Original Article

Investigating the expression of Toll-like receptor 4- Myeloid differentiation primary response 88 pathway after a period of exercise and vitamin E consumption in endometriosis model rats

Heidarzadi S[1], Moradi L[1*], Farzanegi P[2], Abedi B[3]

1- Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, I.R. Iran.
3- Department of Physical Education, Mahallat Branch, Islamic Azad University, Mahallat, I.R. Iran.

Received: 2022/07/8 | Accepted: 2022/12/6

Abstract:

Background: Endometriosis is a chronic, inflammatory and estrogen-dependent disease characterized by the growth of endometrial tissue outside the uterine cavity. The responses of the immune system, nutrition, sports activity are among the most important factors affecting this disease. The research aimed to investigating the expression of TLR4 and MyD88 pathway after a period of exercise and vitamin E consumption in endometriosis model rats.

Materials and Methods: The research is of fundamental and experimental type. 25 female Wistar rats were selected and divided into 5 different groups. After induction of endometriosis, rats in the training group swam 5 days a week. The vitamin E consumption group consumed the supplement daily. The studied proteins included TLR4 and MyD88. One-way analysis of variance and Bonferroni's post hoc test were used at the significance level of $P \leq 0.05$.

Results: There was a significant difference between the research groups. The results of Bonferroni post hoc test showed that the expression level of MyD88 gene in healthy control group differed from endometriosis model control groups (P=0.0001), exercise group (P=0.019) and patient control group+vitamin E supplement (P=0.021). Significantly, the control group of endometriosis model was significantly different from the exercise group (P=0.002), the patient control group+vitamin E supplement (P=0.002) and the patient group+vitamin E+exercise (P=0.0001). There was a significant difference in the expression of TLR4 gene in the healthy control group with the control group of endometriosis model (P=0.048).

Conclusion: Induction of endometriosis strongly affects this pathway to cause inflammation in the tissue. Exercise with enzymatic adaptations may help slow the pathway and prevent inflammation and tissue cell proliferation down.

Keywords: Endometriosis, Exercise, Vitamin E, Toll-like receptor 4, Myeloid differentiation primary response gene 88 protein

***Corresponding Author**
Email: moradi.lida@gmail.com
Tel: 0098 912 380 5653
Fax: 0098 217 700 9808

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, January, 2023; Vol. 27, No 6, Pages 637-645

Please cite this article as: Heidarzadi S, Moradi L, Farzanegi P, Abedi B. Investigating the expression of Toll-like receptor 4- Myeloid differentiation primary response 88 pathway after a period of exercise and vitamin E consumption in endometriosis model rats. ***Feyz*** 2023; 27(6): 637-45.

بررسی بیان گیرنده شبه تول ۴- میلوئید تمایزیافته فاکتور ۸۸، متعاقب یک دوره تمرینات ورزشی و مصرف ویتامین E در موش‌های مدل آندومتریوز

سهیلا حیدرزادی [۱]، لیدا مرادی [۲*]، پروین فرزانگی [۳]، بهرام عابدی [۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: آندومتریوز یک بیماری مزمن، التهابی و وابسته به استروژن است که با رشد بافت آندومتر در خارج از حفره رحم مشخص می‌شود. پاسخ‌های سیستم ایمنی، تغذیه و فعالیت ورزشی از جمله مهم‌ترین عوامل اثرگذار بر این بیماری هستند. هدف از تحقیق حاضر، بیان مسیر گیرنده شبه تول ۴- میلوئید تمایزیافته فاکتور ۸۸، متعاقب یک دوره تمرینات ورزشی و مصرف ویتامین E در موش‌های مدل آندومتریوز بود.

مواد و روش‌ها: تحقیق حاضر از نوع بنیادی و تجربی می‌باشد. ۲۵ سر موش ماده نژاد ویستار به‌صورت تصادفی انتخاب و در ۵ گروه مختلف تقسیم شدند. پس از القای آندومتریوز، موش‌های گروه تمرین، ۵ روز در هفته شنا می‌کردند. گروه مصرف ویتامین E، مکمل را به‌صورت روزانه دریافت می‌کردند. ۲۴ ساعت پس از پایان مطالعه از موش‌ها خونگیری شد و سپس کشتار شدند. پروتئین‌های مورد مطالعه شامل TLR4 و MyD88 بودند. از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی در سطح معنی‌داری $P\leq ۰/۰۵$ استفاده شد.

نتایج: تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تحقیق مشاهده شد. نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که میزان بیان ژن MyD88 در گروه کنترل سالم با گروه‌های کنترل مدل آندومتریوز ($P=۰/۰۰۰۱$)، تمرین ($P=۰/۰۱۹$) و بیمار+مکمل ویتامین E ($P=۰/۰۲۱$) اختلاف معنادار و همچنین گروه کنترل مدل آندومتریوز با گروه‌های تمرین ($P=۰/۰۰۲$)، بیمار+مکمل ویتامین E ($P=۰/۰۰۲$) و بیمار+ویتامین E+تمرین ($P=۰/۰۰۰۱$) تفاوت معنادار دارند. میزان بیان ژن TLR4 در گروه کنترل سالم با گروه کنترل مدل آندومتریوز ($P=۰/۰۴۸$) اختلاف معنی‌داری نشان داد.

نتیجه‌گیری: القای آندومتریوز به‌شدت این مسیر را در جهت ایجاد التهاب در بافت متأثر می‌سازد. فعالیت ورزشی با سازگاری‌های آنزیمی، احتمالاً به کندشدن مسیر کمک کرده و از التهاب و تکثیر سلولی بافت جلوگیری می‌کند.

