

Original Article

The effect of aerobic exercise and consumption of vitamin B6 and omega-3 on the expression of genes related to autophagy caused by endometriosis in female rats

Zahra Rezaeei,[✉] Parvin Farzanegi*,[✉] Hajar Abbaszadeh

Exercise Physiology Department, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Abstract

Background and Purpose: Endometriosis is an estrogen-dependent inflammatory disease that affects 5-10% of women of reproductive age. Different cellular pathways are involved in the pathogenesis of endometriosis. One of these pathways is autophagy. Autophagy is a genetically and evolutionarily conserved programmed process that degrades long-lived cellular proteins and organelles. The aim of this study was to investigate the effect of aerobic exercise and consumption of vitamin B6 and omega-3 on the expression of genes related to autophagy caused by endometriosis in female rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 40 adult male Wistar rats were about eight weeks old. After transferring the rats to the laboratory environment and after two weeks of familiarization with the new environment and creating the endometriosis model, randomly and with an equal number of five rat in each group, they were divided into the control-healthy, endometriosis, sham, endometriosis+exercise, endometriosis+B6, endometriosis+omega-3, endometriosis+exercise groups after creating an endometriosis model+ B6, endometriosis+exercise+omega-3 were categorized. The duration of training in the water was 30 minutes daily until the end of the training period. Two weeks after the creation of the model, omega-3 supplement at a dose of 2 ml/kg to the endometriosis+omega-3 and endometriosis+exercise+omega-3 groups and vitamin B6 supplement at the rate of 60 mg/kg body weight of the rats to the groups endometriosis+B6 and endometriosis+exercise+B6 were taken daily in the form of gavage. One-way analysis of variance was used to analyze the data.

Results: The results showed that the expression levels of LC3-I and LC3-II genes in the endometriosis group were significantly higher than the healthy control group ($P < 0.0001$) and the expression levels of LC3-I and LC3-II genes in the group endometriosis+exercise, endometriosis+omega-3, endometriosis+B6, endometriosis+exercise+B6 and endometriosis+exercise+omega-3 were significantly lower than the endometriosis group ($P < 0.0001$). Their values in endometriosis+exercise+B6 and endometriosis+exercise+omega-3 groups were significantly lower than other groups ($P < 0.0001$). Also, the results showed that the expression levels of FOXO3 and LC3-II/I genes in the endometriosis group were significantly lower than in the healthy control group ($p < 0.0001$). The expression levels of FOXO3 and LC3-II/I genes in endometriosis+exercise, endometriosis+omega-3, endometriosis+B6, endometriosis+exercise+B6 and endometriosis+exercise+omega-3 groups were significantly higher than the endometriosis group ($P < 0.05$). Their values in endometriosis+exercise+B6 and endometriosis+exercise+omega-3 groups were significantly higher than other groups ($P < 0.0001$).

Conclusion: In general, the results of the present research indicate that the increased expression of autophagy genes that occurs in endometriosis can be inhibited by regular aerobic exercise such as swimming and omega-3 and B6 supplements. Probably, the pathological disorder caused in autophagy by exercising and supplementing omega-3 and B6 through the regulatory reduction of the expression of lc3-I, lc3-II genes and the increase of the expression of FOXO3 genes and the ratio of lc3-II / lc3-I helps in improving endometriosis.

Keywords: Autophagy, Endometriosis, Aerobic exercise, Omega-3, B6.

How to cite this article: Rezaeei Z, Farzanegi P, Abbaszadeh H. The effect of aerobic exercise and consumption of vitamin B6 and omega-3 on the expression of genes related to autophagy caused by endometriosis in female rats. *Journal of Sport and Exercise Physiology* 2023;16(2):24-35.

*Corresponding Author; E-mail: parvin.farzanegi@gmail.com

<https://doi.org/10.48308/joeppa.2023.103530>

Received: 10/11/2022

Revised: 04/02/2023

Accepted: 15/02/2023



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقاله پژوهشی

تأثیر تمرینات هوازی و مصرف ویتامین B6 و امگا ۳ بر بیان ژن‌های وابسته به اتوفازی ناشی از اندومتريوز در موش‌های ماده

زهرا رضایی^۱، پروین فرزانیگی*^۲، هاجر عباس‌زاده

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

چکیده

زمینه و هدف: اندومتريوز یک بیماری التهابی وابسته به استروژن است که ۵-۱۰ درصد زنان را در سن باروری تحت تأثیر قرار می‌دهد. در پاتوژنز بیماری اندومتريوز مسیرهای سلولی گوناگونی درگیرند. یکی از این مسیرها اتوفازی است. اتوفازی یک فرایند برنامه‌ریزی شده از نظر ژنتیکی و تکاملی حفاظت شده است که پروتئین‌های سلولی با عمر طولانی و ارگانل‌ها را تخریب می‌کند. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرینات هوازی و مصرف ویتامین B6 و امگا ۳ بر بیان ژن‌های مرتبط با اتوفازی ناشی از اندومتريوز در موش‌های ماده بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، از ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با سن حدود هشت هفته استفاده شد. موش‌ها پس از انتقال به محیط آزمایشگاه و پس از دو هفته آشنایی با محیط جدید و ایجاد اندومتريوز، به صورت تصادفی و به تعداد مساوی پنج سر موش در هر گروه، به گروه‌های کنترل-سالم، اندومتريوز، شام، اندومتريوز+تمرین، اندومتريوز+B6، اندومتريوز+امگا ۳، اندومتريوز+تمرین+B6، اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ جایگزین شدند. مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود. دو هفته پس از ایجاد مدل اندومتريوز، مکمل امگا ۳ با دوز ۲ میلی‌لیتر در کیلوگرم به گروه‌های اندومتريوز+امگا ۳ و اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ و مکمل ویتامین B6 به میزان ۶۰ mg/kg وزن بدن موش‌های صحرایی به گروه‌های اندومتريوز+B6 و اندومتريوز+تمرین+B6 به صورت روزانه و به شکل گاوآذ خورانده شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از تحلیل واریانس یکطرفه استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد میزان بیان ژن‌های LC3-1 و LC3-II در گروه اندومتريوز نسبت به گروه کنترل-سالم به طور معناداری بیشتر بود ($P < 0/0001$) و مقادیر بیان ژن‌های LC3-1 و LC3-II گروه‌های اندومتريوز+تمرین، اندومتريوز+امگا ۳، اندومتريوز+B6، اندومتريوز+تمرین+B6 و اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ نسبت به گروه اندومتريوز+تمرین+B6 و اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ کمتر بود ($P < 0/0001$). مقادیر آن‌ها در گروه اندومتريوز+تمرین+B6 و اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ نسبت به گروه‌های دیگر به طور معنادار کمتر بود ($P < 0/0001$). همچنین نتایج نشان داد میزان بیان ژن‌های FOXO3 و LC3-II/I در گروه اندومتريوز نسبت به گروه کنترل-سالم به طور معناداری کمتر بود ($P < 0/0001$). میزان بیان ژن‌های FOXO3 و LC3-II/I گروه‌های اندومتريوز+تمرین، اندومتريوز+امگا ۳، اندومتريوز+B6، اندومتريوز+تمرین+B6 و اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ نسبت به گروه اندومتريوز+تمرین+B6 و اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ بیشتر بود ($P < 0/05$). مقادیر آن‌ها در گروه اندومتريوز+تمرین+B6 و اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ نیز نسبت به گروه‌های دیگر به طور معناداری بیشتر بود ($P < 0/0001$).

