

Original Article

Interactive effect of 6 weeks of High-intensity interval training and quercetin supplementation on expression of some tumor angiogenesis markers in female mice with breast cancer

Zohreh Jalali¹, Fereshteh Shahidi^{2*}, Abbas Ali Gaeini³, Shaban Alizadeh⁴, Alireza Ramezani²

¹PhD Student in Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Tarbiat Dabir Shahid Rajaei University, Tehran, Iran

²Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Rajaei Teacher Training University, Tehran, Iran

³Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴Department of Hematology, Faculty of Paramedical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding author; E-mail: fereshteh_shahidi98@yahoo.com

Received: 3 Nov 2019 Accepted: 4 Feb 2019 First Published online: 17 April 2021

Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):142-151

Abstract

Background: About angiogenesis, metastasis of breast cancer and exercise, Many studies have been done in recent decades to better understand of regulatory mechanisms. The purpose of this study was to investigate the Interactive effect of high-intensity interval training (HIIT) and quercetin supplementation (Q) on the expression of key angiogenic factors in tumor tissue of mouse with breast cancer.

Methods: Twenty-four female Balb/C mouse were injected with estrogen receptor-dependent breast cancer cells MC4L2 and then divided into three groups of tumor (T), tumor + of high-intensity interval training (TH) and tumor + high-intensity interval training + quercetin (THQ). The TH and THQ groups ran the treadmill 3 days a week for 6 weeks and each session 1 hour. The THQ group received 110 mg / kg quercetin solution for 6 weeks, 3 days a week with training. After completion of the work, the mouse were sacrificed and their tumor tissue removed and frozen in liquid nitrogen And stored at -70 ° C. Expression of TIE-2 and VEGF-A genes was measured by REAL TIME-PCR. ΔCt , $\Delta\Delta Ct$, and Fold change were calculated with the relevant statistical tests at the significant level ($P < 0.05$) by GENEX software.

Results: The results showed that THQ interaction significantly decreased the expression of TIE-2 and VEGF-A genes in TH and THQ groups compared to T group. In addition, quercetin in THQ group significantly decreased TIE-2 and VEGF-A gene expression compared to TH group.

Conclusion: interaction of HIIT and Q supplementation are probably effective in inhibiting tumor angiogenesis.

Keywords: Breast Cancer, Vascular Endothelial Growth Factor, Quercetin, TIE-2 Receptor

How to cite this article: Jalali Z, Shahidi F, Gaeini AA, Alizadeh Sh, Ramezani A. [Interactive effect of 6 weeks of High-intensity interval training and quercetin supplementation on expression of some tumor angiogenesis markers in female mice with breast cancer]. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):142-151. Persian.

مقاله پژوهشی

تأثیر تعاملی ۶ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف مکمل کوئرتستین بر بیان برخی شاخص‌های آنژیوژنزی تومور در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان

زهره جلالی^۱، فرشته شهیدی^۲، عباسعلی گائینی^۳، شعبان علیزاده^۴، علیرضا رمضانی^۵

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران
^۲ گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران
^۳ گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
^۴ گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۵ نویسنده مسؤل؛ ایمیل: fereshteh_shahidi98@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۸/۸/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۵ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۱/۲۸
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۱):۱۴۲-۱۵۱

چکیده

زمینه: درباره آنژیوژنز، متاستاز سرطان پستان و فعالیت ورزشی، پژوهش‌های فراوانی در چند دهه اخیر انجام شده است تا سازوکارهای تنظیمی آن بهتر معلوم شود. هدف این پژوهش، بررسی تأثیر تعاملی تمرین تناوبی خیلی شدید (HIIT) و مکمل کوئرتستین (Q) بر بیان عوامل کلیدی آنژیوژنزی در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود.

روش کار: به ۲۴ سر موش بلب سی ماده، سلول‌های سرطانی وابسته به گیرنده استروژن MC4L2، تزریق و به سه گروه تومور (T)، تومور+ تمرین تناوبی خیلی شدید (TH) و تومور+ تمرین تناوبی خیلی شدید+ کوئرتستین (THQ) تقسیم شدند. گروه TH و گروه THQ، ۳ روز در هفته به مدت ۶ هفته و هر جلسه ۱ ساعت، روی تردمیل دویدند. به گروه THQ، به جز تمرین، ۶ هفته، هفته‌ای ۳ روز، مقدار ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم، محلول کوئرتستین تزریق شد. پس از پایان کار، موش‌ها کشته شدند، بافت تومور برداشته و در نیتروژن مایع فریز و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بیان ژن‌های VEGF-A و TIE-2 به روش Real Time-PCR سنجیده شد. $\Delta\Delta Ct$ ، $\Delta\Delta Ct$ با $Fold\ change$ با آزمون‌های آماری مربوط در سطح معناداری ($p < 0.05$) با نرم افزار GENEX محاسبه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تعامل THQ باعث کاهش معنادار بیان ژن‌های TIE-2 و VEGF-A در گروه TH و THQ در مقایسه با گروه T شده است. بعلاوه، مصرف کوئرتستین در گروه THQ باعث کاهش معنادار بیان ژن‌های TIE-2 و VEGF-A در مقایسه با گروه TH شد.
نتیجه‌گیری: تعامل HIIT و مصرف مکمل Q احتمالاً در مهار آنژیوژنز تومور موثر است.

کلید واژه‌ها: سرطان پستان، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، کوئرتستین، گیرنده TIE-2.

