

طراحی روش اندازه گیری مقادیر رادیکالهای فعال اکسیژن در In Vitro و بررسی اثرات ویتامینهای C و E بر روی واکنش رادیکال زایی

صفر شمس^۱، محمدرضا صفری^۱

۱- مربی - عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه علوم آزمایشگاهی

یافته / دوره هفتم / شماره ۲ / تابستان ۸۴ / مسلسل ۲۵

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۱/۱۴، پذیرش مقاله: ۸۴/۳/۸

*** مقدمه:** رادیکالهای آزاد و در رأس آنها ترکیبات مشتق از اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species=ROS)، مهمترین عوامل شکل گیری واکنش استرس اکسیداتیو هستند. امروزه آسیب رادیکالی به عنوان عامل مؤثری در بسیاری از بیماریها از جمله آلزایمر، آترواسکلروز و سرطان در نظر گرفته می شود. هدف از این تحقیق، ارائه روشی جدید و سریع، برای اندازه گیری رادیکالهای ROS است.

*** مواد و روش ها:** این مطالعه توصیفی - تحلیلی میزان رادیکال زایی یونهای فلزات واسطه نظیر آهن، مس و وانادیوم در حضور ترکیبات تیول دار گلوتاتیون و سیستئین (به عنوان مواد احیاکننده) و اکسیژن مولکولی، در محیط Invitro با استفاده از آزمون تیوباربیتوریک اسید مورد سنجش قرار گرفت. برای اندازه گیری مقادیر رادیکالهای آزاد تولیدی، از مولکول قند دزوکسی ریبوز، به عنوان معرف استفاده شد. در اثر حمله رادیکالهای آزاد به دزوکسی ریبوز، تعدادی از ترکیبات آلدئیدی نظیر مالون دی آلدهید، تولید شد. سپس مالون دی آلدهید حاصل، با شناساگری بنام تیوباربیتوریک اسید ترکیب شد و محصول رنگی بدست آمده دارای حداکثر جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر بود. همچنین در این تحقیق، اثرات دو ویتامین آنتی اکسیدان یعنی C و E بر روی میزان رادیکال زایی یونهای فلزات مورد مطالعه، بررسی شد.

*** یافته ها:** نتایج حاصل نشان داد که وانادیوم در مقایسه با آهن و مس، دارای بیشترین توان رادیکال زایی بود و از بین آهن و مس، بسته به این که محیط شامل سیستئین یا گلوتاتیون بود با یکدیگر تفاوت داشت. همچنین ویتامینهای C و E، بر روی ساخت رادیکال آزاد در هر سه یون مورد استفاده، اثرات مهاري داشتند. بخصوص ویتامین C در غلظت صد میکرومولار، دارای بیشترین تأثیر (۸۳ درصد) بر روی کاهش تولید رادیکال بود.

*** نتیجه گیری:** این مطالعه مشخص بود که واکنش فلزات واسطه با مواد تیول دار در حضور اکسیژن، منجر به تولید رادیکالهای ROS می شود و ویتامینهای C و E، رادیکال زایی را مهار می کنند.

واژه های کلیدی: اکسیژن، رادیکال آزاد، فلز واسطه، مواد تیول دار، ویتامین C، ویتامین E

آدرس مکاتبه: همدان - خیابان مهدیه، بلوار شهید فهمیده، روبروی پارک مردم، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی،

گروه علوم آزمایشگاهی

یست الکترونیک: Safarshams@yahoo.com

مقدمه

واکنش استرس اکسیداتیو، سبب آسیب به بیومولکولهای نظیر اسیدهای نوکلئیک، پروتئینها و چربیها می شود. رادیکالهای آزاد و در رأس آنها ترکیبات ROS، جزء مهمترین عوامل شکل گیری استرس اکسیداتیو هستند (۱). تاکنون بالغ بر یکصد بیماری مختلف از جمله آلزایمر، آترواسکلروز و سرطان شناسایی گردیده است که رادیکالهای آزاد در ایجاد آنها نقش دارند (۲).

