

## تأثیر مکمل‌دهی ویتامین E بر پاسخ فاکتور آنژیوژنیک به فعالیت وامانده‌ساز

دکتر مریم نورشاهی<sup>۱</sup>، دکتر خسرو ابراهیم<sup>۲</sup>، حسین طاهری چادر نشین<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۸/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۴/۲۱

## چکیده

هدف از این تحقیق بررسی تأثیر مکمل‌دهی ویتامین E بر پاسخ فاکتور آنژیوژنیک (سطوح VEGF سرم) به فعالیت وامانده‌ساز و بررسی ارتباط مکمل‌دهی ویتامین E با VEGF سرمی در مردان فعال است. بدین منظور، ۳۰ مرد فعال (میانگین  $\pm$  انحراف معیار: حداکثر اکسیژن مصرفی  $40/19 \pm 2/54$  میلی‌لیتر بر کیلوگرم در دقیقه) انتخاب و براساس  $VO_{2max}$  به دو گروه مکمل (۴۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E به‌طور روزانه) و دارونما (۴/۰ گرم آمیلیوم به‌طور روزانه) تقسیم شدند. پس از ۱۴ روز مکمل‌دهی، آزمودنی‌های هر دو گروه فعالیت وامانده‌ساز (۲۰ دقیقه فعالیت با ۵۰ درصد  $VO_{2max}$  و سپس ۴۰ دقیقه بعدی با ۶۵ درصد  $VO_{2max}$  و ۵ دقیقه پایانی با حداکثر تلاش تا حد واماندگی) انجام دادند. نمونه‌های خونی قبل از دوره مکمل‌دهی، قبل، بلافاصله و دو ساعت بعد اجرای وامانده‌ساز گرفته شدند. از آزمون‌های تحلیل واریانس و همبستگی پیرسون برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. بر اساس نتایج، دو هفته مکمل‌دهی ویتامین E باعث افزایش معنی‌دار سطوح سرمی ویتامین E گروه مکمل نسبت به گروه دارونما شد ( $P=0/006$ ). همچنین، فعالیت وامانده‌ساز موجب افزایش معنی‌دار VEGF سرمی بعد از اجرا در گروه مکمل ( $P=0/001$ ) و دارونما ( $P=0/000$ ) شد. با وجود این، بین سطوح VEGF سرمی در دو گروه مکمل و دارونما در هیچ‌یک از وهله‌های زمانی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $P=0/865$ ). همچنین، بین سطوح ویتامین E و میزان VEGF سرم پایه ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ( $P=0/221$ ). در نهایت، به نظر نمی‌رسد مکمل‌دهی ویتامین E با دوز ۴۰۰ واحد به مدت ۱۴ روز تأثیر معنی‌داری بر سطوح VEGF سرمی استراحتی و VEGF ناشی از فعالیت وامانده‌ساز داشته باشد.

**کلیدواژه‌های فارسی:** آنتی‌اکسیدان، آنژیوژنز، VEGF سرمی، ویتامین آلفا دی توکوفریل استات، فعالیت وامانده‌ساز.

Email: m-nourshahi@sbu.ac.ir

۱. دانشیار دانشگاه شهید بهشتی (نویسنده مسئول)

Email: k-ebrahim@sbu.ac.ir

۲. استاد دانشگاه شهید بهشتی

Email: kh.taheri\_62@yahoo.com

۳. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزش دانشگاه شهید بهشتی

### مقدمه

فعالیت جسمانی منظم از یک سو باعث کاهش بیماری‌های قلبی - عروقی، دیابت، و سرطان می‌شود (۱، ۲) و از سوی دیگر، انقباضات عضلانی شدید با تولید مقادیر فراوانی رادیکال آزاد<sup>۱</sup> موجب پراکسیداسیون غشای لیپیدی، آسیب پروتئین‌های سلولی و DNA و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (۳، ۴). ورزشکاران برای کاهش سطوح و برداشت رادیکال‌های آزاد، مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی، به‌ویژه ویتامین E مصرف می‌کنند (۴). به‌تازگی مشخص شده است که اگرچه سطوح بالای رادیکال‌های آزاد می‌توانند موجب آسیب سلولی شوند، سطوح متوسط تا پایین اکسیدان‌ها چندین نقش تنظیمی در سلول ایفا می‌کنند؛ مانند تنظیم تولید نیروی عضله اسکلتی، کنترل بیان ژنی و تنظیم مسیرهای پیام‌دهی سلولی (۵).

یکی از مهم‌ترین مسیرهای پیام‌دهی که رادیکال‌های آزاد در آن درگیرند آنژیوژنز<sup>۲</sup> است (۳، ۵). آنژیوژنز یا رگ‌زایی به معنی افزایش چگالی مویرگ‌های عضله اسکلتی و قلبی است (۶). آنژیوژنز مستلزم درگیری انواع سلولی، مسیرهای پیام‌دهی، فاکتورهای رشدی و گیرنده‌هاست (۷) که در نهایت موجب می‌شود رگ خونی جدید به دو صورت جوانه زدن (۶، ۸) و تقسیم طولی (۱) از رگ قبلی به‌وجود آید. مهم‌ترین میتوز درگیر در فرآیند آنژیوژنز، فاکتور رشدی آندوتلیال عروقی (VEGF)<sup>۳</sup> است (۷). فاکتور رشدی آندوتلیال عروقی، گلیکوپروتئینی ۴۵ کیلودالتونی است که عمدتاً از سلول‌های آندوتلیال (۶) و سلول‌های توموری (۳، ۹، ۱۰) ترشح می‌شود. فاکتور رشدی آندوتلیال عروقی از طریق اتصال به گیرنده خود یعنی VEGFR-۲<sup>۴</sup> موجب بقا، تکثیر و مهاجرت سلول‌های آندوتلیال و در نهایت، تشکیل عروق جدید می‌شود (۸، ۱۱). برای اتصال VEGF به گیرنده خود لازم است سطح بهینه‌ای از اکسیدان‌ها در سطح خارج سلولی وجود داشته باشند؛ زیرا این اکسیدان‌ها اتصال VEGF به VEGFR-۲ را میانجی‌گری می‌کنند (۵). از طرفی، نشان داده شده است که اتصال VEGF به گیرنده VEGFR-۲ موجب فعال‌سازی NADPH اکسیداز (جایگاه اصلی تولید رادیکال آزاد در سلول‌های آندوتلیال) و متعاقباً تولید اکسیدان می‌شود که این اکسیدان‌ها برای پیام‌دهی پاسخ آنژیوژنیک VEGF ضروری‌اند (۹). مهم‌ترین رادیکال آزاد درگیر در فرآیند رگ‌زایی پراکسید هیدروژن است که در غلظت‌های میکرومولار در سطح خارجی سلول آندوتلیال و در سطح داخلی سلول آندوتلیال

