

TENTATIVES PHARMACOLOGIQUES ET NUTRITIONNELLES POUR CORRIGER LE STRESS OXYDATIF

par

M.E.J. LEAN¹ ET J. BURNS*

INTRODUCTION

Le stress oxydatif est largement accepté comme étant un composant critique de plusieurs – peut-être de la plupart – des voies pathologiques. Il est particulièrement lié au développement des maladies coronariennes (MC), des accidents vasculaires cérébraux (AVC), des cancers et à la maladie d'Alzheimer [1-4]. Le diabète aussi bien de type 1 que 2, est caractérisé par une augmentation de l'activité des radicaux libres et une réduction des défenses antioxydantes [5]. Le diabète est associé à une augmentation du risque de MC et d'AVC, ce qui est en partie expliqué par l'association avec l'hypertension et les dyslipidémies. Il est possible que l'augmentation de quelques-uns de ces hasards résultent de l'augmentation du stress oxydatif. La fonction endothéliale est altérée dans le diabète [6] et les antioxydants sont connus pour servir de médiateurs dans la fonction endothéliale en favorisant la synthèse de NO [7, 8], réduisant la destruction de NO en réprimant les superoxydes [9, 10] et probablement d'autres mécanismes.

Le diabète est aussi associé à la cataracte, qui est un processus oxydatif, et au déclin intellectuel auquel le stress oxydatif peut contribuer par le biais de plusieurs infarctus ou indépendamment. Les liens entre la micro-angiopathie et le stress oxydatif sont plus compliqués mais le processus de glycation non enzymatique doit certainement y contribuer. La glycation par elle-même est une réaction oxydative, bloquée in vitro par les antioxydants.

Si la théorie reliant le stress oxydatif à la maladie est correcte et si le stress oxydatif est augmenté dans le diabète, alors on est en droit de s'attendre à une augmentation du risque de cancer chez les patients diabétiques. Jusqu'à récemment, étant donné la survie relativement courte des patients diabétiques, les banques de données n'étaient pas assez larges pour explorer cette question. Cependant, des preuves maintenant disponibles d'un grand nombre d'articles indiquent réellement une augmentation de l'incidence des cancers (revue in [11]). Sur cette base, il y a de bonnes raisons d'explorer les moyens de réduire le stress oxydatif, en particulier chez les patients diabétiques.

¹University of Glasgow, Department of Human Nutrition, Glasgow Royal Infirmary, Glasgow, Royaume-Uni.
Traduit de l'anglais par le Docteur Catherine Alamovitch.

IDENTIFICATION DU STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif dû aux radicaux libres entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines de l'ADN ou des lipides. La mesure de leurs produits oxydatifs est difficile et la méthodologie imparfaite, mais ceux-ci apportent des indicateurs du stress oxydatif, qui peuvent être, de façon mécanistique, reliés aux développements de la maladie. En fin de compte, le but des interventions pour corriger le stress oxydatif est de réduire le risque ou l'incidence des maladies coronariennes, des AVC, etc., et même de la mort.

Oxydation des protéines

La fonction et l'activité des protéines sont profondément affectées par n'importe quelle altération de leur structure complexe – particulièrement l'oxydation. En général, les protéines oxydées sont inactives et sont rendues particulièrement vulnérables à l'action des protéinases. Dans ces conditions d'augmentation du stress oxydatif, les cellules peuvent être incapables d'éliminer l'accumulation des protéines oxydées par protéolyse, ce qui conduit aux dégâts protéiques observés dans le diabète (fig. 1).

FIG. 1. — Marqueurs quantitatifs du stress oxydatif.

Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines. Les carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives à l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés. Histidine, proline, arginine et lysine sont particulièrement prédisposées à cette attaque. La formation de nitrotyrosines est due au peroxy-nitrite hautement toxique, produit par la réaction de l'oxyde nitrique et de superoxyde. Les carbonyles protéinés et les nitrotyrosines sont tous les deux très stables et ne sont généralement pas retrouvés chez les patients, faisant d'eux des marqueurs biologiques utiles et fiables.

