

وضعیت اکسیدان و آنتی‌اکسیدانی در بیماران مبتلا به تنگی عروق کرونر تأیید شده با آنژیوگرافی

دکتر کمال خادم‌وطن¹ فریبرز حق‌پرست² ابراهیم افتخار³ دکتر جعفر نوروززاده⁴
¹ استادیار گروه داخلی، ³ کارشناس ارشد بیوشیمی، ⁴ استاد گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ² کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد لارستان

مجله پزشکی هرمزگان سال دوازدهم شماره چهارم زمستان 87 صفحات 236-231

چکیده

مقدمه: بیماریهای قلبی-عروقی عامل اصلی مرگ‌ومیر در کشورهای صنعتی و در حال توسعه می‌باشد. شواهد اخیر نشان داده است افزایش رادیکال‌های آزاد و تضعیف قدرت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در پاتوژنز بیماری‌های قلبی-عروقی دخیل باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به گرفتگی عروق کرونر تأیید شده با آنژیوگرافی می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه مورد شاهد، 58 بیمار مبتلا به گرفتگی عروق کرونر تأیید شده با آنژیوگرافی به عنوان گروه مورد و 55 نفر شخص سالم به عنوان گروه شاهد انتخاب گردیدند. مقادیر ویتامین E با کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC)، گلوکاتایون و مالون دی آلدئید (MDA) با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-11 و آزمون t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج: سطوح پلاسمایی MDA بیماران $114/93 \pm 40/65$ نانومول در لیتر) نسبت به گروه شاهد $50/49 \pm 17/52$ نانومول در لیتر) افزایش چشمگیری ($p < 0/05$) نشان داد. بین مقادیر ویتامین E بیماران با گروه شاهد $28/55 \pm 6/3$ در مقابل $32/07 \pm 7/4$ میکرومول در لیتر؛ ($p < 0/05$) و گلوکاتایون بیماران با گروه شاهد $43/01 \pm 48$ در مقابل $124/4 \pm 63/4$ نانومول در لیتر؛ ($p < 0/05$) اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین بین سطوح MDA با ویتامین E و گلوکاتایون ارتباط معنی‌دار و معکوس مشاهده شد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما مبنی بر، اختلال در تعادل اکسیدان/آنتی‌اکسیدان گویای آن است که افزایش استرس اکسیداتیو احتمالاً در پاتوژنز بیماری‌های قلبی-عروقی دخیل است. شناخت دقیق فرآیندهای مسبب این تغییرات به همراه مکانیزم‌های مولکولی آن، شاید بتواند راهکارهای درمانی جدیدی برای این بیماران فراهم آورد.

کلیدواژه‌ها: تنگی عروق کرونر - استرس اکسیداتیو - ویتامین E - گلوکاتایون - مالون دی آلدئید

نویسنده مسئول:

دکتر جعفر نوروززاده
دانشگاه پزشکی، بخش بیوشیمی
دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
ارومیه - ایران
تلفن: 0914 346 1997
پست الکترونیکی:
jnouroozadeh@yahoo.com

دریافت مقاله: 86/3/13 اصلاح نهایی: 87/5/8 پذیرش مقاله: 87/7/21

مقدمه:

بیماری مبتلا می‌شوند (2). کاهش سن ابتلا به بیماری می‌تواند بدلیل وضعیت اقتصادی و معیشتی پایین، کاهش تحرک و تغییر الگوهای تغذیه ای و استفاده از غذاهای پرچرب و پر کالری به جای غذاهای سنتی و غنی از ویتامین‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدان باشد. کاهش دریافت ترکیبات آنتی‌اکسیدان در کنار عوامل خطری مانند هیپرکلسترولمیا، دیابت، هیپر تانسسیون،

بیماریهای قلبی - عروقی عامل اصلی مرگ و میر در کشورهای صنعتی و در حال توسعه به حساب می‌آید و تقریباً 20 درصد کل مرگ‌ومیر سالانه در جهان را شامل می‌شود (1). در ایران نیز طبق آمار وزارت بهداشت، بیماری‌های قلبی - عروقی اولین عامل مرگ‌ومیر می‌باشد و 65 درصد افراد در سنین پایین (40-55 سال) به این

