

Evaluarea stresului oxidativ și sistemelor antioxidante în bolile cardiovasculare

Oxidative stress and antioxidant systems evaluation in cardiovascular disease

Elena Bobescu *

Universitatea „Transilvania” Brașov, Facultatea de Medicină, Catedra de medicină internă

Rezumat

Bolile cardiovasculare sunt principala cauză de mortalitate și morbiditate în lume. Ateroscleroza la nivel coronarian are ca expresie clinică boala cardiacă ischemică manifestată ca angină stabilă, angină instabilă, infarct miocardic acut sau moarte subită. Aceasta impune o mai bună cunoaștere a mecanismelor moleculare și metabolismul celular al miocardului. În condițiile în care patogeniza aterosclerozei este explicată prin ipoteza disfuncției endoteliale datorate răspunsului complex la agresiune, rolul stresului oxidativ și al sistemelor antioxidante în bolile cardiovasculare reprezintă un subiect de cercetare fundamentală și clinică. Disfuncția endotelială poate fi realizată de agenți virali și microbieni expunerea la toxine, nivele înalte ale metaboliților sau factori mecanici. Leziunile pot fi agravate de stresurile metabolice cum sunt hiperglicemia și hipercolesterolemia și de stresul oxidativ. Factorii majori de risc cardiovascular prin intermediul mediatorilor ce apar ca răspuns la acești factori de risc - oxLDL, produși de glicare avansată, angiotensina II, TNF α - stimulează la nivelul endoteliului vascular sistemele enzimatice și neenzimatice răspunzătoare de generarea speciilor reactive ale oxigenului. Biomarkerii stresului oxidativ sunt biomarkeri de depleție antioxidantă și markeri specifici: produși de peroxidare lipidică și produși de degradare oxidativă a proteinelor și a ADN. Peroxidarea lipidelor este un proces complex prezent din faza de inițiere a aterosclerozei și se desfășoară în multiple stadii. Metodele de determinare a peroxidării lipidelor pot fi indirecte prin determinarea pierderilor de substrat sau directe prin determinarea peroxizilor care se pot realiza prin evaluarea totală sau parțială. Imposibilitatea obținerii unei metode ideale de determinare a peroxidării lipidice a impus evaluarea complexă a stresului oxidativ și perfecționarea metodelor de determinare a activității antioxidante totale a plasmăi și serului uman.

Abstract

Cardiovascular disease are the major cause of mortality and morbidity in the world. Clinic expression of atherosclerosis is coronary heart disease – stable angina, unstable angina, myocardial infarction and sudden cardiac death. All these involve a great need for research in cellular myocardial metabolism and molecular

***Adresa de corespondență:** Elena Bobescu, Spitalul Clinic Județean de Urgență Brașov, Clinica de Cardiologie, Str. Independenței nr 1, 500157 Brașov
Tel.: 0268425701, Fax:0268470318, E-mail: elena_bobescu@yahoo.com

mechanisms. The role of oxidative stress in cardiovascular disease was evaluated by both experimental and clinical studies. In this context the most accepted in atherosclerosis is hypothesis of endothelial dysfunction because of multiple aggression factors. Endothelial dysfunction could be produced by mechanic, viral or bacterial factors, toxic exposure, high level of metabolites, turbulent blood flow, all this aggression are followed by atherosclerosis. These atherosclerotic lesions could be aggravated by metabolic stress – hyperglycemia and hypercholesterolemia and oxidative stress. Mediators produced in response to major cardiovascular risk factors including advanced glycation end-products, LDL and ox-LDL, angiotensin II and cytokines such as TNF- α stimulate generation of reactive oxygen species at endothelial level by a variety of enzymatic and non-enzymatic sources. Oxidative stress biomarkers are biomarkers of antioxidants depletion and specific markers: lipid peroxidation products, protein and ADN oxidative degradation products. Lipid peroxidation is a complex process, started from the beginning of atherosclerosis. Peroxide assay could be loss of substrate and total or partial peroxide measurements. Impossibility to obtain an ideal assay to determinate lipid peroxidation was followed by complex evaluation of oxidative stress and development of total antioxidant activity assays.