Oxydation de l'ADN

Comme les protéines, l'ADN est vulnérable aux dégâts oxydatifs, mais il existe des mécanismes enzymatiques sophistiqués pour réparer les dégâts sur l'ADN [12]. Sans de tels mécanismes, la stabilité génomique serait très faible. La plupart des dégâts oxydatifs sur l'ADN sont ainsi corrigés sans créer de maladie, mais les dégâts sur l'ADN peuvent être utilisés comme marqueurs du stress oxydatif. Les dégâts sur l'ADN peuvent résulter en des cassures de brins, des enchaînements croisés protéines-ADN et des modifications de bases. Chacune de ces réactions est potentiellement mutagène et peut bloquer la réplication de l'ADN. Ces facteurs peuvent en partie expliquer l'augmentation du risque retrouvée chez les patients diabétiques.

Le marqueur biologique de l'oxydation de l'ADN le plus largement utilisé est la détection de bases modifiées. Les quatre bases d'ADN peuvent être endommagées par l'attaque des radicaux libres mais la plus étudiée est la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est formée à partir de l'attaque des radicaux hydroxyles sur la déoxyguanosine. Un large panel de techniques est employé pour détecter et quantifier la 8-OHdG, dont l'HPLC qui est la plus fréquente. Cependant la plupart des premiers travaux dans ce domaine ont été remis en question à cause de problèmes expérimentaux et méthodologiques. Un rapport récent sur la comparaison des différentes méthodes pour mesurer la 8-OHdG a trouvé que parmi les groupes utilisant l'HPLC, les résultats variaient de $\pm 40\%$ de la valeur correcte [13]. Cependant cette approche reste largement utilisée pour estimer les dégâts oxydatifs sur l'ADN in vivo. Les acides nucléiques oxydés peuvent être détectés dans l'ADN des cellules sanguines [12] et aussi dans les urines. En effet, l'excrétion urinaire de 8-OHdG a été rapportée chez des personnes diabétiques [14].

Une autre méthode pour détecter l'oxydation de l'ADN est l'électrophorèse sur gel d'une cellule unique ou dosage de la "comète". En utilisant cette méthode, il est possible de quantifier la protection envers un stress oxydatif standard à partir d' H_2O_2 dans des cellules intactes, comme les lymphocytes, qui peuvent être prétraités avec des anti-oxydants possibles ou pris chez des sujets après exposition diététique. Donc, bien que cette méthode soit indirecte, elle a quelque validité écologique et s'applique aux cellules vivantes intactes.

Peroxydation lipidique

L'oxydation des lipoprotéines est probablement l'un des nombreux indices de stress oxydatif, récemment les plus étudiés. Le coût humain et économique toujours croissant des maladies coronariennes a conduit à des investigations approfondies sur les facteurs de risque associés. Il est maintenant bien établi que l'athérosclérose – un composant majeur de la pathogenèse des MC – est due à l'association d'une hyperlipidémie et à l'oxydation des lipoprotéines. Les

LDL oxydées ne sont pas reconnues par le LDL récepteur, et sont éliminées par les monocytes et le cholestérol est finalement déposé dans la paroi artérielle.

Quand les lipides sont attaqués par les espèces réagissant à l'oxygène, un radical carbone est formé qui, ensuite, réagit avec un radical peroxy et génère des peroxydes lipidiques. Ceci conduit à une réaction en chaîne et à une oxydation plus étendue et rapide. Un certain nombre de méthodes est disponible pour la détection et la quantification du niveau de dégâts. Ces approches sont utilisées en même temps que les techniques de chromatographie (HPLC et GCMS) pour séparer les composés à titrer d'intérêt prioritaire. Les principaux marqueurs de la peroxydation lipidique sont les substances réagissant aux malonaldéhyde/acide thiobarbiturique, aux diènes conjugués, aux hydroperoxydes lipidiques et aux isoprostanes. Alors que ces dosages sont valables pour les travaux in vitro, des problèmes peuvent survenir quand ils sont utilisés pour des analyses in vivo.