نحوه استناد به این مقاله: جلالی ز، شهیدی ف، گائینی ع، علیزاده ش، ا رمضانی غ. ر. تأثیر تعاملی ۶ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف مکمل کوئرتستین بر بیان برخی شاخص‌های آنژیوژنزی بافت تومور در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۱):۱۴۲-۱۵۱

حقوق تالیف برای مولفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌تو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

پژوهش‌های جدید انجمن سرطان آمریکا نشان می‌دهد تقریباً یک هشتم زنان با خطر ابتلا به سرطان پستان در عمر خود مواجه‌اند (۱). با توجه به نقش چشمگیر آنژیوزنز در رشد و متاستاز سرطان، پژوهش‌های فراوانی، سازوکارهای تنظیمی و مفاهیم بالینی را در مدیریت بیماران سرطانی در چند دهه اخیر مطالعه کرده‌اند و استفاده از داروهای ضد آنژیوزنز و افزایش عوامل ضد آنژیوزنی با استفاده از روش‌های گوناگون از جمله فعالیت ورزشی، مورد توجه زیادی هستند (۲). آنژیوزنز، فرآیندی است که در آن، رگ‌های خونی جدید از عروق موجود جوانه می‌زنند. آنژیوزنز، فرآیند چند مرحله‌ای پیچیده‌ای است که بر اثر تعادل دقیق بین عوامل فیزیولوژیکی القاکننده و مهارکننده هموستاز رخ می‌دهد (۳). تکثیر تومور، رگ‌زایی را از راه تغییر در تعادل عوامل القاکننده و مهارکننده فعال می‌کند و از این طریق باعث افزایش اکسیژن و مواد مغذی مورد نیاز رشد تومور می‌شود (۴). این مفهوم که فرآیند رشد تومور به شبکه عروقی گسترده‌ای نیاز دارد، ریشه در مشاهدات دانشمند برجسته‌ای مانند ویرشو و همکاران، دارد که بیش از ۱۰۰ سال پیش، آن را متذکر شدند (۵). در سال ۱۹۷۱، فولکمن و همکاران، با شناسایی و مهار عوامل کلیدی موثر در آنژیوزنز تومور و راهبرد گرسنگی تومور و مرگ آن، در جهت درمان بیماری سرطان اقدام کردند (۶). پس از آن، گولینو و همکاران، در سال ۱۹۷۶ نشان دادند که استفاده از راهبرد ضد رگ‌زایی در جلوگیری از پیشرفت سرطان موثر است (۷). هفده سال بعد از ارایه مقاله فولکمن و معرفی راهبرد ضد آنژیوزنز در درمان سرطان، عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF-A) به عنوان نقطه عطفی در درک مکانیسم رگ‌زایی معرفی شد (۸). VEGF-A، نخستین عامل رشدی است که معلوم شد آثار ویژه‌ای بر سلول‌های اندوتلیالی دارد. VEGF-A را به جز سلول‌های اندوتلیالی، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های عضلانی صاف نیز تولید می‌کنند (۹). تنظیم مقادیر VEGF ناشی از هیپوکسی نیروی محرک اصلی آنژیوزنز در مسیر پیشرفت تومور است (۱۰). در شیمی درمانی سرطان، تلاش‌های زیادی برای مهار فرآیند آنژیوزنز تومور انجام شده است و علی‌رغم برخی نتایج قابل توجه، هنوز انتظارات برآورده نشده است. در شروع آنژیوزنز، VEGF باعث افزایش نفوذپذیری عروق می‌شود. افزایش نفوذپذیری، خروج پروتئین‌های پلاسمایی و ورود آن‌ها به فضای میان‌بافتی را به دنبال دارد تا امکان مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیالی میسر و موجب آنژیوزنز شود. فعال شدن کامل آنژیوزنز به پیام‌رسانی مناسب گیرنده TIE-2 نیاز دارد (۱۱). TIE-2 -گیرنده تیروزین کینازی ویژه اندوتلیال - به‌طور گسترده‌ای در اندوتلیوم عروقی بیان می‌شود و یکپارچگی و پایداری اندوتلیالی را افزایش می‌دهد (۱۲). دو لیگاند ANGPT-1 و ANGPT-2 آن را تنظیم

می‌کنند. ANGPT-1، با فعال کردن گیرنده TIE-2 موجب استحکام و پایداری اتصالات بین سلولی و میان سلول‌های اندوتلیالی با غشای پایه و سلول‌های حمایت‌کننده عروق مانند پریوسیت‌ها و سلول‌های عضلانی صاف عروق می‌شود. هر چقدر مقادیر TIE-2 زیاده‌تر باشد، پیوند ANGPT-1 به آن بیشتر و در نتیجه پایداری عروق زیاده‌تر می‌شود و آنژیوزنز کمتر اتفاق می‌افتد. همچنین، در عروقی که مقادیر پیوند ANGPT-1 به TIE-2 زیاد است، به پیام‌رسانی VEGF به نسبت مقاوم‌ترند. از سوی دیگر، ANGPT-2 برای پیوند به TIE-2 با ANGPT-1 رقابت می‌کند و پیوند نشدن سلول‌های اندوتلیالی به غشای پایه و پریوسیت‌ها و عروق اولیه را رقم می‌زند تا پاسخ به VEGF و پیشرفت آنژیوزنز به خوبی ممکن شود (۱۱).

مطالعات جدید نشان می‌دهد فعالیت ورزشی با کاهش تراکم عروق تومور و بازسازی عروق تومور از راه تغییر در مسیر TIE-2 و VEGF-A می‌تواند باعث درمان شود. با وجود این، سازوکارهای مسئول آثار فعالیت ورزشی بر مهار پیشرفت تومور، ناشناخته است. تسای و همکاران (۱۳) تاثیر ۴ هفته/۵ روز در هفته تمرین هوازی تداومی و ۴ هفته/۵ روز در هفته تمرین هوازی ایترنال را بر سطوح VEGF و حجم تومور کبد و ریه را در موش‌های مبتلا به سرطان بررسی کردند. آن‌ها افزایش قابل توجهی در سطوح VEGF در هر دو گروه تمرین ورزشی هوازی تداومی و ایترنال نسبت به گروه کنترل مشاهده کردند. اگرچه این افزایش نسبت به گروه کنترل معنادار نبود. آن‌ها همچنین گزارش کردند تمرین ورزشی تغییری در حجم تومور موش‌های مبتلا به سرطان ایجاد نکرده است. فائستینو-روچا و همکاران، تاثیر ۳۵ هفته تمرین استقامتی دویدن روی تردمیل را بر سطح VEGF-A در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بررسی کردند (۱۴). آن‌ها گزارش نمودند که فعالیت ورزشی طولانی مدت باعث افزایش بیان VEGF-A و افزایش عروق تومور می‌گردد. شلمزاری و همکاران، نیز تاثیر ۶ هفته تمرین استقامتی تداومی را در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بررسی کردند (۱۵). آن‌ها همچنین نقش پیشگیرانه و درمانی تمرین استقامتی بر سرطان پستان را با تعیین تاثیر تمرین استقامتی بر حجم تومور و سطح VEGF بررسی نمودند. در این مطالعه پس از آشناسازی با محیط، دو گروه از موش‌ها به مدت ۸ هفته تمرین استقامتی تداومی را انجام دادند و سپس سلول‌های سرطانی وابسته به استروژن به همه موش‌ها تزریق گردید. پس از آن یک گروه از موش‌های تمرین کرده و یک گروه از موش‌های تمرین نکرده به مدت ۶ هفته، ۵ روز در هفته تمرینات استقامتی را انجام دادند. آن‌ها گزارش کردند میزان رشد تومور و مقدار VEGF در گروه‌هایی که پس از سرطانی شدن تمرین استقامتی انجام می‌دادند نسبت به دو گروهی که فعالیت نمی‌کردند کمتر بود. در پژوهشی دیگر خلیق‌فرد و همکاران، تاثیر ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی را بر