یونهای فلزات واسطه، به علت توانایی در راه اندازی واکنشهای اکسیداسیون - احیاء در بسیاری از مولکولهای حیاتی، قادر به تبدیل مواد غیرفعال یا کم فعالیت به انواع ترکیبات فعال هستند (۳). در این میان، نقش دو عنصر آهن (Fe) و مس (Cu) برجسته تر است. این دو فلز، جزء عناصر ضروری برای بدن انسان محسوب می شوند و در ساختمان تعدادی از پروتئینها و آنزیمها شرکت دارند (۴). همچنین عنصر وانادیوم (V) که در جایگاه فعال تعدادی از آنزیمها شرکت دارد و در متابولیسم قند گلوکز نیز مؤثر است، به عنوان یک عنصر ضروری محسوب می گردد. هر سه یون فوق (Cu, Fe, V)، به راحتی در حضور ترکیبات احیاکننده مختلف، تمایل خود را برای واکنش پذیری نشان می دهند (۵).

رادیکالهای ROS در مواجهه با انواع مولکولهای آلی، می توانند ضمن واکنش با آنها، سبب تغییرات ساختمانی و کاهش فعالیتشان گردند. از جمله این مولکولها، دزوکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA) است. ترکیبات ROS می توانند با اجزای مختلف این مولکول یعنی بازهای گوانین، آدنین، تیمین و سیتوزین و قند دزوکسی ریبوز، مستقیماً واکنش داده و محصولات متنوعی تولید کنند. به طور مثال، در واکنش با دزوکسی ریبوز، مولکول قند شکسته شده و در نهایت، مواد آلدیدی نظیر مالون دی آلدید (Malon dialdehyde=MDA) به دست می آید (۶).

در این تحقیق با توجه به اهمیت هرگونه آسیب به بیومولکولها، روشی جهت سنجش اندازه گیری رادیکالهای گروه ROS که مسبب واکنش استرس اکسیداتیو در سلولها هستند،

معرفی شده است. این روش، بر پایه واکنش بین MDA (محصول بدست آمده از اثر ترکیبات ROS با دزوکسی ریبوز) و معرفی به نام تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric Acid=TBA) استوار است (۷).

ترکیبات کلات کنند (Chelating agents) یونهای فلزات واسطه و جمع کننده های رادیکالهای آزاد، می توانند باعث کاهش یا توقف آسیب اکسیداتیو گردند [۸]. در این رابطه، اثرات ویتامینهای C و E را بر روی رادیکال زایی فلزات فوق بررسی می کنیم و درصد مهار احتمالی هریک را بر روی این واکنش اندازه گیری می نماییم.

مواد و روش ها

نوع مطالعه توصیفی تحلیلی است.

همه مواد شیمیایی از شرکت مرک (Merck) تهیه گردیدند. ۱- تهیه محلولهای مورد نیاز: ابتدا محلولهای زیر با استفاده از آب دوبار تقطیر ساخته شد:

جدول شماره ۱- محلولهای مورد استفاده

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶
گلوکاتین	-	-	-	۰/۱	۰/۱	۰/۱
سیستئین	۰/۱	۰/۱	۰/۱	-	-	-
آمونیم متاوانادات	-	-	۰/۱	-	-	۰/۱
کلریدمس	-	۰/۱	-	-	۰/۱	-
کلرید آهن	۰/۱	-	-	۰/۱	-	-
دزوکسی ریبوز	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴
بافر فسفات	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵

(مقادیر فوق همگی بر حسب میلی لیتر می باشند)

قند دزوکسی ریبوز صد میلی مولار، کلرید آهن III، کلرید مس II و آمونیوم متاوانادات با غلظت یک میلی مولار، سیستئین و گلوکاتین با غلظت ده میلی مولار، بافر فسفات ۰/۵ مولار با $\text{pH}=7$ ، تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲/۸ درصد (W/V) و تیوباربیتوریک اسید (TBA) یک درصد (W/V) در محلول هیدروکسید سدیم پنجاه میلی مولار.

۲- مرحله آنکوباسیون:

ابتدا طبق مقادیر فوق، محلولها در ۶ لوله به طور جداگانه تهیه شد و به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از آن، به هریک از نمونه ها، ۰/۵ میلی لیتر محلول TCA و ۰/۵ میلی لیتر محلول TBA اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در حال جوش گذاشته شد. بعد از سرد شدن لوله ها، میزان جذب هریک در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (۹).

برای بررسی اثرات غلظتهای مختلف ویتامینهای C و E بر روی واکنش رادیکال زایی در محیط *in vitro*، غلظتهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از هریک از محلولهای ویتامینی، به طور جداگانه به هرکدام از مخلوطهای آزمایش فوق که قبلا تهیه گردیده بود، اضافه شد و بقیه مراحل مطابق روش بالا انجام گرفت. آنالیز آماری: نتایج حاصل به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد. مقایسه بین گروهها با آزمون آماری واریانس ANOVA انجام گرفت. همچنین در صورت وجود تفاوت معنی دار بین دو گروه

با آزمون واریانس ANOVA، تست فیشر استفاده شد.