INTERVENTIONS (PHARMACOLOGIQUES ET NUTRITIONNELLES) POUR REDUIRE LE STRESS OXYDATIF

Ce n'est pas du ressort des études cliniques d'explorer l'impact d'une intervention sur " des points finals sûrs " à long terme mais une confirmation devrait être recherchée sur des signes d'observation. Il y a des preuves que les populations qui consomment de plus grandes quantités de fruits et de légumes ont moins de MC [15]. Une étude a trouvé moins d'infarctus du myocarde secondaires chez des patients qui avaient augmenté leur consommation de fruits et légumes [16]. Il existe plusieurs mécanismes pour expliquer cela, mais ces résultats sont compatibles avec les bénéfices d'une plus grande consommation d'antioxydants. Des preuves chez les patients diabétiques manquent. On peut prédire moins de glycation protéinée chez des personnes qui consomment plus d'antioxydants, mais de telles preuves ne sont pas disponibles et la protection contre la glycation apportée par les antioxydants alimentaires sera probablement dépassée par l'hyperglycémie.

Diverses d'approches existent pour étudier l'effet de l'apport de suppléments antioxydants sur les marqueurs des dégâts oxydatifs. La première étape doit être des cultures cellulaires poussées et des études animales. Ceci a été mis en évidence par des travaux récents sur l'effet de l'apport de suppléments de β -carotène chez les fumeurs, où l'intervention diététique avec un antioxydant bien connu a eu de sérieux effets délétères sur la santé de ceux enrôlés dans l'essai. Seulement, lorsque des études animales auront été menées avec un possible effet négatif de(s) composé(s) en question, des interventions sur l'homme pourront démarrer.

L'effet d'une intervention diététique ou d'un apport de supplément sur les trois indices majeurs du stress oxydatif (c'est-à-dire les dégâts sur l'ADN, les protéines et les lipides) reste controversé. Alors que certaines études ont montré un effet protecteur par l'adjonction d'antioxydants (nutritionnels ou pharmacologiques), d'autres études ont échoué dans l'observation d'une influence significative.

Plusieurs de ces études d'interventions, à ce jour, ont examiné l'effet d'un apport supplémentaire en antioxydants bien connus, vitamines C et E, ou d'autres antioxydants comme les flavonoïdes. Cependant dans un nombre croissant d'études, plutôt que de compléter avec des formes purifiées d'un composé intéressant, les auteurs augmentent la consommation de sources diététiques appropriées. Les aliments végétaux apportent de multiples bénéfices mais ils contiennent plusieurs composés potentiellement protecteurs, ainsi attribuer le bénéfice à des vitamines antioxydantes conventionnelles est probablement une erreur.

Intervention pour réduire les dégâts oxydatifs sur l'ADN (tableau I)

Les preuves de l'influence des antioxydants apportés soit par l'alimentation soit par des suppléments, sur l'oxydation de l'ADN sont contradictoires. Une étude récente de notre groupe a été menée utilisant le "titrage comète" pour prouver la capacité des flavonols dérivés de l'alimentation de protéger des lymphocytes de diabétiques contre les dégâts oxydatifs sur l'ADN. Nous avons trouvé que de compléter un régime pauvre en flavonol avec des oignons et du thé (sources riches en flavonol) entraînait une diminution des dégâts oxydatifs sur l'ADN [17]. Une étude très similaire, utilisant également des suppléments en oignons et thé n'a pas retrouvé d'effet oxydatif sur les produits de dégradation de l'ADN dans les leucocytes [36]. Une étude italienne, qui a utilisé de la purée de tomates comme source alimentaire de lycopène et de β -carotène (et aussi de flavonols), a constaté une augmentation similaire de la résistance des lymphocytes aux dégâts oxydatifs [18].

TABLEAU I. — CONCENTRATIONS DE PRODUITS PAR DEGATS OXYDATIFS DES BASES D'ADN (PMOL/MG) DANS LES LEUCOCYTES DE SUJETS APRES UNE PERIODE DE TRAITEMENT ALIMENTAIRE PAUVRE ET RICHE EN FLAVONOL (VALEURS MOYENNES AVEC LES ERREURS STANDARDS DES 36 SUJETS)

REGIME	PAUVRE		RICHE	
	M	SEM	M	SEM
8-hydroxyguanine	31	3,3	35	4
FAPy guanine	416	81	483	88
2-hydroxyadénine	129	17	147	21
8-hydroxyadénine	38	5	45	8
FAPy adénine	95	9	99	11
5-hydroxycytosine	72	7	77	7
5-hydroxyhydantoïne	22	2	24	3
5-hydroxyméthylhydantoïne	43	5	45	6
5-hydroxyuracile	7	1	9	1
5-hydroxyméthyluracile	12	1	15	2
thymine glycol (cis + trans)	201	18	224	20
Total des produits mesurés des bases d'ADN	1037	88	1222	123

Aucune différence significative entre les traitements n'a été observée.
 FAPy guanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine ; FAPy adénine, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine.
 Pour le détail des régimes et des procédures, voir [36].

