین B6 دو هفته بعد از القائ بیماری به صورت روزانه و به شکل گاواژ به میزان ۶۰ mg/kg وزن بدن، رت‌های گروه بیمار + ویتامین و بیمار+ ویتامین+ تمرین دریافت کردند (۲۳).

رت‌های گروه‌های بیمار+ تمرین و بیمار+ ویتامین+ تمرین، قبل از شروع پروتکل اصلی، به مدت یک هفته (۵ روز) هر بار به مدت ۲۰ دقیقه به منظورآشنایی 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 ۵۰×۵۰×۱۰۰ سانتی‌متری با درجه حرارت ۳۰-۳۲ درجه سانتی‌گراد در طی ۸ هفته به شنا پرداختند و مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود (۲۴).

جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه‌بردای از حیوانات پس از ۴۸ ساعت بعد از آخرین برنامه تمرینی شنا و مصرف مکمل انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۳۰mg/kg- ۵۰) و زایلازین (۳ mg/kg- ۵) بی‌هوش و پس از شکافتن حفره شکمی، بافت تخمدان به دقت جدا و بخشی در فرمالین ده درصد جهت عکسبرداری و بخشی دیگر در دمای ۸۰- درجه جهت بررسی بیان ژن GATA2 فریز و به آزمایشگاه منتقل شد.

برای بررسی بیان ژن ALDH1A2 از تکنیک PCR Real Time استفاده شد. بدین منظور ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید (۲۵). 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 (Kiazol)، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن (CinnaGen) استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I Fermentas قرار گرفت. سپس کیفیت RNAهای استخراج شده با دستگاه اسپکترفتومتری (DPI-1, Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر Oligodt MWG-Biotech, Germany و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (شرکت فرمنتاز (Fermentas)) استفاده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. هر واکنش PCR با استفاده از PCR master mix Applied Biosystems و SYBER Green در دستگاه Applied Biosystems, Sequences Detection Systems. Foster City, CA (ABI Step One) 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]

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. توالی پرایمرها در جدول یک مشاهده می‌شود.

نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Thereshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قراردادن داده‌ها در فرمول زیر:

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

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

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.

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CT\,target}}{(E_{reference})^{\Delta CT\,reference}}$$

$$\Delta Ct_{refrence} = Ct_{control} - Ct_{treatment}, \Delta Ct_{target} = Ct_{control} - Ct_{treatment})$$

در فرمول فوق E معرف Efficiency است و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای ژن به دست می‌آید (۲۵).

بعد از تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌های بافتی، برای توصیف کمی داده‌ها از شاخص‌های آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک 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 $p\leq ۰/۰۵$ برای بررسی تغییرات بیان ژن ALDH1A2 استفاده شد. برای انجام کلیه امور آماری از نرم افزار SPSS-23 استفاده شد و برای رسم نمودار از نرم افزار اکسل استفاده گردید.

یافته‌ها

در جدول ۱ توالی پرایمر ژن ALDH1A2 مشاهده می‌شود.

