اثر ایسکمی پرفیوژن مجدد بر میزان تغییرات ویتامین E در خون وریدی و بافت کلیوی موش صحرایی

سیمین آریامنش Ph.D.☆♦، مهدیه فقیهی Ph.D.☆، مهری کدخدائی Ph.D.☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۷۳۱۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

* **هدف:** بررسی اثر ایسکمی پرفیوژن (IR: Ischemia-Reperfusion) (۳۰ دقیقه ایسکمی و ۱۰ دقیقه پرفیوژن) از طریق بستن و باز کردن شریان کلیه بر موقعیت آنتی‌اکسیدانی بافت و پلاسمای ورید کلیوی

* **مواد وروشها:** موشهای صحرایی نر با میانگین وزن ۴۰ ± ۲۶۰ گرم به طور تصادفی به دو گروه کنترل و ایسکمی-پرفیوژن مجدد (n= ۷) تقسیم شدند. در گروه کنترل ۷۰ دقیقه پس از باز کردن شکم خون ورید کلیوی و بافت کلیه برداشته شد و در گروه IR ۳۰ دقیقه پس از باز کردن شکم به مدت ۳۰ دقیقه ایسکمی (بستن شریان کلیه) و ۱۰ دقیقه پرفیوژن مجدد (باز کردن شریان فوق) داده شد. سپس خون ورید کلیوی و بافت کلیوی برداشت شد. ویتامین E به‌عنوان آنتی‌اکسیدان اندوژن در پلاسمای ورید کلیوی و بافت کلیه پس از استخراج توسط دستگاه HPLC (High Perfarmance Liquid Chromatography) اندازه گیری شد.

* **نتیجه‌گیری:** به طور کلی بدن برای مبارزه با رادیکالهای آزاد اکسیژن حاصل از ایسکمی -پرفیوژن از آنتی‌اکسیدانهای اندوژن استفاده می‌کند و اندازه گیری این فاکتورها می‌تواند برای نشان دادن موقعیت اکسیداتیو یک بافت مفید باشد.

گل واژگان: ایسکمی، پرفیوژن مجدد، کلیه/ ورید کلیوی، ویتامین E

مقدمه

حضور اکسیژن در محیط برای بقای زندگی موجودات زنده روی کرهٔ زمین به‌عنوان منبع انرژی ضروری است. با وجود این، رساندن دوبارهٔ این مولکول حیاتی به ناحیهٔ فاقد خون اثرهای مخربی بر عضو می‌گذارد. در طی سالهای اخیر مطالعات بسیاری دربارهٔ آثار مخرب خونرسانی مجدد (ری‌پرفیوژن) متعاقب قطع خون (ایسکمی) در اندامهای مختلف صورت گرفته است (۱، ۲، ۳). در این ارتباط رادیکالهای آزاد به‌عنوان عامل تشدیدکنندهٔ ضایعات بافتی و اختلال عمل اندامها مطرح شده‌اند (۴). یکی از مهمترین عوامل ایجاد IR در کلیه عمل جراحی و پیوندکلیه است. در پیوندکلیه، بافت به ناچار مدت طولانی در خارج از بدن می‌ماند که رادیکالهای آزاد اکسیژن در طی این مدت در آن تجمع کرده و موجب تخریب کلیه‌ها می‌شوند. آسیب اکسیدانتی به سه علت ایجاد می‌شود:

۱) تولید اضافی رادیکالهای آزاد اکسیژن، ۲) کاهش آنتی‌اکسیدانها، ۳) هر دو مورد. چون آنتی‌اکسیدانها باعث خارج کردن متابولیتهای اکسیژن سمی می‌شوند؛ در کم کردن آسیب حاصل از IR نقش مؤثری دارند(۵).

از مدتها قبل ویتامین E به‌عنوان آنتی‌اکسیدان محلول در چربی که باعث پایدار کردن چربیهای غیراشباع علیه اکسیداسیون خودبه‌خودی می‌شود، شناخته شده بود. توافق همه‌جانبه‌ای در این مورد که ویتامین E دارای عمل حفاظتی مشابهی در بافتها است، وجود دارد. ویتامین E باعث پاک شدن رادیکالهای آزاد از محیط هیدروفوب می‌شود (۶، ۷).