واژگان کلیدی: آندومتریوز، تمرین، ویتامین E، Toll-like receptor 4، Myeloid differentiation primary response gene 88 protein

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و ششم، شماره ۶، بهمن-اسفند ۱۴۰۱، صفحات ۶۴۵-۶۳۸

مقدمه

آندومتریوز ((EndoMetriosis (EM)) که ظهور بافت آندومتر در خارج از رحم می‌باشد، یک بیماری مزمن، التهابی و وابسته به استروژن است که با رشد بافت آندومتر در خارج از حفره رحم مشخص می‌شود. آندومتریوز به دو شکل لگنی و خارج لگنی یافت می‌شود [۱].

شایع‌ترین شکل آندومتریوز نوع خارج لگنی آن، آندومتریوز جلدی می‌باشد که می‌تواند به‌صورت خودبه‌خودی و یا ثانویه به‌علت عمل‌های جراحی شکمی و لگنی در محلّ بافت اسکار رخ دهد. آندومتریوز جدار شکم شایع‌ترین نوع آندومتریوز جلدی می‌باشد که تشخیص آن نیز دشوار است [۱]. EM به‌خاطر وجود غدد آندومتر و استروما در خارج از رحم، به‌عنوان آندومتریوز سطحی یا صفاقی، تخمدان و نفوذ عمیق (Deep Infiltrating Endometriosis (DIE)) طبقه‌بندی می‌شود [۲]. DIE به وجود تهاجم آندومتریوتیک زیرصفاقی به عمق حداقل ۵ میلی‌متر اطلاق می‌شود و شامل ضایعات رکتوواژینال و همچنین اشکال نفوذی به اندام‌های شکمی است (مانند روده، حالب و کیسه مثانه) [۳]. علامت مشخصه EM درد مزمنی می‌باشد که بیشتر در اطراف بافت رحم به‌صورت خارج رحمی احساس می‌شود [۴]. مطالعات علمی نشان داده است که رشد و پیشرفت آندومتریوز حتی در موش‌های ماده که تخمدان آن‌ها برداشته شده است نیز ادامه دارد. این مسأله نشان می‌دهد که علاوه‌بر هورمون‌های استروئیدی تخمدان، سیستم ایمنی هم نقش تنظیم‌کننده در توسعه آندومتریوز دارد. به‌عنوان یک جزء از سیستم ایمنی ذاتی،

۱. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ایران

۲. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. دانشیار، واحد ساری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

۴. استاد، گروه تربیت بدنی، واحد محلات، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

تهران، اتوبان بابایی، خروجی حکیمیه، خیابان شهید صدوقی، بلوار وفادار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم انسانی

تلفن: ۰۹۱۲۳۸۰۵۶۵۳ **دورنویس:** ۰۲۱۷۷۰۰۹۸۰۸

پست الکترونیک: moradi.lida@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۴۰۱/۹/۱۵

افزایش نفوذ ماکروفاژها در بافت دست‌نخورده و مایع صفاقی زنان مبتلا به آندومتریوز مشاهده شده است. سلول‌های ایمنی مختلف و سلول‌های دندریتیک، گیرنده شبه تول (The toll-like receptors (TLR)) را بیان می‌کنند [۵]. این گیرنده‌ها مولکول‌های سطحی سلول‌های یوکاریوتی هستند که عفونت میکروبی را تشخیص و به آن واکنش نشان می‌دهند. TLRها، یک گروه از گیرنده‌های میزبان هستند که به‌عنوان گیرنده‌های تشخیص الگو pattern recognition receptors (PRR) شناخته می‌شوند. TLRها در تنظیم پاسخ‌های ایمنی سازگار محافظ میزبان، مهم هستند. TLR4 با شناسایی عوامل بیماری‌زای خارجی و تنظیم آبشارهای التهابی پایین‌دست از سلول‌های میزبان محافظت می‌کند [۴]. Lupi و همکاران (۲۰۲۰) در تحقیقشان عنوان کردند که مسیر سیگنالینگ TLR4در سرطان‌های تخمدان، دهانه رحم و آندومتر نقش دارد [۶]. باتوجه به این موضوع که TLR4 نقش مهمّی در ارتباط بین آندومتریوز و عوامل مؤثر بر آن دارد [۵]، می‌توان این فرضیه را عنوان کرد که با کاهش TLR4 می‌توان از پیشرفت این عارضه جلوگیری کرد یا حداقل جلوی پیشرفت آندومتریوز را گرفت. به‌طور کلاسیک، درمان‌های موجود برای EM شامل داروهای ضددرد، هورمون‌ها، جراحی و درمان باروری می‌باشد [۴،۱]. به‌نظر می‌رسد استرس اکسیداتیو در پاتوفیزیولوژی آندومتریوز دخیل باشد، زیرا ظاهراً گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر در مایع صفاق زنان مبتلا به آندومتریوز افزایش می‌یابد [۷]. از طرفی مشخص شده است که کاهش استرس اکسیداتیو بیان ژن TLR4 را کاهش داد و متعاقب آن مولکول‌های پایین‌دست MyD88، NF-κB و NLRP3 نیز کاهش یافت [۸]. ویتامین E محلول در چربی است [۹]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ویتامین E و احتمالاً متابولیت‌های ویتامین E یک روش درمانی امیدوارکننده برای درمان بیماری‌های التهابی باشد [۱۰]. اگرچه ویتامین E در انسان و حیوانات چندین عملکرد دارد، اما عملکرد اصلی آن محافظت از سلول‌ها دربرابر آسیب اکسیداتیو است. از زمان کشف آن، چندین مطالعه نشان داده است که کمبود ویتامین E باعث اختلال در باروری در انسان و حیوانات آزمایشگاهی می‌شود [۱۲،۱۱]. امینی و همکاران (۲۰۲۱) در تحقیقی گزارش کردند که مصرف آنتی‌اکسیدان (ویتامین‌های E و C) موجب کاهش درد لگن در بیماران مبتلا به آندومتریوز شد [۱۳] که نشان‌دهنده نقش کاربردی ویتامین E در کاهش عوارض آندومتریوز می‌باشد. درخصوص اثر ترکیبی تمرینات ورزشی و ویتامین E، شهیدیان و همکاران در تحقیقاتشان گزارش کردند که تمرینات ورزشی و مصرف ویتامین E با تأثیر بر بیان ژن ESR و IGFBP1 [۱۴] و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز موجب کاهش مالون دی‌آلدهید شدند [۱۵] که نشان‌دهنده نقش مثبت هر دو روش در کاهش عوارض ناشی از آندومتریوز می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که فعالیت بدنی منظم دارای اثرات محافظتی دربرابر بیماری‌هایی است که درگیر فرآیندهای التهابی هستند، زیرا باعث افزایش سطح سیتوکین‌ها با خواص ضدالتهابی می‌شود [۱۶]. مسیر سیگنالینگ TLR4 -myD88 یکی از مسیرهای مرتبط با التهاب و ترشح سیتوکین‌های التهابی می‌باشد و می‌تواند اطلاعات مفیدی درخصوص اثر مداخلات بر آندومتریوز و پیشرفت بیماری ارائه دهد؛ از این‌رو مطالعه حاضر در پی پاسخ به این سؤال است که مسیر TLR4-myD88 متعاقب یک دوره تمرینات ورزشی و مصرف ویتامین E در موش‌های مدل آندومتریوز چه نقشی دارد و پس از این دوره تمرین چه تغییراتی در متغیرهای این مسیر ایجاد می‌شود؟

