

Inhibitory effects of Oak fruit Husks hydroalcoholic extract on serum LDL oxidation in vitro

H. Ahmadvand*

F. Abdolapour**

S. Bagheri**

M. Rashidipour***

K. Beyranvand****

S. Chash*****

*Assistant Professor of Biochemistry, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

** MSc. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

***BSc. Student of pure chemistry, Azad University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

****BSc. Of Biochemistry Laboratory, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

*****BSc. Of Laboratory Sciences Razi Herbal Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

*Abstract

Background: Oxidation of low-density lipoprotein (LDL) has been strongly implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. The use of some antioxidant compounds in dietary food stuff such as vitamin E and Oak fruit (*Quercus*) husks hydroalcoholic extract (OHE) may inhibit the production of oxidized LDL and decrease both the development and the progression of atherosclerosis.

Objective: The present work investigated the effects of OHE on LDL oxidation induced-CuSO₄ quantitatively in vitro.

Methods: This study was an experimental research performed in Khoramabad province during 2010. Fasting blood samples were collected from normal people followed by LDL isolation. The population study was divided into five groups (1: control; 2: those exposed to CuSO₄ without treatment, and groups 3-5: those exposed to CuSO₄ and treated with OHE (0.2, 2, and 20 µg/ml, respectively). Later, the formation of conjugated dienes, lag time, and malondialdehyde (MDA) were measured. Inhibition of Cu-induced oxidation was investigated in the presence of several concentrations of OHE (0.2, 2 and 20 µg/ml). Data were statistically analyzed by SPSS 13 using Mann Whitney test.

Findings: OHE was found to have the ability to inhibit the CuSO₄-induced LDL oxidation. Administration of oak (*Quercus*) husks hydroalcoholic extract (OHE) showed an increased rate of 2.2, 3, and 4.3 fold s at concentrations ranging from 0.2 to 20µg/ml against oxidation in vitro. Also conjugated dienes decreased 13.33%, 46.66% and 80.00% at concentrations ranging from 0.2 to 20 µg/ml of OHE, respectively. The inhibitory effects of OHE on LDL oxidation at concentrations used were dose-dependent.

Conclusion: This study showed that the OHE has the potential to prevent the oxidation of LDL in vitro and it may suggest that this compound is capable of producing a similar effect in vivo.

Keywords: Oak Fruit Husks Hydroalcoholic Extract, Low Density Lipoprotein (LDL) Oxidation

Corresponding Author: Hassan Ahmadvand, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

Email: hassan_a46@yahoo.com

Tel: +98-913-2267893, +98-661-6200133

Received: 5 Sep 2010

Accepted: 3 May 2011

اثر مهاری عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر اکسیداسیون LDL سرم برون تنی

دکتر حسن احمدوند*

فواد عبدالله پور**

شاهرخ باقری**

مرضیه رشیدی پور***

خدیدجه بیرانوند****

سمیرا چاش*****

* استادیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
 ** کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
 *** دانشجوی کارشناسی شیمی محض دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد
 **** کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان
 ***** کارشناس علوم آزمایشگاهی مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

آدرس نویسنده مسؤول: خرم آباد، کیلومتر ۵ جاده خرم آباد بروجرد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

تلفن ۰۹۱۳۲۲۶۷۸۹۳ و ۰۶۶۱-۶۲۰۰۱۳۳

Email: hassan_a46@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۳

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۱۴

* چکیده

زمینه: اکسیداسیون چربی‌ها و از جمله LDL در ایجاد آترواسکلروز نقش مهمی دارد. با استفاده از مواد آنتی اکسیدان در جیره غذایی مانند ویتامین E و عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط می‌توان از اکسیداسیون LDL جلوگیری و در نتیجه باعث جلوگیری از ایجاد آترواسکلروز شد.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر اکسیداسیون LDL سرم برون تنی ناشی از سولفات مس انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در شهرستان خرم آباد انجام شد. نمونه خون افراد سالم بعد از یک شب ناشتایی تهیه و LDL سرم آن جدا شد. نمونه‌های LDL به پنج گروه تقسیم شدند: گروه اول شاهد، گروه دوم در معرض عامل اکسیدان سولفات مس و درمان نشده و گروه‌های سوم، چهارم و پنجم در معرض عامل اکسیدان سولفات مس و درمان شده با عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به ترتیب با غلظت‌های ۲۰، ۲ و ۰/۲ میکروگرم بر میلی لیتر. جهت بررسی اکسیداسیون LDL مقدار دی‌ان‌های کونجوگه، زمان تأخیری (Lag time) و مالون دی آلدئید (Malondialdehyde) تشکیل شده اندازه‌گیری شد و اثرات غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار اکسیداسیون LDL سرم بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS۱۳ و آزمون من ویتنی تحلیل شدند.

