

The Effect of Swimming Training and Vitamin B6 Intake on GATA2 Gene Expression in Endometriosis Rat

Ghasemian Langharodi S¹, Farzanegi P^{*1}, Moradi L²

1. Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

2. Department of Sport Physiology, Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

***Corresponding author.** Tel: +989112230233, Fax: +981142265394, E-mail: Parvin.farzanegi@gmail.com

Received: Oct 22, 2019

Accepted: Dec 21, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: In the pathogenesis of endometriosis, a variety of genes are involved. The aim of this study was to investigate the GATA2 gene expression changes in endometriosis model rats following a period of aerobic exercise and vitamin B6 intake.

Methods: For this purpose, 25 adult Wistar rats were randomly divided into 5 groups of healthy control, patient control, patient+Training, patient+vitamin, patient+vitamin+Training. In order to model endometriosis, rats were anesthetized first and after abdominal muscle opening, ovarian tissue and part of uterine tissue were removed and were inserted into a sterile container with one cc of PBS and sliced and the fragments were then transplanted to the abdominal and ovarian areas. The amount of vitamin intake was 60mg/kg and swimming program lasted 8 weeks, five days a week for 30 minutes each day. One-way ANOVA test and Tukey post hoc test was used for data analysis.

Result: The results showed that a period of swimming exercise program in the patient + training group significantly Increase GATA2 levels compared to the Patient control group ($p \leq 0.001$). GATA2 gene expression was also significantly increased in the patient + training + vitamin group compared to the Patient control group ($p = 0.002$). However, its level in the patient group was significantly lower than that of the Healthy control group ($p \leq 0.001$).

Conclusion: Regular aerobic exercise as well as concomitant intake of vitamin B6 may decrease GATA2 gene expression in endometrial model rats.

Keywords: Swimming; Vitamin; GATA2; Endometriosis

تأثیر تمرین شنا و مصرف ویتامین B6 بر بیان ژن GATA2 در رت‌های مدل اندومتريوز

سپیده قاسمیان لنگرودی^۱، پروین فرزانیکی^{۱*}، لیدا مرادی^۲

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۱۲۲۳۰۲۳۳ فاکس: ۰۱۱۴۲۲۶۵۳۹۴ پست الکترونیک: Parvin.farzanegi@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: در پاتوژنز بیماری اندومتريوز عوامل مختلفی از ژن‌ها درگیر هستند. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات بیان ژن GATA2 رت‌های مدل اندومتريوز به دنبال یک دوره تمرین شنا و مصرف ویتامین B6 بود.

روش کار: بدین منظور ۲۵ سر رت بالغ نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۵ گروه کنترل سالم، کنترل بیمار، بیمار+تمرین، بیمار+ویتامین، بیمار+ویتامین+تمرین دسته‌بندی شدند. به منظور ایجاد مدل اندومتريوز، 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 قطعه قطعه گردیدند و سپس این قطعات به نواحی شکمی و تخمدان پیوند زده شدند. میزان مصرف ویتامین، ۶۰ mg/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: یک دوره برنامه تمرینی شنا در گروه بیمار+تمرین سبب افزایش معنادار سطوح GATA2 نسبت به گروه کنترل بیمار ($p=0/001$) گردید. همچنین سطح بیان ژن GATA2 در گروه بیمار+تمرین+ویتامین نسبت به گروه کنترل بیمار افزایش معنادار داشت ($p=0/002$) و این در حالی بوده که سطح آن در گروه کنترل بیمار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنادار داشت ($p=0/001$).

نتیجه‌گیری: انجام فعالیت ورزشی منظم هوازی همراه با مصرف ویتامین B6 می‌تواند منجر به کاهش سطح بیان ژن GATA2 در رت‌های مدل اندومتريوز گردد.