هفته اول برای سازگار شدن با محیط جدید در گروه‌های ۵ تایی در قفسه‌های پلکسی‌گلاس با درب توری با ابعاد $25 \times 27 \times 33$ سانتی‌متر در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات از غذای پلت ساخت شرکت بهپرور، که آزادانه در دسترس آن‌ها بود، استفاده می‌کردند. آب مورد نیاز حیوانات نیز آزادانه در دسترس آن‌ها بود. پس از یک هفته آشنایی با محیط، سلول‌های سرطانی آدنوکارسینوما گیرنده استروژن مثبت (+ER) MC4L2 به روش زیر جلدی و در پهلوی راست موش‌ها تزریق شد. پروتکل فعالیت ورزشی و مصرف مکمل کوئرستین ۱۰ روز پس از تزریق سلول‌های سرطانی آغاز شد.

کشت سلول و نحوه ایجاد تومور

ابتدا در آزمایشگاه کشت سلول دانشکده پیراپزشکی دانشگاه تهران، سلول‌های MC4L2، در فلاسک‌های سایز T75 حاوی محیط کشت DMEM/F-12، FBS ۱۰ درصد و پنی‌سیلین 100 ug/ml کشت داده شدند و پس از تکثیر، با استفاده از تریپان بلو و لام هماسیتومتر شمرده شدند (۱۵). پس از شمارش تعداد سلول‌ها، به هر موش یک میلیون سلول به روش زیر جلدی و متمرکز، در پهلوی راست آن‌ها تزریق شد. قبل از تزریق سلول‌های سرطانی، موش‌ها با تزریق زیر جلدی ترکیب زایلانین و کتامین بیهوش شدند.

پروتکل تمرین تناوبی خیلی شدید

با هدف سازگار شدن موش‌های گروه HT و گروه THQ، با فعالیت ورزشی، آن‌ها ابتدا ۳ روز و هر روز به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰-۱۵ متر در دقیقه روی تردمیل دویدند. سپس، آزمون ظرفیت ورزشی با هدف دستیابی به حداکثر سرعت اجرای فعالیت ورزشی انجام شد. موش‌ها با سرعت ۸ متر در دقیقه روی تردمیل شروع به دویدن کردند و هر ۲ دقیقه، ۱ متر در دقیقه تا وقوع درماندگی، سرعت افزایش یافت. درماندگی، به عنوان سرعتی که در آن، موش‌ها به جای دویدن بر روی تردمیل، در قسمت شوک الکتریکی تردمیل بیش از ۱۰ ثانیه توقف کنند، تعریف می‌شود. هنگام وقوع درماندگی، زمان و سرعت ثبت شد. پروتکل HIIT ۳ روز در هفته به مدت ۶ هفته و هر جلسه یک ساعت دویدن روی تردمیل اجرا شد. هر جلسه فعالیت ورزشی با ۱۰٪ حداکثر سرعت به دست آمده در آزمون تعیین ظرفیت ورزشی به مدت ۲ دقیقه شروع شد و پس از هر مرحله از دویدن، مرحله استراحت ۲ دقیقه‌ای اجرا شد. در هفته اول، موش‌ها ابتدا ۲ دقیقه با حداکثر سرعت دویدند و پس از ۲ دقیقه استراحت، با سرعت ۱۵ متر در دقیقه در تناوب‌های ۲ دقیقه فعالیت ورزشی و ۲ دقیقه استراحت، به مدت ۶۰ دقیقه روی تردمیل دویدند. سرعت اجرای تمرین هر هفته ۱ متر در دقیقه افزایش می‌یافت (۱۸).

تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی

بیان VEGF در موش‌های مبتلا به سرطان پستان، بررسی کردند و گزارش نمودند که میزان بیان VEGF پس از تمرین تناوبی به طور معناداری در بافت تومور کاهش یافت (۱۶). با این که مطالعات بالینی آثار فعالیت ورزشی بر بیماران مبتلا به سرطان پستان را بررسی کرده‌اند تا مسیرهای درگیر را شناسایی کنند، اما تنوع مراحل تومور، نوع و شدت فعالیت ورزشی و ویژگی‌های بیماران، از جمله عوامل مداخله‌گری هستند که شناسایی سازوکارهای بیولوژیکی و مولکولی آثار فعالیت ورزشی بر پیشرفت تومور را با ابهام مواجه کرده‌اند. به علاوه، بیشتر پژوهش‌ها تاثیر فعالیت‌های ورزشی بر بیان عوامل ضد آنژیوژنزی TIE-2 را در آزمودنی‌های سالم بررسی کرده‌اند. از سویی، یکی دیگر از راه‌کارهای اصلی کاهش آنژیوژن در بافت تومور، استفاده از مواد غذایی و مکمل‌های ویژه‌ای است که در این بین مکمل پلی‌فنولی کوئرستین (Quercetin) مورد توجه پژوهشگران است، زیرا خواص ضد اکسایشی و فعالیت ضد توموری دارد. کوئرستین در میوه‌ها و سبزیجات فراوان وجود دارد و یکی از رایج‌ترین فلاونوئیدهای غذایی در رژیم‌های غذایی غربی است. پیاز از جمله غذاهایی است که مقدار زیادی از این فلاونوئید را دارد (۰/۲۸-۰/۰۳ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پیاز سفید و زرد و تقریباً ۱/۳۱ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پیاز قرمز). پژوهش‌ها نشان داده‌اند کوئرستین فعالیت‌های بیولوژیکی زیادی، از جمله ویژگی‌های ضد اکسایشی، ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد دیابتی و ضد میکروبی اعمال می‌کند. پژوهش‌ها خواص ضد سرطانی کوئرستین را، به دلیل توانایی آن در کاهش تکثیر سلول‌های توموری، القا آپوپتوز، توقف چرخه سلولی و مهار آنژیوژن، یادآوری کرده‌اند (۱۷). پژوهش‌های اندکی اثر کوئرستین بر بیان VEGF-A را بررسی کرده‌اند و پژوهشی که تاثیر تعاملی مصرف کوئرستین و فعالیت ورزشی HIIT را بر بیان VEGF-A در سرطان پستان بررسی کرده باشد، یافت نشد. همچنین پژوهشی که اثر کوئرستین بر TIE-2 را به تنهایی و یا همراه با فعالیت ورزشی بررسی کرده باشد، یافت نشد.