Bolile cardiovasculare sunt principala cauză de mortalitate și morbiditate în lume. Ateroscleroza la nivel coronarian are ca expresie clinică boala cardiacă ischemică manifestată ca angină stabilă, angină instabilă, infarct miocardic acut sau moarte subită. Aceasta impune o mai bună cunoaștere a mecanismelor moleculare și metabolismului celular al miocardului a cărui afectare ischemică reprezintă patologia cu cel mai mare impact asupra stării de sănătate a populației adulte și vârstnice⁵.

În condițiile în care patogeneza aterosclerozei este explicată prin ipoteza disfuncției endoteliale datorate răspunsului complex la agresiune, rolul stresului oxidativ și al sistemelor antioxidante în bolile cardiovasculare reprezintă un subiect de cercetare fundamentală și clinică¹³. Disfuncția endotelială este rezultatul agresiunii prin agenți virali și microbieni (Herpes virus, Citomegalovirus, Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori), expunerea la toxine (fumul de țigară), nivele înalte ale metabolitelor (glucoza, homocisteina), factori mecanici - fluxul turbulent de sânge la bifurcația arterelor, accentuat de valori înalte ale tensiunii arteriale¹. Leziunile pot fi agravate de stresurile metabolice cum sunt hiperglicemia și hipercolesterolemia și de stresul oxidativ. Factorii majori de risc cardiovascular – dislipidemia, hipertensiunea, diabetul zaharat, fumatul, vârsta înaintată, stresul psihic și fizic, prin intermediul mediato-

rilor ce apar ca răspuns la acești factori de risc – oxLDL¹⁷, produși de glicare avansată, angiotensina II, TNF α , - stimulează la nivelul endoteliului vascular sistemele enzimatice și neenzimatice răspunzătoare de generarea speciilor reactive ale oxigenului (SRO): ciclooxigenaze, lipooxigenaze, Citocrom P450, NAD(P)H oxidaza, xantin oxidaza, lanțul respirator la nivel mitochondrial, NO sintetaza^{14,15} și epuizează sistemele endogene de apărare antioxidantă – enzimatice: superoxid-dismutaze, catalaze, glutathion peroxidaze și neenzimatice: glutathion, α -tocoferol, ascorbat. SRO devin astfel al doilea mesager transmițând semnale extracelulare care modulează expresia genelor implicate în bolile cardiovasculare, cum sunt cele ale moleculelor de adeziune, gene proliferative, citokine, metaloproteinaze³⁻⁷.

Generarea SRO este o consecință a metabolismului aerob. Stresul oxidativ este definit ca situația în care se produce un dezechilibru între producția de specii reactive ale oxigenului SRO respectiv specii reactive ale azotului (SRN) și apărarea antioxidantă. Speciile reactive ale oxigenului includ radicali liberi ai oxigenului: superoxid($O_2^{\bullet-}$), hidroxil, ($OH^{\bullet}$), peroxil ($RO_2^{\bullet}$), Alkoxil ($RO^{\bullet}$), hidroxiperoxil ($HO_2^{\bullet}$) dar și non-radicali derivați din oxigen: peroxid de hidrogen (H_2O_2), acidul hipocloros (HOCl), ozonul (O_3), oxigen singlet ($^1\Delta g$), peroxinitrit

(ONOO⁻). Un radical liber este definit ca o specie reactivă care are capacitatea de existență independentă și conține unul sau mai mulți electroni nepereche. Un electron nepereche este un electron ce ocupă singur un orbital atomic sau molecular. Existența unuia sau mai multor electroni nepereche, conferă radicalilor liberi un grad variabil de reactivitate dependent de structura chimică^{2,7}.

Speciile reactive ale oxigenului sunt implicate în patogenia a peste 100 de afecțiuni ale speciei umane, prin agresiune asupra tuturor tipurilor de biomolecule - ADN, proteine, carbohidrați, lipide și asupra metabolismului celular fără a se putea preciza care este ținta primară a stresului oxidativ deoarece degradări ale ADN apar înainte de modificări detectabile ale peroxidării lipidelor și degradărilor oxidative proteice - acestea fiind dependente de sensibilitatea metodei de determinare⁹.