Cependant, dans une étude de 184 adultes non fumeurs, un apport à court terme de suppléments de vitamines C et E n'a pas eu d'effet significatif sur l'excrétion urinaire de 8-OHdG [19]. La même approche a été utilisée pour estimer l'apport de suppléments de rutine flavonol [20], et de nouveau aucun changement significatif des taux urinaires de 8-OHdG n'a été noté.

Il est difficile de déterminer quel effet, s'il y en a un, a l'intervention avec des antioxydants sur les dégâts sur l'ADN. La nature qualitative du dosage de la comète et les problèmes bien décrits de la mesure du 8-OHdG compliquent la question. Toutes les méthodes sont techniquement exigeantes et opérateur- dépendantes.

Intervention pour réduire les dégâts oxydatifs sur les protéines

L'influence d'un certain nombre d'antioxydants sur les dégâts protéiques a été examinée dans des études d'apports de suppléments, principalement sur des modèles de rats et il y a eu quelques essais chez l'homme.

De façon intéressante, de compléter des volontaires sains pendant 5 semaines avec de la vitamine C n'a aucun effet. Cependant, après 10 et 15 semaines de traitement, les taux de carbonyles ont été significativement abaissés [21]. Ceci suggère que les autres études, qui n'ont pas réussi à trouver une influence de l'apport de suppléments antioxydants, devraient être prolongées sur une plus longue durée. L'apport de suppléments de vitamine C prévient également des dégâts oxydatifs sur les protéines induits par la fumée de cigarettes [22]. Des études animales avec du β -carotène [23] et de l'acide α -lipoïque [24] ont aussi démontré qu'ils empêchaient les dégâts protéiques.

Intervention pour réduire les dégâts oxydatifs sur les lipides

La prise de composés phénoliques a été largement rapportée pour protéger contre le développement de maladies coronariennes. Le mécanisme d'action des composés phénoliques est en cours d'étude. Cependant, de nombreuses preuves existent montrant que les composés phénoliques peuvent prévenir l'oxydation des LDL. Généralement l'oxydation des LDL est mesurée avec une chromatographie gazeuse (CG) statique d'espace de tête de l'hexanal produit [25] ou par des changements de l'absorbance de diènes conjugués [26], formés par l'oxydation, catalysée par le cuivre, des LDL humains.

Peu d'études ont rapporté l'effet de la consommation de vin rouge sur l'oxydation des LDL in vivo. Celles qui ont été publiées ont présenté des résultats contradictoires. Une des études originales dans ce domaine comparait l'effet de la consommation de vin rouge ou de vin blanc sur la susceptibilité des LDL à l'oxydation [27]. La consommation de 400 ml par jour de vin rouge pendant 2 semaines réduisait la capacité des LDL à subir la peroxydation lipidique induite par le cuivre. Il y avait une diminution de 72 % du contenu en peroxydes lipidiques et une diminution de 54 % dans la formation des diènes conjugués. La consommation de vin blanc entraînait une augmentation de la propension des LDL à subir une oxydation. Après deux semaines de consommation de vin rouge, la concentration des phénols totaux dans les LDL augmentait de 4 fois. Aucun changement n'était noté dans les taux plasmatiques des vitamines antioxydantes E et C. Les effets protecteurs de la consommation de vin rouge ont été attribués au contenu en composés polyphénoliques, qui sont en concentration considérablement plus basse dans le vin blanc. L'effet pro-oxydant du vin blanc est peut-être le résultat de l'association du contenu en alcool du vin et l'absence de polyphénols protecteurs.