واژه‌های کلیدی: شنا، ویتامین، GATA2، اندومتريوز

پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۳۰

دریافت: ۱۳۹۸/۷/۳۰

مقدمه

علائم همراه است که شایع‌ترین آن‌ها درد مزمن لگنی و ناباروری است [۲،۳]. در پاتوژنز این بیماری عوامل مختلفی مانند انتقال معکوس سلول‌های آندومتر، نقص ایمنی، ژنتیک، متاپلازی^۳، هورمون‌ها و شرایط محیطی تأثیر دارند [۴]. اخیراً اهداف درمانی بر روی مهار جریان سلول بنیادی و آغاز و تکثیر آندومتريوز

رشد غدد و استرومای آندومتر^۱ در خارج از رحم اندومتريوز^۲ نامیده می‌شود و یکی از شایع‌ترین دلایل ناباروری است که تقریباً ۱۰ درصد از زنان را در سنین باروری مبتلا می‌کند [۱]. اندومتريوز با طیفی از

^۱ Endometrial Stromal

^۲ Endometriosis

^۳ Metaplasia

تمرکز پیدا کرده است. در این راستا مطالعات نشان داده است فعال شدن یا غیرفعال شدن فاکتورهای رونویسی می‌تواند باعث پیشبرد اندومتریوز، بقا و تکثیر سلولی شود. فاکتورهای رونویسی می‌توانند غالباً به عنوان انکوژن عمل کنند [۵].

اخیراً رده سومی از فاکتورهای رونویسی معرفی شده است که فقدان آن‌ها در توسعه بیماری‌های ناباروری مشارکت دارد، این فاکتورها شامل برخی از پروتئین‌های خانواده رونویسی انگشت روی (GATA)^۱ است که به‌طور طبیعی در تکثیر و تمایز سلولی شرکت داشته و تمایز سلولی را افزایش می‌دهد [۶]. عملکرد ناقص یا بیان کاهش یافته این فاکتورها به علت عدم تمایز سلول‌های تأثیر یافته و خروج سیکل سلولی در توسعه اندومتریوز مشارکت دارند. خانواده فاکتورهای رونویسی GATA در پستانداران متشکل از ۶ عضو (GATA1- GATA6) است [۵، ۷]. بر اساس الگوهای بیان و همولوژی توالی، خانواده GATA شامل دو زیر خانواده است: GATA1/2/3 عمدتاً در سلول‌های هماتوپوئیتیک (خون‌ساز) بیان می‌شوند در حالی که GATA4/5/6 در بافت‌های مختلف مشتق شده از مزودرم و اندودرم مثل قلب و دستگاه گوارش بیان می‌شوند [۵]. GATA2 به عنوان فاکتور تنظیم‌کننده رونویسی که بیشتر باعث افزایش بیان ژن‌ها می‌شود، فعالیت دارد. این ژن در مسیرهای بیولوژیکی از جمله انعقاد خون، تمایز سلولی عضلات صاف، پاسخ سلولی به هیپوکسی^۲، کاهش سرعت مرگ سلولی، کاهش بیان فاکتور رشد بتا ۱ و ۲^۳، اتصال به توالی خاص DNA و فعالیت فاکتور رونویسی فعالیت دارد [۷]. از سوی دیگر، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ صورت گرفته است نشان داده شده است که یک شبکه بزرگ از تنظیم‌گرهای رونویسی به‌صورت متفاوتی در

آندومتریوز متبله می‌شود که شامل اعضای خانواده GATA بوده که در بین آنها GATA2 به شدت نقش مهمی در این فرایند دارد. همچنین، بر اساس نقش آن در تمایز گلبول قرمز، احتمال دارد GATA2 در القا رشد و ویژگی بنیادی سلول‌های پیش‌ساز آندومتریوز مؤثر باشد [۶، ۷].