یافته ها

نتایج حاصل نشان داد که نمکهای Cu، Fe و V در اثر واکنش با ترکیبات تیول داری نظیر سیستئین و گلوتاتیون در حضور مولکول اکسیژن باعث تولید رادیکالهای گروه ROS می شوند که در واکنش با قند دزوکسی ریبوز، سبب تجزیه آن به ترکیبات آلدیدی مثل MDA می گردند و MDA در واکنش با معرف TBA، تولید محصولی می نماید که در طول موج ۵۳۲ نانومتری دارای حداکثر جذب است.

مطابق با اطلاعات جدول ۲، از بین یونهای مورد مطالعه، یون V^{+5} دارای بیشترین توان تولید رادیکال آزاد در هر دو محیط سیستئین و گلوتاتیون بود و در مقایسه بین دو یون Fe^{+3} و Cu^{+2} ، بستگی به این که سیستئین یا گلوتاتیون در محیط موجود باشد. میزان رادیکال زایی تفاوت معنی دار داشت. در حضور سیستئین، Cu^{+2} و در حضور گلوتاتیون، Fe^{+3} رادیکال بیشتری تولید نمودند.

جدول شماره ۲- مقایسه مقادیر جذب کمپلکس MDA-TBA در طول موج ۵۳۲nm، به عنوان معیاری برای تعیین مقدار رادیکال آزاد تولیدی

بوسیله یونهای Fe^{+3} ، Cu^{+2} و V^{+5} در حضور سیستئین و گلوتاتیون

سیستئین			گلوتاتیون		
Fe^{+3}	Cu^{+2}	V^{+5}	Fe^{+3}	Cu^{+2}	V^{+5}
۰/۳۵۴±۰/۰۴۵*	۰/۵۹۲±۰/۰۳۳*	۱/۳۷۲±۰/۰۶۸*	۰/۶۱۱±۰/۰۳۹*	۰/۴۷۰±۰/۰۵۱*	۰/۹۰۷±۰/۰۱۷*

* $P < ۰/۰۵$ معنی دار است (داده ها شامل ۵ بار آزمایش است)

اعداد جذب در حضور سیستئین و گلوتاتیون به ترتیب به مقدار ۸۳٪ و ۵۸٪ کاهش یافته است.

با توجه به اطلاعات جدول ۴، ویتامین E نیز سبب کاهش رادیکال زایی سه فلز مورد مطالعه شده است. به نظر می رسد که این ویتامین بیشترین اثر کاهش دهندگی خود را در غلظت $100 \mu M$ و بر روی یون V^{+5} انجام داده است، به طوری که اعداد جذب نمونه های شامل سیستئین و گلوتاتیون به ترتیب به میزان ۶۴٪ و ۴۵٪ کم شده است.

همچنین نتایج اثرات ویتامینهای C و E بر روی واکنش رادیکال زایی یونهای Fe^{+3} ، Cu^{+2} و V^{+5} به ترتیب در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است.

همان طوری که اطلاعات جدول ۲ نشان می دهد، ویتامین C باعث کاهش تولید رادیکال در حضور هر سه فلز مزبور گردیده است، بیشترین تأثیر در غلظت $100 \mu M$ و در محیطهای شامل یون Cu^{+2} مشاهده شده است. به طوری که

جدول شماره ۳- مقایسه غلظتهای مختلف ویتامین C بر روی واکنش رادیکال زاوی یونهای Fe^{+3} , Cu^{+2} و V^{+5} در حضور سیستئین و گلوتاتیون

