

بررسی اثر مارگارین پردازش شده بر میزان نشانه‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی نر جوان

زهرا سالمی*

استادیار بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

*اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک

Zsalemi @ ibb.ut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۸۹/۵/۱۱، پذیرش: ۸۹/۸/۲)

چکیده - استرس اکسیداتیو، مشکل عمده قرن و سرچشمه پیدایش بیماری‌های گوناگون، از آب مروارید تا سرطان است. استرس اکسیداتیو زمانی ایجاد می‌شود که میزان رادیکال‌های آزاد در بدن، از میزان آنتی‌اکسیدان‌ها بیشتر باشد. برخی مطالعات بر این موضوع دلالت دارند که مارگارین، به دلیل داشتن اسیدهای چرب ترانس، مولد رادیکال‌های آزاد بوده و در افزایش نشانه‌های استرس اکسیداتیو مؤثر است. اما مطالعات دیگر با تأکید بر وجود افزایش‌دهنده‌های آنتی‌اکسیدان، مانند آلفا و بتا کاروتن، ویتامین D، C و به‌ویژه ویتامین E به مارگارین، نشان داده‌اند که مصرف مارگارین در حذف رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو مؤثر است. گزارشات متناقض، ما را بر آن داشت که آثار مارگارین را بر استرس اکسیداتیو بررسی کنیم. به این سبب دو گروه کنترل و آزمایش، هر یک شامل ده موش نر، از نژاد ویستار به مدت ۴ ماه، به ترتیب با غذای استاندارد و غذای استاندارد همراه با ۱۵ درصد مارگارین، تغذیه شدند و آثار آن با سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و میزان گروه‌های تیول پروتئین‌های پلاسما، ارزیابی شد. نتایج نشان می‌دهد که ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما ($P < 0.05$) و میزان گروه‌های تیول پروتئین‌های پلاسما در موش‌های تغذیه شده با مارگارین، بیش‌تر از موش‌های کنترل است، هم‌چنین میزان پراکسیداسیون لیپیدی در موش‌های دریافت کننده مارگارین کم‌تر از گروه کنترل است. نتایج بالا نشان‌دهنده تأثیر مثبت مارگارین بر کاهش نشانه‌های استرس اکسیداتیو است و به نظر می‌رسد که تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی، با مصرف مارگارین غنی شده، در کاهش آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد مؤثر است.

کلیدواژه‌گان: مارگارین، استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان، موش‌های صحرایی.

۱- مقدمه

رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی هستند که به سبب دارا بودن یک یا چند الکترون جفت نشده، از فعالیت زیادی برخوردارند و به دلیل داشتن تک الکترون، هنگام گردش خون، می‌توانند به ماکرومولکول‌های حیاتی جانداران مانند DNA، لیپیدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها متصل شده و آسیب جبران ناپذیری وارد کنند [۶]. در افراد سالم، بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی‌اکسیدان بدن تعادل مناسبی وجود دارد. بروز اختلال در این تعادل، سبب ایجاد استرس اکسیداتیو شده و این مسأله، تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد را در پی دارد [۱۷].

برخی مطالعات نشان می‌دهد که روغن‌های گیاهی پردازش شده مانند، مارگارین در غذا، می‌تواند منشاء تولید رادیکال‌های آزاد در بدن باشد. علت این مسأله، وجود مقادیری ایزومر غیرطبیعی ترانس در اسیدهای چرب موجود در مارگارین است که در خلال هیدروژناسیون روغن‌های گیاهی در دمای بالا، ایجاد می‌شود [۱۳]. اسیدهای چرب ترانس، نه تنها به دلیل افزایش پراکسیداسیون لیپید، میزان تولید رادیکال‌های آزاد را افزایش می‌دهند، بلکه موجب پیدایش آثار بدی بر الگوی لیپوپروتئین‌های پلازما می‌شوند [۱۲]. اولین گزارش‌ها در مورد اثر زیان‌بار اسیدهای چرب ترانس در سال ۱۹۹۰ منتشر شد [۱۳]. پس از آن مطالعاتی دیگر این آثار را اثبات کرد [۱۵ و ۲۱].