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج پژوهش حاضر بیانگر آن است که افزایش بیان ژن‌های اتوفازی که در اندومتريوز ایجاد شده، می‌تواند با فعالیت ورزشی منظم هوازی مانند شنا و مکمل امگا ۳ و B6 مهار شود. شاید اختلال آسیب‌شناختی ایجاد شده در اتوفازی با انجام فعالیت ورزشی و مکمل امگا ۳ و B6 از طریق کاهش تنظیمی بیان ژن‌های LC3-I، LC3-II، FOXO3 و افزایش بیان ژن‌های FOXO3 و نسبت LC3-II / LC3-I در بهبود اندومتريوز کمک‌کننده باشد. **واژه‌های کلیدی:** اتوفازی، اندومتريوز، تمرینات هوازی، امگا ۳، B6.

* نویسنده مسئول: رایانامه: parvin.farzanehi@gmail.com

مقدمه

موش‌های مبتلا به دیابت منجر می‌شود (۹). همچنین آقاعلی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۹) اثر تمرینات ورزشی در مقابله با رشد تومور از طریق تغییر در بیان ژن‌های LC3 و Bcl-2 در موش‌های مبتلا به سرطان را نشان داده‌اند (۱۰). تحقیقات نشان داده است که انجام فعالیت‌های ورزشی می‌تواند دست‌کم در مورد درمان اندومتريوز، سودمند باشد (۱۱). با این همه، سازوکارهای سلولی و مولکولی هنوز به‌خوبی شناخته نشده است. نشان داده شده است که افزون‌بر تمرین ورزشی عوامل دیگری مانند اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع امگا۳ (O-PuFA) توانایی کاهش نشانه‌های دردناک مربوط به اندومتريوز، کاهش اندازه ضایعه، حفظ توانایی بارداری در بیمار و بروز کمترین تأثیرات جانبی را دارد (۱۲). مصرف غذاهایی با اسیدهای چرب امگا۳ بالا دارای تأثیر ضدالتهابی در عارضه‌هایی مانند آترواسکلروز است. مهم این است که نشان داده شده است که اسید چرب امگا۳ می‌تواند به‌عنوان پیش‌ماده تشکیل دهنده گسترده‌ای از واسطه‌های دخیل در رفع التهاب عمل کند (۱۳، ۱۴). پژوهشگران بیان کرده‌اند که انجام فعالیت‌های ورزشی و نیز افزایش مصرف اسیدهای چرب امگا۳ می‌تواند موجب کاهش احتمال خطر اندومتريوز شود. بی‌تحركی و کمبود مکمل امگا۳ به ایجاد زمینه‌های گوناگونی در توسعه بیماری‌های التهابی منجر می‌شود. ورزش منظم دارای تأثیرات محافظتی در برابر بیماری‌هایی است که شامل فرایندهای التهابی می‌شوند، زیرا موجب افزایش سطح عمومی سایتوکاین‌ها با خواص ضدالتهابی و ضداکسایشی می‌شود و همچنین با کاهش سطح استروژن عمل می‌کند. در سال‌های اخیر، تأثیرات ضدگرایزی، ضدالتهابی، ضدآپوپتوز و ضدتکثیر اسیدهای چرب غیراشباع امگا۳ در چندین مطالعه تجربی نشان داده شده است، مطابق با این مشاهدات، امگا۳ ممکن است گزینه درمانی بسیار مناسبی برای مسیرهای پاتوفیزیولوژی اندومتريوز باشد (۱۲). آزمایش‌های زیادی برای مشاهده تأثیرات گسترده از فعالیت بدنی و مصرف مکمل امگا۳ بر مشکلات بهداشتی انسان مانند پیشگیری و بهبود بیماری‌های التهابی انجام گرفته است. از مزایای افزایش مکمل امگا۳ و فعالیت بدنی می‌توان به نقش آنها به‌عنوان کوفاکتور در فرایندهای بهبودی اشاره کرد. شواهد نشان می‌دهد که بیماران مبتلا به اندومتريوز

اندومتريوز یک بیماری التهابی وابسته به استروژن است که ۵-۱۰ درصد زنان را در سن باروری تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). از علل ایجاد اندومتريوز می‌توان به ناباروری، سابقه خانوادگی اندومتريوز، انسداد راه خروج طبیعی قاعدگی از بدن، سابقه عفونت لگنی و اختلال رحمی اشاره کرد (۱). براساس پژوهش‌های انجام‌گرفته افزون‌بر عوامل محیطی، عوامل ارثی هم در ابتلا به این بیماری نقش مهمی دارند (۱، ۲). در آسیب‌شناسی بیماری اندومتريوز مسیرهای سلولی گوناگونی درگیرند. یکی از این مسیرها اتوفازای است. اتوفازای یک فرایند برنامه‌ریزی‌شده از نظر ژنتیکی و تکاملی حفاظت‌شده است که پروتئین‌های سلولی با عمر طولانی و اندامک‌ها را تخریب می‌کند. در واقع اتوفازای شامل تشکیل وزیکول دوغشایی است که سیتوپلاسم و ارگانل‌ها را احاطه می‌کند و سپس با لیزوزوم‌ها ادغام می‌شود، بنابراین محتوای لیزوزوم را تخریب می‌کند (۳). اتوفازای پاسخی به فرایند آنابولیکی ساختن ماکرومولکول‌هاست و به‌منظور حفظ هومئوستاز انرژی، تأمین‌کننده انرژی است (۴). دانشمندان با ارائه شواهد ثابت کرده‌اند که بین انواع مرگ سلولی، رابطه درونی وجود دارد. مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و نکروز به موازات یکدیگر عمل کرده و اتوفازای را هم درگیر می‌کنند. شرایط و عوامل درونی می‌توانند تعادل بین مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و نکروز را تعیین کنند. در حالت ناتوانی برای سازگار شدن با شرایط گرسنگی، مسیر اتوفازای به سمت مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی یا نکروز می‌رود (۵، ۶). حدود ۳۰ ژن ویژه، اتوفازای را تنظیم می‌کنند که از بین آن‌ها، LC3 (پروتئین زنجیره سبک-۳ مرتبط با میکروتوبول) نقش مهمی در اتوفازای پستانداران ایفا می‌کند و به‌طور معمول به‌عنوان نشانگر تشکیل اتوفازوزوم به‌کار می‌رود که تعداد اتوفازوزوم‌های مشاهده‌شده در بافت به نوبه خود می‌تواند به‌عنوان مقیاس فعالیت اتوفازیک در نظر گرفته شود (۷). مشخص شده است که تمرین ورزشی می‌تواند اتوفازای و ترویج تخریب پروتئین‌های آسیب‌دیده را بهبود دهد (۸). پژوهش‌های گوناگونی درباره تأثیر فعالیت ورزشی بر اتوفازای انجام گرفته است، جوکار و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که هشت هفته تمرین ورزشی به کاهش محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 بافت قلب و مهار اتوفازای در