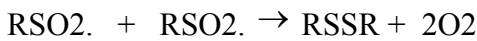
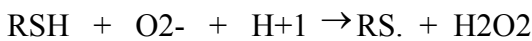
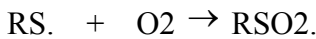
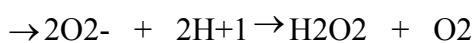
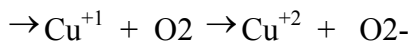
ویتامین C (μM)	سیستئین			گلوتاتیون			
	Fe^{+3}	Cu^{+2}	V^{+5}	Fe^{+3}	Cu^{+2}	V^{+5}	Fe^{+3}
۰	۰/۳۵۴±۰/۰۴۵	۰/۵۹۲±۰/۰۳۳	۱/۳۷۲±۰/۰۶۸	۰/۶۱۱±۰/۰۳۹	۰/۴۷۰±۰/۰۵۱	۰/۹۰۷±۰/۰۱۷	
۱۰	۰/۲۹۰±۰/۰۱۹ *	۰/۳۹۰±۰/۰۸۸ *	۱/۱۵±۰/۰۹۱ *	۰/۵۰۱±۰/۰۴۴ *	۰/۳۹۰±۰/۰۵۴ *	۰/۸۵۵±۰/۰۳۹ *	
۵۰	۰/۲۷۹±۰/۰۳۸	۰/۳۱۹±۰/۰۶ *	۱/۱±۰/۰۴۸ *	۰/۴۹۸±۰/۰۳	۰/۳۵۵±۰/۰۶۵ *	۰/۸۳۹±۰/۰۵	
۱۰۰	۰/۱۹۵±۰/۰۲۹ *	۰/۰۹۵±۰/۰۲۵ *	۰/۹۹±۰/۰۳ *	۰/۴۰۵±۰/۰۱۸ *	۰/۱۹۹±۰/۰۳ *	۰/۷۵±۰/۰۶۶ *	

* $P < ۰/۰۵$ معنی دار است (داده ها شامل ۵ بار آزمایش است)

جدول شماره ۴- مقایسه غلظتهای مختلف ویتامین E بر روی واکنش رادیکال زاوی یونهای Fe^{+3} , Cu^{+2} و V^{+5} در حضور سیستئین و گلوتاتیون

ویتامین E (μM)	سیستئین			گلوتاتیون		
	Fe^{+3}	Cu^{+2}	V^{+5}	Fe^{+3}	Cu^{+2}	V^{+5}
۰	۰/۳۵۴±۰/۰۴۵	۰/۵۹۲±۰/۰۳۳	۱/۳۷۲±۰/۰۶۸	۰/۶۱۱±۰/۰۳۹	۰/۴۷±۰/۰۵۱	۰/۹۰۷±۰/۰۱۷
۱۰	۰/۳۳±۰/۰۶	۰/۵۵±۰/۰۱ *	۰/۹۲۳±۰/۰۵ *	۰/۵۹۱±۰/۰۴	۰/۴۱±۰/۰۶۷ *	۰/۸۹±۰/۰۲
۵۰	۰/۲۷±۰/۰۴ *	۰/۵۱۸±۰/۰۲	۰/۷۸۹±۰/۰۲ *	۰/۵۵۷±۰/۰۵۴ *	۰/۴۲±۰/۰۳	۰/۶۷±۰/۰۵ *
۱۰۰	۰/۲۹±۰/۰۲۷ *	۰/۵±۰/۰۵ *	۰/۴۹±۰/۰۳۳ *	۰/۵۱±۰/۰۴۶ *	۰/۴±۰/۰۴۳	۰/۵±۰/۰۳۸ *

* $P < ۰/۰۵$ معنی دار است (داده ها شامل ۵ بار آزمایش است)



واکنشهای مشابهی نیز در حضور یونهای Fe^{+3} و V^{+5}

انجام می شود.

درحقیقت، در اثر واکنش یونهای فوق با عوامل تیولی که بخصوص در پروتئینهای مختلف وجود دارند و شکل گیری رادیکالهای فعالی مثل ترکیبات ROS، پروتئینها دچار صدمات جبران ناپذیری می شوند (۹). البته لازم به تذکر است که جایگاه اتصال یون فلزی به هر مولکول حیاتی، تأثیر بسزایی در نوع و شدت آسیب وارده دارد.

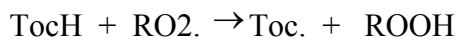
یکی از فعال ترین رادیکالهای گروه ROS، رادیکال هیدروکسیل (OH) است. این رادیکال می تواند در سه نوع واکنش مختلف شامل: افزایشی، جذب هیدروژن و انتقال

بحث

در این تحقیق، میزان تولید رادیکالهای گروه ROS توسط یونهای فلزات واسطه (Cu, Fe, V) را در حضور ترکیبات تیول دار (سیستئین و گلوتاتیون) و اکسیژن مولکولی بررسی کردیم. Fe به فرم "هم" در ساختار پروتئینهای مختلف شرکت دارد و می تواند باعث انجام واکنش اکسیداسیون بر روی بسیاری از بیومولکولها نظیر چربیها، پروتئینها، لیپوپروتئینها و اسیدهای نوکلئیک شود، اما واکنش پذیری آن در اثر اتصال به پروتئین خاصی بنام "هموپکسین"، کاهش چشمگیری می یابد. مولکول "هم" در صورتی که به آلبومین متصل گردد، می تواند سبب تحریک اکسیداسیون در اسیدهای چربی همراه آلبومین شود (۱۰).