درعین حال، مطالعاتی دیگر، حاکی از آن است که علاوه بر سیستم دفاع شیمیایی و بیوشیمیایی بدن برای کنترل و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی نیز که به صورت افزودنی، به مارگارین اضافه می‌شوند، می‌توانند

با انتقال الکترون به رادیکال‌های آزاد، آن‌ها را به شکل پایدار تبدیل کرده و از آثار زیان بار این مولکول‌ها بکاهند [۱۶]. آنتی‌اکسیدان‌های اصلی شیمیایی عبارتند از ویتامین‌های A، E، C، آلفا و بتا کاروتن، فلاونوئیدهای طبیعی، یوبی‌کینون، سلنیوم، روی و ترکیبات پلی فنلی موجود در چای سبز در اغلب موارد برای کاستن از رادیکال‌های آزاد و کاهش علامت‌های استرس اکسیداتیو، برخی از این ترکیب‌ها آنتی‌اکسیدان قوی، مانند ویتامین‌های A، E، C و آلفا و بتاکاروتن به مارگارین تجاری افزوده می‌شود [۴، ۵، ۶] این آنتی‌اکسیدان‌های بیوشیمیایی، نه تنها رادیکال‌های آزاد را جارو می‌کنند، بلکه تشکیل آن‌ها را در بدن مهار می‌کنند [۱۴] بنابراین استفاده از غذا و گیاهان غنی از آنتی‌اکسیدان و مارگارین غنی شده می‌تواند در کاهش میزان نشانه‌های استرس اکسیداتیو و حذف رادیکال‌های آزاد ایجاد شده از طریق اسیدهای چرب غیراشباع موجود در آن، مفید باشد [۲۰]. با توجه به گزارشات متناقض در این زمینه، هدف از این تحقیق، بررسی اثر مصرف مارگارین بر میزان نشانه‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی نر جوان است.

۲- مواد و روش‌ها

این مطالعه، در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک روی موش‌های صحرایی نر ۵ ماهه، از نژاد ویستار، با وزن بین ۳۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. گروه کنترل، شامل ده عده موش، به مدت ۴ ماه، از غذای استاندارد تهیه شده با شرکت دانه پارس تهران تغذیه شدند. در حالی که ده موش گروه آزمایش، در خلال این مدت، همراه با غذای استاندارد، میزان (w/w) ۱۵٪

شاخص برای بررسی فرایند لیپید پراکسیداسیون محسوب می‌شود. انکوآسیون نمونه‌های مورد مطالعه، در دمای 59°C با مصرف تیوبار بیتوریک اسید (TBA) انجام می‌شود که منجر به تشکیل کمپلکس MDA-TBA می‌شود که صورتی رنگ است و بیشینه جذب نوری آن در محدوده طول موج ۵۳۵ تا ۵۳۲ نانومتر است [۵ و ۴].

ج- اندازه‌گیری گروه‌های تیول پروتئین‌های پلاسما:

اینروش در سال ۱۹۹۴ توسط HU ابداع شده است. با توجه به این‌که گروه‌های تیول پلاسما به آسیب اکسیداتیو حساس بوده و در نتیجه این آسیب‌ها کاهش می‌یابند، می‌توانند به‌عنوان علامت آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد محسوب شوند. همان‌طور که اشاره شد، برای ارزیابی گروه‌های تیول از روش کالری‌متری HU و از معرف DTNB (۲ و ۲ دی نیتروبنزوتیک اسید یا همان معرف Ellman) استفاده شد. گروه‌های تیول در دمای اتاق با DTNB کمپلکس زرد رنگی ایجاد می‌کنند که در طول موج ۴۱۲nm، بیشینه‌ی جذب را داراست [۹].

د-آزمونهای آماری مورد استفاده:

محاسبات آماری، پس از جمع‌آوری داده‌ها، با استفاده از برنامه کامپیوتری SPSS انجام شد و آزمون t مستقل، برای ارزیابی معنی‌دار بودن تفاوت مشاهده شده بین میانگین پارامترهای مورد مطالعه انجام شد. $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

نتایج آماری نشان داد که میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما در موش‌های تغذیه شده با مارگارین 178 ± 99.0 و در موش‌های گروه کنترل، 163 ± 79.6 نانومول بر میلی‌لیتر است. میزان P در این تست کم‌تر از

مارگارین دریافت کردند. برای حذف احتمال اکسیداسیون لیپیدی مارگارین در خلال تغذیه، مارگارین روزانه به غذا اضافه و با آن مخلوط می‌شد و مازاد غذای مصرف نشده، پس از گذشت ۲۴ ساعت برداشته و حذف می‌شد.

پس از گذشت ۴ ماه تغذیه، موش‌ها به‌مدت ۱۲ ساعت، ناشتا نگهداشته شدند و از هر کدام، ۵ میلی‌لیتر خون (از بطن راست) گرفته شد. پلاسمای خون جدا شد و با انجام آزمایش‌های زیر، میزان آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما، پراکسیداسیون لیپید و گروه‌های تیول پروتئین‌های پلاسما اندازه‌گیری شد.