روش کار

نوع پژوهش حاضر و روش آن تجربی است. در این پژوهش، همه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. برای انجام پژوهش، ۲۴ سر موش ماده بальب سی (۳ تا ۵ هفته‌ای با میانگین وزن 2 ± 18) از مرکز انستیتو پاستور تهیه شد و پس از انتقال به محیط آزمایشگاه حیوانات دانشکده علوم ورزشی دانشگاه شهید رجایی و آشنایی با محیط جدید به طور تصادفی به ۳ گروه تومور (Tumor=T) (ایجاد تومور سرطان سینه)، گروه تومور+ تمرین تناوبی خیلی شدید (Tumor + HIIT = TH) و گروه تومور+ تمرین تناوبی خیلی شدید+ مکمل کوئرستین (Tumor+HIIT+Quercetin = THQ) تقسیم شدند. موش‌ها، در

گروه تومور محاسبه شد. (نکته: $\Delta\Delta Ct$ گروه تومور صفر می‌شود زیرا گروه کنترل است و با تفریق ΔCt گروه تومور از خودش که گروه کنترل است، صفر حاصل می‌شود). سپس Fold Change (به مفهوم چند برابر بیان شدن ژن گروه تجربی نسبت به گروه کنترل) از فرمول ۲ به توان $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد (جدول ۲) و (نمودار ۱ (الف، ب، پ)). از آنجایی که توزیع داده‌ها طبیعی بود، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد (مقدار p آنالیز واریانس یک طرفه در جدول ۲، نتایج آزمون توکی در جدول ۳). همه مراحل تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار جنکس (GENEX) نسخه ۶/۱ (نرم‌افزار اختصاصی تجزیه و تحلیل داده‌های Real Time-PCR) انجام شد. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

یافته‌های پژوهش نشان می‌دهد پروتکل HIIT باعث کاهش معنادار بیان TIE-2 و VEGF-A در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان در گروه TH نسبت به گروه T شده است. همچنین، پروتکل HIIT همراه کوئرستین باعث کاهش معنادار بیان TIE-2 و VEGF-A در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان در گروه THQ در مقایسه با گروه T و گروه TH شد (جدول ۳). بیان TIE-2 و VEGF-A در گروه TH در مقایسه با گروه T به ترتیب ۳/۰۶ و ۴/۷۲ برابر کاهش یافت (جدول ۲، نمودار ۱ (الف)) به علاوه، بیان TIE-2 و VEGF-A در گروه THQ در مقایسه با گروه T، به ترتیب ۸/۷۸ و ۱۳/۸۴ برابر کاهش (جدول ۲، نمودار ۱ (ب)) و در مقایسه با گروه TH به ترتیب ۲/۸۶ و ۲/۹۲ برابر کاهش داشته است (جدول ۲، نمودار ۱ (پ)).

همه گروه‌ها در شرایط یکسان و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق مکمل کوئرستین و فعالیت ورزشی تناوبی خیلی شدید) با کتامین و زایلوزین بیهوش شدند و بافت تومور آن‌ها برداشته شد و در داخل پلیت حاوی PBS استریل قرار گرفت. عروق خونی و بافت چربی اطراف تومور و قسمت نکروز شده مرکزی تومور حذف شدند و تومور با قیچی به قطعات کوچکتر تقسیم شد و در میکرو تیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز و در دمای -۷۰ نگهداری شد. در آزمایشگاه دانشکده پیراپزشکی دانشگاه تهران، تقریباً ۱۰۰ میلی‌گرم بافت تومور به همراه یک سی‌سی ترايزول در لوله هموزن دستی ریخته شد و بافت هموزن شد و مایع رویی برای استخراج RNA به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل شد. با توجه به پروتکل ترايزول ساخت شرکت لایف تکنولوژی کشور آمریکا، مراحل استخراج RNA انجام شد و برای رونویسی RNA به cDNA، طبق دستور العمل کیت سنتز cDNA، Regent RT PrimerScript شرکت تاکارا کشور ژاپن، میزان بیان عوامل مورد نظر سنجیده شد. مراحل Real Time-PCR بر اساس دستورالعمل SYBER-Green شرکت تاکارا کشور ژاپن، انجام شد. از ژن ACTB به عنوان ژن کنترل استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ ارائه شده است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

با هدف کمی‌سازی مقادیر بیان ژن، ΔCt ژن مورد نظر در هر نمونه از تفریق CT ژن مربوطه و CT ژن ACT-b (ژن رفرنس) محاسبه شد. سپس $\Delta\Delta Ct$ از تفریق ΔCt ‌های به دست آمده و ΔCt