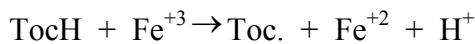
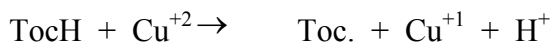
مکانیسمی که بوسیله آن یونهای فلزات واسطه می توانند در حضور ترکیبات تیول دار و مولکول اکسیژن، رادیکالهای گروه ROS ایجاد کنند، به صورت زیر است (واکنش برای یون Cu):

استرس اکسیداتیو روی لیپیدها و لیپوپروتئینها، برابر صد میکرومولار گزارش شده است (۱۴) که با نتایج ما، کاملا هماهنگی دارد. ویتامین E یا آلفاتوکوفرول (ToCH)، جزء ویتامینهای محلول در چربی است و خواص آنتی اکسیدانی آن به اثبات رسیده است. ویتامین E باعث مهار واکنش پراکسیداسیون لیپید در مولکولهای حیاتی می گردد و طبق معادله زیر به عنوان جمع کننده رادیکال پراکسیل (RO2.) که در مرحله انتشار پراکسیداسیون لیپید ساخته می شود عمل می کند:

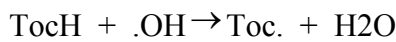
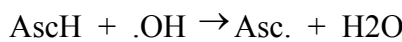


Toc رادیکال آلفاتوکوفرول است که همانند Asc، تمایل چندانی به واکنش دادن ندارد.

همچنین، ویتامین E می تواند باعث احیای یونهای فلزات واسطه گردد (مشابه ویتامین C)، معادلات واکنشها عبارتند از:



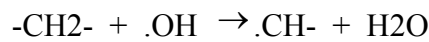
پس، ویتامین E نیز از طریق واکنش با فلزات واسطه رادیکال زا و احیای آنها، سبب کاهش فعالیت شیمیایی آنها می شود و در نتیجه از تشکیل ترکیبات رادیکالی (ROS)، ممانعت می نماید (۱۵). علاوه بر این، هردو ویتامین مورد مطالعه می توانند مستقیماً با OH. واکنش دهند و به صورت جمع کننده این رادیکال عمل کنند. معادلات واکنشها عبارتند از (۱۶):



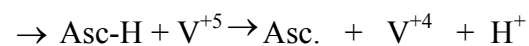
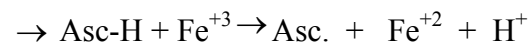
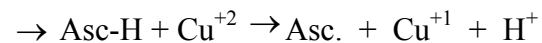
در تأیید مطالب فوق، رولند^۳ (۱۷)، صفری^۱ (۱۸) و زو^۴ (۱۹)

در طی تحقیقات خود از دو ویتامین C و E، به عنوان آنتی اکسیدانهایی که به عنوان کلات کننده های یونهای فلزات واسطه و جمع کننده های رادیکالهای ROS عمل می کنند، یاد کرده اند.

الکترون شرکت نماید. نمونه روشنی از واکنش جذب هیدروژن، واکنش پراکسیداسیون لیپید است که توسط OH. در ساختمان غشاهای سلولی، لیپوپروتئینها و ... صورت می گیرد. در مرحله آغازین پراکسیداسیون لیپید، OH. با گرفتن H از گروه متیلن (-CH2-) موجود در زنجیره اسید چرب، مولکول آب و رادیکال کربنی ایجاد می نماید، به صورت زیر (۱۱):



یکی از قطعی ترین پیامدهایی که در انتظار مولکولهای حیاتی (پروتئینها، چربیها و ...) آسیب دیده توسط ترکیبات ROS می باشد، تسریع در روند مکانیسمهای تجزیه آنهاست (۹). ویتامین C یا اسید آسکوربیک (Asc-H)، یکی از ویتامینهای محلول در آب است که علاوه بر نقش آنتی اکسیدانی، به عنوان کوفاکتور برای تعدادی از آنزیمهای مهم بدن عمل می کند. اما مهمترین ویژگی آن، حضور آن به عنوان یک ماده احیا کننده در واکنشهای مختلف است، به طوری که به راحتی باعث احیای یونهای فلزات واسطه نظیر Cu^{+2} ، Fe^{+3} و V^{+5} می گردد. مطابق واکنشهای زیر:



Asc، رادیکال آسکوربات است که از نظر بیوشیمیایی کاملاً غیرفعال است. همان طوری که در واکنشهای فوق مشخص شده است، یونهای فلزات واسطه تحت تأثیر اسید اسکوربیک، احیا شده اند درحالی که به شکل اکسید، در ساخت رادیکالهای آزاد (مثل OH.) شرکت می کنند. بنابراین، طبیعی است که در حضور اسید آسکوربیک، از توانایی رادیکال زایی آنها کاسته می شود (۱۲).