مکانیسم مهم عمل آنتی‌اکسیدانی ویتامین E شامل غیرفعال کردن یک رادیکال (R) به‌وسیلهٔ یک مولکول ویتامین E (α توکوفرول (TOCH)) طی دو واکنش زیر است (۸):

واکنش ۱: $TOCH + R \rightarrow RH + TOC^{\cdot}$ و به دنبال آن پاک کردن رادیکال دوم به‌وسیله α توکوفروکسیل رادیکال (TOC) تشکیل شده در واکنش اول است.

واکنش ۲: محصولات غیررادیکالی $\rightarrow R^{\cdot} + TOC^{\cdot}$ رادیکالهای آزاد به‌وسیلهٔ روندهای طبیعی متابولیسمی یا از فاکتورهای خارجی و عواملی مثل تشعشعات، مواد سمی شامل آلاینده‌های محیطی، دود سیگار، مواد سرطان‌زا و مولکولهای اکسیژن فعال مشتق از نوتروفیلهای تحت شرایط ایسکمی ـ پرفیوژن مجدد، تولید می‌شوند. این رادیکالهای آزاد با اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلولی واکنش کرده و منجر به شکسته شدن ترکیبات سلولی و درنهایت تخریب سلول می‌شوند (۹). به‌نظر می‌آید وقتی که ویتامین E جذب بدن می‌شود، در غشای سلول بافتهای مختلف با رادیکالهای آزاد و احتمالاً با مواد حدواسط اکسیدان واکنش می‌دهد. به این ترتیب ویتامین E، غشاهای سلولی را با متوقف کردن واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد حفظ می‌کند (۹). طی پیوندکلیه و اعضای دیگر، عضو مورد پیوند به مدت طولانی در خارج از بدن بدون خونرسانی باقی می‌ماند. این عمل باعث رهایش رادیکالهای آزاد اکسیژن می‌شود. پرفیوژن مجدد به جای بهبودی، آسیب اولیهٔ حاصل از القای ایسکمی بلند مدت را تشدید می‌کند و ممکن است منجر به تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن شود. بنابراین تعیین تغییرات ویتامین E بافتی و پلاسمایی طی ایسکمی پرفیوژن مجدد برای روشن کردن مکانیسم اثر آن در مبارزه با رادیکال آزاد طی پیوند بافتی مهم است. در مطالعهٔ حاضر دو آزمایش برای مشخص کردن اثر IR روی مقدار ویتامین E بررسی شدند. در یک آزمایش سعی شد که اثر IR بر مقدار ویتامین E اندوژن پلاسمای خون وریدکلیه و در آزمایش دیگر اثر IR روی سطح ویتامین E بافت کلیه بررسی شود. نتایج این آزمایشها می‌تواند راهگشایی برای حفظ بافت در مقابل ضایعات ناشی از IR باشد.

مواد و روشها

* وسایل

دستگاه کروماتوگرافی مایع باکارکرد عالی با فاز معکوس از شرکت واترز میلی‌پور (ماس، میلفورد) شامل پمپ با سیستم کنترل کننده (E ۶۰۰)، پیش ستون نوواپک C_{18}، ستون نوواپک C_{18} استیل با اولترااسفیر ODS[1] (۴μm) (۳۰۰mm × ۳/۹)، آشکار کننده (دتکتور) uv و کامپیوتر تحلیل‌گر اطلاعات بود. برای اندازه‌گیری ویتامین E (α توکوفرول) از طول موج ۲۹۲ نانومتر استفاده شد.

حساسیت دتکتور برابر ۰/۰۱ با فیلتر ۱ بود. تزریقات به‌وسیلهٔ سرنگ هامیلتون ۱۰۰ μl واترز میلی‌پور انجام شد. وسایل دیگر شامل سانتریفوژ یخچال‌دار (سوفر ـ آمریکا)، انکوباتور (هیروس)، هموژنایزر دستی پیرکس و وسایل جراحی بود.