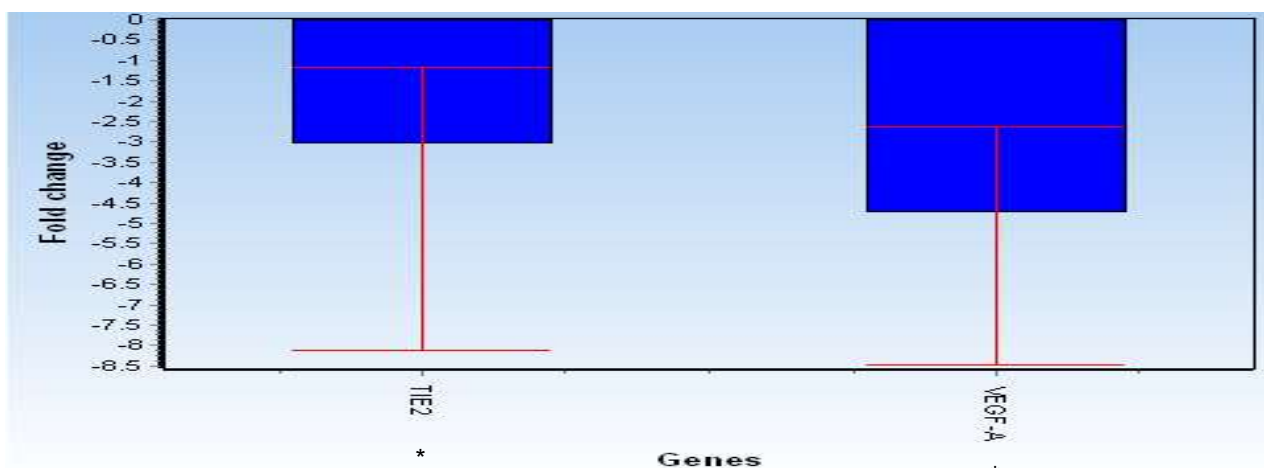
جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن‌ها

نام ژن	آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی
TIE-2	CACCAAGATCCACTGGAGGTTTC	GCAGGTAGGAAGGATGCTTGTG
VEGF-A	GTTCGGGAACCCAGACCTCTC	CCAAAGTGCTCCTCGAAGAGTC
ACT-b	CTGTGAGTCGCGTCCAC	TCATCCATGGCGAACTGGTG

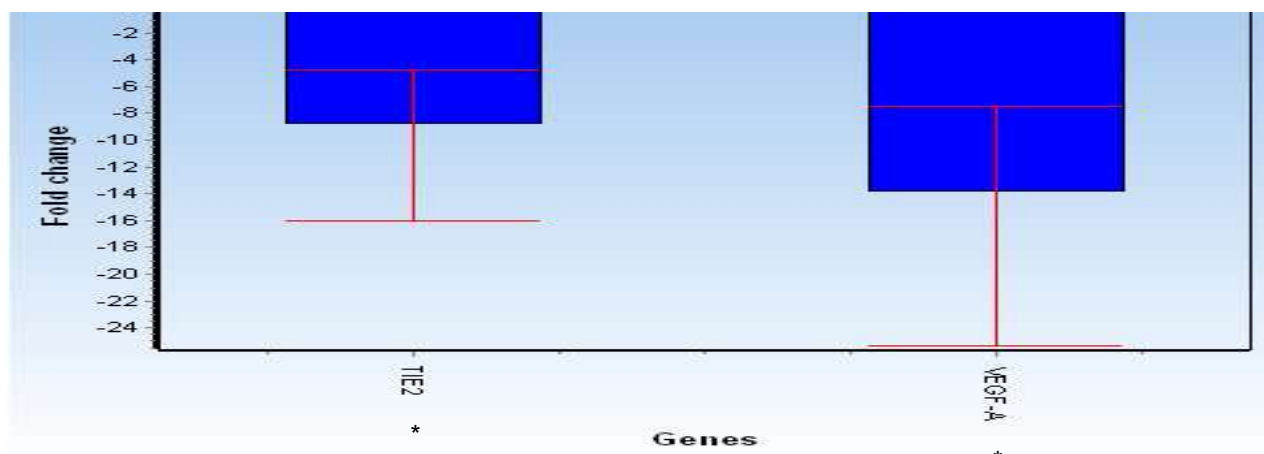
جدول ۲: نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+کوئرستین (TQ) و گروه تومور+ HIIT + کوئرستین (THQ) در مقایسه با گروه تومور (T) (Fold Change)، مقدار p و نتیجه تغییرات متغیرهای پژوهش

نام ژن‌ها	VEGF-A	TIE-2
Fold Change گروه تومور+ HIIT نسبت به گروه تومور	-۴/۷۲	-۳/۰۶
Fold Change گروه تومور+ HIIT+ کوئرستین نسبت به گروه تومور	-۱۳/۸۴	-۸/۷۸
Fold Change گروه تومور+ HIIT+ کوئرستین نسبت به گروه تومور+ HIIT	-۲/۹۲	-۲/۸۶
p	*۰/۰۰	*۰/۰۰
نتیجه	اختلاف معنادار	اختلاف معنادار

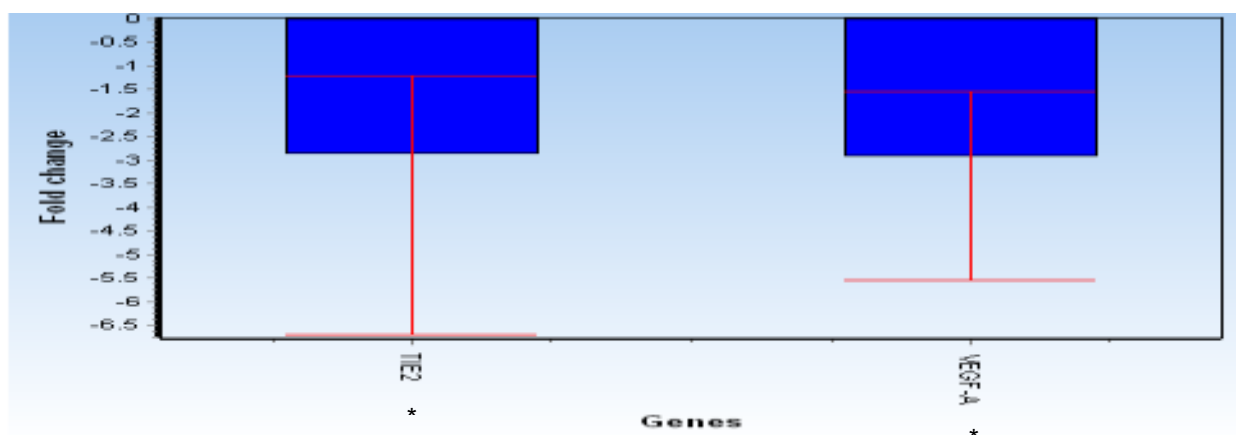
* نشانگر معنادار بودن اختلاف است. (p<۰/۰۵)



نمودار ۱ (الف): نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+HIIT (TH) در مقایسه با گروه تومور (T) (Fold Change) (T) * نشانگر معنادار بودن اختلاف است. ($p < 0.05$)



نمودار ۱ (ب): نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+HIIT + کوئرستین (THQ) در مقایسه با گروه تومور (T) (Fold Change) (T) * نشانگر معنادار بودن اختلاف است. ($p > 0.05$)



نمودار ۱ (پ): نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+HIIT + کوئرستین (THQ) در مقایسه با گروه تومور+HIIT (TH) (Fold Change) (T) * نشانگر معنادار بودن اختلاف است. ($p < 0.05$)

جدول ۳. آزمون توکی ویژه TIE-2 و VEGF-A در گروه های مختلف پژوهش.