Agresiunea la nivel celular inclusiv la nivelul celulei miocardice și endoteliale este urmată de:

- eliberarea acidului arahidonic, formarea peroxizilor (prin activarea lipooxigenazelor, ciclooxigenazelor);

- descompunerea peroxizilor în peroxil/alcoxil radicali realizând inițierea și propagarea peroxidării lipidice și degradarea proteinelor membranare de vecinătate;

- inactivarea prin produșii de peroxidare lipidică- peroxil/alcoxil radicali, aldehide (în special hidroxinonenal-HNE) a receptorilor celulari de suprafață pentru hormoni, citokine, enzimelor implicate în metabolismul celular - glucozo-6-fosfataza, glicerol-3-fosfat-acil transferaza- și în menținerea balanței ionice transmembranare - Ca²⁺ ATP-aza din reticulul endoplasmic, Na⁺, K⁺ ATP-aza¹⁰;

- oxidarea grupărilor -SH ale canalelor transmembranare bogate în metiononă prin produșii de peroxidare lipidică- peroxil/alcoxil radicali;

- eliberarea ionilor metalici din situsurile de depozit (Fe²⁺, Cu²⁺) stimulând conversia

H₂O₂ la OH[•], a peroxizilor lipidici la RO₂[•]/RO[•] și reacții de autooxidare¹⁶;

- eliberarea proteinelor hem din mioglobină, hemoglobină, citocromi; proteinele hem reacționează cu peroxizii stimulând agresiunea prin radicali liberi (dacă peroxizii sunt în exces) și eliberează Fe²⁺ și hem care descompun peroxizii în RO₂[•]/RO[•];

- interacțiunea cu sistemul de apărare antioxidantă: consumarea GSH și ascorbatului din celule și consumarea ascorbatului din fluidele extracelulare¹¹;

- conversia xantin-dehidrogenazei în xantin-oxidază în țesuturi, cu producerea efectelor sistemice, creșterea nivelului hipoxantinei conducând la întreruperea metabolismului energetic¹²;

- leziuni mitocondriale, accentuarea scurgerilor de electroni cu formarea O₂^{•-};

- creșterea Ca²⁺ intracelular cu stimularea nucleazei- Ca²⁺ dependente și nitric-oxid-sintetazei Ca²⁺/calmodulin- dependente eliberând mai mult NO[•] cu formarea ONOO⁻.

Biomarkerii stresului oxidativ sunt biomarkeri de depleție antioxidantă: status antioxidant total; antioxidanți specifici; specii antioxidante derivate ex: radical ascorbat, produși de oxidare ai acidului uric² și markeri specifici: produși de peroxidare lipidică : peroxizi, oxisteroli, lipide clorinate sau nitrate, malon-dialdehidă(MDA), hidroxi-nonenal (HNE), aldehide, izoprostani, izoleucotriene; produși de degradare oxidativă a proteinelor: formare de carbonil, aldehide, oxidare de tirozină, triptofan, histidină, metionină, lizină, leucină, izoleucină, valină, nitrare sau clorinare de tirozină, triptofan, formarea de protein-peroxizi sau hidroxi; produși de degradare oxidativă a ADN - baze oxidate în celule și urină; baze nitrate sau dezaminate în celule și urină; baze legate de aldehide în celule și urină⁴.

Peroxidarea lipidelor este un proces complex prezent din faza de inițiere a aterosclerozei și se desfășoară în multiple stadii. Multe

tehnici sunt disponibile pentru măsurarea nivelului de peroxidare a membranelor lipidice, lipoproteinelor și acizilor grași. Fiecare tehnică măsoară un anumit component și nici o metodă nu poate măsura cu acuratețe peroxidarea lipidelor în ansamblu^{11,12}.

Metodele de determinare a peroxidării lipidelor:

A. Metode indirecte prin determinarea pierderilor de substrat - analiza acizilor grași prin cromatografie în gaz (GC) sau cromatografie de înaltă performanță în lichid (HPLC). Determinarea pierderilor de acizi grași nesaturați este utilă pentru evaluarea peroxidării lipidice stimulate de anumiți prooxidanți. Peroxidarea lipidelor produce pierderi de lanțuri de acizi grași astfel încât măsurarea ratei peroxidării se suprapune în principiu ratei de pierdere a acizilor grași. Sistemul studiat trebuie să fie descompus (lipidele extrase din celule sau lipoproteine) și lipidele trebuie să fie hidrolizate pentru a elibera acizii grași care pot fi măsurați prin HPLC sau convertiți în produși volatili și separați prin gaz-lichid cromatografie (GLC)¹³.

B. Metode directe de determinare totală sau parțială a peroxizilor, cantitatea de peroxizi prezentă la un moment dat în timpul peroxidării fiind dependentă nu numai de rata de inițiere a peroxidării ci și de viteza de descompunere a peroxizilor în alți produși⁷.