طالقای ارومیه مراجعه کرده بودند و 55 نفر شخص سالم (23 مرد، 32 زن؛ سن 39 - 71 سال؛ متوسط سن $49/85 \pm 8/56$) به عنوان گروه شاهد می‌باشد. تمامی بیماران حداقل در یکی از رگ‌های اصلی کرونر قلب بیش از 90 درصد گرفتگی داشتند که با آنژیوگرافی تأیید شده بود. گروه کنترل نیز از بین افرادی که از لحاظ آنژیوگرافی در هیچ یک از رگ‌های کرونر قلب گرفتگی نداشتند، انتخاب گردیدند. لازم به ذکر است که آنژیوگرافی توسط کاردیولوژیست‌های هیات علمی دانشگاه صورت پذیرفت و در نهایت توسط کاردیولوژیست شرکت‌کننده در طرح مورد بازبینی قرار گرفت. هر دو گروه بیمار و شاهد از نظر سن و جنس همخوانی داشتند. آنها دیابت نداشتند. قرص‌های حاوی ویتامین و داروهای پایین آورنده کلسترول و لیپید مصرف نمی‌کردند.

نمونه‌گیری به روش تصادفی ساده انجام شده است. نمونه خون ناشتا (12-10 ساعته) از دو گروه بیمار و کنترل بین ساعات 7/3 تا 9 صبح در لوله‌های حاوی **K₂-EDTA** جمع‌آوری شد. جهت تهیه پلاسما، نمونه‌ها برای 10 دقیقه در **1500 g** سانتریفوژ شدند. پلاسما جدا شده تا زمان انجام آنالیز مارکرهای مورد نظر در فریزر -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تمامی بیماران از اهداف طرح آگاه بوده و از آنها رضایت‌نامه کتبی دریافت شده است.

اندازه‌گیری سطوح پلاسمایی ویتامین E با استفاده از دستگاه **HPLC** و استاندارد آلفا-توکوفرول استات با غلظت **10 µg/ml** بعد از استخراج با محلول هپتان با استفاده از ستون **C₁₈ (Netherlands ID chrompack) 10*2** سانتی‌متر و جریان فاز متحرک متانول 95 درصد با سرعت 0/5 میلی‌متر در دقیقه در طول موج 282 نانومتر صورت گرفت (8).

گلوکاتینون با روش آنزیمی چرخه‌ای و به کمک معرف المن یا دی تیونیترو بنزوئیک اسید (**Dithionitro benzoic acid**) با استفاده از نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (**Nicotine amid adenine dinucleotide phosphate**) و گلوکاتینون ردوکتاز به عنوان عوامل احیاکننده در طول موج 412 نانومتر اندازه‌گیری شد (9). سنجش مالون

سیگار کشیدن و پیری همگی می‌توانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش دهند. گونه‌های فعال اکسیژن از طریق آغاز فرآیندهایی مانند بیان مولکول‌های چسپاننده، تحریک تکثیر و مهاجرت سلولهای ماهیچه صاف عروق، آپوپتوز در اندوتلیوم، اکسیداسیون لیپیدها، بر هم زدن تعادل آنتی‌اکسیدان / اکسیدان، فعال کردن ماتریکس متالوپروتئینازها و تغییر فعالیت وازوموتور در ایجاد آترواسکلروز نقش دارند (3). اثرات گونه‌های فعال اکسیژن بر لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA به وسیله طیفی از آنتی‌اکسیدان‌ها شامل ویتامین‌های E، C و A، گلوکاتینون، اوریک اسید و غیره در بدن کنترل می‌شود (4).

Serdar و همکارانش افزایش مالون دی آلدهید، به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطوح آنتی‌اکسیدان‌های پلاسمایی شامل ویتامین E، C و A را در بیماران مبتلا به تنگی عروق کرونر نشان دادند (5). Nojiri و همکارانش در یک مطالعه مورد - شاهدی جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به تنگی عروق کرونر سطوح ویتامین‌های E، C، A و نیز ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی را در این بیماران مورد مطالعه قرار دادند که نتایج حاکی از کاهش ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و افزایش سطوح ویتامین E داشت (6). در مطالعات پیشین همواره سنجش ویتامین E در کنار ویتامین C و یا سایر آنتی‌اکسیدان‌ها به غیر از گلوکاتینون انجام پذیرفته است. گلوکاتینون به دلیل پتانسیل احیایی بالایی خود قادر است به طور مستقیم و نیز از طریق کوفاکتور بودن برای آنزیم گلوکاتینون پراکسیداز نقش کلیدی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد ایفاء کند (7).

هدف از این مطالعه ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به گرفتگی عروق کرونر تأیید شده با آنژیوگرافی در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد.