* مواد شیمیایی

مواد شیمیایی شامل ویتامین E (α توکوفرول) و ویتامین E استات (α توکوفرول استات) به ترتیب به‌عنوان استاندارد خارجی و داخلی، بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن[2]، سدیم دودسیل سولفات (SDS)[3]، هگزان، اتانول، متانول و استونیتریل مخصوص HPLC، کلاژناز B و پروتئاز K، کتامین هیدروکلرید و کلروپرومازین هیدروکلراید برای تزریق زیرصفاقی و اتیلن ـ دی‌نیترو تترااستیک اسید (EDTA)[4] بود.

محلول غلیظ استاندارد α توکوفرول و α توکوفرول استات در اتانول ۱۰۰ درصد تهیه و در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد به دور از نور برای ۳ ماه نگهداری شد. قبل از آزمایش جذب نوری ویتامین E استاندارد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد. سپس غلظتهای مختلف استاندارد (۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰ میکرومول) توسط اتانول ۱۰۰ درصد که محتوی BHT نیز بود تهیه شد.

از محلول EDTA برای جلوگیری از انعقاد خون در سرنگ استفاده می‌شد. محلول پروتئاز با مخلوط کردن ۱۰۰ mg از پودر پروتئاز با ۱۰ml از فسفات بافر نمکی سرد[5] و محلول کلاژناز با

1. Octa Desyl Silyl
2. Butylated Hydroxy Toluene
3. Sodium Dodecyl Sulfate
4. Ethylene Diamine Tetraatic Acid
5. Phosphate Buffer Saline

مخلوط کردن ۵۰۰mg از پودر کلاژناز با ۱۰ml از PBS سرد تهیه شدند (۱۰، ۱۱).

۱ ml از محلول ۲۰ درصد SDS-H_2O که قبلاً در فریزر ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شده بود، با ۱۹ ml از اتانول ۱۰۰ درصد توسط ورتکس مخلوط شد که در حرارت اتاق برای مدت ۵ روز قابل نگهداری است بلافاصله قبل از مصرف به آن BHT (W/V ۰/۱ درصد) افزوده شد. محلول فاز متحرک[1] شامل متانول، استونیتریل، هگزان (V/W) (cc ۸۵ : ۱۰ :۵) بود که قبل از مصرف فیلتر شد. محلول BHT در ۱۰۰ درصد اتانول (۰/۱۲۵ درصد) و در هگزان (۰/۰۲۵ درصد) تهیه شد (۲۱، ۲۲، ۲۳).

از α توکوفرول استات برای کنترل کمی آزمایشها استفاده شد.

* روش اجرا

در این بررسی از دو گروه کنترل جراحی و گروه ایسکمی - پرفیوژن مجدد (IR) استفاده شد. هر گروه شامل ۷ موش صحرایی نر سفید با وزن ۳۰۰-۲۲۰گرم بود که به طور تصادفی انتخاب شدند و در شرایط دسترسی آزاد به آب و غذا و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. مادهٔ بیهوشی به کار رفته شامل کتامین هیدروکلراید (۵۰ mg/kg/ml) و کلروپرومازین هیدروکلراید (۲۵ mg/kg/ml) با تزریق داخل صفاقی بود.

گروه کنترل

در این گروه حیوان فقط مورد عمل جراحی قرار گرفت. به این ترتیب که روی شکم بدون آسیب رسیدن به اندام داخلی برش طولی و عرضی داده شد. محل زخم با گاز آغشته به محلول نمکی ۰/۹ درصد مرطوب و در زیر نور چراغ برای حفظ حرارت بدن در دمای اتاق قرار داده شد. پس از ۷۰ دقیقه (برای تطابق زمانی با گروه دیگر)، ابتدا خون وریدکلیهٔ راست به کمک سرنگ ۲ml آغشته به EDTA کشیده شد و به درون لوله شیشه‌ای ۱۰ml منتقل گردید.