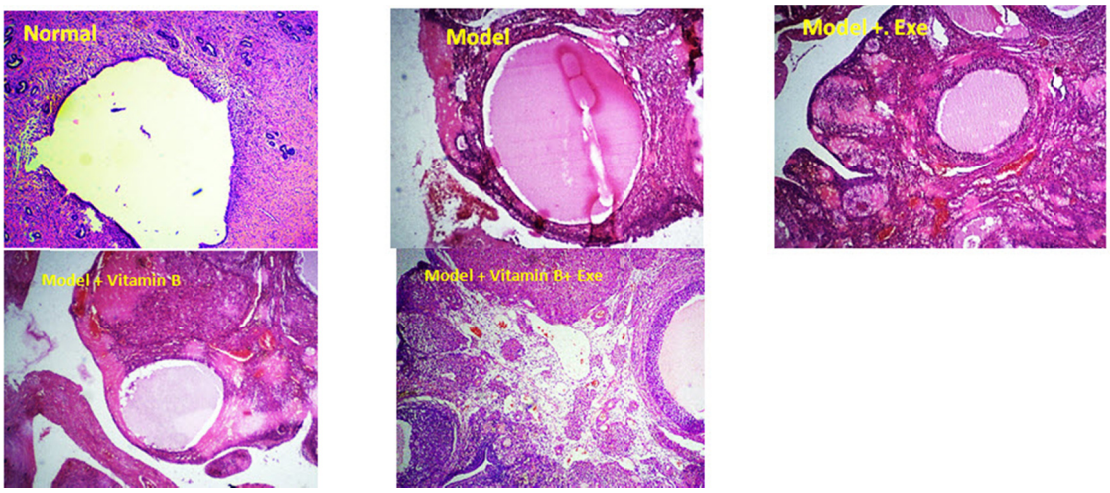
بافت رحمی پیوند زده در مناطق مختلف ناحیه شکمی پس از گذشت دو هفته از پیوند منجر به ایجاد توده‌های برجسته کیست شکلی با ابعاد متفاوت گردید، به این ترتیب مدل اندومتریوز با مشاهده قطعات کیستی مورد تأیید قرار گرفت. گروه‌های مختلف درمان چنانچه توضیح داده شد، نشان دادند که با گذشت زمان تیمار قادر به تحلیل و کوچک شدن بافت کیستی بودند، به این ترتیب که ابعاد لوله رحمی پیوند شده که پس از برش بافتی حاوی ترشحات بود در گروه‌های درمانی، کوچک‌تر مشاهده شد. به علاوه ضخامت دیواره کیست ایجاد شده و سلول‌های لایه اندومتری که در رحم نرمال به صورت اپی‌تلیوم استوانه‌ای شکل دیده می‌شوند، در این کیست‌های ایجاد شده به صورت‌های متفاوتی مشاهده شد؛ به طوری که در گروه مدل (بیمار) این دیواره اندمتری کاملاً محو شده بود و تنها در برخی مناطق قابل مشاهده بود و سایر بخش‌های مربوط به بافت اندومتری به صورت غیرقابل تفکیک از بافت نرمالی که در ابتدا برای پیوند استفاده شده بود، دیده شدند (شکل ۱).

از طرفی در گروه‌های مربوط به ویتامین و ورزش، اگرچه اندازه کیست بسیار کوچک شده بود ولی ساختار اپیتلیوم کاملاً طبیعی مشاهده نمی‌شد. با این حال خون‌گیری بافت به خوبی صورت گرفته بود و در اطراف بافت عروق قابل مشاهده بودند. از طرفی مناطق کم‌رنگ که نشان از القاء مرگ بافتی در لایه‌های اطراف کیست بود، مشاهده شد که این علائم می‌تواند دلیلی بر کوچک‌ترشدن سایز کیست و حذف آن در آینده محسوب شود. در گروه ورزش و ویتامین، ترشحات

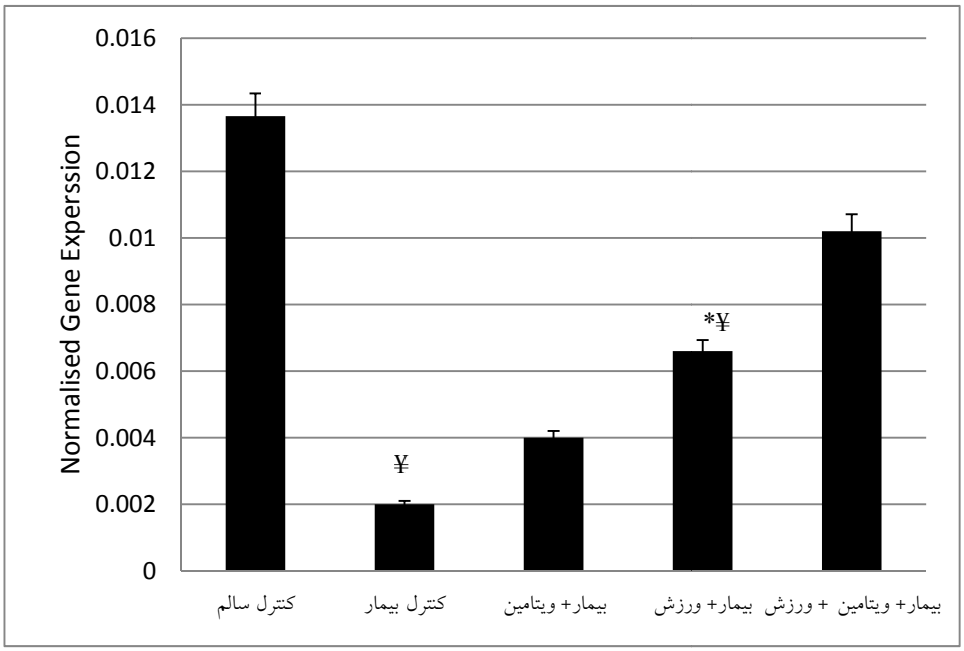
جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن مورد مطالعه

r-ALDH1a2- forward	AATGGGAGAGAAATGGGTGAG
r-ALDH1a2-Revrse	TGTTGTGAGGGAAGAGTGGT

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]