الف- روش FRAP یا اندازه‌گیری ظرفیت

آنتی‌اکسیدان تام پلاسما (1996 Benzi و Stain):

FRAP روشی حساس، تکرارپذیر و دقیق است [۱۰]. در این روش، عوامل آنتی‌اکسیدان موجود در نمونه مورد مطالعه سبب تبدیل کمپلکس "فریک تری پیریدیل تریازیل" به فرم "فرو" می‌شود، که در محیط اسیدی، آبی رنگ بوده و بیشینه جذب نوری آن در طول موج ۵۹۳nm است. سرعت واکنش با قدرت احیاکنندگی نمونه رابطه خطی دارد [۱۱].

ب- اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید

(1996 Kelly و Brown):

اسیدهای چرب غیراشباع موجود در فسفولیپیدها و کلسترول استریفیه، در اثر فرایند اکسیداسیون، به لیپید هیدروپراکسید و نهایتاً رادیکال‌های لیپید پروکسی تبدیل می‌شوند که طی واکنش‌های زنجیره‌ای، رادیکال‌های آزاد، قادر به وارد ساختن صدمات جدی به سلول‌ها و بافت‌های بدن هستند. علاوه بر این، تجزیه لیپید هیدروپراکسیدها منجر به تشکیل مقادیر زیادی مالونیل دی آلدئیل (MDA) می‌شود. به‌همین دلیل اندازه‌گیری غلظت MDA در نمونه‌های بیولوژیک به‌عنوان مهم‌ترین

۴- بحث

در این کار تحقیقی، تأثیر مصرف مارگارین بر میزان نشانه‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی نر جوان بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که موش‌هایی که به مدت ۴ ماه همراه با رژیم غذایی استاندارد، میزان (w/w) ۱۵٪ مارگارین مصرف کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل، دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های تام پلاسما بیشتری هستند و همچنین میزان گروه‌های تیول پلاسما در آن‌ها بالاتر است. (جدول ۱)

در ارتباط با اثر مارگارین بر نشانه‌های استرس اکسیداتیو، گزارش‌های زیادی وجود دارد. مطالعات Seis و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان داد که رادیکال‌های آزاد در بدن، به‌طور طبیعی و از تجزیه ترکیبات شیمیایی مختلف، از جمله مواد غذایی ایجاد می‌شوند. مصرف روغن‌های گیاهی پردازش شده و حرارت دیده در دماهای بالا، انتقالی مانند بیسکویت، چیپس، کیک، غذاهای آماده، اسنک و سیب زمینی سرخ شده، منبع اصلی ایجاد رادیکال‌های آزاد است [۱۷]. رادیکال‌های آزاد از سم‌زدایی برخی داروها، رنگ‌ها، اسانس‌های مصنوعی، دود، مواد نگهدارنده، غذاها، الكل، سیگار، آب آشامیدنی کلردار، حشره‌کش‌ها، تشعشع، مایعات پاک‌کننده، فلزات سنگین مانند سرب، کادمیوم و هیدروکربن‌های آروماتیک مانند بنزن و نفتالین نیز ایجاد می‌شوند. استرس روحی نیز با رها کردن هورمون‌ها در بدن، سهم عمده‌ای در ایجاد رادیکال‌های آزاد دارد [۱۶].

همان‌طور که اشاره شد، مصرف مارگارین نیز موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. در هر حال رادیکال‌های آزاد تولید شده از منابع مختلف در بدن در شرایط عادی با آنتی‌اکسیدان‌های موجود در بدن خنثی

۰/۰۵ بوده و اختلاف معنی‌داری وجود دارد (معنی‌دار بودن اختلاف با ستاره روی جدول مشخص شده است) بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که موش‌هایی که مارگارین دریافت کرده‌اند، دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدان بالاتری نسبت به گروه کنترل هستند.

نتایج آماری در مورد میانگین پراکسیداسیون لیپیدی در موش‌های تغذیه شده با مارگارین، $1/6 \pm 2/7$ و در موش‌های کنترل $2/9 \pm 4/7$ ، نانومول بر میلی‌لیتر است. هر چند اختلاف معنی‌دار نیست ولی میزان پراکسیداسیون لیپیدی در موش‌های تغذیه شده با مارگارین نسبت به گروه کنترل پایین‌تر است.

در مورد مقایسه میانگین گروه‌های تیول پروتئین‌های پلاسما، به ترتیب مقادیر $0/28 \pm 0/69$ و $0/5 \pm 0/59$ برای موش‌های تحت آزمایش و گروه کنترل به‌دست آمده است (جدول ۱) معنی‌دار نبودن اختلاف به منزله عدم تفاوت است.