- 
1. Free radical
  2. Angiogenesis
  3. Vascular endothelial growth factor (VEGF)
  4. Vascular endothelial growth factor receptor- 2

به‌عنوان پیامبر مرکزی در فرآیند آنژیوژنز عمل می‌کند (۵).  
چندین مطالعه تأثیر رادیکال‌های آزاد را در فرآیند آنژیوژنز و اثرگذاری مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها روی آنژیوژنز بررسی کرده‌اند. زاهو و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۰۹) در بررسی اثر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)<sup>۲</sup> روی آنژیوژنز قلبی پس از انفارکتوس میوکارد (MI)<sup>۳</sup> متوجه شدند که آنژیوژنز در هفته اول انفارکتوس میوکارد حاصل می‌شود که از لحاظ زمانی و مکانی متقارن با ROS توسعه یافته است (۱۲). جکس و همکاران<sup>۴</sup> (۲۰۰۷) با تخلیه ژنی زیرواحدهای NADPH اکسیداز متوجه سرکوب شدن جوانه زدن و بیرون زدگی عروق حلقه آئورتی موش شدند (۱۳). رودریگز و همکاران<sup>۵</sup> (۲۰۰۵) با مکمل‌دهی ۹ هفته‌ای خوک‌های دچار هیپرکلسترمی با ویتامین E (دی‌ل‌آلفا‌توکوفرول استات) کاهش بیان VEGF و VEGFR-۲ را مشاهده کردند (۱۴). ودسون و همکاران<sup>۶</sup> (۲۰۰۲) متوجه شدند که مکمل‌دهی طولانی مدت آلفا‌توکوفرول (ویتامین E) با سطوح سرمی کاهش یافته VEGF همبسته است (۱۵).

از آنجا که در تحقیقات به نقش مصرف مکمل آنتی‌اکسیدان روی رگ‌زایی حاصل از فعالیت ورزشی اشاره نشده است و از طرفی مطالعات نشان داده‌اند رادیکال‌های آزاد به‌عنوان میانجی‌های سلولی در فرآیند رگ‌زایی مشارکت می‌کنند، مشخص نیست مکمل‌های ویتامین E که توسط ورزشکاران برای برداشت رادیکال‌های آزاد مصرف می‌شود بر رگ‌زایی یا به عبارتی بر بیان فاکتورهای آنژیوژنیک اثر می‌گذارد یا نه؟ بنابراین تحقیق حاضر به دنبال پاسخ‌گویی به این سؤال است که آیا مصرف آنتی‌اکسیدان ویتامین E، سطوح VEGF را متعاقب ورزش تغییر می‌دهد؛ به بیان دیگر آیا مصرف آنتی‌اکسیدان ویتامین E می‌تواند رگ‌زایی حاصل از فعالیت ورزشی را تغییر دهد؟

### روش‌شناسی پژوهش

در این تحقیق از میان داوطلبان واجد شرایط که پرسشنامه فعالیت بدنی بک<sup>۸</sup> و پرسشنامه سلامت عمومی را کامل کرده بودند، ۳۰ مرد فعال (که دست‌کم شش ماه فعالیت منظم و هر

- 
1. Zhao, et al.
  2. Reactive oxygen species (ROS)
  3. myocardial infarction (MI)
  4. Jx, e al.
  5. Rodriguez, et al.
  6. D , L -  $\alpha$  - tocopherol acetate
  7. Woodson, et al.
  8. Baeck Questionnaire of Habitual Activity

هفته دست کم سه جلسه فعالیت فیزیکی داشتند) از بین دانشجویان دانشگاه انتخاب شدند. آزمودنی‌ها براساس حداکثر اکسیژن مصرفی به دو گروه مکملی (۱۵ نفر) و دارونما (۱۵ نفر) تقسیم شدند. سابقه پزشکی آزمودنی‌ها مبنی بر عدم ابتلا به هرگونه سابقه بیماری قلبی - عروقی، آترواسکلروز، هایپرلیپیدمی، پرفشار خونی، سرطان و تومور، سابقه مصرف سیگار یا هر نوع دارو و مکمل بررسی شد. پس از توضیحات اولیه در خصوص هدف، نحوه اجرای آزمون و خطرات احتمالی آن آزمودنی‌ها رضایت‌نامه را تکمیل کردند. در جدول ۱ ویژگی‌های توصیفی آزمودنی‌ها ارائه شده است.

جدول ۱. ویژگی‌های آزمودنی‌های تحقیق

گروه مکمل	گروه دارونما	
$23/46 \pm 2/16$	$24/33 \pm 1/63$	سن (سال)
$73/61 \pm 10/9$	$72/30 \pm 5/31$	وزن (kg)
$174/80 \pm 6/32$	$175/33 \pm 5/9$	قد (cm)
$40/37 \pm 2/69$	$40/15 \pm 1/47$	حداکثر اکسیژن مصرفی (ml/kg/min)

ویژگی‌های آزمودنی‌ها به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین بیان شده‌اند.