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع بنیادی و تجربی می‌باشد. این پژوهش به‌روش آزمایشگاهی و کنترل‌شده انجام شد (کد اخلاق شماره IR.IAU.M.REC.1400.034 از دانشگاه آزاد اسلامی). باتوجه به این‌که از لحاظ محدودیت‌های مکانی، اخلاقی و زمانی دسترسی به آزمودنی‌های انسانی مقدور نبوده است؛ بنابراین از آزمودنی‌های حیوانی (رت‌های ویستار ماده) استفاده شد. در ابتدا برای کسب مجوزهای لازم اقدام شد و سپس مطابق با دستورالعمل انجمن ایرانیان حمایت از حیوانات آزمایشگاهی، رت‌ها در قفس‌هایی به‌صورت جداگانه نگهداری شدند. جامعه آماری در تحقیق حاضر را رت‌های ویستار ماده آزمایشگاهی با سنّ ۶ تا ۸هفته‌ای و میانگین وزنی ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم تشکیل می‌دادند. نمونه آماری شامل ۲۵ سر رت آزمایشگاهی بود که به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و در ۵ گروه ۵تایی شامل گروه کنترل سالم، کنترل مدل آندومتریوز، بیمار+ مکمل ویتامین E، بیمار + تمرین و بیمار+ ویتامین E+ ورزش قرار گرفتند. حجم نمونه ۲۵ موش تعیین شد. موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات در شرایط کنترل‌شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۶ عصر و شروع خاموشی ۶ صبح)، دما (۳±۲۲ سانتی‌گراد) و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند.

القای آندومتریوز

برای القای آندومتریوز، رت‌ها با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش شدند. پس از شیو ناحیه شکمی در طرف راست، محل با بتادین تمیز شد. سپس با استفاده از تیغ بیستوری، شکافی در پوست ناحیه پهلو در بخش لگنی ایجاد شد. پس از باز کردن عضله شکمی و ناحیه صفاق، ابتدا بافت تخمدانی به‌همراه بخشی از بافت

لوله رحمی برداشته شد. سپس در داخل ظرف استریل با ۱ سی‌سی PBS قرار داده شد. سپس هر بافت به یک قطعه ۱ در ۱ میلی‌متر بریده شد و قطعات بافتی که برای هر موش ۴ قطعه بود، به نواحی دیواره عضلانی لگنی سمت راست، صفاق شکمی، عضله قدامی دیواره شکمی و چربی اطراف تخمدان پیوند زده شد. سپس به ناحیه جراحی‌شده، بخیه زده شد و موش‌ها به قفس مربوطه انتقال داده شدند [۱۴].

پروتکل تمرینی و نحوه مکمل‌دهی

در تحقیق حاضر، مداخله تمرین شامل هشت هفته تمرین شنا بود. آزمودنی‌های گروه مداخله ورزشی قبل از شروع پروتکل اصلی، به‌مدت یک هفته (۵ روز در هفته) هر بار به‌مدت ۲۰ دقیقه به‌منظور آشنایی با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، در داخل استخر آب قرار گرفتند. سپس ۵ روز در هفته تا پایان دوره تحقیق در یک مخزن آب به ابعاد ۵۰×۵۰×۱۰۰ سانتی‌متری با درجه‌حرارت ۳۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد در طی ۸ هفته به شنا پرداختند. مدت‌زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان دوره بود. در این تحقیق مصرف ویتامین E به‌صورت گاواژ با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلو وزن بدن به‌صورت روزانه انجام شد [۱۴].

کشتار و تشریح حیوانات و بافت‌برداری

۲۴ ساعت پس از پایان مطالعه، از موش‌ها خونگیری شد و بعد از کشتار، بافت‌های پیوندشده مربوط به نواحی آندومتریوزیز جهت بررسی بافت‌شناسی و مطالعات ژنی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور نمونه‌های بافتی به فرمالین ۱۰٪ و نمونه‌های مربوط به بررسی بیان ژنی به تانک ازت منتقل شد.

برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه تحقیق در هر گروه، بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time انجام شد. ابتدا طراحی پرایمر صورت گرفت، سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل شد. در ادامه cDNA به‌روش PCR تکثیر شد و از نظر بیان ژن‌های ذکرشده مورد بررسی قرار گرفت.