روش کار:

جامعه مورد مطالعه شامل 58 بیمار مبتلا به گرفتگی عروق کرونر (41 مرد، 17 زن؛ سن 70 - 41 سال؛ متوسط سن $54/59 \pm 8/7$) که به بخش قلب و عروق بیمارستان

جدول شماره 2- نتایج شاخص‌های استرس اسیداتیو در گروه

بیماری و شاهد

پارامتر	گروه شاهد n=55 (mean±sd)	گروه بیمار n=58 (mean±sd)	P
ویتامین E (میکرومول/لیتر)	32/07±7/4	28/55±6/3	<0/05
مالون‌دی‌آلدهید (نانومول/لیتر)	50/48±17/52	114/93±40/65	<0/05
کلوتاتیون (نانومول/لیتر)	124/4±63/4	43/01±48/7	<0/05
ویتامین E/کلسترول	0/18±0/038	0/119±0/01	<0/05
ویتامین E/LDL	0/25±0/18	0/17±0/04	<0/05
ویتامین E/تری‌گلیسرید	0/22±0/056	0/13±0/037	<0/05
ویتامین E/تری‌گلیسرید + کلسترول	0/096±0/01	0/061±0/009	<0/05
LDL/HDL	4/2±2/1	5/43±1/09	<0/05
مالون‌دی‌آلدهید/LDL	0/42±0/47	0/75±0/37	<0/05
مالون‌دی‌آلدهید/ کلسترول	0/29±0/15	0/5±0/23	<0/05
مالون‌دی‌آلدهید/تری‌گلی سرید + کلسترول	0/15±0/07	0/26±0/13	<0/05

سطوح پلاسمایی MDA بیماران نسبت به گروه کنترل افزایش چشمگیری داشت ($P < 0/05$). مقادیر ویتامین E و گلوکاتاتیون بیماران در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشتند ($P < 0/05$). نسبت‌های سطوح ویتامین E به کلسترول، ویتامین E به LDL، ویتامین E به تری‌گلیسرید و ویتامین E به لیپید توتال در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان دادند ($P < 0/05$).

بین سطوح ویتامین E و کلسترول توتال ($P = 0/008$)؛ $r = 0/34$ و نیز ویتامین E با LDL ($P = 0/002$)؛ $r = 0/29$ ارتباط مستقیم معنی‌داری بدست آمد. بین سطوح ویتامین E با تری‌گلیسرید ($P = 0/08$)؛ $r = 0/18$ و نیز ویتامین E با HDL ($P = 0/08$)؛ $r = 0/159$ ارتباط مستقیمی حاصل شد که از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

بین سطوح پلاسمایی ویتامین E با MDA ($P < 0/05$)؛ $r = - 0/14$ و نیز گلوکاتاتیون با MDA ($P < 0/005$)؛ $r = - 0/26$ ارتباط معنی‌دار و معکوس وجود داشت.

دی‌آلدهید (MDA) بر پایه واکنش یک مولکول MDA با دو مولکول تیوباربیتریک اسید (TBA) جهت تشکیل کمپلکس رنگی در دمای بالا (100 درجه سانتی‌گراد) تحت شرایط اسیدی صورت گرفت. جذب نوری کمپلکس حاصل بعد از استخراج با بوتانول در طول موج 532 نانومتر اندازه‌گیری شد (10). ضریب تغییرات هر سه مارکر سنجش شده (مالون‌دی‌آلدهید، گلوکاتاتیون و ویتامین E) کمتر از 5% بوده است. برای مقایسه داده‌ها بین دو گروه از آزمون آماری t استفاده شد. برای نشان دادن همبستگی داده‌ها از پیرسون استفاده شد. نتایج در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار تلقی شده است. برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS-11 استفاده شد.

نتایج:

نتایج داده‌های کلینیکی بیماران در جدول شماره 1 نشان داده شده است. بین سطوح تری‌گلیسرید، کلسترول توتال و HDL بیماران نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. اما بین سطح LDL بیمار در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در جدول شماره 2 نتایج شاخص‌های استرس اکسیداتیو به همراه سطوح معنی‌داری آنها بیان شده است.