شواهد نشان می‌دهد که بیماران مبتلا به اندومتریوز دارای سطوح بالاتر استرس اکسایشی و سایتوکین‌های التهابی و پیش‌التهابی می‌باشند [۵]. محققان جهت کاهش این علائم، افزایش روند بهبودی و کیفیت زندگی بیماران، مطالعات انجام مداخلات مناسب را مورد تأکید قرار دادند؛ چرا که دیده شده که در ترشحات و مایعات رحمی افراد مبتلا به اندومتریوز سطح شاخص‌های اکسیدکننده بالاست [۷] و به‌طور کلی سطح آنزیم‌های ضد اکسیداسیون مثل سوپراکسیددسموتاز (SOD)^۴، کاتالاز (CAT)^۵، گلووتاتیون پراکسیداز (GPX)^۶ و آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی مثل ویتامین C و E و B در زنان مبتلا پایین‌تر است [۷، ۵]. 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 B1، B2، B6 از پیشرفت اندومتریوز جلوگیری می‌کنند (۸).

از سوی دیگر مطالعات نشان داد استفاده مداخله‌های ورزشی در بیماران مبتلا به اندومتریوز اثربخش می‌باشد [۸]. 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 [۹]. در رویکرد ورزش‌درمانی به بیمار کمک می‌شود

⁴ Superoxide Dismutase

⁵ Catalase

⁶ Glutathione Peroxidase

¹ Zinc Finger Transcription Factor (GATA)

² Hypoxia

³ TGF-β1-2

تا با سرعت بهبودی بیشتر همراه گردد [۱۰]. تمرینات هوازی یکی از متداول‌ترین روش‌های تمرینی برای بهبود عملکرد ناباروری و بیماری‌های زنان 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 بافت رحم، التهاب سیستمیک و در نتیجه بهبود پاسخ‌های ایمنی گردد [۱۱]. 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 [۱۲]. فعالیت ورزشی آرام تا متوسط به علت افزایش جریان خون به تدریج سبب بهبود فعالیت متابولیکی می‌شود اما فعالیت شدید به دلیل تغییر جهت جریان خون به سمت عضلات فعال سبب کاهش آن می‌شود [۱۱-۱۳]. ولی تحقیقی که تأثیر تمرین هوازی به ویژه شنا را بر بیان ژن GATA2 بافت تخمدان مورد بررسی قرار دهد، مشاهده نشد. براساس شواهد یاد شده، پژوهش‌های انجام گرفته در زمینه تأثیر تمرینات ورزشی بر بیان ژن GATA2 محدود و در عین حال از جمع‌بندی روشنی برخوردار نیست. نظر به اهمیت پیامدهای ناشی از اندومتریوز چون کاهش کیفیت زندگی، توانایی کار و ارتباطات اجتماعی و نیز اختلال عملکرد جنسی و همچنین اهمیت نقش فعالیت ورزشی و ارتباط آن با سلامت جسمی، انجام پژوهش در این زمینه حائز اهمیت می‌باشد. 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 بررسی تأثیر یک دوره تمرین شنا با شدت پایین با مصرف ویتامین B6 بر بیان ژن GATA2 بافت تخمدان در رت‌های مدل اندومتریوز انجام گرفت.

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، در صورتی که تفاوت‌های مورد انتظار برابر با ۱/۵ باشد، با توان آزمون ۸۰ درصد در سطح معنی داری ۰/۰۵، تعداد آزمودنی‌های هر گروه برابر پنج می‌باشد [۱۴]. بدین منظور تعداد ۲۵ سر رت بالغ نژاد ویستار ۶ تا ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی با میانگین وزنی $202/85 \pm 15/62$ گرم از انستیتو پاستور خریداری و به مرکز پژوهش منتقل 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 [۱۵]. 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. 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. به منظور ایجاد مدل اندومتریوز، 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^۱ PBS 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 [۱۶].

ویتامین B6 دو هفته بعد از القای بیماری به صورت روزانه و به شکل گاوآبه به میزان ۶۰ mg/kg وزن بدن، رت‌های گروه بیمار + ویتامین و بیمار + ویتامین + تمرین دریافت کردند [۹، ۱۳، ۱۷].

رت‌های گروه‌های بیمار + تمرین و بیمار + ویتامین + تمرین، قبل از شروع پروتکل اصلی، به مدت یک هفته (۵ روز) هر بار به مدت مدت ۲۰ دقیقه به منظور آشنایی 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 [۹، ۱۳] و مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود [۱۷].

جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه‌برداری 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 (۳۰-۵۰ mg/kg) و زایلازین (۳-۵ mg/kg) 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 GATA2 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 [۱۸]. 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 کيازول^۲، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن^۳ استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I Fermentas قرار گرفت. سپس کیفیت RNAهای استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری^۴ (DPI-1, Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر Oligodt MWG-Biotech, Germany و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (شرکت فرمنتاز^۵) استفاده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. هر واکنش PCR با استفاده از Applied Biosystems PCR master mix و SYBER Green در دستگاه 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 ۳۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای

^۲ Kiazol^۳ CinnaGen^۴ Spectrophotometry^۵ Fermentas^۱ Phosphate Buffer Solution

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. توالی پرایمرها در جدول یک مشاهده می‌شود.

نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قراردادن 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 [۱۸].

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 $p \leq 0.05$ برای بررسی تغییرات بیان ژن GATA2 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 Gata2 مشاهده می‌شود.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن مورد مطالعه

Gata2- Forward	5'CCAAGAGACCCACTTCCTCC3'
Gata2- Reverse	5'TCTATCCCTAGTCTCCTCCTCT5'

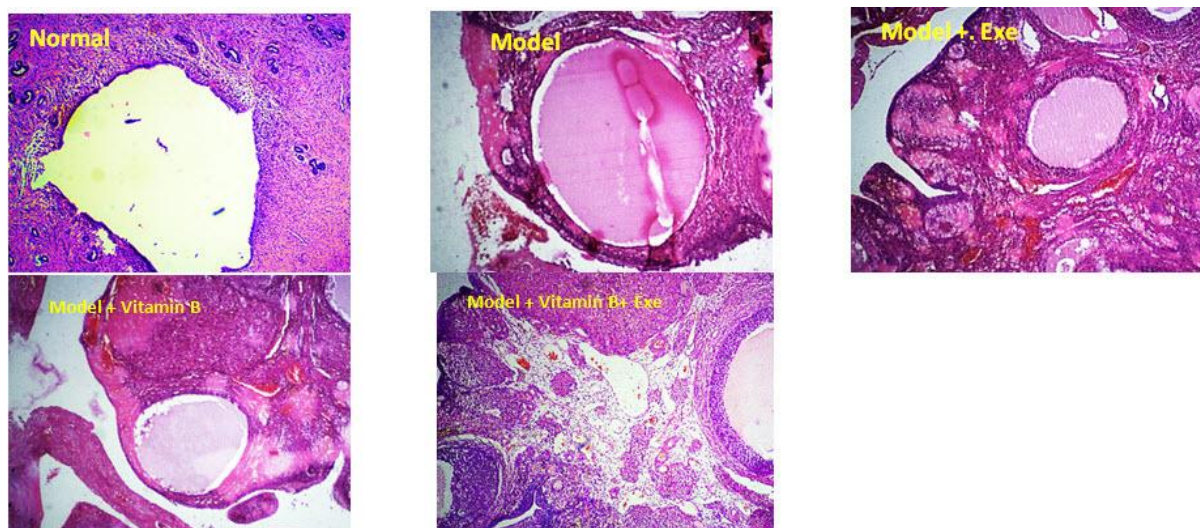
جدول ۲، میانگین وزن موش‌های گروه‌های مختلف تحقیق را نشان می‌دهد. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد تفاوت معناداری در وزن موش‌های گروه‌های مختلف تحقیق وجود ندارد.

جدول ۲. میانگین وزن در گروه‌های مختلف تحقیق

گروه	کنترل سالم	کنترل بیمار	بیمار + ورزش	بیمار + ویتامین	بیمار + ویتامین + تمرین
شاخص	میانگین	میانگین	میانگین	میانگین	میانگین
وزن (گرم)	۲۰۵/۵ ± ۵/۱۶	۲۰۲/۵ ± ۱۴/۱۸	۲۱۰/۵ ± ۶/۱۵	۲۱۶/۷ ± ۳/۱۸	۲۱۱/۱۵ ± ۷/۰۵

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 اندومتری 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 کوچک‌تر شدن سایز کیست و حذف آن در آینده محسوب شود. در گروه ورزش و ویتامین، ترشحات داخل حوزة 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).