تجربی بود. نمونه آماری پژوهش موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار با سن حدود هشت هفته بودند که از بین آن‌ها ۴۰ سر موش خریداری و پس از انتقال به محیط آزمایشگاه و آشنایی با محیط جدید پس از دو هفته و ایجاد مدل اندومتريوز، موش‌ها به صورت تصادفی و به تعداد مساوی به هشت گروه کنترل- سالم (n=۵)، اندومتريوز (n=۵)، اندومتريوز+ شم (n=۵)، اندومتريوز+تمرین (n=۵)، اندومتريوز+ B6 (n=۵)، اندومتريوز+ امگا ۳ (n=۵)، اندومتريوز+ تمرین+ B6 (n=۵)، اندومتريوز+ تمرین+ امگا ۳ (n=۵) دسته‌بندی شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین‌المللی سلامت و شیوه‌نامه‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام گرفته است. همچنین پژوهش حاضر توسط کمیته مراقبت از حیوانات و استفاده از آن در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تأیید شده است (شماره مجوز تصویب: IR.IAU.SARI.REC.1399.120).

روش اجرای پژوهش: این پژوهش بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت. از آنجا که انتقال و جابه‌جایی موش‌ها موجب ایجاد فشار و تنش در آنها می‌شود، آنها به منظور سازگاری با محیط به مدت یک هفته پس از انتقال در آن محیط نگهداری شدند و برای آشنایی با آب به تمرینات کوتاه مدت شنا به مدت یک هفته پرداختند. طی یک هفته آشنایی آزمودنی‌ها پنج جلسه تمرین انجام می‌دادند که هر دفعه به مدت ۲۰ دقیقه برای آشنایی با آب و کاهش فشارهای وارده شنا و سازگاری با شرایط تمرینی به تمرین می‌پرداختند. آزمودنی‌ها پس از هر بار تمرین شنا پس از خشک کردن کامل با استفاده از حوله و خشک‌کن ویژه به داخل قفس‌ها بازگردانده می‌شدند. برای ایجاد مدل اندومتريوز، ابتدا موش‌های صحرایی بالغ با استفاده از کتامین (۳-۵ mg/kg) و زایلازین (۳-۵ mg/kg) 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 شکافتن عضله شکمی و ناحیه صفاق، ابتدا، بافت تخمدانی به همراه بخشی از بافت لوله رحمی برداشته شد. سپس در داخل ظرف استریل با یک میلی‌لیتر BPS (phosphate Buffer solution) قرار داده شد. سپس هر بافت به یک قطعه یک در یک

دارای سطوح بالاتر فشار اکسایشی و سایتوکین‌های التهابی و پیش‌التهابی‌اند (۱۵). پژوهشگران به منظور کاهش این علائم، افزایش روند بهبود و کیفیت زندگی بیماران، مطالعات بر انجام مداخلات مناسب تأکید می‌کنند، چراکه دیده شده که در ترشحات و مایعات رحمی افراد مبتلا به اندومتريوز سطح شاخص‌های اکساینده بالاست و به‌طور کلی سطح آنزیم‌های ضد اکسایشی مانند سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، گلوکوتایون پراکسیداز و ضد اکساینده‌های غیر آنزیمی مانند تورین، ویتامین‌های C، E و B در زنان مبتلا پایین‌تر است (۱۶). براساس نتایج تحقیقات مصرف مکمل‌های غذایی، ویتامین‌ها مانند ویتامین‌های گروه B مانند B6 مقدار استروژن را در بدن کنترل و به کاهش علائم اندومتريوز کمک می‌کنند، از این رو به کنترل‌کننده سطح استروژن معروف‌اند، به‌ویژه B6، B2، B1 از عود مجدد اندومتريوز جلوگیری می‌کنند. استفاده از مداخلات ورزشی در بیماران مبتلا به اندومتريوز مؤثر است. ورزش هوازی از رایج‌ترین روش‌های تمرینی برای بهبود ناباروری و بیماری‌های زنان است. ویتامین‌های B با تعدیل مسیرهای پیام‌رسانی سلولی، نقش مهمی در پیشگیری و درمان سرطان دارند. ویتامین B6، یک عامل ضدالتهابی، جهش‌یافته و تقویت‌کننده اعصاب قوی است که با فعال کردن ژن‌های سرکوبگر تومور، غیرفعال کردن رگ‌زایی و فعال کردن ژن‌های ضدالتهابی و القای آپوپتوز از پیشرفت جلوگیری می‌کند. تومورهای سرطانی از بسیاری از تغییرات آسیب‌شناختی که در پاسخ به نفوذ سلول‌های التهابی رخ می‌دهد، جلوگیری می‌کنند (۱۷). با توجه به بررسی‌های انجام‌گرفته و همه‌گیرشناسی بیماری اندومتريوز، نقش فعالیت بدنی و مصرف اسید چرب غیراشباع به‌ویژه امگا ۳ و ویتامین B6 بر میزان بیان ژن‌های اتوفآژی در موش‌های درگیر اندومتريوز پس از تمرینات هوازی منظم و مصرف امگا ۳ و ویتامین B6 در کاهش سطح این بیماری یافت نشده است. بنابراین در این پژوهش تأثیر تمرینات هوازی و مصرف ویتامین B6 و امگا ۳ بر بیان ژن‌های مرتبط با اتوفآژی ناشی از اندومتريوز در موش‌های ماده بررسی شده است.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: روش انجام این پژوهش از نوع

بررسی به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیاژول، RNA کل سلول‌ها طبق شیوه‌نامه سیناژن استخراج شد و برای اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I Fermentas قرار گرفت. سپس کیفیت RNAهای استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری (DPI-1, Kiagen) ارزیابی شد. به منظور تهیه cDNA تک‌رشته‌ای از آغازگر Oli-godt MWG-Biotech, Germany و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (شرکت فرمنتاز) استفاده شد و طبق شیوه‌نامه شرکت سازنده انجام گرفت. هر واکنش PCR با استفاده از SYBER Green و PCR master mix Applied Biosystems در دستگاه Sequences Detection Applied Biosystems, Foster City, CA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ چرخه برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸-۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting به منظور بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام گرفت و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی به منظور بررسی وجود آلودگی در هر واکنش ارزیابی شد. توالی آغازگرها در جدول ۱ مشاهده می‌شود. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) ارزیابی شد. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول زیر:

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

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}})_{\text{TimeX}} - (CT_{\text{target}} - C_{\text{Treference}})_{\text{Time0}}$$

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

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{AC\text{Target}}}{(E_{\text{reference}})^{AC\text{Reference}}}$$

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

در فرمول بالا E معرف Efficiency است و با استفاده

از رسم منحنی استاندارد برای ژن به دست می‌آید.