مقدار p	میانگین اختلاف (CtΔΔ)	گروه‌ها
		آزمون توکی ویژه TIE-2
		تومور (T)
*۰/۰۲	۱/۶۱	تومور+HIIT (TH)
*۰/۰۰	۳/۱۳	تومور+HIIT+کوئرستین (THQ)
		آزمون توکی ویژه TIE-2
		تومور+HIIT (TH)
*0/03	1/51	تومور+HIIT+کوئرستین (THQ)
		آزمون توکی ویژه VEGF-A
		تومور (T)
*0/00	۲/۲۴	تومور+HIIT (TH)
*0/00	۳/۷۹	تومور+HIIT+کوئرستین (THQ)
		آزمون توکی ویژه VEGF-A
		تومور+HIIT (TH)
*0/00	1/55	تومور+HIIT+کوئرستین (THQ)

*نشانهگر معنادار بودن اختلاف است. (p<۰/۰۵)

بحث

در چند دهه گذشته، پژوهش در زمینه نقش فعالیت بدنی و ورزش در پیشگیری از ابتلا به سرطان و پیشرفت بیماری، موضوع مورد توجه بسیاری از پژوهشگران بوده است. پژوهش‌ها در زمینه فعالیت ورزشی نشان داده‌اند که ترکیب هایپوکسی با تمرین ورزشی منجر به تغییراتی در بیان VEGF می‌شود. از آنجا که VEGF به عنوان مهمترین عامل موثر بر آنژیوژنز است و به طور مستقیم با متاستاز و رشد تومور مرتبط است، می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در سرکوب تومور در نظر گرفته شود. در این رابطه، پژوهش‌ها نشان دادند که با افزایش متاستاز و رشد بیشتر تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان، مقادیر VEGF نیز افزایش می‌یابد (۱۹). اکثر پژوهش‌ها نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی به طور قابل توجهی باعث مهار رشد تومور و انتشار متاستاتیک در مدل‌های سرطانی انسان و موش می‌شود. در این رابطه، بیشتر پژوهش‌ها تاثیر تمرینات استقامتی بر تومور و پژوهش‌های اندکی تاثیر تمرین تناوبی را بر تومور بررسی کرده‌اند. نتایج پژوهش حاضر با پژوهش خلیق‌فرد و شلمزاری همسو و با نتایج پژوهش‌های تسای، فاستینو روچا، ناهمسو بود که ممکن است به دلیل متفاوت بودن نوع تمرین و شدت آن باشد. از طرفی لیوید و همکاران، افزایش بیان TIE-2 mRNA را در طول تمرین ورزشی در آزمودنی‌های سالم مشاهده کردند و گزارش کردند که بیان

TIE-2 mRNA پس از ۸ روز تمرین دویدن بر روی تردمیل، به اوج خود رسید (۲۰). اما هیچ پژوهشی که تاثیر تمرین ورزشی را بر بیان TIE-2 در بیماران سرطانی بررسی کرده باشد یافت نشد. عروق تومور بسیار غیرطبیعی هستند و از نظر عملکردی و مورفولوژیکی تفاوت زیادی با عروق طبیعی دارند. اندوتلیوم عروق تومور در معرض هیپوکسی، PH کم، افزایش تولید عوامل پروآنژیوژنیک مانند VEGF توسط سلول‌های تومور، جریان خون ضعیف و فشار برشی اندک هستند. قرار گرفتن در معرض این عوامل منجر به تشکیل الگوی عروقی غیرطبیعی می‌شود. تومور دارای یک محیط بسیار ناهمگن با جریان خون و فشار برشی متغیر است. فشار برشی در عروق تومور نسبت به عروق بافت سالم کمتر است. از طرفی هم فشار برشی زیاد و پرخونی و خلاف آن، جریان خون و فشار برشی اندک (مانند عروق تومور) از طریق یک رابطه سینرژیک میان عوامل مکانیکی و بیوشیمیایی، منجر به تحریک آنژیوژنز می‌شود. بنابراین، هر دو انتهای مخالف دامنه فشار برشی، آنژیوژنز را فعال می‌کنند. فعال‌سازی کانال‌های یونی، کانال‌های کاتیونی و کانال‌های حساس به کشش در سلول‌های اندوتلیال بلافاصله پس از قرار گرفتن در معرض فشار برشی مشاهده شده است. همچنین افزایش طولانی مدت Ca^{2+} درون سلولی و افزایش قابل توجه تولید نیتریک اکساید مشخص شده است. این عوامل می‌توانند نقش مهمی در پیام‌دهی سلول‌های تحت فشار برشی ایفا کنند و باعث ایجاد واکنش شوند، اما