آزمون در سه روز (جلسه) مجزا در آزمایشگاه فیزیولوژی ورزش دانشگاه شهید بهشتی تهران اجرا شد. در جلسه اول که جلسه توجیهی بود، هدف کار، نحوه اجرا، میزان خون‌گیری، جزئیات کنترل تغذیه‌ای و وضعیت سلامتی آزمودنی‌ها تشریح و بررسی شد. در این جلسه از آزمودنی‌ها درخواست شد سه روز قبل از اجرای آزمون  $VO_{2max}$  و فعالیت وامانده‌ساز از فعالیت حاد خودداری کنند (۴). در جلسه دوم، اندازه‌های آنتروپومتریکی (قد و وزن) و اندازه‌های فیزیولوژیکی ( $VO_{2max}$  و  $HR_{max}$ ) اندازه‌گیری شدند. براساس  $VO_{2max}$  به دست آمده آزمودنی‌ها به دو گروه مکمل و دارونما تقسیم شدند و به مدت ۱۴ روز مکمل و دارونما مصرف کردند. در طول این دوره زمانی ۱۴ روزه، آزمودنی‌های هر دو گروه فعالیت خود را مانند سابق انجام می‌دادند. برای اینکه مشخص شود سطوح پایه‌ای ویتامین E سرمی آزمودنی‌ها متفاوت نیست و اینکه مکمل‌دهی ویتامین E موجب افزایش سطوح ویتامین E سرمی گروه مکملی می‌شود یا نه، قبل و بعد از دوره مکمل‌دهی خون‌گیری انجام شد. جلسه سوم بعد از ۱۴ روز برگزار شد و آزمودنی‌ها در آزمون فعالیت وامانده‌ساز شرکت کردند. در ابتدای این جلسه خون‌گیری دوم به عمل آمد. بعد از اجرای فعالیت وامانده‌ساز، بلافاصله و دو ساعت بعد، خون‌گیری مجدداً تکرار شد. در تمامی مراحل خون‌گیری، آزمودنی به مدت ۳۰ دقیقه روی صندلی می‌نشست و ۲ سی‌سی خون از سیاهرگ آنتی‌کوبیتال گرفته می‌شد با این استثنا که در مورد خون‌گیری بلافاصله بعد از اجرا، اندازه‌گیری فوراً انجام می‌شد. بعد از اجرا از آزمودنی‌ها خواسته شد از فعالیت ورزشی جانبی برای دو

ساعت بعد (به دلیل گرفتن خون دوم) خودداری کنند و فعالیت‌های عادی و معمولی خود مانند مطالعه کردن و جستجو در کامپیوتر را انجام دهند.

گروه مکمل، ۱۴ کپسول ویتامین E (۴۰۰ واحد بین‌المللی) (دی آلفا توکوفریل استات<sup>۱</sup>) ساخت آمریکا (شرکت وایتان فارماکیوتیکال<sup>۲</sup>) را به مدت ۱۴ روز و ۴۵ دقیقه قبل از صرف شام مصرف کردند. در ترکیب این مکمل، ژلاتین و گلیسرین (برای کمک به جذب بیشتر این مکمل) نیز به کار رفته بود؛ از این رو شرکت سازنده درجه خلوص این ویتامین را در ترکیب مکملی آن، بسته به سیستم آنالیزی، بین ۹۸ تا ۱۰۲ درصد گزارش کرده بود. همچنین، استفاده از دوز ۴۰۰ واحد بر مبنای پیشنهادات RDA<sup>۳</sup> بوده است. گروه دارونما نیز ۰/۴ گرم آمیلیوم (نشاسته) را برای دوره زمانی مشابه گروه مکملی مصرف کردند (۴).

حداکثر اکسیژن مصرفی (VO<sub>2</sub>max) به وسیله دوچرخه کارسنج مونارک<sup>۴</sup> (ساخت سوئد) و دستگاه گاز آنالیزور کورتکس متالایزر<sup>۵</sup> (ساخت آلمان) اندازه‌گیری شد. نحوه کار بدین صورت بود که ابتدا آزمودنی‌ها به مدت پنج دقیقه بدون بار شروع به رکاب زدن کردند. سپس، بار کار<sup>۶</sup> ۵۰ وات اضافه شد و به مدت دو دقیقه رکاب زدند و در ادامه به ازای هر دقیقه، ۲۵ وات بار کار افزایش یافت تا اینکه فرد به حالت واماندگی رسید. آزمودنی‌ها برای رسیدن به حداکثر تلاش اجرایی به صورت کلامی تشویق شدند (۱). برنامه آزمایشی روی یکی از آزمودنی‌ها اجرا شد و تعدیلات لازم از لحاظ سختی و شدت اجرا به عمل آمد. ضوابط رسیدن به حداکثر اکسیژن مصرفی عبارت بودند از: ضربان قلب بیش از ۹۰ درصد ضربان قلب بیشینه (سن - ۲۲۰)، نسبت تبادل تنفسی بیش از ۱/۱ و به فلات رسیدن اکسیژن مصرفی با وجود افزایش شدت تمرین. رسیدن به دو معیار از سه معیار فوق برای متوقف کردن پروتکل کافی بود (۱). آزمودنی‌ها قبل از آزمون VO<sub>2</sub>max گرم کردن و حرکات کششی ویژه عضلات پایین‌تنه را انجام دادند.

پروتکل ورزشی که در این تحقیق استفاده شد، پروتکل ورزشی وامانده‌ساز بود (۷) که روی دوچرخه کارسنج مدل مونارک (ساخت سوئد) انجام شد. برای کنترل شدت از شاخص حداکثر اکسیژن مصرفی VO<sub>2</sub>max استفاده شد. پروتکل بدین صورت است که آزمودنی‌ها ۲۰ دقیقه اول را با ۶۰ rpm، با ۵۰ درصد VO<sub>2</sub>max شروع به رکاب زدن کردند. در ادامه، آزمودنی‌ها ۴۰

1. Alpha di tocopheril acetate
2. Vitane Pharmaceuticals Inc.
3. Recommended Daily Allowance
4. Monark
5. Metalyzer 3B cortex
6. Workload

دقیقه بعدی را با ۶۵ درصد  $VO_{2max}$  رکاب زدند. در نهایت، آزمودنی‌ها در بالاترین میزان تحمل کاری تا رسیدن به واماندگی پنج دقیقه با افزایش بار به صورت دستی به طور مداوم رکاب زدند. آزمون آزمایشی نیز به صورت تصادفی روی یکی از آزمودنی‌ها اجرا شد و تعدیلات لازم از لحاظ سختی و شدت کار به عمل آمد.

آزمودنی‌های تحقیق حاضر ساکن خوابگاه بودند و از برنامه غذایی دانشگاه پیروی می‌کردند. بعد از دو ساعت از آخرین وعده غذایی، آزمون تعیین  $VO_{2max}$  و فعالیت وامانده‌ساز اجرا شد. آزمودنی‌ها از خوردن مواد غذایی غنی از ویتامین E مانند روغن خرما، خرما، سویا، ماهی، گوجه فرنگی و سس گوجه فرنگی و مواد مکملی دیگر منع شده بودند (۴) و مجاز بودند طی تمرین و دو ساعت بعد از اجرا آب مصرف کنند. بلافاصله بعد از اجرای فعالیت وامانده‌ساز به آزمودنی‌ها یک کیک داده شد؛ زیرا دانتز و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۰۲) بیان کردند که شرایط هیپوگلیسمی (زمانی که سطوح گلوکز خون کمتر از ۷۵ میلی گرم بر دسی لیتر برسد) باعث افزایش سطوح VEGF سرمی می‌شود (۱۶)، هر چند که در این تحقیق سطوح گلوکز خون به دلیل محدودیت‌های تحقیقی اندازه‌گیری نشد.