1. Determinarea concentrației de iod - una din cele mai vechi metode nespecifice de determinare a peroxizilor lipidici care oxidează I⁻ la I₂ ($\text{ROOH} + 2\text{I}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{I}_2 + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$). În prezența excesului de I⁻ ionul I₃⁻ poate fi măsurat la 358 nm (H₂O₂ și peroxizii proteici pot oxida I⁻ și I₂). Nivelul normal în plasma umană este 2,1-4,6 μM.

2. Oxidarea ionului feros detectată cu xilenol-orange (FOX) - metodă de determinare a peroxizilor LDL. Peroxizii oxidează Fe²⁺ la Fe³⁺ detectat cu xilenol orange cu modificarea

absorbției la 560 nm. Prin această metodă se pot detecta H₂O₂ și peroxizi proteici.

3. Determinarea glutathion peroxidazei (GPX) - GPX nu acționează asupra acizilor grași din membrane sau asupra lipidelor LDL) -GPX reacționează cu H₂O₂ și peroxizii organici oxidând GSH la GSSG. Adăugarea de glutathion reductază și NADPH pentru a reduce GSSG la GSH determină consumarea stoichiometrică a NADPH. Alternativ GSSG poate fi determinat direct prin HPLC. Valorile normale ale nivelului plasmatic de peroxizi sunt de ~ 1μM⁸.

4. Determinarea ciclooxigenaza (COX) - determinarea ratei oxidării COX stimulată de acid arahidonic prin urmele de hidroperoxizi lipidici - măsoară urme de peroxizi în fluide biologice - valori normale ale nivelelor plasmatică ~ 0,5 μM⁶.

5. Degradarea peroxizilor cu ajutorul hem-ului (după separarea HPLC) - hem-ul și proteinele cu hem descompun peroxizi lipidici cu formarea izoluminolului, care produce luminiscentă.

6. Cromatografia în gaz (GC) și spectrometria de masă (MS) pentru determinarea peroxizilor lipidici (aldehide, izoprostani, peroxizi de colesterol / esteri de colesterol) -peroxizii sunt extrași, reduși la alcooli, separați prin GC și identificați prin MS⁷.

C. Metode diverse cu aplicabilitate redusă datorită complexității tehnicilor de determinare și cuantificare a rezultatelor.

1. "Spin trapping"- metodă de determinare prin interceptarea radicalilor intermediari în reacții în lanț (radicali RO•, RO₂•)

2. Emisie de lumină - peroxizii lipidici (oxigen singlet, carbonil excitat) emit de nivele reduse de chemiluminiscentă a căror intensitate este proporțională cu concentrația de radicali liberi și intensitatea stresului oxidativ.

3. Conjugarea dienelor. Oxidarea acizilor grași polinesaturați (PUFA) este însoțită de formarea dienelor conjugate cu absorbția de lumina ultravioletă (UV) în intervalul 230-235 nm. Această metodă este utilă în studiile pe lipi-

de pure și lipoproteine izolate¹³.

D. Evaluarea produșilor finali de peroxidare lipidică

1. Testul acidului tiobarbituric (TBA) este unul dintre cele mai vechi teste in vitro pentru determinarea peroxidării lipidice măsurând malondialdehida (MDA) liberă. De fapt MDA este formată numai în mică parte prin peroxidarea lipidelor cea mai mare parte provenind din peroxidarea microzomilor hepatici în prezența sărurilor de Fe. MDA se produce prin peroxidarea PUFA cu mai mult de două duble legături, cum sunt acidul linolenic, arahidonic și docosahexaenoic. MDA se poate forma și prin metabolismul eicosanoidelor.

MDA reacționează în testul TBA formând un produs colorat roz în mediu acid, care absoarbe lumina la 532 nm. Rapoarte recente au demonstrat că MDA este puternic genotoxic, carcinogenic și mutagenic. Absorbția la 532 nm este nespecifică pentru TBA-MDA, numeroși alți produși având vârful de absorbție la această lungime de undă. Mai specifică este fluorescența (553 nm) și determinarea directă a MDA prin cromatografie de înaltă performanță în lichid (HPLC) sau cromatografie în gaz - spectrometrie de masă (GC-MS). Un alt inconvenient este acela că MDA liberă in vivo este rapid metabolizată.