لوله‌های حاوی خون به مدت ۲۰ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند سپس پلاسما را به‌وسیله سمپلر به درون لوله‌های ۲ml ریخته و در فریزر °۲۰- سانتی‌گراد و به دور از نور تا زمان استفاده، نگهداری شدند. کلیه‌های راست هم بلافاصله پس از خونگیری از بدن جدا شده و پس از جدا کردن کپسول و چربی از آنها، در PBS سرد شسته و سپس با قرار دادن در آلومینیوم فویل در فریزر °۲۰- سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

گروه IR

این گروه نیز مورد عمل جراحی قرار گرفتند. ابتدا شکم ۳۰ دقیقه بازمانده، بعد به‌وسیله گیره (کلامپ) سرخرگ کلیهٔ راست به مدت ۳۰ دقیقه بسته شده (ایسکمی) و پس از ۱۰ دقیقه پرفیوژن، خون سیاهرگ کلیهٔ راست به‌وسیله سرنگ حاوی EDTA و کلیهٔ راست هم توسط عمل جراحی از محل ناف جدا و در مورد آنها نیز مانند گروه کنترل عمل شد.

استخراج ویتامین E از پلاسما

استخراج ویتامین E از پلاسما با استفاده از روش آرنود و همکاران انجام شد (۱۲). کلیه مراحل استخراج در زیر نور کم و منتشر صورت گرفت. همچنین برای جلوگیری از اکسیداسیون چربیها از BHT استفاده شد (۱۳).

استخراج ویتامین E از بافت کلیه

روش استخراج ویتامین E از بافت کلیه روش تغییریافتهٔ پنگ و همکاران است (۱۰، ۱۱). مزیت این روش به روش صابونی شدن در استخراج ویتامین E، استخراج مقدار بیشتری از میکرونوترینت‌ها از مقدار کم بافت است.

تهیه فاز متحرک برای دستگاه HPLC

۸۵ ml از متانول را با ۱۰ ml از استونیتریل (برای جداسازی بیشتر پیکها (۲۴) و ۵ ml هگزان مخلوط و به‌وسیله فیلتر آبی آلی ۰/۲۲μm توسط پمپ خلأ فیلتر شد. سرعت خروج فاز متحرک برابر ۱ml/min و حجم محلول تزریق شده به دستگاه ۵۰μlHPLC بود. اندازه‌گیری بر اساس مقدار ویتامین E برحسب میکرومول در لیتر بود.

* روش آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها

بااستفاده از منحنی استاندارد خارجی مقادیر ویتامین E (برحسب میکرومول در لیتر) در بافت و پلاسمای نمونه‌ها اندازه‌گیری و میانگین مقادیر ویتامین E در گروه کنترل با گروه IR به روش student t test مستقل مقایسه شد و $P<0.05$ با اهمیت به حساب آمد.

یافته‌ها

در این مطالعه میزان ویتامین E در خون وریدی و بافتی کلیهٔ راست در دو گروه کنترل و گروه ایسکمی - پرفیوژن مجدد (IR) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج زیر بدست آمد.

جدول ۱ نشان دهندهٔ مقادیر ویتامین E (میانگین ± خطای استاندارد) در بافت و پلاسمای خون وریدکلیه در گروههای کنترل و IR است.

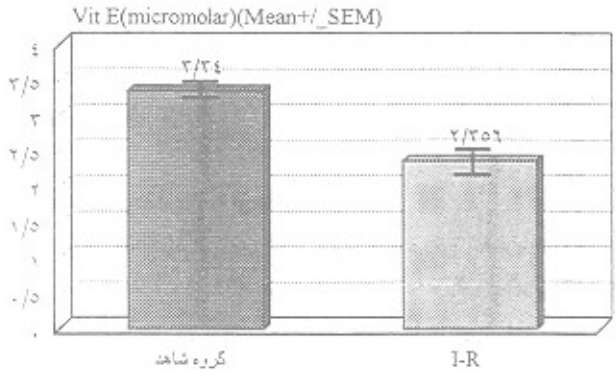
جدول ۱: تعیین غلظت ویتامین E در بافت و پلاسمای خون وریدی کلیه در گروههای کنترل و تحت ایسکمی - پرفیوژن مجدد