نمونه‌های خونی برای جدا سازی سرم و اندازه‌گیری فاکتور رشدی آندوتلیال عروق و ویتامین E به آزمایشگاه بیوشیمی پژوهشکده غدد و متابولیسم انتقال داده شدند. خون گرفته شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، برای سانتریفیوژ کردن خون از دستگاه اسپندورف (به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به ویتامین E از کیت ایزی‌کالریمتریکی ویتامین E<sup>۲</sup> ساخت چین (شرکت مهندسی نان‌جینگ جیان‌چنگ<sup>۳</sup>) استفاده شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به VEGF از کیت الایزا<sup>۴</sup> ساخت چین (شرکت لایف ساینس ایالات متحده - چین<sup>۵</sup>) استفاده شد.

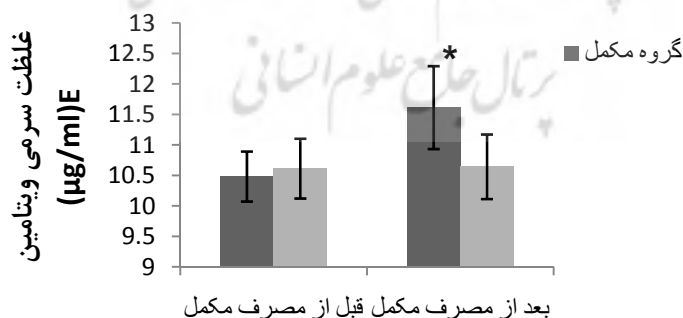
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف<sup>۶</sup> و ماچولی تست<sup>۷</sup>، به ترتیب برای تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس‌ها استفاده شد. مشخص شد که داده‌های تحقیق طبیعی‌اند؛ بنابراین، برای آزمون

- 
1. Dantz, et al.
  2. Vitamin E Colorimetric Assay Kit
  3. Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute
  4. VEGF Elisa Kit
  5. USCN Life Science Institute
  6. Kolmogrov-Smirnov
  7. Mauchly's Test

معنی‌داری تغییرات سطوح ویتامین E سرمی از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه  $2 \times 2$  با عامل بین‌گروهی، برای آزمون معنی‌داری اثر فعالیت وامانده‌ساز روی سطوح VEGF سرمی از تحلیل واریانس با اندازه‌های تکراری، برای آزمون تفاوت بین دو گروه مکمل و دارونما از تحلیل واریانس دوطرفه  $2 \times 3$  با عامل بین‌گروهی و آزمون ارتباط ویتامین E با VEGF سرمی پایه از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد (۱۵). سطح معنی‌داری  $P \leq 0/05$  تعیین شده بود.

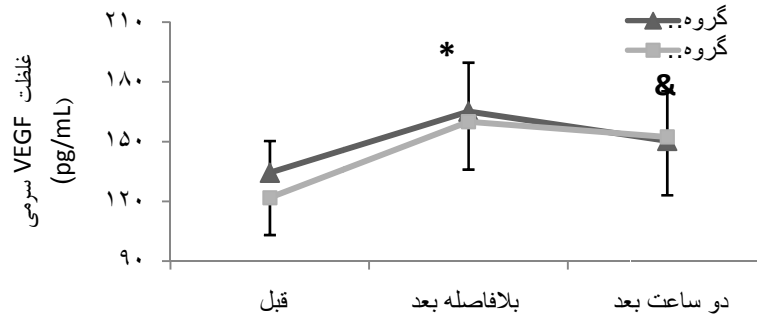
### یافته‌های پژوهش

نتایج تحقیق نشان داد دو هفته مکمل‌دهی ویتامین E باعث افزایش معنی‌دار سطوح سرمی ویتامین E گروه مکمل ( $11/61 \pm 0/68$ ) نسبت به گروه دارونما ( $10/64 \pm 0/89$ ) شد ( $P=0/006$ ).  $F_{1,28} = 8/882$  (نمودار ۱). یک جلسه فعالیت وامانده‌ساز موجب افزایش معنی‌دار سطوح VEGF سرمی بلافاصله بعد از اجرا در گروه مکمل ( $P=0/001$ ) شد، ولی این تغییر دو ساعت بعد از اجرا ( $P=0/149$ ) معنی‌دار نبود ( $F_{2,28} = 8/938$ ) (نمودار ۲). همچنین یک جلسه فعالیت وامانده‌ساز موجب افزایش معنی‌دار سطوح VEGF سرمی بلافاصله ( $P=0/001$ ) و دو ساعت بعد از اجرا ( $P=0/043$ ) در گروه دارونما شد ( $F_{2,28} = 10/128$ ) (نمودار ۲). با وجود این، نشان داده شد که دو هفته مکمل‌دهی ویتامین E تأثیر معنی‌داری بر سطوح VEGF سرمی دو گروه مکمل و دارونما در هیچ یک از وهله‌های زمانی استراحتی ( $133/4 \pm 15/90$ ) در برابر  $18/80 \pm 122/5$ ، بلافاصله ( $165/1 \pm 24/57$ ) در برابر  $157 \pm 24/06$ ) و دو ساعت ( $150/4 \pm 29/31$ ) در برابر  $24/91 \pm 146/8$ ) بعد از فعالیت ورزشی وامانده‌ساز ندارد ( $F_{1,56} = 0/145$ ,  $P=0/865$ ) (نمودار ۲). همچنین، بین سطوح ویتامین E و میزان VEGF سرم پایه ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ( $F=0/230$ ,  $P=0/221$ ) (نمودار ۳).