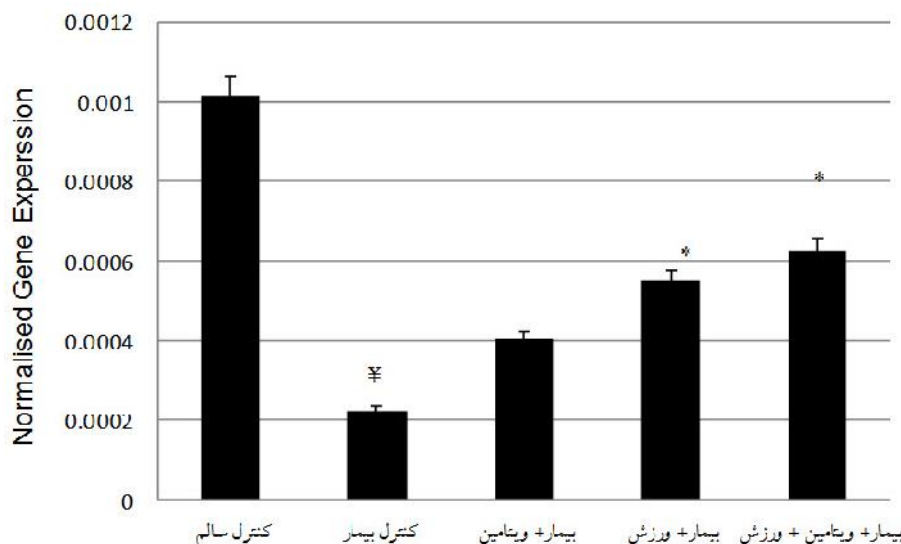
شکل ۱. نتایج هیستولوژی بافت تخمدان گروه‌های تحقیق

بر اساس نتایج آنالیز یک‌طرفه، بین مقادیر سطوح GATA2 در گروه‌های تحقیق، تفاوت آماری

معناداری وجود دارد ($p \leq 0.01$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد در گروه کنترل بیمار سطح GATA2

نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنادار داشت ($p=0/000$)؛ در حالی که ۸ هفته تمرین شنا با شدت پایین موجب افزایش معنادار سطوح GATA2 در گروه بیمار + تمرین نسبت به گروه کنترل بیمار و نیز

گروه بیمار + ویتامین + ورزش نسبت به گروه کنترل بیمار گردید (به ترتیب $p=0/001$ ، $p=0/002$)؛ این در حالی است که بین دیگر گروه‌ها تفاوت معناداری مشاهده نشد ($p\geq 0/01$) (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن GATA2 در گروه‌های مختلف تحقیق

* نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه کنترل بیمار

‡ نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه کنترل سالم

بحث

در تحقیق حاضر تأثیر یک دوره برنامه تمرین شنا با شدت پایین به همراه مصرف ویتامین B6 بر بیان ژن GATA2 در موش‌های مدل اندومتریوز مورد بررسی قرار گرفت. از نتایج مهم تحقیق حاضر کاهش معنادار سطوح GATA2 رت‌های مدل بیمار نسبت به گروه سالم می‌باشد که با مداخله ورزش سطح آن نسبت به گروه بیمار افزایش معنادار داشت. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه برخی از محققین که در تحقیق خود اظهار داشتند بیماری آندومتریوز منجر به کاهش بیان ژن خانواده GATA می‌گردد، همسو است [۱۹،۲۰]، و نیز با برخی از مطالعات که نشان دادند که انجام فعالیت بدنی منجر به افزایش سطح بیان ژن GATA2 می‌شود، هم‌راستا می‌باشد [۹،۲۱،۲۲،۲۳]. پزشکان و محققان در بررسی این بیماری، دریافتند که ژن‌های بسیاری در بهبود و