L'effet de l'alcool a été éliminé dans un travail ultérieur qui a réduit le contenu en alcool des vins rouge et blanc à 3,5 % [28]. Les sujets ont suivi un régime pauvre en flavonol pour éviter une interférence avec des phénols issus de l'alimentation. Les sujets ont bu 550 ml de vin blanc pendant deux semaines avant l'étude, ce qui a servi de période de "wash-out". Puis, ils ont consommé soit du vin rouge soit du vin blanc pendant quatre autres semaines. L'oxydation des LDL a été déterminée par la formation de diènes conjugués. Aucun effet sur l'oxydabilité des LDL n'a été observé après la consommation de l'un ou l'autre vin. Il a été supposé que le retrait de l'alcool a pu entraver l'absorption des composés phénoliques.

Une étude récente a été réalisée pour examiner les résultats contradictoires issus des groupes sus-cités [29]. Les sujets consommaient soit du vin rouge, soit une gélule de poudre de polyphénols de vin rouge, ou le même extrait dissous dans du vin blanc ou une autre boisson alcoolisée pendant deux semaines. Au terme de cette période, les taux de polyphénols plasmatiques ont augmenté de 38 % pour le vin rouge, et de 27 et 28 % pour le vin blanc contenant l'extrait et l'extrait respectivement. Le temps de retard pour l'oxydation des LDL induite par le cuivre a augmenté de 17,8 mn après le vin rouge, 14,2 mn après la gélule et 11,7 mn après le vin blanc et l'extrait. Les résultats de ce groupe confirment les effets protecteurs du vin rouge observés par le groupe israélien [27].

Nigdikar et al. [29] proposaient que le manque de protection observé dans l'étude néerlandaise [28] soit dû à des différences techniques dans l'analyse de l'oxydation des LDL. Après le recueil du plasma ou des LDL, de l'EDTA peut être ajouté pour prévenir l'oxydation en enlevant le cuivre ou le fer. L'EDTA est enlevé avant l'analyse des LDL par dialyse ou sur une colonne d'absorption. Le groupe néerlandais a cependant rajouté un excès de cuivre pour maîtriser l'effet de l'EDTA. Cette action a peut-être permis à l'EDTA présent d'inhiber l'oxydation des LDL induite par le cuivre.

De très nombreuses recherches ont aussi été réalisées sur le rôle du thé dans la prévention des dégâts oxydatifs sur les lipides. Cependant, de nouveau, des preuves contradictoires ont été rapportées. Alors que Serafini et al. [37] ont trouvé qu'à la fois le thé noir et le thé vert étaient capables d'inhiber l'oxydation des LDL, McAnlis et al. [30] et Van Het Hof et al. ont échoué à trouver un effet significatif.

Bien que des travaux complémentaires soient nécessaires, il semble qu'une intervention diététique avec des phénoliques, du lycopène alimentaire [31] et de l' α -tocophérol [32] protège réellement les lipides de dégâts oxydatifs.

Intervention pour réduire les cataractes

Des preuves épidémiologiques existent qui relient cataracte et dégénérescence maculaire lors d'une exposition à un régime pauvre en antioxydants. Spécifiquement, la vitamine C (qui se concentre dans les cristallins) semble avoir une action protectrice (ex Nhanes et al., [41]). Un certain nombre d'antioxydants ont été explorés expérimentalement, bien qu'à ce jour, il n'y ait pas de larges études contrôlées randomisées sur les antioxydants dans les maladies ophtalmologiques humaines [33]. Cependant, de la mélatonine, injectée en intra-péritonéal chez des rats, a réduit les marqueurs ventriculaires de l'oxydation après une exposition aux ultraviolets B [34]. De même, Orhan et al. [38] ont examiné plusieurs composés naturels et synthétiques sur des cataractes induites par du sélénite chez le rat, et ont montré que du dicloferae (60 %), de la vitamine C (58 %) et de la quercétine (40 %) sont protecteurs et sont associés à des changements dans les marqueurs enzymatiques dans les cristallins. De façon intéressante, Brown et al. [39] et Lyle et al. [40] ont trouvé un taux faible d'exérèses de cataracte chez des sujets à forte consommation de caroténoïdes, lutéine et zéaxanthine (mis en évidence lors d'un simple questionnaire de fréquence alimentaire).