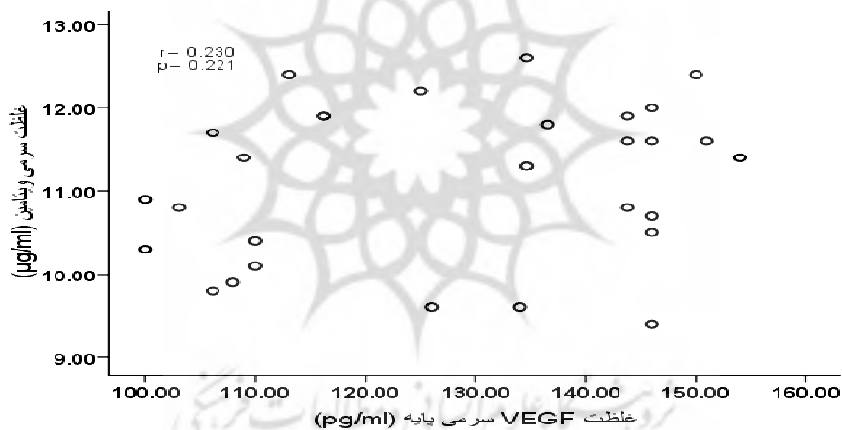


نمودار ۱. سطوح ویتامین E سرمی دو گروه مکمل و دارونما قبل و بعد از بارگیری

\* تفاوت معنی‌دار بین دو گروه مکمل و دارونما بعد از بارگیری



نمودار ۲. سطوح VEGF سرمی گروه مکمل و دارونما در سه حالت قبل، بلافاصله و دو ساعت بعد اجرا  
\* تفاوت معنی دار سطوح VEGF سرمی نسبت به سطح پایه در دو گروه مکمل و دارونما  
& تفاوت معنی دار سطوح VEGF سرمی نسبت به سطح پایه در گروه دارونما



نمودار ۳. همبستگی بین سطوح ویتامین E و VEGF سرمی پایه

## بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق نشان داد دو هفته مکمل دهی ویتامین E موجب افزایش سطوح ویتامین E سرمی می شود. نتایج تحقیق حاضر با نتایج مطالعات لمبرچیت و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۰۹)، داقینی و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۰۷)، کئونگ و همکاران<sup>۳</sup> (۲۰۰۶) و میگر و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۰۱) همسو و موافق

1. Lamprecht, et al.
2. Daghini, et al.
3. Keong, et al.



بود (۱۷-۲۰). در پژوهش حاضر پس از دو هفته مکمل‌دهی ویتامین E افزایشی تقریباً ۱۰ درصدی در سطوح ویتامین E سرمی مشاهده شد. با وجود این لمبرجیت و همکاران (۲۰۰۹) افزایش تقریباً دو برابری را در سطوح ویتامین E پس از دو هفته مکمل‌دهی گزارش کردند. این مقدار افزایش در تحقیق آنان احتمالاً به دلیل مکمل‌دهی ویتامین C و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها همراه با ویتامین E است؛ زیرا ویتامین C در بازیابی دوباره ویتامین E مشارکت می‌کند (۱۸)، (۱۹). از طرفی، میگر و همکاران (۲۰۰۱) افزایشی تقریباً پنج برابری در سطوح ویتامین E سرمی پس از هشت هفته مکمل‌دهی ویتامین E در دوزهایی برابر ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی در روز گزارش کردند. کئونگ و همکاران (۲۰۰۶) با شش هفته مکمل‌دهی توکوترینول، افزایشی ۳۳ درصدی در سطوح آلفا توکوفرول سرمی گزارش کردند. سازوکار این رخداد مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد توکوترینول در بدن تبدیل به آلفا توکوفرول می‌شود یا در زمان برداشت از خون و انتقال به بافت چربی با آلفا توکوفرول معاوضه می‌شود (۱۹). همچنین، داقینی و همکاران (۲۰۰۷) افزایشی چهار برابری در سطوح ویتامین E پلاسمایی متعاقب ۱۲ هفته مکمل‌دهی ویتامین E همراه با ویتامین C گزارش کردند.

ویتامین E به هشت ایزومر ساختاری توکوفرول و توکوترینول آلفا ( $\alpha$ )، بتا ( $\beta$ )، گاما ( $\gamma$ )، دلتا ( $\delta$ ) گفته می‌شود (۳). ویتامین E بعد از جذب از روده وارد سیستم لنفاوی و از این طریق وارد جریان خون می‌شود (۸). در خون، از طریق اتصال به گیرنده LDL وارد سلول می‌شود (۳)، (۱۰). قسمت عمده ویتامین E در بافت چربی ذخیره می‌شود، اما مقادیر کمی نیز در کبد، ریه، قلب، عضله و مغز ذخیره می‌شود (۳، ۲۰). به طور کلی، سطوح ویتامین E سرمی بسته به طول دوره مکمل‌دهی (۱۷، ۱۹، ۲۰)، مصرف و عدم مصرف ویتامین C (۱۸، ۱۹)، میزان دوز مصرفی ویتامین E (۱۷)، سطوح پایه‌ای ویتامین E آزمودنی‌ها و نوع ایزومر مصرفی ویتامین E (۱۹) تغییر خواهد کرد.

نتایج نشان داد فعالیت وامانده‌ساز موجب افزایش معنی‌دار VEGF سرمی در گروه مکمل و دارونما می‌شود. نتایج این مطالعه با نتایج تحقیقات تنگ و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۱۰) و سوهر و همکاران<sup>۳</sup> (۲۰۰۷) همسو بود (۶، ۹). تنگ و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که پس از تمرین ورزشی حاد، بافت‌های مختلفی (عضله اسکلتی، مغز، ریه) در افزایش سطوح سرمی VEGF مشارکت می‌کنند (۹). همچنین، سوهر و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که VEGF سرمی پس