یافته‌ها: میزان زمان تأخیری براساس غلظت عصاره به ترتیب ۲/۲، ۳ و ۴/۳ برابر افزایش یافت. همچنین میزان دی ان کونجوگه براساس غلظت عصاره به ترتیب ۱۳/۳۳، ۴۶/۶۶ و ۸۰/۰۰ درصد کاهش یافت. اثر مهاری عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر اکسیداسیون LDL متناسب با غلظت بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط باعث جلوگیری از اکسیداسیون LDL می‌شود و این ترکیب ممکن است اثرهای مشابهی در درون تنی داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط، اکسیداسیون لیپوپروتئین با دانسیته کم (LDL)

* مقدمه

آترواسکلروز می‌شود^(۳،۲) با استفاده از مواد آنتی اکسیدان مانند ویتامین E و گیاهانی مانند پوست بلوط که غنی از مواد آنتی اکسیدان هستند می‌توان از اکسیداسیون LDL و در نتیجه از ایجاد آترواسکلروز جلوگیری نمود.^(۴-۷) بلوط با نام علمی Quercus از گیاهان بومی ایران و مناطق معتدله است که به طور گسترده‌ای در جنگل‌های

اکسیداسیون LDL در ایجاد آترواسکلروز نقش مهمی دارد. استفاده از مواد اکسیدان در مواد غذایی باعث ایجاد اکسید LDL و در نتیجه ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز می‌شود.^(۱) وقتی LDL اکسید می‌شود، تمایل آن به گیرنده‌اش کاهش می‌یابد. جمع شدن LDL اکسیده در ماکروفاژها موجب پیدایش سلول‌های کف‌آلود و ایجاد

تهیه شد. برای تهیه عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط، ابتدا پوست سبز میوه بلوط در سایه خشک و سپس پودر شدند مقدار ۱۰۰ گرم پودر به دست آمده به مدت ۹ ساعت در الکل ۵۰ درصد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه سوکسله قرار داده شد. عصاره به دست آمده بعد از صاف شدن، خشک و ماده مومی به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگاه‌داری و خشک شد که بازده به دست آمده ۴۵/۷ درصد بود. سپس نمونه‌های خون افراد سالم که ۸ تا ۱۲ ساعت ناشتا بودند، گرفته و سرم آن‌ها با استفاده از سانتریفیوژ (دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد. برای جلوگیری از اکسیداسیون، سدیم آزید با غلظت نهایی (۰/۰۶ درصد وزنی - حجمی) به نمونه‌های سرم اضافه شد. (۱۱ و ۱۲)

LDL سرم در مرکز تحقیقات قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان با روش ناپیوسته شیب غلظتی با استفاده از اولتراسانتریفیوژ جدا شد. چگالی سرم با اضافه کردن برمید پتاسیم ۰/۳۶۵ گرم بر میلی‌لیتر به ۱/۲۱ گرم بر میلی‌لیتر رسانده شد. ۳/۵ میلی‌لیتر سدیم کلرید (۰/۱۵۴ مول بر لیتر) و ۱/۵ میلی‌لیتر از سرم‌های غلیظ شده داخل لوله‌های سانتریفیوژ ریخته شد و با استفاده از اولتراسانتریفیوژ بکمن L7-55 با دور ۴۰۰۰۰ rpm به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. LDL جدا شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در بافر PBS کلرید سدیم (۰/۱۶ مول بر لیتر)، فسفات منوهیدروژن دی سدیک (۰/۰۱ مول بر لیتر) با PH ۷/۴، اکسیژن زدا شده، حاوی آزید سدیم (۰/۰۱ درصد) و EDTA (۰/۰۱ درصد) دیالیز شد و بافر در زمان دیالیز سه بار تعویض شد. (۱۳) سپس غلظت پروتئین LDL با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۱۴) و جهت بررسی اکسیداسیون LDL با PBS ۱۰ میلی مولار و PH= ۴/۷ به ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید.