شکل ۱- نتایج هیستولوژی بافت تخمدان گروه‌های تحقیق



شکل ۲- تغییرات مقادیر شاخص بیان ژن ALDH1A2 در گروه‌های مختلف تحقیق

* نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه کنترل بیمار.

¥ نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه کنترل سالم.

داخل حوزه کیستی مشاهده نشد، لایه اپی‌تلیوم کاملاً واضح دیده شد ولی ابعاد کیست بسیار کوچک شده بود. خون‌گیری بافت به خوبی انجام شده بود و مشکل بافت و سلول‌های کم‌رنگ گرفته اطراف کیست نشان از القاء مرگ سلولی و حذف کیست در آینده می‌باشد. در گروه نرمال لایه اندومتر از یک لایه اپی‌تلیال پوششی و یک لایه اپی‌تلیال عددی تشکیل شده است. در تبدیل تصاویر به اعداد کمی در صورت شباهت لایه‌های کیست به بافت نرمال درجه سه و در صورت عدم شباهت به بافت نرمال درجه صفر در گرفته شده است (شکل ۱).

بر اساس نتایج آنالیز یک‌طرفه، بین مقادیر سطوح ALDH1A2 در گروه‌های تحقیق، تفاوت آماری معناداری وجود دارد ($p\leq$ ۰/۰۱). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد در گروه کنترل بیمار سطح ALDH1A2 نسبت به گروه کنترل سالم، بیمار+ تمرین و بیمار+ تمرین+ ویتامین کاهش معنادار داشت (به ترتیب P=۰/۰۰۰۷؛ P=۰/۰۰۹ و P=۰/۰۰۸). همچنین

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]

در گروه بیمار+ تمرین، بیمار+ ویتامین سطح آن نسبت به گروه سالم کاهش معنادار داشت (به ترتیب P=۰/۰۰۳۸؛ P=۰/۰۰۶). این در حالی بود که بین دیگر گروه‌ها تفاوت معناداری مشاهده نشد (شکل ۲).