توسعه این بیماری درگیر هستند که از جمله این ژن‌ها می‌توان به خانواده GATA اشاره کرد [۲۰]. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که بیماری آندومتریوز از تغییر در برخی از اعضای خانواده GATA از قبیل GATA2 نیز حاصل می‌شود [۲۴]. عملکرد ناقص یا بیان کاهش یافته این فاکتور به علت عدم تمایز سلول‌های تأثیر یافته و خروج سیکل سلولی در توسعه آندومتریوز مشارکت دارند [۲۵]. 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 [۲۲]. با این حال، عوامل قابل اصلاحی مانند تغذیه و فعالیت بدنی وجود دارند که به پیشگیری و درمان از طریق تنظیم و تعدیل این بیماری کمک می‌کنند [۲۶،۲۷]. فعالیت بدنی هوازی می‌تواند تأثیرات مختلفی روی

این بیماری بسته به ذخیره انرژی، قدرت و تناوب ورزش و همچنین میزان استرس اکسایشی ناشی از ورزش داشته باشند [۲۸،۲۹]. 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 در این زمینه شامل مواردی مانند کاهش استرس اکسایشی، تقویت سیستم ایمنی، تعدیل عوامل هورمونی است [۳۰].

مونتنگرو^۱ و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که ورزش سبک (شنا یک بار در هفته)، ورزش متوسط (شنا ۳ بار در هفته) و ورزش شدید (شنا ۵ بار در هفته) منجر به کاهش در اندازه ضایعات آندومتریوتیک بدون در نظر گرفتن فراوانی آن می‌گردد و البته کاهش بیشتر آن در گروه‌هایی که فعالیت متوسط و پایین داشتند، مشاهده شد [۹].

همچنین آدریانا^۲ و همکاران در مطالعه خود اظهار داشتند که از جمله روش‌های درمانی در زنان مبتلا به آندومتریوز، درمان دارویی و جراحی و فعالیت ورزشی هوازی و مصرف آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد [۳۰]. کاهش بیان غیرطبیعی GATA2 منجر به پاتوژنز می‌شود که در انواع مختلفی از بدخیمی‌ها و توسعه بیماری آندومتریوز مشاهده می‌شود [۳۱].

مطالعات نشان دادند که فعالیت ورزشی مانند شنا دارای نقش ضدالتهابی است. گزارش شده است میزان فاکتورهای التهابی پس از یک دوره فعالیت هوازی کاهش و بیان GATA2 استراحتی پس از یک دوره فعالیت هوازی افزایش می‌یابد [۲۶]. احتمالاً یکی از مکانیسم‌های ضدتوموری ایجادشده توسط فعالیت هوازی مانند شنا، به کاهش حضور ماکروفاژ در محیط کوچک توموری مربوط می‌شود [۲۹]. نشان داده شده است که فعالیت هوازی فرآیندهای التهابی سیستمیک و موضعی را تعدیل می‌کند. این فعالیت منجر به کاهش توده چربی احشایی و کاهش متعاقب

در ترشح آدیپوکین‌های پیش‌التهابی و همچنین کاهش در تکثیر ماکروفاژها به داخل بافت چربی می‌شود [۳۱]. فعالیت هوازی همچنین می‌تواند پولاریزاسیون ماکروفاژ را در بافت چربی به سمت یک فنوتیپ M2 ضدالتهابی وادار کند، در نتیجه کاهش التهاب سیستمیک به وجود آورد که از این طریق بر بیان GATA2 اثر می‌گذارد [۳۲]. نتایج مطالعات نشان داد که تمرین هوازی از قبیل شنا با توجه به بهبود کاهش سطح بیان ژن‌های التهابی، سطح کیفیت زندگی را در افراد مبتلا به اندومتریوز افزایش می‌دهد [۲۸].

فعالیت بدنی می‌تواند باعث آزاد شدن اکسیدنیتریک^۳ گردد. اکسیدنیتریک، آنزیم گوانیل سیکلاز را فعال کرده و در نتیجه میزان cGMP^۴ افزایش می‌یابد. این افزایش منجر به اتساع عروق دستگاه تناسلی شده و باعث افزایش جریان خون در آن می‌شود و متعاقب آن منجر به افزایش بیان ژن‌های درگیر در این بیماری از قبیل بیان ژن GATA2 می‌گردد [۳۰].