جدول شماره ۱- توالی پرایمر ژن‌های مورد مطالعه

نام ژن	نوع پرایمر	توالی پرایمر
MyD88	Forward Reverse	CAGAGGAGGATTGCCAAAAG GGGGTCATCAAGTGTGGTG
TLR4	Forward Reverse	AGCTTCTCCAATTTTTCAGAACTTC TGAGAGGTGGTGTAAGCCATGC
β-actin	Forward Reverse	CTGGAACGGTGAAGGTGACA AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA

روش آماری

در تجزیه‌وتحلیل استنباطی نیز برای بررسی نرمالیتی از آزمون شاپیرو - ویلک و برای تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. برای آزمون فرضیه‌ها نیز تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی به‌کار رفت. سطح معنی‌داری برابر با $P\leq$۰/۰۵ در نظر گرفته شد. جهت انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ استفاده شد.

نتایج

در مطالعه حاضر، بیان ژن ۲ پروتئین TLR4 و MyD88 با استفاده از تکنیک PCR Real Time در آزمایشگاه اندازه‌گیری شد که نتایج در جدول شماره ۲ به‌صورت میانگین و انحراف استاندارد در گروه‌ها گزارش شده است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- میانگین و انحراف‌معیار و نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه متغیرها در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه	$\bar{X} \pm SD$	β-actin	آزمون (F)	P	اندازه اثر
MyD88	گروه کنترل سالم	۰/۰±۰۶۱۵/۰۲۸	۲۴/۰±۲۶۴/۴۰۰	۱۸/۵۵۷	*۰	۰/۷۸۸
	گروه کنترل مدل آندومتریوز	۰/۰±۷۴۹۴/۰۴۴	۲۴/۰±۲۸۴/۶۶۶			
	گروه بیمار+ مکمل ویتامین E	۰/۰±۳۶۲۹/۲۲۴	۲۱/۱±۴۵۸/۱۵۴			
	گروه بیمار + تمرین	۰/۰±۳۵۹۴/۱۷۷	۱۸/۰±۷۰۰/۵۵۵			
	گروه بیمار + ویتامین E+ تمرین	۰/۰±۲۰۷۷/۰۶۵	۱۶/۰±۱۲۸/۶۰۵			
TLR4	گروه کنترل سالم	۰/۰±۰۷۳۸/۰۶۷	۲۴/۰±۲۹۶/۳۹۲	۳/۲۶۵	*۰/۰۳۳	۰/۳۹۵
	گروه کنترل مدل آندومتریوز	۰/۰±۳۷۵۵/۲۸۸	۲۴/۰±۲۷۶/۷۷۱			
	گروه بیمار + مکمل ویتامین E	۰/۰±۳۶۶۶/۱۸۰	۱۶/۰±۰۶۰/۸۰۶			
	گروه بیمار + تمرین	۰/۰±۲۰۳۲/۰۸۳	۲۱/۱±۴۱۲/۱۸۲			
	گروه بیمار + ویتامین E + تمرین	۰/۰±۱۴۴۲/۱۰۳	۲۰/۰±۹۹۶/۵۸۳			

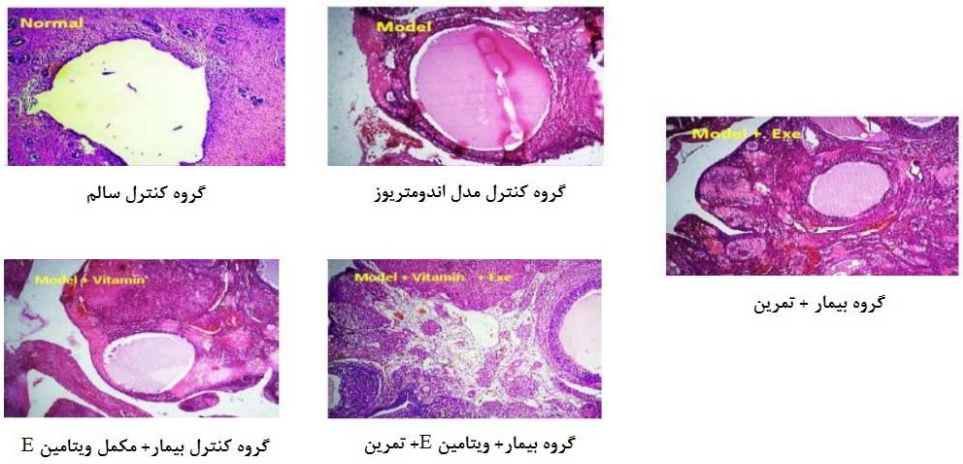
* تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq$ ۰/۰۵

از آزمون پارامتریک تحلیل واریانس یک‌راهه به‌منظور مقایسه متغیرهای وابسته در گروه‌های تحقیق استفاده شد. نتایج آزمون فرضیه‌های تحقیق، تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمون در دو متغیر را نشان داد (جدول شماره ۱). در نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی مشاهده شد که میزان بیان ژن MyD88 در گروه کنترل سالم با گروه‌های کنترل مدل آندومتریوز (P=۰/۰۰۰۱)، تمرین (P=۰/۰۱۹) و بیمار + مکمل ویتامین E (P=۰/۰۲۱) اختلاف معنادار، همچنین گروه کنترل مدل آندومتریوز با گروه‌های تمرین (P=۰/۰۰۲)، بیمار + مکمل ویتامین E (P=۰/۰۰۲) و بیمار + ویتامین E + تمرین (P=۰/۰۰۰۱) تفاوت معنادار دارند. در میزان بیان ژن TLR4 در گروه کنترل سالم با گروه کنترل مدل آندومتریوز (P=۰/۰۴۸) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳- نتایج آزمون تعقیبی توکی