در یک میلی‌متر بریده شد. قطعات بافتی که برای هر موش چهار قطعه بود به ناحیه دیواره عضلانی لگنی سمت راست، ناحیه صفاق شکمی، ناحیه عضله قدامی دیواره شکمی و چربی اطراف تخمدان پیوند زده شد. سپس ناحیه جراحی شده بخیه شده و موش‌ها به قفس مربوطه انتقال داده شدند (۱۵). موش‌های گروه آندومتريوز+تمرین، آندومتريوز+تمرین+ امگا ۳ و آندومتريوز+تمرین+B6 پیش از شروع پروتکل اصلی، به مدت یک هفته (پنج روز) هر دفعه به مدت ۲۰ دقیقه به منظور آشنایی با آب و کاهش فشار و تنش شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، در داخل استخر آب قرار می‌گرفتند. سپس پنج روز در هفته تا پایان دوره پژوهش در مخزن آب به ابعاد ۱۰۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متر با درجه حرارت ۳-۳۲ درجه سانتی‌گراد طی هشت هفته به شنا می‌پرداختند. مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود (۱۱، ۱۹). دو هفته پس از ایجاد مدل، مکمل امگا ۳ با دوز ۲ میلی‌لیتر در کیلوگرم (۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) (۲۰) به گروه‌های آندومتريوز+امگا ۳ و آندومتريوز+تمرین+ امگا ۳ و مکمل ویتامین B6 به میزان ۶۰ mg/kg وزن بدن موش‌های صحرایی (۲۱) به گروه‌های آندومتريوز+B6 و آندومتريوز+تمرین+B6 به صورت روزانه و به شکل گاواژ خورنده شد.

روش‌های آزمایشگاهی: نمونه‌گیری بافتی موش‌ها جهت حذف اثر حاد تمرین، پس از ۴۸ ساعت پس از آخرین برنامه تمرینی شنا انجام گرفت. برای این منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۳-۵ mg/kg) بی‌هوش و سپس جراحی شدند و پس از آن، به منظور بررسی و مطالعات ژنی بافت‌های پیوندشده ارزیابی شدند. بدین منظور نمونه‌های بافتی با فرمالین ۱۰ درصد به تانک ازت منتقل شدند. برای بررسی بیان ژن‌های مورد بررسی پژوهش در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time انجام گرفت. ابتدا طراحی آغازگر انجام گرفت و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج شد و به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و میزان بیان ژن LC3-II، FOXO3، LC3-II، LC3-I/LC3-I بررسی شد. بدین منظور ابتدا طراحی آغازگر انجام گرفت و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج و به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از تکنیک RT-qPCR برای تأیید بیان ژن‌های مورد

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به منظور همسان سازی ژن ها

Reverse primer 5'-3'	Forward primer 5'-3'	ژن
CTGTGTCCGTTACCAACAG	AGCAGCATCCAACCAAAATC	LC3-I
TTCACCAGCAGGAAGAAGGC	TACAGCAGATACGCGACCAG	LC3-II
TCCAAGCTCCCATTGAACAT	TTCGCAAGGACCCAAATGA	FOXO3
AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	GAPDH

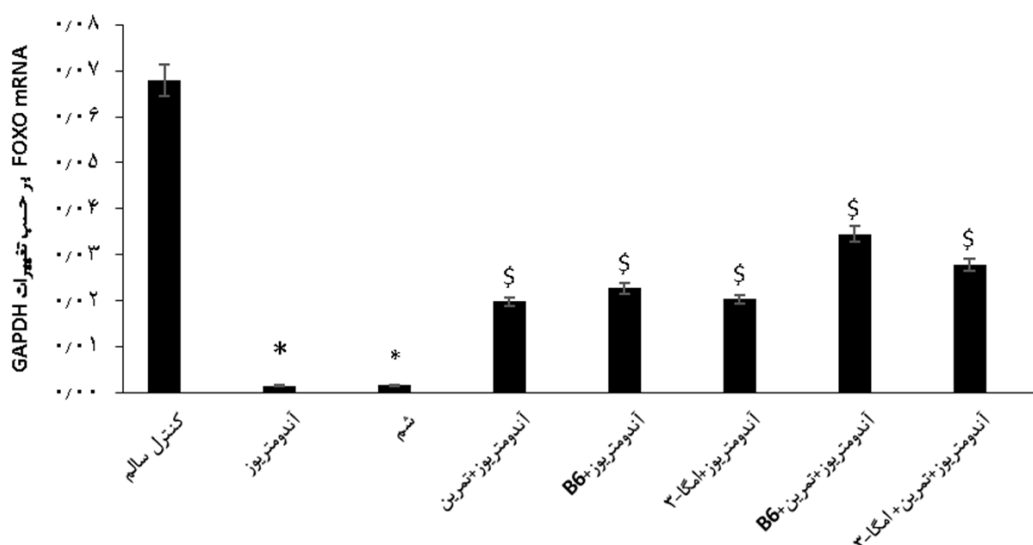
تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل یافته‌های این پژوهش از آزمون‌های شاپیروویلیک، تحلیل واریانس یکطرفه و توکی برای مقایسه بین گروه‌های گوناگون استفاده شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS با نسخه ۲۳ و در سطح معناداری $P < 0/05$ انجام گرفت.

نتایج آماری دیده شد ($P < 0/0001$). نتایج آزمون تعقیبی نیز نشان داد میزان بیان ژن‌های FOXO3 و LC3-II/I در گروه اندومتريوز نسبت به گروه کنترل-سالم به طور معناداری کمتر بود ($P < 0/0001$). میزان بیان ژن‌های FOXO3 و LC3-II/I در گروه‌های اندومتريوز+تمرین، اندومتريوز+امگا ۳، اندومتريوز+B6، اندومتريوز+B6+امگا ۳ نسبت به گروه اندومتريوز به طور معناداری بیشتر بود ($P < 0/05$). مقادیر آن‌ها در گروه اندومتريوز+تمرین+B6 و اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ نسبت به گروه‌های دیگر به طور معناداری بیشتر بود.