CONCLUSIONS

Plusieurs réactions vitales dépendent de l'équilibre entre l'activité des radicaux libres (ex : dans le système immunitaire) et la protection tissulaire antioxydante. Il serait étrange si, au cours de l'évolution, nous soyons devenus dépendants d'une très forte consommation d'antioxydants alimentaires, étant donné l'importance d'une activité équilibrée des radicaux libres et d'une régulation de cet équilibre. La régulation des systèmes antioxydants endogènes doit être probablement plus cruciale pour la santé en général mais les antioxydants exogènes agissent nettement sur certains processus pathologiques.

Pris dans sa globalité, il y a maintenant suffisamment de preuves pour conclure que des interventions pour corriger le stress oxydatif ont des effets biologiques. Les preuves interventionnelles sont extrêmement limitées et des difficultés méthodologiques existent clairement. Les essais sont sujets à une variance considérable qui réduit la puissance des études.

Les effets des suppléments antioxydants sur des processus pathologiques sont vraiment relativement minimes bien que toute une vie d'exposition pourrait avoir un bénéfice cumulatif. Des conséquences dangereuses n'ont pas été retrouvées. Il est utile de rechercher des effets sur la santé à plus long terme. Enlever ou éviter des sources ajoutées de radicaux libres (ex : fumer, ou mauvais contrôle du diabète) auront probablement plus de chances de réussir que des tentatives pour corriger le stress oxydatif. Les essais contrôlés randomisés en cours devraient apporter quelques réponses.

BIBLIOGRAPHIE

1. TEMPLE NJ. Antioxidants and disease : more questions than answers. *Nutrition Res*, 2000, 20 : 449- 459.
2. PRATICO D, DELANTY N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system : Focus on Alzheimer's disease. *Am J Med*, 2000, 109 : 577-585.
3. MIRANDA S, OPAZO C, LARRONDO LF et al. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid b-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 2000, 62 : 633-648.
4. LYRAS L, CAIRNS NJ, JENNER A et al. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 1997, 68 : 2061-2069.
5. LAIGHT DW, CARRIER MJ, ÄNGGÅRD EE. Antioxidants, diabetes and endothelial function. *Cardiovasc Res*, 2000, 47 : 457-464.
6. SKYRME-JONES RAP, O'BRIEN RC, BERRY KL, MEREDITH IT. Vitamin E supplementation improves endothelial function in Type I diabetes mellitus : A randomized, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36 : 94-102.
7. HUANG Y, CHAN NWK, LAU CW et al. Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)-epicatechin. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1427 : 322-328.
8. ANDRIAMBELOSON E, KLESCHYOV AL, MULLER B et al. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol*, 1997, 120 : 1053-1058.
9. HODGSON EK, FRIDOVICH I. The accumulation of superoxide radical during the aerobic action of xanthine oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 430 : 182-188.
10. ROBAK J, GRYGLEWSKI RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37 : 837-841.
11. CZYZYK A, SZCZEPANIK Z. Diabetes mellitus and cancer. *Eur J Intern Med*, 2000, 11 : 245-252.
12. REHMAN A, NOUROOZ J, MÖLLER W et al. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett*, 1999, 448 : 120-122.
13. COLLINS AR, BROWN J, BOGDANOV M et al. Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative damage. *Free Radical Res*, 2000, 32 : 333-341.