---

1. Meagher, et al.

2. Tang, et al.

3. Suhr, et al.

از فعالیت دوچرخه‌سواری افزایش می‌یابد. در تحقیق سوهر و همکاران (۲۰۰۷) دوچرخه‌سواری توأم با لرزش و در شرایط هایپوکسی اجرا شد؛ بنابراین تمرین ورزشی نمی‌تواند تنها عامل افزایش VEGF سرمی در این تحقیق باشد. اجرای فعالیت ورزشی در حالت توأم با لرزش بیشتر از اجرای بدون لرزش جریان خون عضله اسکلتی را افزایش می‌دهد و در پی آن، استرس مکانیکی بیشتری به جدار عروقی وارد می‌شود (۶). از طرفی نشان داده شده است که شرایط هایپوکسی (کمبود اکسیژن) از طریق افزایش بیان VEGF زمینه عروقی شدن بافت و فراهمی کافی اکسیژن را در این شرایط مهیا می‌کند (۶، ۷، ۹). با وجود این، نتایج این مطالعه با نتایج تحقیق لیک و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۰۹) و داویس و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۰۲) ناهمسو است (۲، ۲۱). دلیل ناهمسو بودن با تحقیق لیک و همکاران (۲۰۰۹) این است که این محققان در تحقیق خود از رت استفاده کرده‌اند و آن‌ها را به مدت پنج هفته در شرایطی تمرین دادند که PGC1 $\alpha$  آن‌ها تخریب شده بود و متوجه کاهش بیان پروتئین VEGF شدند. مشخص شده است که طی تمرین ورزشی، افزایش فسفریله شدن AMPK<sup>۴</sup>، از طریق افزایش PGC1 $\alpha$  موجب افزایش بیان VEGF می‌شود (۲۱). از طرفی داویس و همکاران (۲۰۰۲) عدم تغییر در سطوح VEGF پلاسمایی را در دوچرخه‌سواران حرفه‌ای متعاقب فعالیت ورزشی گزارش کردند. دلیل تضاد با تحقیق داویس و همکاران (۲۰۰۲) را می‌توان در نوع آزمودنی و اندازه‌گیری VEGF پلاسمایی به جای VEGF سرمی خلاصه کرد. فاکتور رشدی آندوتلیال عروقی از مهم‌ترین فاکتورهایی است که تفاوت‌های فردی و وضعیت آمادگی بدنی در پاسخ آن به فعالیت ورزشی اثرگذار است و بیان آن در افراد مختلف متعاقب فعالیت ورزشی متفاوت است (۱). از طرفی مقادیر VEGF سرمی از مقادیر VEGF پلاسمایی بعد از فعالیت ورزشی بیشتر است؛ زیرا پلاکت‌ها مقادیر عمده‌ای VEGF را به داخل خون ترشح می‌کنند (۱، ۶، ۷). به‌طور کلی محقق معتقد است که بیان VEGF در بافت‌های مختلفی صورت می‌گیرد (۹) و پاسخ VEGF متعاقب فعالیت ورزشی با توجه به نوع محرک اعمال شده روی بدن یا به عبارتی شرایط تمرینی (۳)، وضعیت آمادگی آزمودنی‌ها (۱، ۲)، اندازه‌گیری VEGF پلاسمایی به جای VEGF سرمی (۲) متفاوت خواهد بود.

تحقیقات مختلف محرک‌های مختلفی را بیان کرده‌اند که موجب آنژیوژنز می‌شوند. مهم‌ترین

- 
- 1 . Leick, et al.
  - 2 . Davis, et al.
  - 3 . Prostaglandin cyclin1 $\alpha$
  - 4 . AMP-activated protein kinase

محرک‌های آنژیوژنیک هاپوکسی، نیروهای همودینامیکی<sup>۱</sup> و کشش چرخه‌ای هستند. شرایط هاپوکسی از دو طریق افزایش تجمع آدنوزین بافتی و متعاقباً فعال‌سازی گیرنده A<sub>۲</sub> و القای بیان ژنی فاکتور قابل القای هاپوکسی (HIF-1)<sup>۲</sup> بیان VEGF را افزایش می‌دهند (۶). نیروی همودینامیکی شیر استرس از اصطکاک جریان خون با دیواره عروقی حاصل می‌شود و موجب بیان VEGF و تحریک ترشح اتساع‌کننده‌های عروقی، به‌ویژه NO می‌شود که به نوبه خود بیان VEGF را افزایش می‌دهند (۷، ۱). افزایش اتساع‌پذیری عضله قلبی و برگشت به حالت اولیه نوعی کشش چرخه‌ای را به‌وجود می‌آورد که در طول زمان با پیشرفت فعالیت تکرار می‌شود. مشخص شده است که در چنین شرایطی بیان VEGF افزایش و میزان ترشح آن به عروق کرونری افزایش می‌یابد (۹).

در این تحقیق فعالیت وامانده‌ساز دو مؤلفه مدت زمان طولانی و رسیدن به واماندگی داشت. نشان داده شده است که ۳۰ دقیقه بعد از اجرای ورزشی رونویسی mRNA VEGF افزایش می‌یابد (۷)؛ بنابراین، بخشی از افزایش بیان پروتئین VEGF ممکن است به‌دلیل افزایش رونویسی ژن VEGF باشد. از طرفی، فعالیت وامانده‌ساز با تغییر دستگاه سوخت و سازی بدن وارد مسیر گلیکولیتیک غیرهوازی می‌شود و فشار اکسایشی فراوانی در بدن به‌وجود می‌آورد و ممکن است از طریق مسیری مستقل از هاپوکسی بیان ژنی VEGF را افزایش دهد (۲۱). از طرفی، آزمودنی‌های این تحقیق افراد فعال بودند. مشخص شده است که افراد فعال علاوه بر بالا بودن تعداد سلول‌های آندوتلیال عروقی VEGF بیشتری در سلول‌های آندوتلیال و میوسیت‌های عضلانی خود ذخیره دارند که با اجرای فعالیت وامانده‌ساز و افزایش غلظت متابولیت‌ها از جمله لاکتات و آدنوزین در این شرایط مقادیر زیادی VEGF را به داخل گردش خون رها می‌کنند (۶). از طرفی نشان داده شده است که دو ساعت بعد از اجرا، سطوح VEGF سرمی کاهش می‌یابد، هر چند که در گروه دارونما این کاهش به سطح معنی‌داری نرسید. به نظر می‌رسد که این کاهش به‌دلیل اتصال VEGF به گیرنده‌های خود یعنی VEGFR-۲، گلیکوپروتئین‌های پاران سولفات و سلول‌های مغز استخوان باشد. رادیکال‌های آزاد موجب آسیب ساختاری پروتئین‌ها می‌شود (۳، ۴). به نظر می‌رسد کاهش سطوح VEGF سرمی گروه مکمل به‌دلیل اتصال مقادیر زیادی VEGF به گیرنده‌های خود باشد که به واسطه مصرف مکمل ویتامین E کمتر دچار تخریب ساختاری شده باشند. به نظر می‌رسد عدم کاهش معنی‌دار VEGF گروه دارونما به‌دلیل کمتر در دسترس بودن VEGFR-۲ باشد؛ چون این احتمال وجود

---

1. Shear stress

2. Hypoxia inducible factor – 1 (HIF-1)

دارد که رادیکال‌های آزاد موجب تخریب گیرنده‌های پروتئینی شده باشد (۵) و اتصال کمتری بین VEGF و VEGFR-۲ صورت بگیرد.