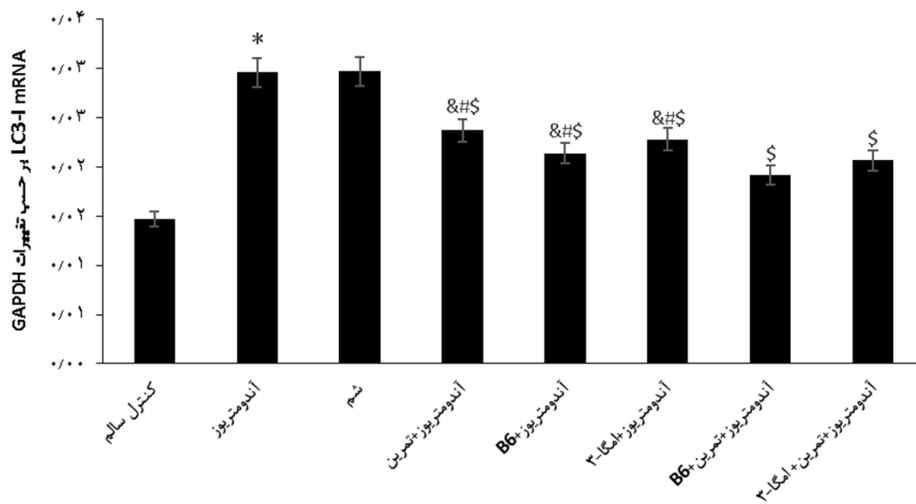
نتایج آماری دیده شد ($P < 0/0001$). نتایج آزمون تعقیبی نیز نشان داد میزان بیان ژن‌های FOXO3 و LC3-II/I در گروه اندومتريوز نسبت به گروه کنترل-سالم به طور معناداری کمتر بود ($P < 0/0001$). میزان بیان ژن‌های FOXO3 و LC3-II/I در گروه‌های اندومتريوز+تمرین، اندومتريوز+امگا ۳، اندومتريوز+B6، اندومتريوز+B6+امگا ۳ نسبت به گروه اندومتريوز به طور معناداری بیشتر بود ($P < 0/05$). مقادیر آن‌ها در گروه اندومتريوز+تمرین+B6 و اندومتريوز+تمرین+امگا ۳ نسبت به گروه‌های دیگر به طور معناداری بیشتر بود.

نتایج

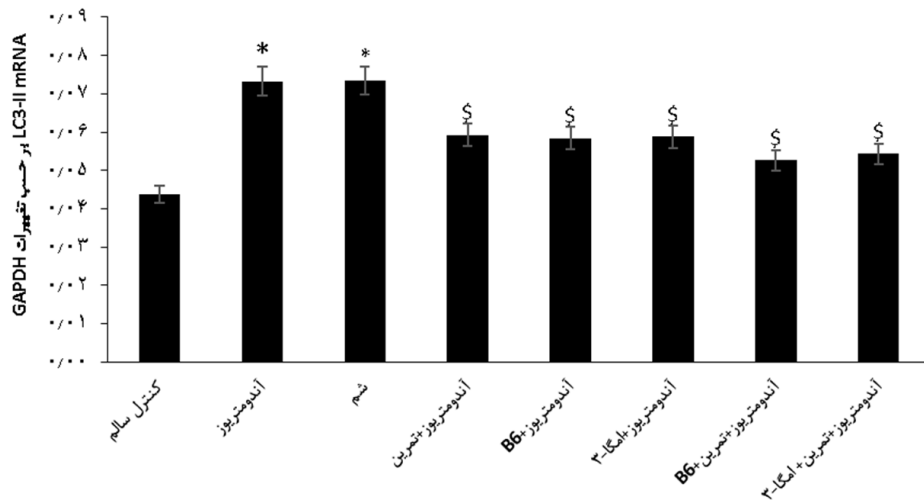
نتایج آزمون تحلیل واریانس نشان داد که بین گروه‌های گوناگون پژوهش در سطوح بیان ژن LC3-1 ($P < 0/0001$) و LC3-II ($P = 0/002$) تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی نیز نشان داد میزان بیان ژن‌های LC3-1 و LC3-II در گروه اندومتريوز نسبت به گروه کنترل-سالم به طور معناداری بیشتر بود ($P < 0/0001$) و مقادیر بیان ژن‌های LC3-1 و LC3-II در گروه‌های اندومتريوز+تمرین، اندومتريوز+امگا ۳، اندومتريوز+B6، اندومتريوز+تمرین+B6 و اندومتريوز+B6+امگا ۳ نسبت به گروه اندومتريوز به طور معناداری بیشتر بود.



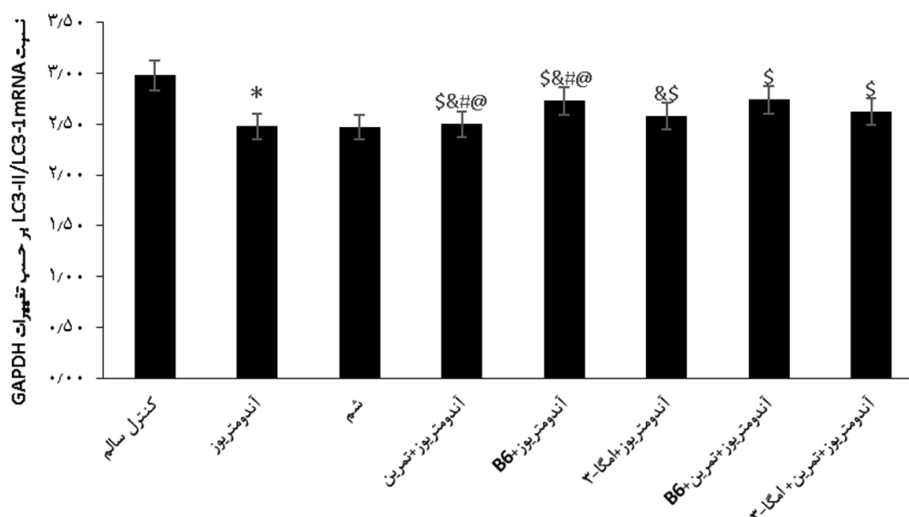
شکل ۱. شاخص‌های مرکزی و پراکندگی mRNA FOXO3 بر حسب تغییرات GAPDH. * تغییرات معنادار نسبت به گروه کنترل سالم. \$: تغییرات معنادار نسبت به گروه اندومتريوز



شکل ۲. شاخص های مرکزی و پراکندگی mRNA LC3-1 بر حسب تغییرات GAPDH. *: تغییرات معنادار نسبت به گروه کنترل سالم. \$: تغییرات معنادار نسبت به گروه آندومتريوز. &: تغییرات معنادار نسبت به گروه آندومتريوز+تمرين+B6. #: تغییرات معنادار نسبت به گروه آندومتريوز+تمرين+B6+تمرين.



شکل ۳. شاخص های مرکزی و پراکندگی mRNA LC3-II بر حسب تغییرات GAPDH. *: تغییرات معنادار نسبت به گروه کنترل سالم. \$: تغییرات معنادار نسبت به گروه آندومتريوز.



شکل ۴. شاخص‌های مرکزی و پراکندگی mRNA LC3-II/I بر حسب تغییرات GAPDH. *: تغییرات معنادار نسبت به گروه کنترل سالم. \$: تغییرات معنادار نسبت به گروه آندومترئوز. &: تغییرات معنادار نسبت به گروه آندومترئوز+تمرین+ B6. #: تغییرات معنادار نسبت به گروه آندومترئوز+تمرین+امگا ۳. @: تغییرات معنادار نسبت به گروه آندومترئوز+امگا ۳.