بحث

در تحقیق حاضر تأثیر یک دوره برنامه تمرین شنا با شدت پایین به همراه مصرف ویتامین B6 بر بیان ژن ALDH1A2 در موش‌های مدل اندومتریوز مورد بررسی قرار گرفت. از نتایج مهم تحقیق حاضر افزایش معنادار سطوح ALDH1A2 رت‌های مدل اندومتریوز نسبت به گروه بیمار می‌باشد که مداخله ورزش سطح آن کاهش معنادار نسبت به گروه بیمار داشت. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه برخی از محقین که در تحقیق خود اظهار داشتند بیماری آندومتریوز منجر به تغییر بیان ژن خانواده ALDH1A2 می‌گردد، همسو است (۲۶) و نیز با برخی از مطالعات که نشان دادند که انجام فعالیت بدنی منجر به افزایش سطح بیان ژن ALDH1A2می‌شود، هم‌راستا می‌باشد (۲۷، ۲۸). آندومتریوز به معنی وجود غدد آندومتریال و استرومای رحم در بیرون از آندومتر و عضله رحم است که یک بیماری مزمن خوش خیم زنان است که با شکل گیری نابجا از استروما و غدد آندومتر عمدتاً در صفاق لگن دیده می‌شود (۲۶). نقش آنزیم آلدهید دهیدروژناز نیز به‌عنوان یک شاخص در سلول‌های بنیادی سرطان و چندین بدخیمی از جمله پانکراس پستان پروستات است، شناخته شد. این عامل در اکسیداسیون آلدهیدها و تمایز اولیه سلول‌های بنیادی نقش ایفا می‌کند. آلدهید دهیدروژناز ALDH آنزیمی است که بر اساس فعالیت کاتالیزی وابسته به NAD(P) معکوس کردن فعالیت اکسیدیشن فعالیت به‌سزایی در تولید حلقه‌های آروماتیک و آلیفاتیک دارد که بسیاری از آن‌ها طی فعالیت‌های متابولیک درون‌ریز و برون‌ریز تولید می‌شود (۲۷، ۲۸). افزایش بیان CYP26A1 باعث تجزیه شدن آن و ALDH1A2 می‌شود. در نتیجه با کاهش ALDH1A2 با کاهش در سطوح RARα و CRABP2 همراه است. بیان آن‌ها باعث کاهش مسیر RARAR که باعث کاهش بیان Cx43 و GJIC در سلول‌های استرومال می‌شود. هر چند کاهش سطح ALDH1A2 باعث کاهش تولید HSD و افزایش غلظت ناحیه‌ای استروئیدول در سلول‌های اپیتلیال اندومتریوز می‌شود (۲۷، ۲۸). این فاکتور در اکسیداسیون آلدهیدها و تمایز اولیه سلول‌های بنیادی نقش ایفا می‌کند. سلول‌های که فعالیت بالای این آنزیم را داشته باشید، دارای قابلیت خودنوزایی است. این آنزیم تحت شرایط نرمواکسیژنی (سطح نرمال اکسیژن) به طور مؤثری تبدیل ترکیبات نیترات آلی، مانند نیتروگلیسرین را به نیتریک اکسید کاتالیز می‌کند. عملکرد ناقص یا بیان کاهش یافته این فاکتورها به علت عدم تمایز سلول‌های تأثیر یافته و خروج سیکل سلولی در توسعه اندومتریوز مشارکت دارند. ALDH1A2 یک آنزیم سم‌زدا، کاتالیزور واکنش اکسیداسیون آلدهیدهای داخل سلولی است. اکسیداسیون رتینول و تبدیل آن به رتینوئیک اسید توسط می‌تواند در تمایز اولیه سلول‌های بنیادی نقش داشته باشد و فعالیت این آنزیم در سلول‌های نرمال و بدخیم وجود دارد، اما افزایش فعالیت در تورموهای بدخیم مانند کارسینوم‌های پستان به عنوان یک مارکر سلول سرطانی شناخته شده است (۲۷، ۲۸).

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که یک دوره برنامه تمرینی شنا با شدت پایین به همراه مصرف ویتامین B6 منجر به افزایش سطح ALDH1A2 نسبت به گروه بیمار گردید. گیامپولینو (Giampaolino) و همکاران (۲۰۱۹) 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 B منجر به تسکین درد و بهبود ضایعه آندومتریوتیک در مدل‌های آزمایشگاهی و کاهش علایم این بیماری می‌شود (۱۹). تحقیقات نشان دادند که رژیم غذایی سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری از رشد و متاستاز اندومتریوز نقش دارند (۲۹). ویتامین گروه B نقش مهمی در پیشگیری و درمان آن از طریق تعدیل مسیرهای سیگنالی سلولی دارد. ویتامین B6 عامل ضد التهابی قوی و ضد جهش و تقویت‌کننده عصب شناخته شده است که از طریق فعال‌سازی ژن سرکوب‌کننده تومور، غیرفعال‌سازی رگ‌زایی و فعال-سازی ژن ضد التهابی و القاء آپوپتوز موجب مهار پیشرفت تومورهای این بیماری و مانع بسیاری از

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]