متغیر	گروه	گروه کنترل مدل آندومتریوز	گروه بیمار + مکمل ویتامین E	گروه بیمار + تمرین	گروه بیمار + ویتامین E + تمرین
MyD88	گروه کنترل سالم	M= -۰/۶۸۷, P=۰/۰۰۰۱*	M= -۰/۳۰۱, P=۰/۰۱۹*	M= -۰/۲۹۷, P=۰/۰۲۱*	M= -۰/۱۴۶, P=۰/۹۸۰
	گروه کنترل مدل آندومتریوز	----------	M= ۰/۳۸۶, P=۰/۰۰۲*	M= ۰/۳۹۰, P=۰/۰۰۲*	M= ۰/۵۴۱, P=۰/۰۰۰۱*
	گروه بیمار + مکمل ویتامین E	----------	----------	M= ۰/۰۰۳, P=۱/۰۰۰	M=۰/۱۵۵, P=۰/۸۰۲
	گروه بیمار + تمرین	----------	----------	----------	M= ۰/۱۵۱, P=۰/۸۶۸
TLR4	گروه کنترل سالم	M= -۰/۳۰۱, P=۰/۰۴۸*	M= -۰/۲۹۲, P=۰/۱۱۵	M= -۰/۱۲۹, P=۱/۰۰۰	M= -۰/۰۷۰, P=۱/۰۰۰
	گروه کنترل مدل آندومتریوز	----------	M= ۰/۰۰۸, P=۱/۰۰۰	M= ۰/۱۷۲, P=۱/۰۰۰	M= ۰/۲۳۱, P=۰/۳۹۹
	گروه بیمار + مکمل ویتامین E	----------	----------	M= ۰/۱۶۳, P=۱/۰۰۰	M= ۰/۲۲۲, P=۰/۴۷۳
	گروه بیمار + تمرین	----------	----------	----------	M= ۰/۰۵۸, P=۱/۰۰۰

* تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq$ ۰/۰۵



گروه کنترل سالم

گروه کنترل مدل اندومتریوز

گروه بیمار + تمرین

گروه کنترل بیمار+ مکمل ویتامین E

گروه بیمار+ ویتامین E+ تمرین

شکل شماره ۱- نتایج حاصل از درمان در مدل‌های آندومتریوز

نتایج حاصل از درمان در مدل‌های آندومتریوز در گروه نرمال سلول‌های لایه آندومتری که در رحم نرمال به‌صورت اپی‌تلیوم استوانه‌ای‌شکل وجود دارند، دیده می‌شوند. در گروه‌های ویتامین و تمرین، اندازه کیست بسیار کوچک است، ولی ساختار طبیعی اپی‌تلیوم کاملاً مشاهده نمی‌شود. خونگیری بافت به‌خوبی صورت گرفته بود و در اطراف بافت عروق قابل مشاهده بود. در گروه تمرین + ویتامین، ترشحات داخل حوزه کیستی مشاهده نشد، لایه اپی‌تلیوم کاملاً واضح دیده شد، ولی ابعاد کیست بسیار کوچک شده بود (شکل شماره ۱).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که القای آندومتریوز در موش‌ها به افزایش بیان ژن TLR4 منجر شد. اما تمرین ورزشی و مصرف ویتامین E تغییر چندانی در بیان ژن این پروتئین در بافت آندومتر ایجاد نکرد. نتایج این پژوهش با نتایج مطالعه جعفری و همکاران (۲۰۲۰)، همخوانی دارد [۱۷]. جعفری و همکاران سیگنال‌دهی TLR را در سلول‌های فولیکولی زنان مبتلا به آندومتریوز مورد بررسی قرار دادند و بیان داشتند که زنان نابارور مبتلا به آندومتریوز در مقایسه با زنان عادی به میزان قابل‌توجهی