2. Izoprostani F_2 - peroxidarea PUFA produce un amestec complex de izomeri de prostaglandină. Țesuturile animale și fluidele corpului (inclusiv urina) conțin cantități mici de izoprostani- F_2 rezultați din peroxidarea acidului arahidonic din fosfolipide. Nivelul crește în condiții de stres oxidativ de exemplu în plasma și urina fumătorilor. Au mai fost descriși izoprostani E_2 și D_2 izotromboxani și izoleukotriene. Peroxidarea PUFA alții decât acidul arahidonic produce compuși izoprostani-like. Izoprostanii din urină ar putea fi astfel un marker al peroxidării pentru întregul organism.

Nici una din metodele enumerate nu reprezintă metoda ideală de evaluare a peroxidării lipidelor. Cele mai specifice metode și cele mai

greu accesibile sunt cromatografie de înaltă performanță în lichid (HPLC), cromatografie în gaz - spectrometrie de masă (GC-MS) sau determinări de anticorpi ai produșilor individuali: 4-hidroxi-2-nonenali (HNE), izoprostani sau peroxizi, fiind preferată utilizarea simultană a două sau mai multe metode⁴.

Produșii individuali ai peroxidării lipidice pot fi determinați și prin metode colorimetrice:

- hidroperoxizii linoleatului de colesterol derivă din autooxidarea linoleatului de colesterol și cuprind un amestec racemic de esteri de colesterol care au fost extrași din leziunile aterosclerotice și s-a arătat că sunt produși prin oxidarea catalizată de Cu^{2+} a LDL. Hidroperoxizii esterilor de colesterol pot fi transferați de pe LDL pe HDL și transportați de la țesuturi la ficat.

- 7-hidroperoxicoolesterol este un marker al oxidării LDL, fiind unul din cei mai stabili hidroperoxizi observați în placa aterosclerotică.

- 4-hidroxinonenal (4-HNE) este un produs al peroxidării lipidice derivat din acizi grași omega-6 polinesaturați cum este și acidul arahidonic. 4-HNE exercită efecte biologice ca citotoxicitatea, inhibarea activității factorului de creștere, genotoxicitatea și activitatea chemotactică⁴.

Creșterea generării ROS/RNS in vivo poate conduce la depleția unuia sau mai multor antioxidanți. Pierderea antioxidanților individuali (cum sunt ascorbatul sau GSH) și generarea produșilor lor de oxidare (radical ascorbil, GSSG sau alantoina) pot fi măsurate ca index al stresului oxidativ. Depleția antioxidantă nu determină obligatoriu disfuncții sau leziuni oxidative și poate fi urmată de stimularea mecanismelor de apărare¹⁰.

Imposibilitatea obținerii unei metode ideale de determinare a peroxidării lipidice și a degradării oxidative a proteinelor și ADN au impus evaluarea complexă a stresului oxidativ și perfecționarea metodelor de determinare a activității antioxidante totale a plasmelor și serului uman.

Metode de determinare a activității anti-oxidante totale

1. Metoda TRAP (total peroxy radical trapping antioxidant parameter) determină peroxidarea lipidelor endogene sau exogene în fluidele biologice prin expunerea la azo-inițiatori; poate fi aplicată tuturor fluidelor, poate măsura preluarea de O_2 de către electrodul de oxigen sau detecta $RO_2^\bullet$ direct de exemplu prin chemiluminescență; poate fi utilizată pentru a studia antioxidanții ca epuratori de $RO_2^\bullet$; poate folosi proteine ca țintă măsurând formarea de carbonil proteic sau inactivarea enzimatică prin $RO_2^\bullet$.

2. Metoda Phycoerytrin - principiul metodei: reacția cu $RO_2^\bullet$ (sau $OH^\bullet$) determină pierderea fluorescenței; metoda folosește de obicei emisia la 565 nm, excitația la 540 nm; phycoerytrin este o proteină fotosintetizată în algele roșii conținând 34 grupuri prostetice tetrapirrol legate covalent conferind absorbanta maximă la 372, 497, 566 nm și fluorescența maximă la 578 nm.