LDL سرم تهیه شده به پنج گروه مختلف تقسیم شد: گروه اول شاهد حاوی LDL، گروه دوم در معرض عامل اکسیدان و درمان نشده حاوی سولفات مس ۱۰ میکرومولار

کردستان، لرستان و کهگیلویه بویراحمد می‌روید. بلوط از نظر طب قدیم ایران گرم و خشک است و از آن به عنوان غذا استفاده می‌کردند. دم کرده بلوط کم خونی، بواسیر، درد معده و نرمی استخوان را درمان می‌کند. همچنین پوست بلوط در تقویت عمومی بدن و معالجه اسهال کودکان مؤثر است و به عنوان ضد درد و آرام بخش نیز استفاده می‌شود. (۸) پوست و برگ درخت بلوط دارای تانن، اسید گالیک، اسید مالیک، کوئرسین (Quercine)، موسیلاژ، پکتین و مشتقات هگزا هیدروکسی دی فنویل است که خواص آنتی‌اکسیدانی دارند. (۹ و ۱۰) تاکنون مطالعه‌ای با هدف تعیین اثر مستقیم پوست میوه بلوط بر کاهش اکسیداسیون LDL سرم به صورت برون تنی و درون تنی انجام نشده است.

با توجه به شواهد نظری تنش اکسیداتیو یکی از مهم‌ترین عوامل در ایجاد بعضی از بیماری‌ها از جمله آترواسکلروز، دیابت، سرطان و آلزایمر است. (۶) در نتیجه می‌توان از موادی که به هر نحو در مهار تنش اکسیداتیو مؤثر باشند، جهت درمان استفاده کرد. شاید درمان با این عصاره یا سایر آنتی‌اکسیدان‌ها بتواند در مهار تنش اکسیداتیو و سایر مکانیسم‌های آسیب‌زا مؤثر واقع شود. هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر اکسیداسیون LDL سرم برون تنی ناشی از سولفات مس است.

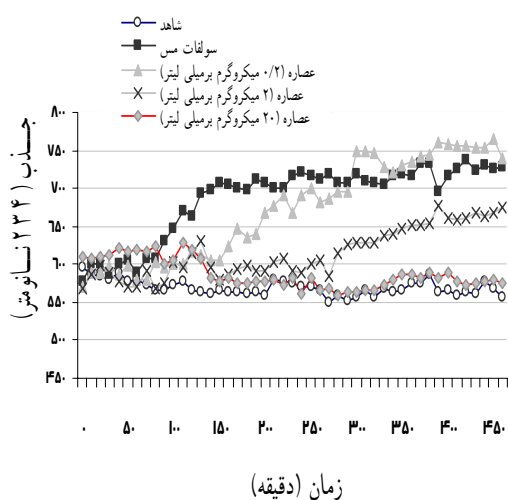
* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در شهرستان خرم‌آباد بر روی نمونه سرم گرفته شده از افراد سالم که به آن‌ها اطلاعات لازم داده شد و به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان رسید انجام شد. دی سدیم اتیلن دی آمین تترا استات (Na₂EDTA)، پتاسیم برمید، سدیم کلرید و دی سدیم هیدروژن فسفات (Na₂HPO₄) از شرکت سیگما خریداری شدند. عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

* یافته‌ها:

عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور معنی‌داری اکسیداسیون LDL برون‌تنی را کاهش داد ($P < 0.05$) به طوری که میزان غلظت پایانی دی‌ان‌های کونجوگه به ترتیب متناسب با غلظت‌های ۰/۲، ۲ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط کاهش یافت (130 ± 14 و 80 ± 9 و 30 ± 6). اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار اکسیداسیون LDL با غلظت عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط متناسب بود این وابستگی با غلظت خطی بود (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- کینتیک اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار اکسیداسیون LDL