بیان بالاتری از TLR1، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۰ داشتند و بیان ژن‌های TLR3 و نوع ۹ در مدل آندومتریوز به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. با این‌حال، بین بیان ژن TLR2 و 4 در هر دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. افزایش قابل‌توجهی در بیان mRNA TLR4 در ضایعات آندومتریال در مقایسه با بافت‌های اوتوپیک مربوطه توسط Allhorn و همکاران گزارش شد [۱۸]. همچنین، نتایج برخی مطالعات نشان داده است که بیان TLR4 در سلول‌های فولیکولی زنان مبتلا به آندومتریوز در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود [۱۷]. پژوهش‌ها گزارش کردند که برخی از سیتوکین‌ها و کموکاین‌های پیش‌التهابی نه‌تنها در آندومتر بلکه در مایع صفاقی و فولیکولی زنان و حیوانات مبتلا به آندومتریوز در حال افزایش هستند [۱۹،۱۸]. علاوه‌براین، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که التهاب لگنی که عمدتاً توسط آندوتوکسین باکتریایی (لیپوپلی ساکارید) و TLRها ایجاد می‌شود، در ایجاد آندومتریوز لگنی دخالت دارد. همزمان با بیان TLR در سلول‌های فولیکولی، میانجی‌های التهابی و ضدالتهابی، مانند IL-8، IL-6 و MIF نیز در مایع فولیکولی افزایش می‌یابند [۱۷]. یافته‌ها افزایش تولید پروتئین MIF را در این بیماران نشان می‌دهند که با مطالعات قبلی که افزایش MIF را در مایع صفاقی [۲۰] و خون محیطی زنان مبتلا به آندومتریوز نشان داده‌اند، مطابقت دارند [۲۱]. علاوه‌براین، اتصال MIF به CD74 و IL-8 به تنظیم پاسخ‌های التهابی و ایمنی منجر می‌شود [۲۲]. گزارش شده است که چسبندگی سلولی، مهاجرت، کلونیزاسیون تهاجمی و توسعه آندومتریوز را می‌توان با سطح بالای TGF-β افزایش داد [۲۳]. ممکن است تعامل بین ماکروفاژها و سلول‌های استرومایی آندومتر (EMS)، ترشح TGF-β و IL-10 را تحریک کند و به کاهش سمّیت سلولی سلول‌های NK منجر شود [۲۴]. بر این اساس، افزایش قابل‌توجهی از TGF-β و IL-10 در فولیکول‌ها تشخیص داده شد [۱۷]. همچنین، اعتقاد بر این است که TGF-β نقش مهمّی در علت آندومتریوز صفاقی ایفا می‌کند و این مسأله ممکن است محیطی مطلوب برای تشکیل ضایعه ایجاد نماید. تعامل بین ماکروفاژهای فعال‌شده یا شاید سلول‌های فولیکولی (تحریک TLR ازطریق محصولات میکروبی به فعال‌شدن ماکروفاژها منجر می‌شود) و سایر سلول‌های استرومایی در زنان مبتلا به آندومتریوز، ممکن است فعال‌شدن سلول‌های ایمنی را با تحریک ترشح IL-10 و TGF-β کاهش دهد و باعث بروز و پیشرفت آندومتریوز در زنان شود [۲۵،۲۴]. TGF-β و IL-10 توسط بسیاری از انواع سلول ازجمله ماکروفاژها ترشح می‌شوند. محرک‌های التهابی (IL-2، IL-10 و TGF-β) که ماکروفاژها و سایر سلول‌ها را مانند سلول‌های فولیکولی فعال می‌کنند، آزادسازی TGF-β و IL-10 فعال را افزایش می‌دهند. علاوه‌براین، سیگنال‌دهی TGF-β مسیری است که نقش آن در رشد فولیکولی و تخمک‌گذاری به‌خوبی مطالعه شده است [۲۶]. به‌طورکلی، یافته‌ها نشان دادند که افزایش بیان مولکول‌های TLRs در سلول‌های فولیکولی به جذب و افزایش مولکول‌های سازگارشونده با آن مثل MyD88، TIRAP، TRAM و TRIF منجر می‌گردد که این موضوع به‌نوبه خود باعث تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی در مایع فولیکولی می‌شود. از دیگر یافته‌های مطالعه حاضر این بود که القای آندومتریوز میزان بیان ژن MyD88 را به‌شدت افزایش داد، اما مصرف ویتامین E و تمرین ورزشی شنا و نیز ترکیب آن‌ها توانست تا حدّ زیادی بیان این ژن در اثر آندومتریوز را کنترل نماید. این یافته هم‌راستا با یافته‌های جعفری و همکاران (۲۰۲۰) و شیروانی و همکاران (۲۰۲۱) است. در این‌خصوص Su و همکاران (۲۰۲۱) در پژوهش خود نشان دادند که سرکوب مسیر سیگنالینگ TLR4-MyD88 درد مزمن مکانیکی را در مدل موش آندومتریوز کاهش می‌دهد. در این مطالعه مدل آندومتریوز موش با پیوند بافت شاخ رحم به گاستروکنمیوس ایجاد شد و از روش وسترن بلات و یا رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس برای تشخیص بیان TLR4، پروتئین آداپتور فاکتور ۸۸ تمایز میلوئیدی (MyD88) و فاکتور هسته‌ای کاپا (NF-kB-p65)-B-p65 استفاده گردید. نتایج نشان داد که موش‌های مدل آندومتریوز به دردهای مکانیکی در محلّ پیوند مبتلا شدند. در مقایسه با گروه شم، TLR4 و MyD88 فسفریله‌شده در سلول‌های نروگلیای ریشه خلفی در موش‌های EM شناسایی شدند. فعال‌شدن آستروسیت‌ها و میکروگلیا نیز در موش‌های EM تأیید شد. این یافته‌ها نشان دادند که مسیر سیگنالینگ HMGB1-TLR4-MyD88 در هیپرپاتی مرتبط با آندومتریوز دخیل می‌باشد و ممکن است مسدود کردن TLR4 و MyD88 به‌عنوان یک درمان بالقوه برای درد در آندومتریوز عمل کند. ازطرفی فعالیت ورزشی شنا نیز با کاهش بیان ژن پروتئین‌های TLR4/myD88 به مهار این مسیر سیگنالی می‌انجامد. ازجمله مکانیسم‌های درگیر در مهار مسیر سیگنالی TLR4/myD88 را می‌توان تغییرات غلظت آیریزین و سایر مایوکین‌های مرتبط عنوان کرد [۲۷، ۲۸]. در همین زمینه Mazur-Bialy و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که آیریزین یک آدیپومایوکین واسطه‌ای می‌باشد که ازطریق فعالیت ورزشی موجب اثر بر مسیر سیگنالینگ TLR4/MyD88 می‌شود. آن‌ها در تحقیق خود اثرات آیریزین را بر مسیر پایین‌دستی Toll-4 در ماکروفاژهای تحریک‌شده با لیپوپلی ساکارید بررسی کردند. نتایج نشان داد که آیزیزین در غلظت‌های بالا (۵۰، ۱۰۰ نانومتر) به‌طور معنی‌داری سطح پروتئین‌های TLR4 و MyD88 را کاهش می‌دهد، در نتیجه