تغییرات پاتولوژیکی می‌شود که در پاسخ به نفوذ سلول-های التهابی ایجاد می‌شود (۳۰). ویتامین B6 ممکن است نقش حیاتی در محافظت از سلول‌ها از استرس اکسیداتیو داشته باشد، زیرا ویتامین نشان می‌دهد فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهد که حتی بیش از ویتامین C و E است (۳۱). در موتاسیون ژن‌هایی که در روند نجات و پیشگیری از سنتز ویتامین B6 دخیل هستند، تعداد زیادی از فنوتیپ‌ها در حساسیت اکسیژن نمک و واکنش (ROS) مشاهده می‌شود. مطالعات بعدی در سایر ارگان‌ها همچنین نشان داد که ویتامین B6 برای تحمل استرس اکسیداتیو و سایر عوامل استرس‌زا وابسته است (۳۲). ویتامین B6 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 ALDH1A2 پس از فعالیت ورزشی به همراه مصرف ویتامین B6 ممکن است به واسطه حذف رادیکال‌های آزاد باشد (۱۹). زیرا این ویتامین دارای آنتی اکسیدان‌هایی است که با تقویت سیستم ایمنی بدن انسان، مقاومت در برابر بیماری‌های التهابی را افزایش می‌دهند. همچنین گزارش شد بخش هگزان ویتامین B6 دارای قابلیت ضدالتهابی قابل ملاحظه در برابر التهاب و مهار ادم می‌باشد. فعالیت‌های ضدالتهابی این ویتامین با مهار آزادسازی واسطه‌های التهابی همانند NO و همچنین مهار آنزیم سیکلواکسیژناز نیز مرتبط است. در واقع این ویتامین خواهص ضدالتهابی خود را در سطوح مختلف از طریق تعدیل مسیرهای سیگنالینگ MAPK، AKt و همچنین مهار تولید سایتوکین‌های پیش‌التهابی، کموکین‌ها و سرکوب آنزیم‌های Inos اعمال می‌کنند (۳۳).

اگرچه در تحقیق حاضر بسیاری از متغیرها از قبیل گونه، نژاد، جنس، وزن، عوامل محیطی (صدا، نور، رطوبت، دما)، عوامل تمرینی (نوع، مدت و شدت فعالیت ورزشی) و برنامه غذایی تحت کنترل بودند؛ با این وجود پژوهش حاضر با محدودیت‌های ذیل مواجه بود:

۱. عدم کنترل فعالیت شبانه آزمودنی‌های پژوهش به ویژه گروه‌های بدون تمرین و تداخل احتمالی آن بر نتایج تحقیق.

۲. عدم اندازه‌گیری میزان آب آشامیدنی مصرف‌شده هر یک از موش‌های گروه‌های تحقیق.

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 B6 در مهار این بیماری و بهبود سطح این بیماری کمک شایانی می‌کند.

تقدیر و تشکر

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

References

1. Johnson NP, Hummelshoj L, Adamson GD, Keckstein J, Taylor HS, Abrao MS, et al. World Endometriosis Society consensus on the classification of endometriosis. Hum Reprod. 2017;32(2):315-24.
2. Symons LK, Miller JE, Kay VR, Marks RM, Liblik K, Koti M, et al. The immunopathophysiology of endometriosis. Trends Mol Med. 2018;24(9):748-62.
3. Wang Y, Nicholes K, Shih IM. The origin and pathogenesis of endometriosis. Annu Rev Pathol: Mechanis Dis. 2020;15:71-95.
4. Gordts S, Koninckx P, Brosens I. Pathogenesis of deep endometriosis. Fertil Steril. 2017;108(6):872-85. e1.
5. Chen Y, Zhu J-Y, Hong KH, Mikles DC, Georg GI, Goldstein AS, et al. Structural basis of ALDH1A2 inhibition by irreversible and reversible small molecule inhibitors. ACS Chem Biol. 2017;13(3):582-90.
6. Wang Y, Shao F, Chen L. ALDH1A2 suppresses epithelial ovarian cancer cell proliferation and migration by downregulating STAT3. OncoTargets Ther. 2018;11:599.
7. Choi JA, Kwon H, Cho H, Chung JY, Hewitt SM, Kim JH. ALDH1A2 Is a Candidate Tumor

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]

Suppressor Gene in Ovarian Cancer. Cancers. 2019;11(10):1553.

8. Zhu L, Chanalaris A, Groves K, Furniss D, Watt FE, Gardiner M, et al. Polymorphic variants in ALDH1A2 determine the expression level of ALDH1A2 and CYP19A1 in the cartilage of patients undergoing trapeziectomy for severe thumb osteoarthritis. Osteoarthr Cartilage. 2018;26:S157.

9. Li Y, Gong H, Ding J, Zhao F, Du J, Wan J, et al. Inhibition of GSK3 Represses the Expression of Retinoic Acid Synthetic Enzyme ALDH1A2 via Wnt/β-Catenin Signaling in WiT49 Cells. Front Cell Develop Biol. 2020;8:94.

10. Montenegro ML, Bonocher CM, Meola J, Portella RL, Ribeiro-Silva A, Brunaldi MO, et al. Effect of Physical Exercise on Endometriosis Experimentally Induced in Rats. Reprod Sci. 2019;26(6):785-93.