همین‌طور افزایش چگالی مویرگی در پاسخ به فعالیت‌های ورزشی منجر به فراهم کردن اکسیژن کافی در بافت‌ها می‌گردد و این مورد باعث فعال‌سازی و تغییر در نفوذپذیری غشاء سلولی و به دنبال آن افزایش ساخته‌شدن mRNA و تقسیم سلولی می‌شود و سطح بیان ژن GATA2 افزایش می‌یابد [۳۱].

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که دوره برنامه تمرینی شنا با شدت پایین به همراه مصرف ویتامین B6 منجر به افزایش سطح GATA2 نسبت به گروه بیمار گردید. گیامپولینو^۵ و همکاران (۲۰۱۹) در یک مطالعه مروری به بررسی ارتباط بین ویتامین‌ها و بیماری آندومتریوز پرداختند و نشان دادند که بین گروه ویتامین‌ها و بهبودی بیماری آندومتریوز رابطه مستقیمی برقرار است و ویتامین

^۳ Nitric Oxide^۴ Cyclic Guanosine Monophosphate^۵ Giampaolino^۱ Montenegro^۲ Adrianna

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 انجام فعالیت ورزشی منظم هوازی و نیز مصرف هم‌زمان ویتامین B6 می‌تواند منجر به کاهش سطح بیان ژن GATA2 در رت‌های مدل آندومتريوز گردد.

تشکر و قدردانی

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

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.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

خانواده گروه B منجر به تسکین درد و بهبود ضایعه آندومتريوتیک در مدل‌های آزمایشگاهی و کاهش علائم این بیماری می‌شود [۳۳]. تحقیقات نشان دادند که رژیم غذایی سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری از رشد و متاستاز اندومتريوز نقش دارند [۱۹]. ویتامین گروه B نقش مهمی در پیشگیری و درمان آن از طریق تعدیل مسیرهای سیگنالی سلولی دارد [۲۳]. ویتامین B6 عامل ضد التهابی قوی و ضد جهش و تقویت‌کننده عصب شناخته شده است [۳۳] 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 [۲۲]. 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 GATA2 پس از فعالیت ورزشی به همراه مصرف ویتامین B6 ممکن است به واسطه حذف رادیکال‌های آزاد باشد [۳۰]. زیرا این ویتامین دارای آنتی‌اکسیدان‌هایی است که با تقویت سیستم ایمنی بدن انسان، مقاومت در برابر بیماری‌های التهابی را افزایش می‌دهند.

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

References

- 1- Sampson CS, White K. Endometriosis: An Unusual Cause of Bilateral Pneumothoraces. Clin Pract Cases Emerg Med. 2020 Jan 24;4(1): 35-37.