MAPK/ ERK1/2 و WNT/ -catenin ، Akt / mTOR مسیره‌های ضد سرطانی خود را بر روی سلول‌های سرطانی و تومورها اعمال می‌کند. کوئرستین با کاهش کاتینین و HIF-1، فعال سازی کاسپاز ۳ و مهار فسفوریلاسیون mTOR، AKT و ERK باعث از بین رفتن قابلیت زنده ماندن سلول‌های سرطانی می‌شود و منجر به آپوپتوز و اتوفازی در آن‌ها می‌شود. کوئرستین همچنین با کاهش ترشح VEGF و سطح MMP از آنژیوژنز و متاستاز جلوگیری کرده و با تخریب مسیره‌های PI3K/ Akt/ mTOR، آنزیم‌های کلیدی گلیکولیز و جذب گلوکز را مهار می‌کند. کوئرستین همچنین فعالیت میتوکندری‌ها را در سلول‌های سرطانی کاهش می‌دهد و منجر به کاهش انرژی زیستی و تحریک آپوپتوز درونی می‌شود. اگرچه، در حال حاضر، هیچ شواهد بالینی مبنی بر اینکه کوئرستین می‌تواند مانع از سرطان در انسان شود، وجود ندارد، اما پژوهش‌های زیادی کوئرستین را به عنوان یک مکمل غذایی (در دوزهای پایین) برای پیشگیری از سرطان و بهبود آن دانسته است (۱۷). در این رابطه داکسیان ژائو و همکاران، فعالیت‌های ضد آنژیوژنیک کوئرستین را در جنین گورخرماهی و در سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف انسانی (HUVECs) (human umbilical vein endothelial cells) بررسی کردند. نتایج نشان داد که کوئرستین، تشکیل عروق ایترسگمستال (intersegmental)، آئورت پشتی و ورید اصلی خلفی جنین گورخرماهی تراریخته را مختل کرد. همچنین کوئرستین حیات سلول را در HUVECs مختل و بیان گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ۲ و تشکیل عروق جدید را مهار کرد. آن‌ها گزارش نمودند که کوئرستین دارای فعالیت ضد آنژیوژنیک قوی است و ممکن است به عنوان یک عامل ضد سرطان برای تحقیقات آینده، گزینه مناسبی باشد (۲۳). همچنین لینگکوان و همکاران، نیز تاثیر مهاری کوئرستین بر آنژیوژنز در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان را بررسی کردند و گزارش نمودند که مصرف کوئرستین به میزان ۳ درصد وعده غذایی موش‌ها به مدت ۲۸ هفته، باعث کاهش بیان فاکتورهای آنژیوژنزی مانند فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (bFGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و کاهش تولید پروتئین H-ras و مهار آنژیوژنز در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌گردد (۲۴). نتایج پژوهش حاضر با این دو پژوهش همسو بود. اگرچه هیچ پژوهشی که تاثیر تعاملی تمرین ورزشی و کوئرستین را بر VEGF-A و TIE-2 در بیماران سرطانی، بررسی کرده باشد، یافت نشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش، HIIT و HIIT + مصرف مکمل Q با کاهش بیان ژن‌های آنژیوژنزی TIE-2 و VEGF-A، می‌تواند روند آنژیوژنز بافت تومور را مختل و رشد تومور سرطان پستان را

مکانیسمی که منجر به فعالسازی این کانال‌ها توسط فشار برشی می‌شود، ناشناخته است. اخیراً مطالعه‌ای، مسیر eNOS-NO را به عنوان مسیری مهم برای حفظ ثبات فیزیولوژیکی مورد توجه قرار داد. مشخص شده است که این مسیر در تحریک آنژیوژنز مانند تیغه دو لبه عمل می‌کند بدین معنی که مسیر eNOS-NO در هر دو محیط فشار برشی زیاد و کم، سلول‌های اندوتلیال را به حالت آنژیوژنیک فعال می‌برد، در حالی که در فشار برشی فیزیولوژیکی، حالت ثابت عروق حفظ می‌شود. به نظر می‌رسد این امر بوسیله افزایش فشار برشی در فعالیت، رونویسی و پایداری eNOS رخ می‌دهد (۲۱). بنابراین از آنجایی که فشار برشی عروق تومور کمتر از فشار برشی عروق بافت سالم است و تمرین تناوبی باعث افزایش فشار برشی در عروق می‌گردد، ممکن است دلیل کاهش بیان TIE-2 و VEGF-A در پژوهش حاضر این باشد که تمرین تناوبی شدید، با بالا بردن فشار برشی در عروق تومور، باعث طبیعی شدن سطح فشار برشی در عروق تومور گردیده و با کاهش هیپوکسی، اسیدوز و نرمال سازی فعالیت کانال‌های یونی، کانال‌های کاتیونی و کانال‌های حساس به کشش در سلول‌های اندوتلیال و مسیر eNOS-NO، باعث کاهش سطح VEGF-A و TIE-2، به عنوان دو عامل کلیدی تحریک کننده آنژیوژنز شده باشد. فعالیت ورزشی، همچنین ممکن است به‌طور مستقیم از طریق توزیع مجدد برون ده قلبی تاثیر مستقیمی بر فیزیولوژی تومور داشته باشد. در پاسخ به پیام‌های موضعی عروق، جریان خون به عضلات اسکلتی فعال به منظور رفع نیازهای متابولیسم، به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (هایپرمی). در نتیجه، جریان خون از اکثریت اندام‌های احشایی و عضلات غیرفعال از طریق انقباض عروقی، دور می‌شود. این فرآیند مسئله جالب توجهی را مطرح می‌کند که چگونه این پاسخ می‌تواند جریان خون تومور را تغییر دهد. در یک مدل موش مبتلا به سرطان پروستات، جریان خون تومور در زمان تمرین در حدود ۲۰٪ در مقایسه با گروه غیرفعال، افزایش یافت و منجر به کاهش ۵۰٪ هیپوکسی در عروق تومور شد که تصور می‌شود این رخداد در نتیجه کاهش همزمان گیرنده‌های مربوط به انقباض عروق (مخصوصاً کاهش گیرنده آلفا آدرنژیک) و کاهش تون میوژنیک (تون حاصل از فشار بالای داخل رگ) است. این داده‌ها نشان می‌دهد که علاوه بر عوامل سیستماتیک محیطی (مکانیسم‌های غیرمستقیم)، فعالیت ورزشی همچنین TME را از طریق مکانیسم‌های مستقیم تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۲). در نتیجه ممکن است دلیل دیگر کاهش بیان VEGF-A و TIE-2 در پژوهش حاضر، کاهش هایپوکسی تومور و در نتیجه کاهش عوامل تحریک کننده VEGF-A و TIE-2 بر اثر تمرین ورزشی باشد. از طرفی در پژوهش حاضر تاثیر تعاملی تمرین تناوبی و مصرف مکمل کوئرستین بر بیان VEGF-A و TIE-2 نیز بررسی شده است. کوئرستین با تعدیل مسیره‌های PI3K

ملاحظات اخلاقی

همه اصول اخلاقی پژوهش حاضر طبق اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب و مورد تایید کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم ورزشی به شماره JR.SSRI.REC.1398.595 رعایت شد.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

نویسندگان این مقاله اظهار می کنند که منافع متقابلی از تالیف و انتشار این مقاله وجود ندارد.