11. Armour M, Sinclair J, Chalmers KJ, Smith CA. Self-management strategies amongst Australian women with endometriosis: a national online survey. BMC Complemen Alter Med. 2019;19(1):17.

12. Awad E, Ahmed HAH, Yousef A, Abbas R. Efficacy of exercise on pelvic pain and posture associated with endometriosis: within subject design. J Physic Ther Sci. 2017;29(12):2112-5.

13. Poli-Neto OB, Oliveira AMZ, Salata MC, Cesar Rosa-e-Silva J, Machado DRL, Candido-dos-Reis FJ, et al. Strength Exercise Has Different Effects on Pressure Pain Thresholds in Women with Endometriosis-Related Symptoms and Healthy Controls: A Quasi-experimental Study. Pain Med. 2020;21(10):2280-7.

14. Krupa A, Padała O, Putowski M, Konopelko M, Piasek E. Available treatment methods for endometriosis. J Educ Health Sport. 2019;9(7):178-84.

15. Del Mar Méndez-Casillas M, Cruz ML, Velazquez-Cruz J, Chompre G, Appleyard CB. Exercise Decreases Estrogen Receptor β and Inflammatory Cytokines in the Mesenteric Fat of an Endometriosis Rat Model. FASEB J. 2020;34(S1):1-.

16. Lopez A, Cruz ML, Chompre G, Hernández S, Isidro RA, Flores I, et al. Influence of Stress on the Vitamin D-Vitamin D Receptor System, Macrophages, and the Local Inflammatory Milieu in Endometriosis. Reprod Sci. 2020;27(12):2175-86.

17. Ciavattini A, Serri M, Delli Carpini G, Morini S, Clemente N. Ovarian endometriosis and vitamin D serum levels. Gynecol Endocrinol. 2017;33(2):164-7.

18. Parazzini F, Viganò P, Candiani M, Fedele L. Diet and endometriosis risk: a literature review. Reprod Biomed Online. 2013;26(4):323-36.

19. Giampaolino P, Corte LD, Foreste V, Bifulco G. Is there a relationship between vitamin D and endometriosis? An overview of the literature. Curr Pharma Design. 2019;25(22):2421-7.

20. Moher D, Dulberg CS, Wells GA. Statistical power, sample size, and their reporting in randomized controlled trials. Jama. 1994;272(2):122-4.

21. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals: Canadian Council on Animal Care Ottawa; 1993.

22. Kiani K, Movahedin M, Malekafzali H, 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. 2018;16(5):305.

23. Manna I, Jana K, Samanta P. Effect of intensive exercise-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders in mature male Wistar strain rats: a correlative approach to oxidative stress. Acta Physiol Scand. 2003;178(1):33-40.

24. Mahmoud RH. The impact of vitamin B6 supplementation on experimental colitis and colonic mucosal DNA content in female rats fed high-sucrose diet. Aust J Basic Appl Sci. 2011;5:1051-60.

25. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45-e.

26. He B, Lanz RB, Fiskus W, Geng C, Yi P, Hartig SM, et al. GATA2 facilitates steroid receptor coactivator recruitment to the androgen receptor complex. Proceed Natl Acad Sci. 2014;111(51):18261-6.

27. Dhillon PK, Holt VL. Recreational physical activity and endometrioma risk. Am J Epidemiol. 2003;158(2):156-64.

28. Shah DK, Correia KF, Vitonis AF, Missmer SA. Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. Hum Reprod. 2013;28(7):1783-92.

29. Fjerbæk A, Knudsen UB. Endometriosis, dysmenorrhea and diet—What is the evidence? Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol. 2007;132(2):140-7.

30. Darling AM, Chavarro JE, Malspeis S, Harris HR, Missmer SA. A prospective cohort study of Vitamins B, C, E, and multivitamin intake and endometriosis. J Endometrios Pelvic Pain Disord. 2013;5(1):17-26.

31. Bellelis P, Podgaec S, Brão MM. Environmental factors and endometriosis. Rev Assoc Méd Brasil (English Edition). 2011;57(4):448-52.

32. Hansen S, Knudsen UB. Endometriosis, dysmenorrhoea and diet. Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol. 2013;169(2):162-71.

33. Zhang SM, Willett WC, Selhub J, Hunter DJ, Giovannucci EL, Holmes MD, et al. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. J Natl Cancer Institute. 2003;95(5):373-80.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-22]