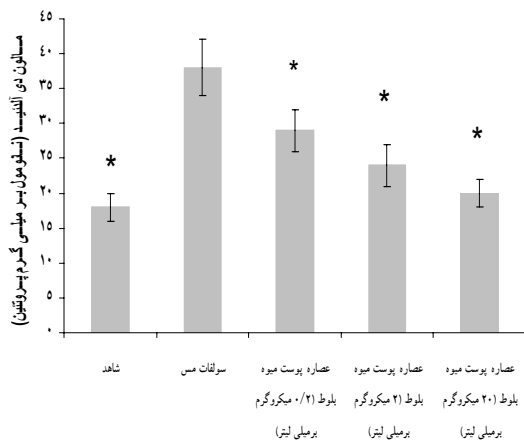
براساس نتایج به دست آمده اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط معنی‌دار است. همچنین با استفاده از منحنی عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور معنی‌داری باعث کاهش دی‌ان کونجوگه شد (نمودار شماره ۲) و همچنین با استفاده از منحنی کینتیک، زمان تأخیری به دست آمد (نمودار شماره ۳).

فاقد عصاره، گروه‌های سوم، چهارم و پنجم در معرض عامل اکسیدان و درمان شده حاوی سولفات مس ۱۰ میکرومولار و عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به ترتیب با غلظت‌های ۰/۲، ۲ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر. معادل حجم عصاره‌های استفاده شده حلال به نمونه شاهد و درمان نشده اضافه شد. تغییرات اکسیداتیو LDL با اندازه‌گیری جذب ماوراء بنفش محلول در ۲۳۴ نانومتر هر ده دقیقه یک بار به مدت ۸ ساعت انجام شد.^(۱۵) جهت ارزیابی کینتیک اکسیداسیون LDL منحنی جذب، جذب‌های به دست آمده، برحسب زمان نمونه‌ها رسم شد و با استفاده از منحنی رسم شده زمان تأخیری (Lagtime) و غلظت پایانی دی‌ان‌های کونجوگه بعد از ۸ ساعت با استفاده از ضریب خاموشی مولی (۲۹۵۰ لیتر بر مول بر سانتی‌متر) به دست آمد.

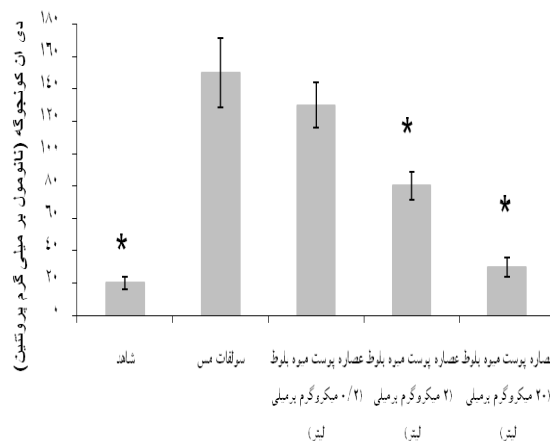
محصول پایانی پراکسیداسیون چربی مالون دی‌آلدئید براساس روش Burge و Aust اندازه‌گیری شد.^(۱۷،۱۶) نمونه‌های LDL بعد از اضافه کردن املاح سولفات مس و عصاره‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در پایان با اضافه کردن EDTA با غلظت پایانی میلی‌مولار، واکنش اکسیداسیون متوقف شد. برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون چربی ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه و ۱/۵ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک اسید ۰/۶ درصد و یک میلی‌لیتر تری‌اسید کلرواستیک ۱۰ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای جوش قرار داده شد. بعد از سرد شدن، ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و جذب محلول‌های رویی در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار جذب‌های به دست آمده با استفاده از ضریب مولی به عنوان مالون دی‌آلدئید تشکیل شده برحسب nm/mg-LDL protein گزارش شد.^(۱۷،۱۶)

نتایج به دست آمده از ۳ آزمایش به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند. معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری و اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۳ و آزمون من ویتنی ارزیابی شد.