مشارکت مولفان

ز ج، طراحی، اجرا، تحلیل نتایج پژوهش و نگارش مقاله، ف.ش همکاری در نگارش و بازبینی مقاله، ع.گ همکاری در اجرای پژوهش و بازبینی مقاله، ش.ع، همکاری در اجرا و تحلیل نتایج پژوهش، ع.ر، در طراحی پژوهش همکاری داشته اند.

کاهش دهد. از این رو می توان تمرین ورزشی HIIT و مصرف کوئرستین را به عنوان راهکاری در کاهش رشد تومور در سرطان پستان پیشنهاد داد. از آنجایی که پژوهش های اندکی اثر کوئرستین بر بیان VEGF-A را بررسی کرده اند و پژوهشی که تاثیر تعاملی مصرف کوئرستین و فعالیت ورزشی HIIT را بر بیان VEGF-A در سرطان پستان بررسی کرده باشد و پژوهشی که اثر کوئرستین بر TIE-2 را به تنهایی و یا همراه با فعالیت ورزشی بررسی کرده باشد، یافت نشد، لذا پیشنهاد می شود در مطالعات آتی فاکتورها و دیگر عوامل درگیر در فرآیند آنژیوژنز برای روشن شدن مکانیسم اثر، ارزیابی شوند. همچنین پیشنهاد می شود تاثیر دوزهای مختلف مکمل کوئرستین بر مقدار بیان این فاکتورها بررسی شود.

قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان نامه دانشجویی دکتری در دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی است. از تمامی افرادی که در این پژوهش همکاری کرده اند، به ویژه جناب آقای دکتر شعبان علیزاده و جناب آقای دکتر عباسعلی گائینی که در تمامی مراحل کار آزمایشگاهی و بیان ژن یاری ام کردند، تقدیر و تشکر می کنم.

References

- Jones LW, Peppercorn J. Exercise research: early promise warrants further investment. *Lancet Oncol.* 2010 May;11(5):408-10. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70094-2. PMID: 20434709.
- Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. The role of angiogenesis in solid tumours: an overview. *Eur J Intern Med.* 2009 Nov;20(7):663-71. doi: 10.1016/j.ejim.2009.07.009. Epub 2009 Aug 27. PMID: 19818284.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):353-64. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80108-7. PMID: 8756718.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):932-6. doi: 10.1038/nature04478. PMID: 16355210.
- Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002 Oct;2(10):795-803. doi: 10.1038/nrc909. PMID: 12360282.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6. doi: 10.1056/NEJM197111182852108. PMID: 4938153.
- Gullino PM. Angiogenesis and neoplastic growth. *Prog Clin Biol Res.* 1983;132C:101-7. PMID: 6195672.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989 Dec 8;246(4935):1309-12. doi: 10.1126/science.2479987. PMID: 2479987.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004 Aug;25(4):581-611. doi: 10.1210/er.2003-0027. PMID: 15294883.
- Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:4-10. doi: 10.1159/000088478. Epub 2005 Nov 21. PMID: 16301830.
- Teicher BA, Ellis LM, editors. *Antiangiogenic agents in cancer therapy.* Springer Science & Business Media; Humana Press;2008:208-12.
- Wragg JW, Durant S, McGettrick HM, Sample KM, Egginton S, Bicknell R. Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium. *Microcirculation.* 2014 May;21(4):290-300. doi: 10.1111/micc.12119. PMID: 24471792.
- Tsai MS, Kuo ML, Chang CC, Wu YT. The effects of exercise training on levels of vascular endothelial growth factor in tumor-bearing mice. *Cancer Biomark.* 2013;13(5):307-13. doi: 10.3233/CBM-130359. PMID: 24440969.
- Faustino-Rocha AI, Silva A, Gabriel J, Gil da Costa RM, Moutinho M, Oliveira PA, et al. Long-term exercise training as a modulator of mammary cancer

- vascularization. *Biomed Pharmacother.* 2016 Jul;81:273-280. doi: 10.1016/j.biopha.2016.04.030. Epub 2016 Apr 22. PMID: 27261604.
15. Shalamzari SA, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, Shahbazi S, Khatib ZK, Kazemi A, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iranian journal of basic medical sciences.* 2014 Apr;17(4):231.
 16. Khalighfard S, Rajbi H, Gharakhanlou R, Setoudeh V. The Effect of 8 Weeks of Interval Aerobic Exercise before and after Induction of Breast Cancer on Serum Level of Irisin and Tumor Growth in Balb/c mice. *Journal of Isfahan Medical School.* 2018;35(459):1775-84.
 17. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism. *International journal of molecular sciences.* 2019 Jan;20(13):3177. doi: 10.3390/ijms20133177
 18. Marcinko K, Sikkema SR, Samaan MC, Kemp BE, Fullerton MD, Steinberg GR. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity. *Mol Metab.* 2015 Oct 9;4(12):903-15. doi: 10.1016/j.molmet.2015.09.006. PMID: 26909307; PMCID: PMC4731736.
 19. Nasiri M, Peeri M, Matinhomaei H. Endurance Training Attenuates Angiogenesis Following Breast Cancer by Regulation of MiR-126 and MiR-296 in Breast Cancer Bearing Mice. *International Journal of Cancer Management.* 2017 Jun 30;10(6). doi: 10.5812/ijcm.8067
 20. Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 May;284(5):H1668-78. doi: 10.1152/ajpheart.00743.2002. Epub 2003 Jan 23. PMID: 12543634.
 21. Wragg JW, Durant S, McGettrick HM, Sample KM, Egginton S, Bicknell R. Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium. *Microcirculation.* 2014 May;21(4):290-300. doi: 10.1111/micc.12119. PMID: 24471792.
 22. Koelwyn GJ, Quail DF, Zhang X, White RM, Jones LW. Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 2017 Sep 25;17(10):620-32. doi: 10.1038/nrc.2017.78. PMID: 28943640.
 23. Zhao D, Qin C, Fan X, Li Y, Gu B. Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis in larval zebrafish and human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2014 Jan 15;723:360-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.069. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24239714.
 24. Kong L, Wu K, Lin H. Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis of experimental mammary carcinoma. *Chinese Journal of Clinical Oncology.* 2005 Jun;2(3):631-6.