بحث و نتیجه‌گیری

حمایت می‌کند. به‌گونه‌ای که اتوفازی به‌عنوان سدی در برابر فشار سوخت‌وسازی عمل می‌کند (۲۳). در تداخل بین مسیرهای مرگ سلولی، مولکول‌های تنظیمی مهمی نقش ایفا می‌کنند. اتوفازی در شرایط تنش مانند گرسنگی، ایسکمی / خون‌رسانی مجدد و عفونت پاتوژن فعال می‌شود و در شرایط بیماری‌زایی گوناگون ایجاد می‌شود. به‌طور معمول پذیرفته می‌شود که ROS، اتوفازی را القا می‌کند و اتوفازی آسیب‌آکسایشی را کاهش می‌دهد (۲۴). تحقیقات اختلال در این مسیر را در بیماری‌های گوناگون گزارش داده‌اند (۲۵).

روی هم‌رفته تاکنون درباره نقش اتوفازی در فرایند مرگ سلولی توافقی حاصل نشده و ناهمگونی در نتایج بسیاری از تحقیقات، بحث برانگیز بوده است. شاید علت آن عملکرد دوگانه اتوفازی باشد. اتوفازی از یک طرف موجب افزایش مدت و میزان بقای سلول و از طرف دیگر در مراحل پیشرفته مرگ سلول می‌شود. شرز شوال و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که فشارهای اکسایشی، فقر غذایی، میتوکندری با عملکرد ناقص و همچنین فشارهای رتیکولوم و اندوپلاستیک، می‌توانند موجب القای اتوفازی شوند (۲۶).

نشان داده شده که اتوفازی فرایند ضروری برای عملکرد طبیعی بافت‌هاست، بنابراین تنظیم فرایند اتوفازی از طریق فعالیت‌های ورزشی می‌تواند روش درمانی مفیدی در شرایط بیماری‌زایی باشد (۲۷). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی می‌تواند

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر تمرینات هوازی و مصرف ویتامین B6 و امگا ۳ بر بیان ژن‌های وابسته به اتوفازی ناشی از آندومترئوز در موش‌های ماده انجام گرفت. نتایج نشان داد که آندومترئوز موجب افزایش بیان ژن LC3-I و LC3-II و کاهش بیان ژن‌های FOXO و نسبت LC3-I/LC3-II می‌شود. در مقابل، انجام فعالیت ورزشی منظم هوازی مانند شنا و مصرف مکمل‌های امگا ۳ و B6 با کاهش بیان ژن LC3-I و LC3-II و افزایش بیان ژن‌های FOXO و نسبت LC3-I / LC3-II موجب بهبود آندومترئوز خواهد شد. مسیر اصلی پروتئین‌های درگیر در فرایند اتوفازی توسط سازوکارهای تنظیمی پیچیده‌ای تنظیم می‌شود که می‌توان به پیام‌های ورودی گوناگون از جمله مواد مغذی، عوامل رشدی، هورمون‌ها، غلظت کلسیم داخل سلولی، میزان ATP، هیپوکسی و ... اشاره کرد (۱۰). پژوهش‌های گوناگون نشان داده‌اند که LC3 می‌تواند مرگ سلولی یا بقای آن را افزایش دهد، همچنین یکی از عوامل مؤثر در اتوفازی است که بر اساس شواهد موجود می‌تواند عملکرد آپوپتوتیک داشته باشد (۲۲). گزارش شده است که کاهش فعالیت اتوفازیک به دلیل کم شدن میزان بیان LC3 و Beclin-1 می‌تواند با توموروز و افزایش رشد تومور همراه باشد. ولی در شرایط آسیب‌شناختی متفاوت است. در شرایط فشار سوخت‌وسازی، اتوفازی، برای محدود کردن نکروز و التهاب توموری، سلول را

نشان می‌دهد که پیام‌های درون سلولی استخراج شده توسط تمرینات استقامتی یا تمرینات مقاومتی به تنظیم بیش از حد نشانگرهای مولکولی UPP، با افزایش بیشتر پس از تمرینات استقامتی منجر می‌شود. با این همه، در حالت تمرین کرده، سطح بیان نشانگرهای مولکولی UPP در پی تمرینات استقامتی تک مرحله‌ای افزایش می‌یابد، ولی کمتر به تمرینات مقاومتی تک مرحله‌ای پاسخ می‌دهد. این مسئله نشان می‌دهد که سازگاری‌های پس از تمرینات استقامتی بیشتر به فرایندهای تخریب UPP پروتئین وابسته‌اند تا سازگاری‌های پس از تمرینات مقاومتی (۳۳). مونتگرو و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیق خود به بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر اندومتريوز در موش صحرائی پرداختند. ۷۰ موش ماده نژاد ویستار به هفت گروه ده‌تایی تقسیم شدند: موش‌هایی با ورزش سبک (شنا یک بار در هفته)، ورزش متوسط (شنا سه بار در هفته) و ورزش شدید (شنا پنج بار در هفته) پیش یا پس از ایجاد اندومتريوز در آنها. در انتهای این پروتکل تجربی، پس از انجام فعالیت بدنی و بدون در نظر گرفتن تعداد آن، شاهد کاهش اندازه آسیب اندومتريک بودند، و در گروه‌های دارای فعالیت متوسط و شدید، کاهش بیشتری مشاهده شد (۱۱). کروپا و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیق خود به بررسی روش‌های درمانی اندومتريوز پرداختند. این پژوهشگران از جمله روش‌های درمانی در زنان مبتلا به اندومتريوز را درمان دارویی و جراحی و فعالیت ورزشی و مصرف ضداکسایش‌ها نامیدند (۳۴). از طرفی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع امگا ۳ خوراکی (o-pufa)، اسید ایکوزاپنتانوائیک (EPA) و اسید دکوזהگزانوائیک (DHA) توانایی کاهش نشانه‌های دردناک مربوط به اندومتريوز، کاهش اندازه ضایعه، حفظ توانایی بارداری در بیمار در حین دارودرمانی را دارند و دارای تأثیرات جانبی اندک یا بدون آن هستند (۳۵). اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع امگا ۳ به واسطه رقابت با اسیدهای چرب امگا ۶ جهت تولید واسطه‌های لیپیدی ضدالتهابی، نقش مهمی در تنظیم پروستاگلاندین‌ها و سایتوکاین‌ها که از عوامل مهم اندومتريوز هستند، ایفا می‌کنند. مصرف غذاهایی با محتوای بالای o-pufa دارای تأثیر ضدالتهابی است. مهم این است که نشان داده شده است که o-pufa می‌تواند به‌عنوان پیش‌ماده تشکیل دهنده گسترده‌ای از واسطه‌های دخیل در رفع

عامل اصلی و مهمی در تنظیم پروتئین‌های درگیر در مسیر اتوفازی باشد و تنظیم اتوفازی از طریق تمرینات ورزشی می‌تواند فرایندی اصلی و مهم در سازوکارهای سلولی و مولکولی باشد (۹، ۱۰).