نمودار ۴- مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار تشکیل مالون دی آلدئید ناشی از اکسیداسیون LDL



نمودار ۲- مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر مهار تشکیل دی ان کونجوگه ناشی از اکسیداسیون LDL



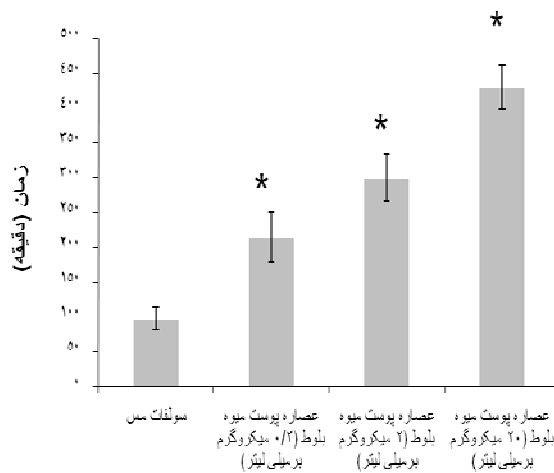
* بحث و نتیجه گیری:

این مطالعه نشان داد عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور مؤثری باعث مهار اکسیداسیون LDL برون تنی می‌شود. براساس مطالعه‌های انجام شده اکسیداسیون LDL در دیواره عروق به عنوان عامل اصلی در پیدایش و توسعه آترواسکلروز مطرح است و در افراد مبتلا به آترواسکلروز، مقادیر کمتری مواد آنتی‌اکسیدان (نسبت به افراد سالم) وجود دارد.^(۲) مس از طریق واکنش فنتون و هابرویس باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد و احتمالاً از این طریق باعث اکسید شدن LDL می‌شود. به دنبال این امر، میزان پراکسید چربی و دی‌ان‌های کونجوگه افزایش می‌یابد و میزان آنتی‌اکسیدان‌های موجود در ساختمان LDL مانند ویتامین E به دلیل تعامل با رادیکال‌های آزاد به وجود آمده توسط مس کاهش می‌یابد.^(۱۸)

در این مطالعه عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور معنی‌داری باعث کاهش دی‌ان‌های کونجوگه و مالون دی آلدئید شد. همچنین زمان تأخیری تحت اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط افزایش یافت. براساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط یک آنتی‌اکسیدان قوی

* $P < 0.05$ نسبت به مس

نمودار ۳- اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط بر زمان تأخیری



اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط در کاهش مالون دی آلدئید تشکیل شده نسبت به نمونه حاوی سولفات مس فاقد عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط معنی‌دار بود (نمودار شماره ۴).

- CuSO₄ in vitro. *J Med Plants Res* 2011; 5 (6): 1012-7
4. Ani M, Moshtaghi AA, Ahmadvand H. Comparative effects of copper, iron, vanadium and titanium on low density lipoprotein oxidation in vitro. *Iran Biomed J* 2007 Apr; 11 (2): 113-8
5. Ahmadvand H, Khosrobeigi A, Bagheri S, et al. Comparison of Inhibitory effects of Satureja Khozistanica oil extract, vitamin E and Coenzyme Q10 on LDL oxidation in vitro. *Yafteh* 2008; 11 (4): 25-31
6. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 2009 Dec 15; 47 (12): 1673-706
7. Yekini I, Hammoudi F, Martin-Nizard F, et al. Antioxidant activity of benzoxazolinonic and benzothiazolinonic derivatives in the LDL oxidation model. *Bioorg Med Chem* 2009 Nov 15; 17 (22): 7823-30
8. Rakic S, Petrovic S, Kukic J, et al. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry* 2007; 104: 830-4
9. Rakić S, Povrenović D, Tešević V, et al. Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *Journal of Food Engineering* 2006; 74 (3): 416-23
10. Rivas-Arreola MJ, Rocha-Guzman NE, Gallegos-Infante JA, et al. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chemistry* 2009; 115 (4): 1320-5
11. Almeida IF, Valentão P, Andrade PB, et al. Oak leaf extract as topical antioxidant: Free radical scavenging and iron chelating activities and in vivo skin irritation potential. *Biofactors* 2008; 33 (4): 267-79