گروه	ویتامین E به میکرومولار (Mean±SE)
کنترل پلاسما	۳/۳۴۰ ± ۰/۱۹۶۰
IR پلاسما	۲/۳۵۶ ± ۰/۰۶۲۸
کنترل بافت	۳/۲۹۲ ± ۰/۲۸۰۳
IR بافت	۱/۹۱۴ ± ۰/۱۵۷۴

نمودار ۱ میانگین مقادیر ویتامین E به در بافت کلیهٔ راست در گروه

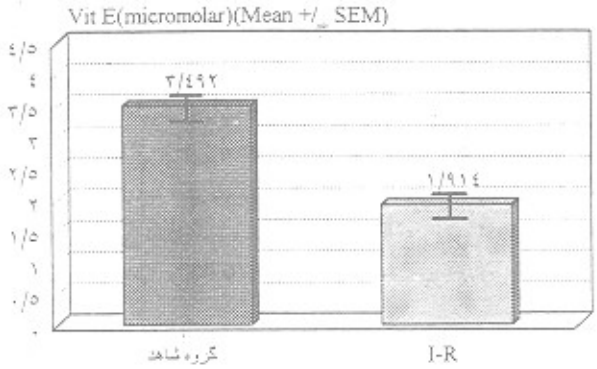
1. Mobile phase

IR نسبت به گروه کنترل با P<0.0004 کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد.



نمودار ۱: اثر ایسکمی - پرفیوژن مجدد (IR)بر غلظت ویتامین E بافت کلیهٔ موش صحرایی و مقایسه آن با گروه شاهد Independent Sample t test; P=0.0004

نمودار ۲ میانگین مقادیر ویتامین E در پلاسمای خون ورید کلیه راست در گروه IR نسبت به گروه کنترل با P<0.0002 کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد.



نمودار ۲: اثر ایسکمی - پرفیوژن مجدد (IR)بر غلظت ویتامین E پلاسمای موش صحرایی و مقایسه آن با گروه شاهد Independent Sample t test; p=0.0020

شکل ۱: کروماتوگرام استخراج ویتامین E از پلاسمای خون ورید کلیهٔ راست در گروه کنترل (منحنی ۱ نمایانگر ویتامین E، منحنی ۲ ناشی از ویتامین E استات و بقیه منحنی‌های ناخواسته هستند)

شکل ۱ و ۲ نشان دهندهٔ مقایسهٔ کروماتوگرامهای ویتامین E استخراج شده از پلاسما در گروه کنترل و گروه IR است. زمان بازدارندگی ویتامین E در هر دو گروه یکسان است ولی ارتفاع و سطح زیر منحنی پیکها در گروه IR (شکل ۲) کمتر از گروه کنترل است (شکل ۱). این مطلب در مورد کروماتوگرام ویتامین E در بافت کلیه صدق می‌کند.

شکل ۲: کروماتوگرام استخراج ویتامین E از پلاسمای خون ورید کلیهٔ راست در گروه (IR) (منحنی ۱ نمایانگر ویتامین E، منحنی ۲ ناشی از ویتامین E استات و بقیه منحنی‌های ناخواسته هستند)

بحث

هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی اثر ایسکمی - پرفیوژن مجدد بر موقعیت آنتی‌اکسیدانی بافت و پلاسمای ورید کلیهٔ موش صحرایی و مقایسهٔ آن با گروه کنترل بود. بنابراین میزان ویتامین E بافتی و پلاسمایی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان اندوژن به‌وسیله دستگاه HPLC پس از استخراج از بافت و پلاسما اندازه‌گیری شد. این مطالعه نشان داد که میزان ویتامین E در بافت و پلاسمای ورید کلیه در گروه IR نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیر و معنی‌داری دارد. این بدان معنی است که در اثر ایسکمی پرفیوژن مجدد رادیکالهای آزاد اکسیژن در بافت و پلاسمای ورید کلیه تجمع کرده و بدن برای مبارزه با آن از آنتی‌اکسیدانهای اندوژن خود (ویتامین E به‌عنوان اندکس پراکسیداسیون چربی) استفاده کرده است.