نتایج تحقیق نشان داد بین سطوح VEGF سرمی در دو گروه مکمل و دارونما قبل و بعد از فعالیت وامانده‌ساز تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. همچنین، ارتباط معنی‌داری بین سطوح ویتامین E با VEGF سرمی پایه وجود ندارد. نتایج این مطالعه با نتایج تحقیقات چانگ و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۱۰)، شیباتا و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۰۸)، داقینی و همکاران (۲۰۰۷)، و دسون و همکاران (۲۰۰۲) ناهمسو است (۲۳، ۲۲، ۲۰، ۱۵). دلیل ناهمسو بودن یافته‌ها با نتایج چانگ و همکاران (۲۰۱۰) این است که تحقیق آن‌ها در سطح کشت سلولی و در سلول‌های توموری صورت گرفته و از دو آنتی‌اکسیدان ویتامین E و روتین<sup>۳</sup> استفاده کرده‌اند. مشخص شده است که روتین خود از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌هاست و در ترکیب با ویتامین E، از طریق بازداری بیان C-Jun باعث کاهش بیان VEGF در دو سطح mRNA و پروتئین می‌شود (۲۳). از طرفی، شیباتا و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیق خود از ایزومر توکوترینول ویتامین E روی سلول‌های آندوتلیال در محیط کشت سلولی استفاده کردند و کاهش آزاد شدن VEGF را گزارش کردند (۲۲). توکوترینول به دلیل داشتن زنجیره جانبی اشباع نشده سریع‌تر از توکوفرول وارد سلول آندوتلیال می‌شود و به نظر می‌رسد همین عامل مبین نقش برتر آنتی‌آکسیدان توکوترینول نسبت به توکوفرول، دست کم در کوتاه مدت باشد (۳). به عکس، داقینی و همکاران (۲۰۰۷) با ۱۲ هفته مکمل‌دهی دوزهای بسیار بالای ویتامین E (توکوفرول) - ۱۰۰ واحد بین‌المللی / کیلوگرم / روز - در خوک‌های سالم متوجه افزایش بیان VEGF در کورتیکال کلیه شدند (۲۰). همچنین، دسون و همکاران (۲۰۰۲) در تحقیق خود مصرف روزانه ۵۰ میلی‌گرم آلفا توکوفرول را برای دوره زمانی طولانی مدت (میانگین ۳/۷ سال) بررسی کردند و متوجه شدند بین سطوح ویتامین E با سطوح سرمی VEGF ارتباط معنی‌داری وجود دارد (۱۵)؛ بنابراین، طول زمان مکمل‌دهی در تحقیق نام‌برده بیشتر از مطالعه حاضر بود و ممکن است در نتیجه تأثیر گذاشته باشد. به‌طور کلی، ممکن است علت اصلی ناهمسو بودن نتایج تحقیقات، تفاوت در سطح بافتی (۲۳)، نوع ایزومر مصرفی ویتامین E (۲۲)، نوع آزمودنی (۲۰)، طول دوره مکمل‌دهی (۱۵) و دوز مصرفی ویتامین E (۳) باشد.

تحقیقات مختلف سازوکارهای متفاوتی را ارائه داده که از طریق آن‌ها ویتامین E آنتی‌اکسیدان بافتی

- 
1. Chuang, et al.
  2. Shibata, et al.
  3. Rutin

را بازداری می‌کند. از جمله می‌توان به بازداری فعال‌سازی Akt و eNOS<sup>۱</sup> (۳)، سرکوب فسفریله شدن VEGFR-۲ و بلوکه کردن پیام‌دهی VEGF (فسفولیپاز C<sup>۲</sup> و پروتئین کیناز C<sup>۳</sup>) (۱۰)، بازداری آنزیم HMG-COA ردوکتاز (۲۴) و سرکوب بیان HIF-1 $\alpha$  ناشی از ایزومر توکوترینول (۲۲) و تغییر در نفوذپذیری و سیالیت غشایی ناشی از ایزومر آلفا توکوفرول سوکسینات (۲۵) اشاره کرد که موجب کاهش آزاد شدن VEGF (رونویسی یا ترشح) می‌شوند. تراوش الکترون از زنجیره انتقال الکترون میتوکندری، آنزیم‌های گزانتین اکسیداز، NADPH اکسیداز، ماکروفاژها و فاگوسیت‌ها منابع عمده تولید فزاینده رادیکال‌های آزاد، به‌ویژه پراکسید هیدروژن در طی تمرین ورزشی هستند (۱۸). رادیکال‌های آزاد، به‌ویژه پراکسید هیدروژن در مقادیر زیاد موجب آسیب سلولی می‌شوند (۳-۵، ۹). با وجود این، نشان داده شده است که پراکسید هیدروژن در غلظت‌های میکرومولار در بیان VEGF مشارکت می‌کند (۵، ۹)؛ بنابراین، یکی از مهم‌ترین دلایلی که نتایج تحقیق معنی دار نشد مشارکت رادیکال‌های آزاد در مقادیر کم در بیان VEGF است. هرچند ویتامین E باعث برداشت رادیکال‌های آزاد تا سطوح نسبتاً کمتر خطرزا می‌شوند (۵، ۱۸، ۱۹)، به نظر نمی‌رسد باعث برداشت کامل رادیکال‌های آزاد تولید شده طی فعالیت وامانده‌ساز از محیط خارج سلولی شوند. همان‌طور که نشان داده شد سطوح VEGF سرمی گروه مکمل نسبت به گروه دارونما بلافاصله و دو ساعت بعد از فعالیت ورزشی وامانده‌ساز چند واحدی بیشتر بود، هرچند که به سطح معنی‌داری نرسید (نمودار ۲). مطالعات نشان داده‌اند که سطوح بالای رادیکال‌های آزاد باعث آسیب‌های ساختاری به DNA و اجزای تکثیری سلول هدف می‌شود (۴، ۵). محقق چنین فرض می‌کند که مصرف ویتامین E از طریق کاهش سطوح رادیکال‌های آزاد تا سطح کمتر خطرزا (۵، ۱۸، ۱۹) سطحی بهینه برای بیان و تولید VEGF فراهم می‌کند. در این زمینه لازم است اثرگذاری ویتامین E روی سطوح mRNA VEGF نیز بررسی شود که در این مطالعه به دلیل محدودیت‌های تحقیق انجام نشد. با توجه به اطلاعات موجود در این مطالعه، برای اولین بار نشان داده شد بین سطوح VEGF سرمی گروه مکمل و دارونما متعاقب دو هفته مصرف ویتامین E یا دارونما بعد از فعالیت وامانده‌ساز تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. همچنین، نشان داده شد بین سطوح ویتامین E با VEGF سرمی پایه ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. از تحقیق حاضر نمی‌توان به سازوکار مولکولی این عدم تفاوت و عدم ارتباط رسید و تحقیقات دیگری لازم است که در این زمینه

- 
- 1 . Endothelial constitutive nitric oxide synthase
  - 2 . Phospholipase C
  - 3 . Protein kinase C

انجام شود، ولی به نظر می‌رسد تولید فزاینده رادیکال آزاد طی فعالیت ورزشی و مشارکت رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های میکرومولار در بیان VEGF سرمی، دلایل عمده عدم تفاوت و عدم ارتباط باشند.