است، هر چند تاکنون تحقیقات کمی در مورد عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط انجام شده است، ولی در مطالعه‌های دیگر نقش محافظتی عصاره برگ بلوط در بیماری‌های قلبی و همچنین نقش ضد باکتریایی عصاره برگ و پوست درخت بلوط نشان داده شده است.^(۲۰،۱۹) همچنین مطالعه‌هایی با اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی‌اکسیدان مانند قدرت احیاکنندگی، قدرت حذف رادیکال‌های آزاد و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی برگ بلوط نشان داده‌اند که نقش آنتی‌اکسیدانی برگ بلوط قابل قیاس و در مواردی بهتر از آنتی‌اکسیدان نهایی مانند ویتامین E و بتاکاروتن و (Hydroxyanisole Butylated) در غلظت‌های مشابه بوده است.^(۲۰-۲۳)

به طور کلی نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی پوست میوه بلوط به طور مؤثری باعث مهار اکسیداسیون LDL برون تنی می‌شود. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان مطالعه‌های مشابه درون تنی و همچنین مطالعه‌هایی در زمینه اثر آن در بیماران قلبی-عروقی و دیابتی پی‌ریزی نمود.

* مراجع:

1. Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. *Am J Cardiol* 2008 May 22; 101 (10A): 75D-86D
2. Lobbes MB, Lutgens E, Heeneman S, et al. Systematic review, Is there more than C-reactive protein and fibrinogen? The prognostic value of soluble CD40 ligand, interleukin-6 and oxidized low-density lipoprotein with respect to coronary and cerebral vascular disease. *Atherosclerosis* 2006 Jul; 187 (1): 18-25
3. Ahmadvand H, Khosrowbeygi A, Ghasemi M. Inhibitory effect of *Allium ascalonicum* hydroalcoholic extract on low-density lipoprotein (LDL) oxidation induced by

12. Ávila-Reyes JA, Almaraz-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, et al. Phenol profile and antioxidant capacity of mescal aged in oak wood barrels. *Food Res Int* 2010; 43 (1): 296-300
13. Nariman F, Eftekhari F, Habibi Z, et al. Antibacterial activity of twenty Iranian plant extracts against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Iran J Basic Med Sci* 2009; 12 (2): 105-11
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7; 72: 248-54
15. Androulakis N, Durand H, Ninio E, Tsoukatos DC. Molecular and mechanistic characterization of platelet-activating factor-like bioactivity produced upon LDL oxidation. *J Lipid Res* 2005 Sep; 46 (9): 1923-32
16. Romeu M, Nogues R, Marcas L, et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with chronic renal failure: a case control study. *BMC Res Notes* 2010 Jan 25; 3: 20
17. Sheu JY, Chen PH, Tseng WC, et al. Spectrophotometric determination of a thiobarbituric acid-reactive substance in human hair. *Anal Sci* 2003 Jun; 19(6): 958-60
18. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004 Oct; 84 (4): 1381-478
19. Rivas-Arreola MJ, Roha-Guzman NE, et al. Antioxidant activity of oak (*Quercus*) leaves infusions against free radicals and their cardioprotective potential. *Pak J Biol Sci* 2010 Jun 1; 13 (11): 537-45
20. Andrenšek S, Simonovska B, Vovk I, et al. Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom. *Int J Food Microbiol* 2004 Apr 15; 92 (2): 181-7
21. Hansen U, Schneiderheinze J, Stadelmann S, Rank B. The alpha-tocopherol content of leaves of pedunculate oak (*Quercus robur*L.) - variation over the growing season and along the vertical light gradient in the canopy. *J Plant Physiol* 2003 Jan; 160 (1): 91-6
22. Stanely Mainzen Prince P, Priscilla H, Devika PT. Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 2009 Aug 1; 615 (1-3): 139-43
23. Priscilla DH, Prince PS. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chem Biol Interact* 2009 May 15; 179 (2-3): 118-24