در تأیید نتایج این مطالعه، اسکورا^۱ در تحقیقات خود در سال ۱۹۹۶، ویتامین C را به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات آنتی اکسیدان برای مقابله با واکنش استرس اکسیداتیو معرفی کردید (۱۳). همچنین در مطالعات صورت گرفته توسط فری و لوری^۲، مناسبترین غلظت ویتامین C برای کاهش واکنش

1. CJ. Schorah
2. B. Frei and L.Lowy
3. Roland
4. Zhu

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق براین نکته تأکید نمود که ویتامینهای C و E در تقلیل اثرات مخرب یونهای فلزات واسطه نظیر تولید رادیکالهای آزاد، نقش مؤثری ایفا می کنند، این امر بویژه در مورد آن دسته از بیماریهایی که فلزات مزبور در ایجاد آنها

دخالت دارند، قابل ملاحظه است. البته پیشنهاد می شود که اثرات ویتامینهای فوق در آزمایشات رادیکالزایی فلزات واسطه در *in vivo* نیز با دقت و شدت بیشتری دنبال گردد تا مناسب ترین دوز هر یک در بیماریهای مرتبط با رادیکالهای آزاد مشخص شود.

References

1. Halliwell B and Gutteridge JMC. Role of free radical and catalytic metal ions in human diseases, *Meth. Enzym.* 1990; 186: 1-10
2. Brent JA, and Rumack BH. Role of free radicals in toxic hepatic injury, *Clin. Toxicol.* 1993; 31: 173-180
3. Evans PJ. Metal ions catalytic for free radical reaction in the plasma of patients with fulminant hepatic failure, *Free Rad. Res.* 1994; 20 : 139-46
4. Kasprzak KS. The role of oxidative damage in metal carcinogenicity, *Chem. Res. Toxicol.* 1991; 4: 604-11
5. Liochev SI and Fridovich I. Vanadate-stimulated oxidation of NAD(P)H in the presence of biological membranes and other sources of superoxide, *Arch. Biochem. Biophys.* 1990; 279: 1-10
6. Breen AP and Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free Rad. Biol. Med.* 1995; 18: 1033-40
7. Gutteridge JMC and Quinlan GJ. MDA formation from lipid peroxides in the TBA test: the role of lipid radicals, iron salts and metal chelators, *J Biochem.* 1993; 5: 293-9
8. Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and non-alcoholic liver diseases, *Adv. Pharmacol.* 1996; 38: 601-10
9. Quinlan GJ, Coudray C and Hubbard A. Vanadium and copper in clinical solutions of albumin and their potential to damage protein structure, *J. Pharma Sci.* 1992; 81: 611-4
10. Gutteridge JMC. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides, *FEBS. Lett.*, 1986; 201: 291-8
11. Halliwell B and Gutteridge JMC. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl generation. An update, *FEBS. Lett.* 1992; 307: 108-12
12. Frei B, England L and Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 86: 6377-82
13. Schorah CJ. Total vitamin C, ascorbic acid and DHA concentration in plasma of critically ill patients, *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; 63: 766-9
14. Frei B, and Lowy L. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidative modification, *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 54: 113-8
15. Wagner BA, Buettner GR and Burns P. Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 334: 261-7.
16. Machlin LJ, and Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, *FASEB J.* 1987; 1: 441-6
17. Roland A. Measurement of copper binding sites in plasma and low density lipoprotein. *Arteriol. Thromb. Vasc. Biol.* 2001 ; 21 : 594-9.
18. Safari MR. Effects of vitamin E and volatile oils on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation. *Iranian Biomed J.* 2003 ; 7(2) : 79-84.
19. Zhu BZ. Vitamin C protects against copper-induced oxidative damage by formation of a redox-inactive copper complex. *Free Rad. Biol. Med.* 2002 ; 32 : 1333-8