### منابع

1. Kraus, R.M., Stallings, H.W., Yeager, R.C., Gavin, T.P. (2004). Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. *J Appl Physiol*, 96: 1445-1450.
2. Davis, P.G., Wideman, L., Bloomer, R.J., Consitt, L.A. Weaver, R.A., You, T. (2002). Acute effect of prolonged cycle ergometer exercise on plasma vascular endothelial growth factor. *Med Sci Sports Exerc*, 34: 30-30.
3. Miyazawa, T., Shibata, A., Nakagawa, K., Tsuzuki, T. (2008). Anti-angiogenic functions of tocotrienol. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17: 253-256.
4. Dabidi, R.V., Moslehi N.E. (2009). The effect of short-term vitamin E supplementation on some indexes of sport performances and lipid per-oxidation in healthy men. *World J Sport Sci*, 2: 75-81.
5. Roy, S., Khanna, S., Sen, C.K. (2008). Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free Radic Biol Med*, 44:180-192.
6. Suhr, F., Brixius, K., de Marees, M., Bolck, B., Kleinoder, H., Achtzehn, S., Bloch, W., Mester, J. (2007). Effects of short-term vibration and hypoxia during high-intensity cycling exercise on circulating levels of angiogenic regulators in humans. *J Appl Physiol*, 103: 474-483.
7. Rullman, E., Rundqvist, H., Wagsater, D., Fischer, H., Eriksson, P., Sundberg, C.J., Jansson, E., Gustafsson, T. (2007). A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 102: 2346-2351.
8. Van Hinsbergh, V.W.M., Koolwijk, P. (2008). Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*, 78: 203-212.
9. Tang, K., Xia, F.C., Wagner, P.D., Breen, E.C. (2010). Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. *Respir Physiol Neurobiol*, 170: 16-22.
10. Miyazawa, T., Tsuzuki, T., Nakagawa, K., Igarashi, M. (2004). Antiangiogenic potency of vitamin E. *Ann NY Acad Sci*, 1031: 401-404.

11. Zachary, I., Glikli, G. (2001). Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*, 49: 568-581.
12. Zhao, W., Zhao, T., Chen, Y., Ahokas, R.A., Sun, Y. (2009). Reactive oxygen species promote angiogenesis in the infarcted rat heart. *Int J Exp Path*, 90: 621-629.
13. Jx, C., Zeng, H., Tuo, Q.H., Yu, H., Meyrick, B., Aschner, J.L. (2007). NADPH oxidase modulates myocardial Akt, ERK1/2 activation, and angiogenesis after hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292: 1664-1674.
14. Rodriguez, J.A., Nespereira, B., Perez-illarbe, M., Eguinoa, E., Paramo, J.A. (2005). Vitamins C and E prevent endothelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL. *Cardiovasc Res*, 65: 665-673.
15. Woodson, K., Triantos, S., Hartman, T., Taylor, P.R., Virtamo, J., Albanes, D. (2002). Long-term alpha-tocopherol supplementation is associated with lower serum vascular endothelial growth factor levels. *Anticancer Res*, 22: 375-378.
16. Dantz, D., Bewersdorf, J., Fruehwald-Schultes, B., Kern, W., Jelkmann, W., Born, J., Fehm, H.L., Peters, A. (2002), Vascular endothelial growth factor: a novel endocrine defensive response to hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 835-840
17. Meagher, E.A., Barry, O.P., Lawson, J.A., Rokach, J., FitzGerald, G.A. (2001). Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *Journal of American Medical Association*, 285: 1178-1182.
18. Lamprecht, M., Hofmann, P., Greilberger, J.F., Schwabegger, G. (2009). Increased lipid peroxidation in trained men after 2 weeks of antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 19: 385-399.
19. Keong, C.C., Singh, H.J., and Singh, R. (2006). Effects of palm vitamin E supplementation on exercise-induced oxidative stress and endurance performance in the heat. *J Sports Sci Med*, 5: 629-639.
20. Daghini, E., Zhu, X.Y., Versari, D., Bentley, M.D., Napoli, C., Lerman, A., Lerman, L.O. (2007). Antioxidant vitamins induce angiogenesis in the normal pig kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293: 371-381.
21. Leick, L., Hellsten, Y., Fentz, J., Lyngby, S.S., Wojtaszewski, J.F., Hidalgo, J., Pilegaard, H. (2009). PGC-1 $\alpha$  mediates exercise-induced skeletal muscle VEGF expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297: 92-103.
22. Shibata, A., Nakagawa, K., Sookwong, P., Tsuduki, T., Tomita, S., Shirakawa, H., Komai, M., Miyazawa, T. (2008). Tocotrienol inhibits secretion of angiogenic factors from human colorectal adenocarcinoma cells by suppressing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Nutr*, 138: 2136-2142.

23. Chuang, C.H., Huang, C.S., Hu, M.L. (2010). Vitamin E and rutin synergistically inhibit expression of vascular endothelial growth factor through down-regulation of binding activity of activator protein-1 in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Chem Biol Interact*, 183: 434-441.
24. Inokuchi, H., Hirokane, H., Tsuzuki, T., Nakagawa, K., Igarashi, M., Miyazawa, T. (2003). Anti-angiogenic activity of tocotrienol. *Biosci Biotechnol Biochem*, 7: 1623-1627.
25. Schindler, R. Mentlein, R. (2006). Flavonoids and Vitamin E Reduce the Release of the Angiogenic Peptide Vascular Endothelial Growth Factor from Human Tumor Cells. *J Nutr*, 136: 1477-1482.