3. Metoda-ABTS (2, 2'azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonat): ABTS este oxidat la un radical cation $ABTS^{\bullet+}$ cu metmioglobina și H_2O_2 cu absorbanta la 660, 734 și 820 nm; metoda rapidă, rapid automatizată; măsurarea la lungime de undă înaltă evită interferența cu cele mai multe biomolecule; poate fi aplicată la LDL de aceea este metoda cel mai des folosită în evaluarea clinică a stresului oxidativ. Este metoda folosită pentru determinarea statusului antioxidant total care cuprinde toate componentele biologice cu activitate antioxidantă. Principiul metodei constă în incubarea ABTS® [2, 2'azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonat)] cu o peroxidază - metmioglobina și H_2O_2 pentru a produce radicalul cation $ABTS^{\bullet+}$. Acesta are o culoare verde-albastru stabilă care este măsurată la 600 nm. Antioxidanții din proba adăugată determină supresia acestui produs colorat cu un grad proporțional cu concentrația lor ².

4. Metoda FRAP (abilitatea de reducere

a Fe) - determină abilitatea antioxidantilor plasmatici (vitamina E, urat, ascorbat, dar nu albumina) de a reduce Fe. (III) la Fe^{2+} la pH scăzut; rapid automatizată; măsoară reducerea abilității de a epura radicalii liberi.

În toate aceste metode un radical este generat și epurat de către antioxidanți. Când au fost epuizate sistemele antioxidante radicalul reacționează cu o moleculă țintă pentru a produce culoare, fluorescență, chemiluminescență, pierdere sau câștigare de semnal de rezonanță spin de electroni, sau alte modificări observabile. Celelalte metode sau dezvoltat folosind variate surse de radicali liberi și diferite tipuri de detectori de molecule^{7,13}.

Sistemul de apărare antioxidantă are multe componente. O deficiență a oricărei componente poate reduce a statusului antioxidant total al individului. Metodele de determinare a capacității antioxidante totale în lichidele biologice sunt utile în măsurarea activității antioxidante relative și a modificărilor apărute în condiții clinice. Când ROS/RNS sunt generați in vivo intervin mulți antioxidanți. Importanța lor depinde de ROS/RNS generați, modul de generare, locul și ținta agresiunii oxidative⁸.

Bibliografie

1. Ambrosio G, Becker LC, Hutchins GM et al. - Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathophysiology of reperfusion injury - *Circulation*, 1986; 74:1424-1433.
2. Ames, BN et al. - Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer. A hypothesis - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981; 78: 6858-6862.
3. Andalibi A, Liao F, Lines G, et al. - Oxidized lipoproteins influence gene expression by causing oxidative stress and activating the transcription factor NFkB - *Biochem Soc Trans*, 1993;21:651-655.
4. Bourasa MG, Tardif JC. - Antioxidants and cardiovascular disease, 2nd Edition, 2006, New York, Springer Science, Business Media, Inc,

- 131-165
5. Braunwald E. - Application of current guidelines to the management of unstable angina and non-ST-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2003;108:28111-28137.
6. Dhalla NS, Elmoselhi AB et al. Status of Myocardial antioxidants in ischemia reperfusion injury. *Cardiovascular Res* 2000; 47: 446-456.
7. Halliwell B and John M. C. Gutteridge.- Free radicals in biology and medicine, third edition, 1999, New York, Oxford University Press Inc, 351-425.
8. Halliwell, B. - Antioxidant characterization. Methodology and mechanism- *Biochem. Pharmacol.* 1995, 49: 1341-1351.
9. Halliwell, B and Gutteridge, JMC. -Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-8.
10. Halliwell, B and Gutteridge, JMC - The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990; 280: 1-9.
11. Navab, M. - The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak- *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996;16: 831-838.
12. Parthasarathy, S et al. - The role of oxidized LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu. Rev. Med.*, 1992; 43: 219-226.
13. Rice-Evans, CA. - Techniques in Free Radical Research. 1991, Amsterdam, Elsevier, 3-64.
14. Ross, R. - The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s- *Nature*, 1993; 362: 801-809.
15. Steinberg D. - Oxidative modification of LDL and atherogenesis-*Circulation*, 1997; 95:1062-1071.
16. Wattanapitayakul SK, Bauer JA.- Oxidative pathways in cardiovascular disease: Roles, Mechanisms, and therapeutics implication- *Pharmacol Ther*, 2001; 89: 187-206.
17. Young SG, Parthasarathy S.-Why are low density lipoproteins atherogenic? - *West J Med.* 1994; 160:153-164.