جدول شماره 1- نتایج داده‌های بالینی گروه بیماری و شاهد

پارامتر	گروه شاهد n=55 (mean±sd)	گروه بیمار n=58 (mean±sd)	P
سن	49/85±8/56	54/59±7/8	NS
جنس (مرد/زن)	31/24	17/41	-
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	155/2±51/25	237/6±97/4	<0/05
کلسترول توتال (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	183/7±52/5	239/46±45/5	<0/05
LDL (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	151/45±54/28	164/7±37/39	NS
HDL (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	39±12/74	32/9±10/34	<0/05
کلوزک (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	84/9±14/42	93/9±18/6	<0/05
کراتینین (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	0/86±0/15	0/91±0/16	<0/05
اوریک اسید (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	5/5±1/73	5/87±0/87	<0/05

NS: Not Significant

بحث و نتیجه‌گیری:

در این تحقیق ارزیابی برخی مارکرهای استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به تنگی عروق کرونر تایید شده با آنژیوگرافی در مقایسه با گروه شاهد انجام گرفته است. این مطالعه نشان داد که سطوح پلاسمایی **MDA**، به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی، در گروه بیمار افزایش چشمگیری نسبت به گروه شاهد داشته است. **MDA** محصول جانبی اکسیداسیون اسیدهای چرب دارای بیش از دو باند دوگانه می باشد. **Serdar** و همکارانش افزایش سطوح پلاسمایی و گلبول قرمز **MDA** در بیماران مبتلا به تنگی عروق کرونر را نشان داده‌اند (5). علاوه بر این، مطالعات دیگری نیز در گذشته افزایش سطوح پلاسمایی **MDA** در این بیماران را گزارش کرده‌اند (6، 11). **Dubois** و همکارانش و **Miwa** و همکارانش وجود رابطه مستقیم بین افزایش سطوح پلاسمایی **MDA** و تمایل **LDL** به اکسیداسیون در این بیماران را مطرح کرده‌اند (12، 13). افزایش پراکسیداسیون لیپیدی‌ها و اکسیداسیون **LDL** در پاتورژن بیماری‌های قلبی-عروقی دخیل می باشد (14). ویتامین **E** جزء مؤثرترین آنتی‌اکسیدان‌های شکننده زنجیر فاز لیپیدی محسوب می‌شود که در غشاءهای سلولی و در ذره **LDL** یافت می‌شود (15). مطالعه **CHAOS (Cambridge Heart Antioxidant Study)** نشان داد که مصرف ویتامین **E** باعث کاهش خطر مرگ‌ومیر ناشی از بیماری‌های قلبی-عروقی در افرادی که از لحاظ آنژیوگرافی آترواسکلروز عروق کرونر آنها تأیید شده است، می‌گردد (16). برخی یافته‌ها وجود ارتباط معکوس میان دریافت زیاد ویتامین **E** و شیوع بیماری‌های قلبی-عروقی در زنان و مردان را گزارش کرده‌اند (17، 18). افزایش سطح ویتامین **E** از طریق افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی و مهار پراکسیداسیون لیپیدی‌ها نقش مهمی در بهبود عملکرد عروق ایفاء می‌کند. به علاوه اینکه مطالعات مداخله‌ای نشان داده‌اند که ویتامین **E** تمایل **LDL** به اکسیداسیون را کاهش می‌دهند (15). در این مطالعه سطوح پلاسمایی ویتامین **E**

بیماران کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که مطابق مطالعات پیشین می‌باشد (5، 19). کاهش ویتامین **E** می‌تواند به دلیل کاهش دریافت خوراکی و نیز افزایش مصرف آن در طی واکنش‌های خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد باشد. وجود ارتباط معکوس میان ویتامین **E** و **MDA** در این مطالعه خود مؤید این مطلب است.

گلوکاتیون مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان داخل سلولی است که در حفظ پتانسیل اکسیداسیون/احیاء و حذف و پاک‌سازی لیپید پراکسیدها و سایر ترکیبات اکسیدان نقش ایفاء می‌کند. کاهش سطوح پلاسمایی گلوکاتیون بیماران در مقایسه با گروه کنترل، که در این مطالعه گزارش شده است می‌تواند به دلیل مصرف آن جهت احیاء و بازیابی ویتامین **E** باشد (20). وجود ارتباط مستقیم و معنی‌دار میان ویتامین **E** و گلوکاتیون تأییدکننده این امر می‌باشد. علاوه بر این فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای گلوکاتیون و استفاده از آن جهت پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌تواند توجیه دیگری بر کاهش غلظت آن در این بیماران باشد. وجود ارتباط معکوس میان گلوکاتیون و **MDA** نشان‌دهنده این موضوع است.