به کاهش ترشح سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند اینترلوکین ۱ بتا، TNFα و اینترلوکین ۶ منجر می‌شود [۲۹]. از دیگر مکانیسم‌های اثرگذاری فعالیت ورزشی بر مسیر سیگنالی TLR4/MyD88 را می‌توان مهار پروتئین‌های لیگاندی پروتئین TLR4 دانست. پروتئین High mobility group box1 (HMGB1)، یک میانجی قوی پیش‌التهابی است که به‌عنوان یک لیگاند درون‌زای گیرنده‌های TLR، ازجمله TLR2، TLR4 و TLR5 عمل می‌کند و ممکن است ازطریق فعال‌کردن سیگنالینگ TLR به فعال‌شدن مسیر سیگنالی TLR4/MyD88 منجر شود. علاوه‌براین، HMGB1 به‌عنوان یک شاخص بالقوه فیبروز در آندومتریوز عمل می‌کند [۳۰] که یک نشانگر زیستی امیدوارکننده و قابل‌قبول در پلاسما برای EM شناسایی شده بود. HMGB1، یک پروتئین غیرهیستونی متصل به DNA هسته‌ای است که همه‌جا در انواع سلول‌های متعدد بیان می‌شود و می‌تواند توسط سلول‌های نکروزه در طی آسیب بافت در پاسخ به سیگنال‌های التهابی آزاد شود. دو شکل HMGB1 وجود دارد: شکل هسته که عمدتاً به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رونویسی عمل می‌کند و شکل سیتوپلاسمی که معمولاً باعث ایجاد فرآیند التهابی می‌شود [۳۱]. به‌عنوان یک میانجی پیش‌التهابی، القای HMGB1 ترشح سیتوکین‌های التهابی را به‌شدت تحریک می‌کند و در علائم نسبی درد دخالت دارد [۲۹]. این مطالعه تأیید کرد که HMGB1 عصبی در DRG و SDH نیز در مدل EM، به‌ویژه HMGB1 سیتوپلاسمی، القاء شده است. ممکن است پروتئین HMGB1 القاءشده در نورون‌ها توسط سلول‌های مربوطه ترشح شود و آبشارهای التهابی عصبی را ازطریق گیرنده‌های خود، ازجمله TLR4، ایجاد کند. HMGB1 نخاعی برای حساسیت موضعی و عمومی در مدل قطع عصب فرواوربیتال جزئی نیز کافی و ضروری است و در شرایط استفاده مزمن از مورفین به تحمل ضددرد کمک می‌کند [۳۲]. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که TLR4 در نورون‌های حسّی اوّلیه با قطر کوچک بیان می‌شود و ممکن است حسّ درد و خارش را تنظیم کند [۳۳]. ترکیب HMGB1 و TLR4 باعث جذب پروتئین فاکتور ۸۸ تمایز میلوئیدی (MyD88) و فرآیند رونویسی وابسته‌به NF-kB در نورون‌های حسّی و سلول‌های گلیال می‌شود که با انواع مختلف درد همراه است [۲۹]. همچنین آسیب عصبی باعث التهاب شدید عصبی در Dorsal Root (DRG) Ganglion ازطریق مسیر سیگنالینگ HMGB1-TLR4-MyD88 می‌شود که با تولید برجسته TNF-α و IL-1β همراه است [۲۹].

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که القاء آندومتریوز به‌شدت این مسیر را در جهت ایجاد التهاب در بافت متأثر می‌سازد و مسیر سیگنالی را نیز در سلول القاء می‌کند. با این‌حال مصرف ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان خارج سلولی که از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی محافظت و از انتقال آن‌ها به داخل سلول جلوگیری می‌کند، تاحدودی باعث مهار این مسیر می‌شود. همچنین فعالیت ورزشی نیز با سازگاری‌های آنزیمی، احتمالاً به کندشدن مسیر کمک و از التهاب و تکثیر سلولی بافت جلوگیری می‌کند. با این‌حال درمورد مقادیر مصرف ویتامین و فعالیت ورزشی و اثر آن‌ها بر مسیرهای سیگنالی یادشده، مطالعات بیشتری لازم است. اگرچه این مطالعه بر روی موش‌های آزمایشگاهی انجام شد و در تعمیم یافته‌ها به انسان‌ها می‌بایست احتیاط کرد، اما پیشنهاد می‌شود برای درمان بیماران مبتلا به آندومتریوز، اثر تمرین شنا در کارآزمایی بالینی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین مصرف ویتامین E در یک دوره زمانی ۸هفته‌ای و ترکیب آن با فعالیت ورزشی شنا، به احتمال زیاد به کنترل بیماری بیشتر کمک کند.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران نهایت سپاس و قدردانی خود را از مسؤولان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و تمامی افرادی که ایشان را در انجام این پژوهش یاری نمودند، اعلام می‌دارند.

References:

[1] TaheriChadorneshin H, Abtahi-Eivary S, Shirvani H, Yousefi M. The interactive effect of vitamin E supplementation along with continuous and interval exercise trainings on brain content of vascular endothelial growth factor. ***J Practical Studies Biosciences Sport*** 2019; 7(13): 19-30. [in Persian]

[2] Foti PV, Farina R, Palmucci S, Vizzini IAA, Libertini N, Coronella M, Spadola S, Caltabiano R, Iraci M, Basile A, Milone P, Cianci A, Ettorre GC. Endometriosis: clinical features, MR imaging findings and pathologic correlation. ***Insights Imaging*** 2018; 9(2): 149-72.

[3] Rossini LG, Ribeiro PA, Rodrigues FC, Filippi SS, Zago Rde R, Schneider NC, et al. Transrectal ultrasound-Techniques and outcomes in the management of intestinal endometriosis. ***Endosc Ultrasound*** 2012; 1(1): 23-35.

[4] Saunders PTK, Horne AW. Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. ***Cell*** 2021; 184(11): 2807-24.