طبق نتایج حاصل، می‌توان ادعا کرد که مصرف مارگارین در موش‌ها از میزان علامت‌های استرس اکسیداتیو در مقایسه با گروه کنترل، کاسته است.

جدول ۱ وضعیت پارامترهای استرس اکسیداتیو در گروه‌های مورد مطالعه

پارامترهای استرس اکسیداتیو	گروه کنترل ۱۰ موش (انحراف معیار \pm میانگین)	گروه آزمایش ۱۰ موش (انحراف معیار \pm میانگین)
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما (نانومول در میلی‌لیتر)	796.0 ± 163	990.5 ± 178
گروه‌های تیول پلاسما (نانومول در میلی‌لیتر)	0.59 ± 0.5	0.69 ± 0.28
پراکسیداسیون لیپیدی (نانومول در میلی‌لیتر)	4.7 ± 2.9	2.7 ± 1.6

(معنی‌دار بودن اختلاف با ستاره روی جدول مشخص شده است).

خوراکی در درمان پلاک‌های آترواسکلروتیک و کاهش انعقاد خون مؤثر است [۱۱].

آلفا توکوفرول، گیرنده چربی‌های رادیکالی است و از این طریق به واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های چربی خاتمه می‌دهد و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان اثر خود را اعمال می‌کند. در این واکنش‌ها، یک رادیکال کم انرژی آلفا توکوفرول تشکیل می‌شود که دیگر نمی‌تواند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کند. این فرم رادیکالی ویتامین E توسط ویتامین C به‌وضعیت اولیه‌اش بر می‌گردد. و از آن پس دوباره فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را از سر می‌گیرد. علاوه بر این، ویتامین E می‌تواند از پروتئین‌های غشایی حاوی سلنیوم یا سولفور محافظت کند. با وجود غلظت کم ویتامین E در اپیدرم، که حدود ۱nmol/g است، این ترکیب مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان محلول در چربی موجود در غشا محسوب می‌شود. تأثیر مثبت ویتامین E بر پوست بدن و محافظت آن در برابر نور، به‌خاطر عملکرد آن در جذب نور و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد است. تحقیقات نشان داده است که غلظت‌های پلاسمایی بالای توکوفرول در سالمندان، می‌تواند آن‌ها را در برابر عفونت‌ها و سرطان مقاوم‌تر کند [۳].

بنابراین مارگارین دارای تأثیر بد، به‌دلیل وجود اسید چرب ترانس و تأثیر خوب به‌دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف به‌ویژه ویتامین E است. امروزه کارخانه‌های تولید کننده مارگارین برای کاهش و یا حذف اسیدهای چرب ترانس تلاش کرده‌اند و این تلاش منجر به تهیه مارگارین خوب شده است. نوع خوب مارگارین، همان نوع مایع است که به‌مراتب از کره بهتر است و در عین حال به‌دلیل تهیه شدن از روغن‌های گیاهی، قیمت آن پایین است. با وجود تناقض در ایجاد و یا حذف رادیکال‌های آزاد با مارگارین، مطالعه حاضر نشان داد که گرچه مارگارین در

می‌شوند و استرس اکسیداتیو زمانی بروز می‌کند که میزان رادیکال‌های آزاد تولید شده بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدان بدن باشد [۱۸]. با توجه به این‌که میزان رادیکال‌های آزاد در بروز استرس اکسیداتیو مؤثر است، برای ارزیابی آن می‌توان میزان رادیکال‌های آزاد موجود در بدن را اندازه‌گیری کرد ولی به‌دلیل پایین بودن نیمه عمر رادیکال‌ها، اندازه‌گیری آن‌ها با دستگاه ESR مشکل و پرهزینه است. بنابراین برای ارزیابی استرس اکسیداتیو می‌توان نشانه‌های این پدیده را بررسی کرد [۶].

با توجه به تأثیر منفی اسید چرب موجود در مارگارین بر استرس اکسیداتیو، کارخانه‌های سازنده، به غنی‌سازی آن مبادرت می‌ورزند و معمولاً ترکیباتی چون آلفا و بتا کاروتن، ویتامین C، A و مهم‌تر از همه ویتامین E به آن می‌افزایند. مطالعه صورت گرفته در سال ۱۹۹۸ به بررسی تأثیر این افزودنی‌ها به مارگارین، در وضعیت آنتی‌اکسیدانی افراد پرداخته، نتیجه تحقیق حاکی از آن است که مصرف این ترکیبات در فرم غنی شده مارگارین، به‌عنوان جزئی از رژیم غذایی، تا حد زیادی در افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در خون تأثیر گذاشته است [۱۹].