لازم به ذکر است که در کنار گلوکاتیون و ویتامین **E**، اوریک اسید نیز یک ترکیب آنتی‌اکسیدان محسوب می‌گردد و همانطور که در جدول شماره 1 آمده است سطح آن در گروه بیمار از افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل برخوردار است. **Nieto** و همکارانش افزایش اوریک اسید در بیمارانی که دچار آترواسکلروز بودند را نشان دادند (21). آنها پیشنهاد کردند افزایش اوریک اسید در این بیماران احتمالاً یک مکانیزم جبرانی در جهت خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. با این وجود برخی مطالعات نشان داده‌اند که در حضور کاهش سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان (مانند گلوکاتیون و ویتامین **E**)، افزایش اوریک اسید نمی‌تواند به خوبی نقش حمایتی خود را ایفاء کند (22).

به عنوان نتیجه‌گیری کلی، این مطالعه کاهش سطوح آنتی‌اکسیدان‌های پلاسمایی و افزایش شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در بیماران مبتلا به گرفتگی عروق

یکی از محدودیت‌های طرح کوچک بودن جامعه مورد مطالعه است که باید در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد.

کرونر را به وضوح نشان داد. این نتایج تاکید دیگری بر نقش استرس اکسیداتیو در پاتوژنز و نیز تسریع روند آترواسکلروز دارد. شناخت دقیق فرآیندهای مسبب این تغییرات به همراه مکانیزم‌های مولکولی آن، شاید بتواند راهکارهای درمانی جدیدی برای این بیماران فراهم آورد.

References

منابع

1. Hennekens CH. Increasing burden of cardiovascular disease: current knowledge and future directions for research on risk factors. *Circulation*. 1998;24:1095-1102.
2. Larijani B, Fakhzadeh H, Mohaghegh M, Pourebrahim R, Akhlaghi MR. et al. Burden of coronary heart disease on the Iranian oil industry (1999- 2000). *Eastern Mediterranean Health Journal*. 2003;9:904-910.
3. David Harrison, Kathy K. Griendling, Ulf Landmesser, Burkhard Hornig and Helmut Drexler. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2003;40:7-11.
4. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995;41:1819-1828.
5. Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandol E, Yesilbursa D, Serdar A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem*. 2006;39:794-803.
6. Nojiri S, Daida H, Mokuno H, Iwama Y, Mae K, Ushio F, et al. Association of serum antioxidant capacity with coronary artery disease in middle-aged men. *Jpn Heart J*. 2001;42:677-690.
7. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 2003;66:1499-1503.
8. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Birlouez I, Wolff SP. Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous-oxidation in Xylenol Orange assay. *J Agric Food Chem*. 1995;43:17-21.
9. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*. 1969;27:502-522.
10. Lepage G, Munoz G, Champagne J, Roy C. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1991;197:277-283.
11. Mutlu-Turkoglu U, Akalin Z, Ilhan E, Yilmaz E, Bilge A, Nisanci Y, et al. Increased plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem*. 2005;38:1059-1065.
12. Dubois-Rande JL, Artigou JY, Darmon JY, Habbal R, Manuel C, Tayarani I, et al. Oxidative stress in patients with unstable angina. *Eur Heart J*. 1994;15:179-183.
13. Miwa K, Miyagi y, Fujita M. Susceptibility of plasma lipoprotein to cupric ion-induced peroxidation in patients with variant angina. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:632-638.
14. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84:1381-1478.
15. Princen HM, van Poppel G, Vogelezang C, Buytenhek R, Kok FJ. Supplementation with vitamin E but not beta-carotene in vivo protects low density lipoprotein from lipid peroxidation in vitro. Effect of cigarette smoking. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:554-62.

16. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996;347:781-786.
17. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med*. 1993;328:1444-49.
18. Rimm EH, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci EL, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in men. *N Engl J Med*. 1993;328:1450-56.
19. Delport R, Ubbink JB, Human JA, Becker PJ, Myburgh DP, Vermaak WJ. Antioxidant vitamins and coronary artery disease risk in South African males. *Clin Chim Acta*. 1998;278:55-60.
20. Jacob RA. The integrated antioxidant system. *Nutr Res*. 1995;15:755-766
21. Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2000;148(1):131-139.
22. Whitehead TP, Jungner I, Robinson D, Kolar W, Pearl A, Hale A. Serum urate, serum glucose and diabetes. *Ann Clin Biochem*. 1992;29:159-161.