نتایج مطالعات تاکنون نشان می‌دهند که عمل ویتامین E (α توکوفرول) ممانعت یاکاستن از تخریب پراکسیداتیو القا شده توسط رادیکال آزاد در سیستمهای بیولوژیکی است. زیرا ویتامین E به‌عنوان اولین یا تنها آنتی‌اکسیدان اندوژن علیه پراکسیداسیون زنجیره‌ای چربی در نظر گرفته می‌شود. بنابراین، کاهش ویتامین E در پلاسما یا بافت می‌تواند مربوط به مصرف آن در موقع پاکسازی رادیکالهای آزاد در غشا باشد. چنین کاهشی توسط مطالعات متعددی در اندامهای مختلف گزارش شده است (۷، ۱۴، ۱۵). مطالعهٔ حاضر هم کاهش معنی‌داری در میزان ویتامین E بعد از ایسکمی پرفیوژن مجدد بر کلیهٔ موش صحرایی نشان می‌دهد. البته یو و همکاران هیچ گونه تغییر معنی‌داری در میزان ویتامین E گروه IR نسبت به گروه کنترل در بافت مغزی گزارش نکردند (۱۶).

از طرف دیگر؛ مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که ۳۰ دقیقه ایسکمی و پس از آن ۱۰ دقیقه پرفیوژن می‌تواند مقدار ویتامین E را در پلاسما و

در بافت نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش دهد، در حالی که دفرین و همکاران فقط دو زمان ۱۵ و ۶۰ دقیقه ایسکمی و به دنبال آنها ۱۰ دقیقه پرفیوژن را بررسی و گزارش کرده بودند که میزان ویتامین E فقط بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی و ۱۰ دقیقه پرفیوژن نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داده است (۱۷).

در طی ایسکمی - پرفیوژن مجدد منابع متعددی ممکن است مسؤول تولید رادیکال آزاد اکسیژن باشند. این منابع می‌تواند شامل تغییرات انتقال الکترون در میتوکندری، متابولیسم اسید آراشیدونیک، فعالیت گزانتینی اکسیداز، کتکول‌آمینها و اکسیداسیون هموگلوبین و رهایش تودهٔ آهن باشد.

به نظر می‌رسد لوکوسیتها به خصوص نوتروفیلهای پلی‌مورفونوکلئر عامل دیگری برای تولید رادیکال آزاد اکسیژن در موقع IR باشند زیرا در اثر فعال شدن، این سلولها می‌توانند عناصر اکسیژن سمی و ترکیبات کلردار به درون محیط خارج سلولی رها کنند.

در مطالعهٔ حاضر که برای اولین بار در ایران انجام شده است، از دستگاه فاز معکوس اندازه‌گیری فشار بالا (HPLC) برای اندازه‌گیری ویتامین E در شرایط استرس اکسیداتیو استفاده شده است و مطالعات دیگر هم نشان‌دهندهٔ اهمیت این دستگاه برای اندازه‌گیری اثر رادیکال هیدروکسیل در ایسکمی است (۱۳، ۱۸).

همان طور که بران و همکارانش گزارش کرده‌اند، تغییرات ویتامین E می‌تواند به طور غیرمستقیم نشان دهندهٔ پراکسیداسیون چربی در حین IR باشد. بنابراین ویتامین E به‌عنوان پارامتر مهمی برای ارزیابی اثر داروها در داخل بدن معرفی می‌شود (۱۹).

ایسکمی - پرفیوژن مجدد روی قلب موش صحرایی موجب کاهش آنتی‌اکسیدانهای غیرآنزیمی شده است (۲۰). بنابراین طی پیوند کلیه که دورهٔ طولانی از ایسکمی را می‌گذراند، متابولیسم اکسیژن می‌تواند منجر به تولید رادیکال آزاد و کاهش ویتامین E شود (۲۱). بنابراین در این مطالعه هم از فاکتور ویتامین E برای نشان دادن موقعیت استرس اکسیداتیو بافتی و خونی استفاده شده است. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که این اطلاعات می‌تواند عامل زیربنایی خوبی برای مطالعات آینده برای کاهش آسیب حاصل از رادیکال آزاد قبل یا هنگام شروع پیوند کلیه باشد.