تحقیقات نشان می‌دهد که تمرین هوازی با شدت پایین می‌تواند با ایجاد سازوکار حفاظتی به کاهش بیان سایتوکین‌های التهابی، فشار اکسایشی در بافت رحم، التهاب سیستمیک و در نتیجه بهبود پاسخ‌های ایمنی منجر شود (۲۸). در پژوهش برنندت و همکاران (۲۰۱۸) یک دوره تمرین ورزشی هشت هفته‌ای متشکل از دوچرخه‌سواری متوسط و مداوم با مدت ۶۰ دقیقه و دویدن با سرعت بیشینه، سه روز در هفته انجام گرفت. پس از انجام دوره تمرینی در هر دو گروه، LC3-I بیشتر از پیش بود و محتوای پروتئین Beclin-1 افزایش یافت (۲۹). نتایج پژوهش‌های ژانگ و همکاران نیز نشان داد که از نظر مکانیکی، عامل رونویسی هسته‌ای ناشی از ورزش FOXO3 به پروموتور CHCHD4 متصل می‌شود و بیان آن را سرکوب می‌کند، از انتقال p53 به میتوکندری جلوگیری می‌کند و در نتیجه محلی‌سازی هسته‌ای p53 را افزایش می‌دهد. افزایش هم‌افزایی FOXO3 و p53 هسته‌ای با ورزش می‌تواند تعامل شناخته‌شده آنها را در فعال‌سازی Sirtuin 1 تسهیل کند. بنابراین نتایج آنها یک سازوکار را نشان می‌دهد که به وسیله آن ورزش می‌تواند در پیشگیری از بیماری‌ها نقش داشته باشد (۳۰). تنظیم دقیق FOXOs برای جلوگیری از پروتئولیز بیش‌ازحد و کاهش ضروری است. فعالیت FOXO را می‌توان با سازوکارهای گوناگونی از جمله فسفوریلاسیون، استیل‌ه و گلیکوزیلاسیون تعدیل کرد. نشان داده شده است که FOXO3 با هیستون استیل ترانسفراز p300 در تعامل است و استیل شدن آن موجب جابه‌جایی و تخریب سیتوزولی می‌شود. تنظیم دقیق FOXO3 ممکن است به‌عنوان یک رویکرد درمانی برای مقابله با تحلیل در بیماری‌ها استفاده شود (۳۱). لوندل و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که فعالیت رونویسی FOXO سوخت‌وساز انرژی و پیام‌رسانی التهابی را تنظیم می‌کند (۳۲). در تحقیق استفان‌تی و همکاران (۲۰۱۵) افراد ده هفته تمرینات استقامتی یا تمرینات مقاومتی را پشت سر گذاشتند و سپس یک دوره تمرین استقامتی یا تمرینات مقاومتی انجام دادند. پروتئین FOXO3 تنها پس از تمرینات استقامتی افزایش یافت. این پژوهش

التهاب، عمل کند (۳۶). در یک شیوه اندومتريوز بر

روی موش‌ها اسید چرب امگا ۳ موجب کاهش اندازه ضایعات و تولید سایتوکاین و پروستاگلاندین موضعی شده است. در آندومتريوز با استفاده از موش‌های Fat-1 که در آنها امگا ۶ می‌تواند به امگا ۳ تبدیل شود، شمار ضایعات ایجاد شده در گروه موش‌های Fat-1 در مقایسه با گروه کنترل، به نحو چشمگیری کمتر شده است (۱۲). در تحقیقات آزمایشگاهی با استفاده از اندومتريوم گرفته شده از زنان مبتلا به اندومتريوز نشان داده شده است که اسیدهای چرب امگا ۳ دارای تأثیر سرکوب‌گرایانه بر روی بقای سلول آندومتري است (۳۷). تحقیق منسجمی در مقیاس بزرگ در مورد نوع رژیم غذایی و احتمال خطر اندومتريوز در زنان انجام و نتیجه گرفته شده است که افزایش مصرف اسیدهای چرب امگا ۳ می‌تواند موجب کاهش احتمال خطر اندومتريوز شود (۱۲).

همچنین یک مطالعه مروری در مورد ارتباط بین ویتامین‌ها و بیماری اندومتريوز، نشان داده است که بین گروه ویتامین‌ها و بهبود بیماری اندومتريوز رابطه مستقیمی برقرار است و ویتامین خانواده گروه B به تسکین درد و بهبود ضایعه آندومتريوز و کاهش علائم این بیماری منجر می‌شود. ویتامین B6 عامل ضدالتهابی قوی و ضد جهش و تقویت‌کننده عصب است (۳۸). ویتامین‌های گروه B نقش مهمی در پیشگیری و درمان آن از طریق تعدیل مسیرهای پیام‌رسانی سلولی دارد. چون ویتامین B6 خاصیت ضد اکسایشی دارد، پس از تمرینات ورزشی سبب بازسازی سریع سلول‌های تخریب‌شده از ورزش شده و موجب می‌شود که بدن بتواند مواد مغذی حل‌شده در چربی را جذب کند و موجب گشادی رگ‌ها شود و به روان کردن جریان خون بینجامد (۳۹). ویتامین B6 برای حفظ سوخت‌وساز طبیعی و پاسخ ایمنی، به ویژه پاسخ ایمنی ضدالتهابی، ضروری تلقی می‌شود.

روی هم‌رفته نتایج پژوهش حاضر بیانگر آن است که افزایش بیان ژن‌های اتوفازی که در اندومتريوز ایجاد شده است، می‌تواند با فعالیت ورزشی منظم هوازی مانند شنا و مکمل امگا ۳ و B6 مهار شود. شاید اختلال آسیب‌شناختی ایجاد شده در اتوفازی با انجام فعالیت ورزشی و مکمل امگا ۳ و B6 از طریق کاهش تنظیمی بیان ژن‌های LC3-I، LC3-II و LC3-II / LC3-I در بهبود اندومتريوز

کمک‌کننده باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دوره دکتری فیزیولوژی ورزشی است. از تمامی کسانی که ما را در پیشبرد اهداف رساله یاری کردند، سپاسگزاریم.

حامی / حامیان مالی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری رشته تربیت بدنی گرایش فیزیولوژی ورزش است که در دانشگاه آزاد واحد ساری به تصویب رسیده و بدون حمایت مالی به انجام رسیده است.

مشارکت نویسندگان

در این پژوهش نویسنده اول به‌عنوان دانشجوی دکتری، نویسنده دوم به‌عنوان راهنمای اول و نویسنده سوم به‌عنوان استاد مشاور مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع

1. Colette S, Donnez J. "Are aromatase inhibitors effective in endometriosis treatment?". Expert Opinion on Investigational Drugs. 2011; 20 (7): 917-31.
2. Fang J, Piessens S. "A step-by-step guide to sonographic evaluation of deep infiltrating endometriosis". Sonography. 2018; 5 (2): 67-75
3. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both?. Cancer research. 2006; 66(19):9349-51
4. Adraskela K, Veisaki E, Koutsilieris M, Philippou A. Physical exercise positively influences breast cancer evolution. Clinical breast cancer. 2017; 17(6):408-17.
5. Ardery S, Horn A, Opoku-Acheampong A, Baumfalk D, Behnke B. Exercise training does not alter prostate tumor cell growth in rat serum or prostate conditioned media . The FASEB Journal. 2018; 32:855-19.
6. Almeida PW, Gomes-Filho A, Ferreira AJ, Rodrigues CE, Dias-Peixoto MF, Russo RC, et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. Journal of applied physiology. 2009; 107(1):261-5.
7. He JH, Luo RZ, Cai MY, Li M, Lu JB, Yuan ZY. Decreased expression of light chain 3 (LC3) increased the risk of distant metastasis in triple-negative breast cancer. Medical Oncology. 2013; 30(1):468.
8. Chen CY, Hsu HC, Lee BC, Lin HJ, Chen YH, Huang HC, et al. Exercise training improves car-