14. LEINONEN J, LEHTIMAKI T, TOYOKUNI S et al. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*, 1997, *417* : 150-152.
15. LAW MR, MORRIS JK. By how much does fruit and vegetable consumption lower the risk of ischemic heart disease ? *Eur J Clin Nutr*, 1998, *52* : 726-733.
16. SINGH RB, RASTOGI V, RASTOGI SS et al. Effect of diet and moderate exercise on central obesity and associated disturbances, myocardial infarction and mortality in patients with and without coronary artery disease. *J Am Coll Nutr*, 1996, *15* : 592-601.
17. LEAN MEJ, NOROOZI M, KELLY I et al. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*, 1999, *48* : 176-181.
18. PORRINI M, RISO P. Lymphocyte lycopene concentration concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. *J Nutr*, 2000, *130* : 189-192.
19. HUANG HY, HELZLSOUER KJ, APPEL LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage : Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, 2000, *9* : 647-652.
20. BOYLE SP, DOBSON VL, DUTHIE SJ et al. Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant : A human supplementation study. *Eur J Clin Nutr*, 2000, *54* : 774-782.
21. CARTY JL, BEVAN R, WALLER H et al. The effects of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochem Biophys Res Com*, 2000, *273* : 729-735.
22. PANDA K, CHATTOPADHYAY R, FHOSH MK et al. Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. *Free Radicals Biol Med*, 1999, *27* : 1064-1079.
23. SARKAR A, BISHAYEE M, CHATTERJEE IB. Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepato carcinogenesis. *Cancer Biochem Biophys*, 1995, *15* : 111-125.
24. CAKATAY U, TELCI A, KAYALI R et al. Effect of a-lipoic acid supplementation on oxidative protein damage in the streptozotocin-diabetic rat. *Res Exp Med*, 2000, *199* : 243-251.
25. MEYER AS, YI OS, PEARSON DA et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes. *J Agricult Food Chem*, 1997, *45* : 1638-1643.
26. FRANKEL EN, KANNER J, GERMAN JB et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 1993, *341* : 454-457.
27. FUHRMAN B, LAVY A, AVIRAM M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr*, 1995, *61* : 549-554.
28. DE RIJKE YB, DEMACKER PNM, ASSEN NA et al. Red wine consumption does not affect the oxidizability of low-density lipoprotein in volunteers. *Am J Clin Nutr*, 1996, *63* : 329-334.
29. NIGDIKAR SV, WILLIAMS NR, GRIFFIN BA, HOWARD AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation *in vivo*. *Am J Clin Nutr*, 1998, *68* : 258-265.
30. MCANLIS GT, MCENENY J, PEARSE J, YOUNG IS. Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. *Eur J Clin Nutr*, 1998, *52* : 202-206
31. JAIN CK, AGARWAL S, RAO AV. The effect of dietary lycopene on bioavailability, tissue distribution, in vivo antioxidant properties and colonic preneoplasia in rats. *Nutr Res*, 1999, *19* : 1383-1391.
32. ISLAM KN, O'BYRNE D, DEVARAJ S et al. Alpha-tocopherol supplementation decreases the oxidative susceptibility of LDL in renal failure patients on dialysis therapy. *Atherosclerosis*, 2000, *150* : 217-224.
33. CHRISTEN WG, GAZIANO JM, HENNEKENS CH. Design of Physicians' Health Study II-A randomized trail of Beta-Carotene, Vitamin C and E, and multivitamins, in prevention of cancer, cardiovascular disease and eye disease, and review of results of completed trials. *Ann Epidemiol*, 2000, *10* : 125-134.
34. BARDAK Y, OZERTURK Y, OZERGUNES F et al. Effect of melatonin against oxidation stress in ultraviolet-B exposed rat lens. *Curr Eye Res*, 2000, *20* : 225-230.
35. SIMON JA, HUDES ES. Serum ascorbic acid and other correlates of self-reported cataract among older Americans. *J Clin Epidemiol*, 1999, *52* : 1207-1211.
36. BEATTY ER, O'REILLY JD, ENGLAND TG et al. Effect of dietary quercetin on oxidative DNA damage in healthy human subjects. *Br J Nutr*, 2000, *84* : 919-925.
37. SERAFINI M, LARANJINHA JA, ALMEIDA LM, MAIANI G. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem*, 2000, *11* : 585-590.
38. OHRAN H, MAROL S, HEPSEN IF, SAHIN G. Effects of some probable antioxidants on selenite-induced cataract formation and oxidative stress-related parameters in rats. *Toxicology*, 1999, *139* : 219-232.
39. BROWN L, RIMM EB, SEDDON JM et al. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. *Am J Clin Nutr* 1999; *70*(4): 517-524.
40. LYLE BJ, MARES-PERLMAN JA, KLEIN BE et al. Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol* 1999; *1*: 149(9): 801-809.
41. NHANES : SIMON JA, HUDES ES. Serum ascorbic acid and other correlates of self-reported cataract among older Americans. *J Clin Epidemiol* 1999; *52*(12): 1207-1211. MARES-PERLMAN JA, LYLE BJ, KLEIN R et al. Vitamin supplement use and incident cataracts in a population-based study. *Arch Ophthalmol* 2000; *118*(11): 1556-1563.