References

1. Fisher AB, Dodia C, Agene I, al Mehdi A: Ischemia reperfusion injury to the lung. Ann NY Acad Sci 1994; 723: 197-207
2. Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M: The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin - 1beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. J Surg Res 2001; 99 (1): 134-141
3. Khanna A, Rossman JE, Fung HL, Caty MG: Intestinal and hemodynamic impairment following mesenteric ischemia/reperfusion. J Surg Res 2001; 99(1): 114-119
4. Kadkhodaee M, Hanson RG, Tower AR, Endre HZ: Detection of hydroxyl and carboncenterd Radicals by EPR spectroscopy after ischemia and reperfusion of the rat kidney. Free Rad Res 1996; 25(1): 31-42
5. Das DK, Maulik N: Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. Met Enzymol 1994; 233: 601-610
6. Sinatra ST, De Marco J: Free radicals, Oxidative stress, Oxidized low density lipoprotein (LDL) and the heart: antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. Conn Med 1995; 59(10): 579-588
7. Martin A, Zulueta J, Hassoun P, Plumberg JB, Meydani M: Effect of vitamin E on hydrogen peroxide production by human vascular endothelial cells after hypoxia/reoxygenation. free Radic Biol Med 1996; 20(1): 99-105
8. Kontush A: Antioxidant and prooxidant activity of α-tocopherol. J Lipid Res 1996; 37: 1441-1447
9. Yoshikawa T, Yasuda M, Ueda S, Naito Y, Tanigawa T, Oyamada H, Kondo M: Vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischemia reperfusion. Am J Clin Nutr 1991; 53: 210S-214S
10. Peng YS, Peng YM: Simultaneous liquid chromatographic determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human buccal mucosal cells. Cancer Epidemiol Biomarkers & prev 1992; 1: 375-382
11. Peng Yei. Mei, peng yeh-shan, Lin yonggu: A non saponification method for the determination of carotenoids. retinoids, and tocopherols in solid human tissues. Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 1993; 2: 375-382
12. Arnuaud J, Fortis I, Blachiers: Simultaneous determination of retinol, α-tocopherol and ß-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography (HPLC). J Chromatogr 1991; 572: 103-116
13. Lang KJ, Gohil K, Packer L: Simultaneous determination of toccopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. Analyt Bioch 1986; 157: 106-116
14. Miwa K, Igawa A, Nakagawa K, Hirai T, Inoue H:

Consumption of vitamin E in coronary circulation in patients with variant angina. Candio Vasc Res 1999; 41(1): 291-298

15. Kuroda T, Shiohara E: Leukocyte and platelet depletion protects the liver from damage induced by cholestasis and ischemia reperfusion in the dog. Scand J Gastroenterol 1996; 31(2): 182-190

16. Yue TL, Barone FC, Gu JL: Brain α-tocopherol levels are not altered following ischemia/reperfusion-induced injury in rats and gerbils. Brain Res 1993; 610(1): 53-56

17. Defraigne JO, Pincemail J, Franssen C: *In vivo* free radical production after cross clamping and reperfusion of the renal artery in the rabbit. Cardivasc Surg 1993; 1(4): 343-349

18. Hu O, Feng YP: HPLC-detection of Hydroxylradicals in striatum extracellular fluid in rats subjectedto reperfusion after central ischemia and the action of vitamin E. Yoo-Hsuch-Hsuch-Pao 1993; 28(5): 337-341

19. Bron Am, Moupoil V, Garcher G, Guyonnet G, Chelqi EH, Rochette L: Modification of vitamin E during ischemia reperfusion in rat retina. Invest ophthalmol Vis Sci 1995; 36(6): 1084-1087

20. Palace V, Kumar D, Hill MF: Regionaal differences in non-enzymatic antioxiidants in the heart under control and oxidative stress conditions. J Mol Cell Cardiol 1999; 31(1): 193-202

21. Pincemail J, Defraigne JO: Evidence for free radical formation during human kidney transplantation. Free Radical Biochem Med 1993; 15: 343-348