- 2- Holoch KJ, Lessey BA. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2010 Aug;27(8):441-47.
- 3- Schrager S, Falleroni J, Edgoose J. Evaluation and treatment of endometriosis. *Am Fam Physician.* 2013 Jan;87(2):107-13.
- 4- Nisenblat V, Bossuyt PM, Farquhar C, Johnson N, Hull ML. Imaging modalities for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Feb 26;2:CD009591.
- 5- Shimizu R, Yamamoto M. GATA-related hematologic disorders. *Exp Hematol.* 2016 Aug;44(8):696-705.
- 6- Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, Shaw PA, Zerbe CS, Calvo KR, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood.* 2014 Feb 6;123(6):809-821
- 7- Bigley V, Cytlak U, Collin M. Human dendritic cell immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol.* 2019 Feb;86:50-61.
- 8- 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. *Human Reproduction Update.* 2011 March;17 (2): 159-70.
- 9- Montenegro ML, Bonochoer 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 Jun;26(6):785-793.
- 10- Bagheri Hamzian Olya J, Khadem Ansari M H, Yaghmaei P. The effect of endurance running activities on Prolactin, Testosterone and DHEA-S levels. *Stud Med Sci.* 2011; 21 (5) :391-397
- 11- Taher, Z. Hamednia, M. Haghighi, H. Investigation of Effect of one Session Moderate and Heavy Resistance Exercise on Acute and Delayed Responses of Leptin, Insulin, Cortisol, Testosterone and 24- Hour Energy Expenditure in Healthy Men. *IJEM.* 2011; 13(1): 67. [Full txt in persian].
- 12- Urhausen A, Kullmer T, Kindermann W. A 7 week follow up study of the behavior of testosterone and cortisol during the competition period in rowers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1987;56(5):528-33.
- 13- Manna I, Jana K, Samanta PK. 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 May;178(1):33-40.
- 14- Moher D, Dulberg CS, Wells GA. Statistical power, sample size, and their reporting in randomized controlled trials. *JAMA.* 1994 Jul 13;272(2):122-4.
- 15- Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. 2nd ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care Ottawa Pub; 1993. 1-193.
- 16- Kiani K, Movahedin M, Malekafzali H, Mirfasihi F, Nargess Sadati S.N, Moini A, et al. Effect of the estrus cycle stage on the establishment of murine endometriosis lesions. *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2018 May; 16(5): 305-314.
- 17- Rasha H. M. The Impact of Vitamin B 6 Supplementation on Experimental Colitis and Colonic Mucosal DNA Content in Female Rats Fed High Sucrose Diet. *AJBAS.* 2011; 5(5): 1051-1060.
- 18- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research.* 2001 May 1;29(9):e45-.
- 19- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Dec 23;111(51):18261-6.
- 20- Johnson KD, Hsu AP, Ryu MJ, Wang J, Gao X, Boyer ME, et al. Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. *J Clin Invest.* 2012 Oct;122(10):3692-704.
- 21- 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 Jul;28(7):1783-92.
- 22- 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.

- 23- Dhillon PK, Holt VL. Recreational physical activity and endometrioma risk. *Am J Epidemiol*. 2003 Jul 15;158(2):156-64.
- 24- Suzuki M, Katayama S, Yamamoto M. Two effects of GATA2 enhancer repositioning by 3q chromosomal rearrangements. *IUBMB Life*. 2020 Jan;72(1):159-169.
- 25- Leubolt G, Redondo Monte E, Greif PA. GATA2 mutations in myeloid malignancies: Two zinc fingers in many pies. *IUBMB Life*. 2020; 72(1):151-158.
- 26- Rubel CA, Wu SP, Lin L, Wang T, Lanz RB, Li X, et al. A Gata2-Dependent Transcription Network Regulates Uterine Progesterone Responsiveness and Endometrial Function. *Cell Rep*. 2016 Oct 25;17(5):1414-1425.
- 27- Bakker ST, Passegue E. Resilient and resourceful: genome maintenance strategies in hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2013 Nov;41(11):915-23.
- 28- Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*. 2002 May;77(5):861-70.
- 29- Febbraio MA. Exercise and inflammation. *J Appl Physiol*. 2007;103:376–377.
- 30- Adrianna K, Olga P, Maciej P, Michał K, Ewa P. Available treatment methods for endometriosis. *J Educ Health Sport*. 2019;9(7):178-184.
- 31- Nagayama K, Sasaki S, Matsushita A, Ohba K, Iwaki H, Matsunaga H, et al. Inhibition of GATA2-dependent transactivation of the TSHbeta gene by ligand-bound estrogen receptor alpha. *J Endocrinol*. 2008 Oct;199(1):113-25.
- 32- Goh, J, Kirk, EA, Lee, S.X, Ladiges, W.C. Exercise, Physical Activity and Breast Cancer: The Role of Tumor-Associated Macrophages. *Exerc Immunol Rev*. 2012;18:158-76.
- 33- Giampaolino P, Della Corte L, Foreste V, Bifulco G. Is there a relationship between Vitamin D and Endometriosis? An overview of literature. *Curr Pharm Des*. 2019;25(22):2421-2427.