[5] Mofazzal-Jahromi MA, Moazzeni SM. Dendritic cell subset biology and application in cancer immunotherapy. ***Feyz*** 2013; 17(1): 100-13. [in Persian]
[6] Lupi LA, Cucielo MS, Silveira HS, Gaiotte LB, Cesário RC, Seiva FR, de Almeida Chuffa LG. The role of Toll-like receptor 4 signaling pathway in ovarian, cervical, and endometrial cancers. ***Life Sci*** 2020; 247: 117435.
[7] Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. ***Fertil Steril*** 2002; 77(5): 861-70.
[8] Wu Z, Mehrabi Nasab E, Arora P, Athari SS. Study effect of probiotics and prebiotics on treatment of OVA-LPS-induced of allergic asthma inflammation and pneumonia by regulating the TLR4/NF-kB signaling pathway. ***J Transl Med*** 2022; 20(1): 130.
[9] Lee GY, Han SN. The Role of Vitamin E in Immunity. ***Nutrients*** 2018; 10(11): 1614.
[10] Wallert M, Börmel L, Lorkowski S. Inflammatory Diseases and Vitamin E – What Do We Know and Where Do We Go? ***Mol Nutrition Food Res*** 2020; 65: 2000097.
[11] Rengaraj D, Hong YH. Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. ***Int J Mol Sci*** 2015; 16(5): 9910-21.
[12] Traber MG. Vitamin E inadequacy in humans: causes and consequences. ***Adv Nutr*** 2014; 5(5): 503-14.
[13] Amini L, Chekini R, Nateghi MR, Haghani H, Jamialahmadi T, Sathyapalan T, et al. The Effect of Combined Vitamin C and Vitamin E Supplementation on Oxidative Stress Markers in Women with Endometriosis: A Randomized, Triple-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. ***Pain Res Manag*** 2021; 2021: 5529741.
[14] Shahidian Akbar F, Farzanegi P, Abbaszadeh H. Evaluation of ESR and IGFBP1 genes of ovarian tissue of endometriosis model mice after a period of regular exercise and vitamin E intake. ***RJMS*** 2020; 27(3): 38-48. [in Persian]
[15] Jamali N, Mostafavi-Pour Z, Zal F, Kasraeian M, Poordast T, Ramezani F, et al. Combination Effect of Caffeine and Caffeic Acid Treatment on the Oxidant Status of Ectopic Endometrial Cells Separated from Patients with Endometriosis. ***Iran J Med Sci*** 2019; 44(4): 315-24. [in Persian]
[16] Bonocher CM, Montenegro ML, Rosa e Silva JC, Ferriani RA, Meola J. Endometriosis and physical exercises: a systematic review. ***Reprod Biol Endocrinol*** 2014; 12: 4.
[17] Jafari R, Taghavi SA, Amirchaghmaghi E, Yazdi RS, Karimian L, Ashrafi M, et al. Detailed Investigation of Downstream TLR Signaling in the Follicular Cells of Women with Endometriosis. ***J Reprod Infertil*** 2020; 21(4): 231-9.
[18] Allhorn S, Böing C, Koch AA, Kimmig R, Gashaw I. TLR3 and TLR4 expression in healthy and diseased human endometrium. ***Reprod Biol Endocrinol*** 2008; 6: 40.
[19] Kyama CM, Overbergh L, Mihalyi A, Meuleman C, Mwenda JM, Mathieu C, et al. Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. ***Fertil Steril*** 2008; 89(2): 301–10.
[20] Xu H, Schultze-Mosgau A, Agic A, Diedrich K, Taylor RN, Hornung D. Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization. ***Fertil Steril*** 2006; 86(6): 1616–20.
[21] Kats R, Collette T, Metz CN, Akoum A. Marked elevation of macrophage migration inhibitory factor in the peritoneal fluid of women with endometriosis. ***Fertil Steril*** 2002; 78 (1): 69–76.
[22] Morin M, Bellehumeur C, Therriault MJ, Metz C, Maheux R, Akoum A. Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor in the peripheral blood of women with endometriosis. ***Fertil Steril*** 2005; 83(4): 865–72.
[23] Xu X, Wang B, Ye C, Yao C, Lin Y, Huang X, et al. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer. ***Cancer Lett*** 2008; 261(2): 147–57.
[24] Soni UK, Chadchan SB, Kumar V, Ubba V, Khan MTA, Vinod BSV, et al. A high level of TGF-B1 promotes endometriosis development via cell migration, adhesiveness, colonization, and invasiveness. ***Biol Reprod*** 2018; 100(4): 917–38.
[25] Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. ***Reprod Biol Endocrinol*** 2003; 1: 123.
[26] Vallvé-Juanico J, Houshdaran S, Giudice LC. The endometrial immune environment of women with endometriosis. ***Hum Reprod Update*** 2019; 25(5): 564-91.
[27] Yu C, Zhou JJ, Fan HY. Studying the Functions of TGF-β Signaling in the Ovary. ***Methods Mol Biol*** 2016; 1344: 301-11.
[28] Su W, Cui H, Wu D, Yu J, Ma L, Zhang X, et al. Suppression of TLR4-MyD88 signaling pathway attenuated chronic mechanical pain in a rat model of endometriosis. ***J Neuroinflammation*** 2021; 18: 65.
[29] Mazur-Bialy AI, Pocheć E, Zarawski M. Anti-Inflammatory Properties of Irisin, Mediator of Physical Activity, Are Connected with TLR4/MyD88 Signaling Pathway Activation. ***Int J Mol Sci*** 2017; 18(4): 701.
[30] Zhong H, Gui X, Hou L, Lv R, Jin Y. From Inflammation to Fibrosis: Novel Insights into the Roles of High Mobility Group Protein Box 1 in Schistosome-Induced Liver Damage. ***Pathogens*** 2022; 11(3): 289.
[31] Thakur V, Sadanandan J, Chattopadhyay M. High-Mobility Group Box 1 Protein Signaling in Painful Diabetic Neuropathy. ***Int J Mol Sci*** 2020; 21(3): 881.

[32] Hou X, Liu G, Zhang H, Hu X, Zhang X, Han F, et al. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) from Cherry Valley duck mediates signaling pathways and antiviral activity. ***Vet Res*** 2020; 51: 12.

[33] Liu X, Wang N, Fan S, Zheng X, Yang Y, Zhu Y, et al. The citrus flavonoid naringenin confers protection in a murine endotoxaemia model through AMPK-ATF3-dependent negative regulation of the TLR4 signalling pathway. ***Sci Rep*** 2016; 6: 39735.