از میان ترکیبات آنتی‌اکسیدان افزوده شده به مارگارین، ویتامین E اهمیت به‌سزایی دارد. فرم فعال این ویتامین یعنی آلفا و گاما توکوفرول و البته بیش‌تر فرم آلفا، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی فعالیت می‌کنند. آلفا توکوفرول به‌طور طبیعی در غشای سلول‌ها و ارگان‌های سلولی حضور دارد و با خنثی کردن رادیکال‌های اکسیژن از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع موجود در ساختمان فسفولیپیدهای غشا جلوگیری می‌کند و غشا را در برابر صدمات ناشی از فسفولیپاز A، اسیدهای چرب آزاد و لیزوفسولیپیدها محافظت می‌کند. لذا ویتامین E

- tocopherols, ascorbyl Palmitate, and lecithin on antioxidation of fish oil. AO CSJ. 75(7), 813-823.
- [8] Hras AR, Hadolin M, Knez Z, Bauman D. 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with alfa-tocopherol. Ascorbyl Palmitate, and citric acid in Sunflower Oil. Food Chemistry J. 71, 229-233.
- [9] Hu ML, Dilard CJ. 1994. Plasma SH and GSH measurement. Method in Enzymology 233, 381-385.
- [10] Iris, F, Benzig F, Stain S. 1996. The ferric reducing ability of Plasma FRAP a measure of antioxidant Power the FRAP assay. Ana. Biochem. 239, 70-76.
- [11] Iris F, Benzig, F, Stain S. 1999. Reducing antioxidant assay. Method in Enzymology. 222, 15-27.
- [12] Katan M.B, Mensink RP, Zock PL. 1995. Trans fatty acids and their effect on lipoproteins in humans. Annu. Rev. Nutr. 15, 473-493.
- [13] Mensink RP, Katan M.B. 1990. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. N. Engl. J. 323, 439-445.
- [14] Montagnier O, Pasquir E. 1998. Oxidative Stress in Cancer, Aids and
- ایجاد رادیکال آزاد نقش دارد ولی غنی‌سازی آن با آنتی-اکسیدان‌های مناسب، به‌ویژه ویتامین E، سبب حذف رادیکال‌های آزاد و کاهش پارامترهای استرس اکسیداتیو می‌شود.

۵- مراجع

- [1] Bandarra NM, Campos RM, Batista I, Nunes M.L, Empi JM. 1999. Antioxidant synergy of α -tocopherol and phospholipids. Aocs J. 76(8), 905-913.
- [2] Chu YH, HsU HF. 1999. Effects of antioxidants on peanut oil stability. Food Chemistry J. 66, 29-34.
- [3] Draelos Z. 1999. Vitamins & their cutaneous effects. Cosmetic Dermatol. 9, 17-20.
- [4] Esterabeur H, Cheeseman k. 1990. Determination of aldehyds lipid Peroxidation Products. Method in Enzymology 186, 407-421.
- [5] Hai-D vargo JS. 1995. Effects of an organophosphate on the antioxidant system of fish tissues. Acta-Biol. J. 46(1), 39-50.
- [6] Hallwell B, Gutteridge JMC. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch. Biochem. Biophys. 280,1-3.
- [7] Hamilton RJ, Kula C, MCNeill GP, Padley FB, Pierce, JH. 1998. Effects of

- [20] Yanishlieva NU, Marinova EM. 1996. Antioxidant effectiveness of some natural antioxidants in Sunflower oil. *Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung and Forshong*. 203, 220-223.
- [21] Zock PL, Katan MB. 1992. Hydrogenation alternatives: effects of trans fatty acids and Stearic acid versus linoleic acid on Serum lipids and lipoproteins in humans. *J. Lipid Res*. 33, 339-410.
- Neuro-degenerative diseases. Markdekker Inc. New york, 20, 153-155.
- [15] Nestel P, Noakes M, Belling B. 1992. Plasma lipoprotein and LP(a) changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. *J. Lipid Res*. 33, 1029-1036.
- [16] Roberto giraldo MD. 1997. Aids and stressors. *Fundation Artery ciencia* 1, 20-25.
- [17] Seis, H. 1991. *oxidative Stress: Oxidants and antioxidants*. Academic Press 2, 1-10.
- [18] Siro Passi A. 1998. Progressive increase in Oxidative stress in advancing human immunodeficiency. *Continum J*. 5, 15-20.
- [19] Van Het Hof K H, Tijburg LB, deBoer HS, Wiseman SA, Weststrate TA. 1998. Antioxidant fortified margarine increases the antioxidant status. *Eur- J- Clin- Nutr*. 52(4), 292-299.