- diac function in infarcted rabbits: involvement of autophagic function and fatty acid utilization. *European journal of heart failure*. 2010; 12(4):323-30.
9. Jokar M, Sherafati Moghadam M. High intensity interval training inhibits autophagy in the heart tissue of type 2 diabetic rats by decreasing the content of FOXO3A and BECLIN-1 proteins. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2019; 18(6): 292-9.
 10. Agha-Alinejad H, Hashemi Jokar E. Effect of Six Weeks of Interval Exercise Training along with Selenium Nanoparticle Ingestion on Bcl-2 and LC3 Genes expression in the Tumor Tissue of Breast Tumor-Bearing Mice. *Iranian Quarterly Journal of Breast Disease*. 2019; 12(2):26-37.
 11. Montenegro ML, Bonoche CM, Meola J, Portella RL, Ribeiro-Silva A, Brunaldi MO, et al. Effect of Physical Exercise on Endometriosis Experimentally Induced in Rats. *Reproductive Sciences*. 2019; 26(6):785-793.
 12. Abokhrais IM, Denison FC, Whitaker LH, Saunders PT, Doust A, Williams LJ, et al. A two-arm parallel double-blind randomised controlled pilot trial of the efficacy of Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment of women with endometriosis-associated pain (PurFECT1). *Plos one*. 2020; 15(1):e0227695.
 13. Mohammadikhou T, Ebrahim K, Nikbakht H. The Effect of 12 Weeks of Training with Omega Supplement on Serum Levels of Chemerin and Insulin Resistance in Obese Inactive Women. *Sport Physiology & Management Investigations*. 2015; 7(3):49-58. (In Persian).
 14. Zekri Kondalaji R, Sarisarrav V, Nourshahi M. Investigating the effect of 4-week fish oil supplementation on inflammation and plasma nitric oxide and reactive oxygen species in response to exhaustive exercise. *Journal of Sport and Exercise Physiology*. 2020; 13(1):16-26. (In Persian).
 15. 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, The Journal of the American Society of Hematology*. 2014; 123(6):809-21.
 16. Shimizu R, Yamamoto M "GATA-related hematologic disorders". *Experimental Hematology*. 2016; 44(8): 696-705.
 17. Ruoss C, Tadros A, O'Shea T, McFarlane J, Almabbobi G. Ovarian follicle development in Booroola sheep exhibiting impaired bone morphogenetic protein signalling pathway. *J Reprod*. 2009; 138(4): 689-96.
 18. 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; 16(5): 305-314.
 19. 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; 178:33-40.
 20. Ghule AE, Kandhare AD, Jadhav SS, Zanwar AA, Bodhankar SL. Omega-3-fatty acid adds to the protective effect of flax lignan concentrate in pressure overload-induced myocardial hypertrophy in rats via modulation of oxidative stress and apoptosis. *International Immunopharmacology*. 2015; 28(1):751-63.
 21. 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. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2011; 5(5): 1051-1060.
 22. Tran TA, Ahn KS, Song YW, Moon JY, Cho M, Lim Y, et al. Mechanism of 2', 3'-dimethoxyflavanone-induced apoptosis in breast cancer stem cells: Role of ubiquitination of caspase-8 and LC3. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014; 562:92-102.
 23. Shamsi MM, Chekachak S, Soudi S, Gharakhanlou R, Quinn LS, Ranjbar K, et al. Effects of exercise training and supplementation with selenium nanoparticle on T-helper 1 and 2 and cytokine levels in tumor tissue of mice bearing the 4 T1 mammary carcinoma. *Nutrition*. 2019; 57:141-7.
 24. Jain A. P62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates element-driven gene transcription. *J.Biol. Chem*. 2010; 285:22576-22591.
 25. Wirawan E, Berghe TV, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell research*. 2012; 22(1):43-61.
 26. Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in cell biology*. 2007; 17(9):422-7.
 27. Lee Y, Kwon I, Jang Y, Song W, Cosio-Lima LM, Roltsch MH. Potential signaling pathways of acute endurance exercise-induced cardiac autophagy and mitophagy and its possible role in cardioprotection. *The Journal of Physiological Sciences*. 2017; 67(6):639-54.
 28. Siomara Hernandez, Myrella L. Cruz, Annelyn Torres-Reveron, Caroline B. Appleyard. Impact of physical activity on pain perception in an animal model of endometriosis. *J Endometr Pelvic Pain Disord*. 2015; 7(3): 89-114.
 29. Brandt N, Gunnarsson TP, Bangsbo J, Pilegaard H. Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle. *Physiological reports*. 2018; 6(7):e13651.
 30. Zhuang J, Kamp WM, Li J, Liu C, Kang JG, Wang PY, et al. Forkhead box O3A (FOXO3)

- and the mitochondrial disulfide relay carrier (CH-CHD4) regulate p53 protein nuclear activity in response to exercise. *Journal of Biological Chemistry*. 2016; 291(48):24819-27.
31. Bertaggia E, Coletto L, Sandri M. Posttranslational modifications control FOXO3 activity during denervation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2012; 302(3):C587-96.
 32. Lundell LS, Massart J, Altıntaş A, Krook A, Zierath JR. Regulation of glucose uptake and inflammation markers by FOXO1 and FOXO3 in skeletal muscle. *Molecular metabolism*. 2019; 20:79-88
 33. Stefanetti RJ, Lamon S, Wallace M, Vendelbo MH, Russell AP, Vissing K. Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2015; 467(7):1523-37.
 34. Krupa A, Padoła O, Putowski M, Konopelko M, Piasek E. Available treatment methods for endometriosis. *Journal of Education, Health and Sport*. 2019; 9(7):178-84.
 35. Wakefield SL, Lane M, Schulz SJ, Hebart ML, Thompson JG, Mitchell M. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008; 294(2):E425-34.
 36. Arem H, Neuhouser ML, Irwin ML, Cartmel B, Lu L, Risch H, et al. Omega-3 and omega-6 fatty acid intakes and endometrial cancer risk in a population-based case-control study. *European journal of nutrition*. 2013; 52(3):1251-60.
 37. Hansen SO, Knudsen UB. Endometriosis, dysmenorrhoea and diet. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2013; 169(2):162-71.
 38. Ciavattini A, Serri M, Carpini GD, Morini s, Clemente N. Ovarian endometriosis and vitamin D serum levels. *Gynecological Endocrinology*. 2017; 33(2):164-7.
 39. Ghasemian Langharodi S, Farzanegi P, Moradi L. The Effect of Swimming Training and Vitamin B6 Intake on ALDH1A2 gene Expression in Endometriosis Rat. *Razi J of Medical Sciences*. 2021; 28(3):152-162.