

ارتباط غلظت مس، روی و مارگرهای رادیکال‌های آزاد در کارگران شاغل در صنایع مس

دکتر احمد غلامحسینیان^{۱*}، دکتر غلامعباس محمدی^۱، مهدیه نظری^۲، دکتر محمود یگانه^۳، دکتر حامد زحمتکش^۴ و مسعود ترک‌زاده^۴

خلاصه

مقدمه: مس و روی نقش مهمی در واکنش‌های اکسیداتیو ایفا می‌کنند و مطالعات *in vivo* اثرات متفاوت این عناصر را نشان داده است. در این مطالعه تأثیر مواجهه با مس و روی بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیس میوتاز (SOD) و تولید مالون دی‌آلدهید (MDA) اریتروسیستی و نیز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم (TAS) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش: در این تحقیق ۷۰ نفر از کارکنان مرد مجتمع مس و ۷۰ نفر فرد سالم در محدوده سنی ۳۵-۵۵ سال مورد مطالعه قرار گرفتند. غلظت مس و روی به روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی و فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD اریتروسیستی و آنتی‌اکسیدان کل به روش رنگ سنجی اندازه‌گیری شد. با استفاده از واکنش اسیدتیوباریتوریک غلظت مالون‌دی‌آلدهید به دست آمد.

یافته‌ها: غلظت مس و روی در سرم کارگران به ترتیب $113/8 \pm 2/2$ و $148/3 \pm 3/2$ میکروگرم در دسی‌لیتر بود که در مقایسه با مقادیر آنها در گروه شاهد (به ترتیب $104/5 \pm 1/5$ و $107/7 \pm 2$ میکروگرم در دسی‌لیتر) بالاتر بود ($P < 0/001$). فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD اریتروسیستی کارگران به ترتیب برابر $7621/7 \pm 199/3$ U/gHb و $1421/7 \pm 111/1$ بیشتر بود ($P < 0/05$). میزان TAS در گروه آزمون به طور معنی‌داری از افراد شاهد بیشتر بود ($1/6 \pm 0/03$ در مقابل $1/4 \pm 0/01$ میلی‌مول در لیتر، $P < 0/001$). همچنین مقدار MDA گروه مورد برابر $245/8 \pm 3/7$ nmol/gHb بود که از میزان آن در گروه شاهد با $205 \pm 3/2$ nmol/gHb به طور معنی‌داری بالاتر بود. ارتباط معنی‌داری بین غلظت مس و روی با سایر فاکتورهای مورد مطالعه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق مشخص شد که استرس اکسیداتیو در کارگرانی که در معرض تماس با مس و روی بودند افزایش یافته که برای مقابله با آن دفاع اکسیدان نیز افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: مس، روی، کارگران، مالون‌دی‌آلدهید، کاتالاز، سوپراکسید دیس میوتاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام

۱- دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۳- کارشناس اداره بهداشت کار، مجتمع مس سرچشمه کرمان ۴- کارشناس مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی ماهان

* نویسنده مسؤل، آدرس: گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: agnajar@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۵/۱۰/۲۸ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۲/۳۰ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۳/۹

مقدمه

فلزات به دلیل دارا بودن ویژگی‌های ساختمانی و کوآنزیمی نقش مهمی در فرایندهای زیستی ایفا می‌کنند. مس و روی از جمله مهم‌ترین فلزات واسطه‌اند که برای حفظ هموستاز سلولی ضروری می‌باشند به طوری که مقادیر بسیار زیاد یا کم آنها می‌تواند سبب ایجاد عوارض پاتولوژیک شود. روی در متابولیسم سلولی بی‌همتا است زیرا جزء اصلی جایگاه کاتالیزوری حداقل یک آنزیم در هر طبقه‌بندی آنزیم است (۷،۱۲).

مس نیز یکی از اجزاء مهم چندین پروتئین داخل و خارج سلولی همچون سیتوکروم اکسیداز، سوپراکسید دیس میوتاز و سرولوپلاسمین است که نقش مهمی در رشد، تکامل و بقاء ایفا می‌کنند (۲۵). نقش روی به عنوان جزئی از سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی به صورت *in vivo* و *in vitro* مطالعه شده است. گزارش شده که کمبود آن منجر به آسیب اکسیداتیو به اجزاء سلولی و بروز تغییراتی در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود (۱۳،۲۴). به نظر می‌رسد که روی (Zn) عمل آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق اتصال به محل‌هایی در لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA که محل قرار گرفتن آهن و مس است انجام می‌دهد (۲،۱۴). بررسی‌های *in vitro* نشان داده‌اند که مس توانایی تولید گونه‌های فعال اکسیژن را از طریق واکنش فنتون دارد که نتیجه آن، واکنش گونه‌های فعال اکسیژن با بیومولکول‌هایی چون لیپیدها و تشکیل رادیکال‌های پراکسی‌لیپید است (۹). پراکسیداسیون لیپیدهای LDL می‌تواند آتروژنز را با افزایش تبدیل ماکروفاژها به سلول‌های کف مانند (foam cells) تسریع کند (۶). مطالعه Sokol و همکاران بر روی موش‌هایی که از رژیم غذایی غنی از مس تغذیه می‌کردند نشان داد که مقدار مالون‌دی‌آلدهید، یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدی، در آنها افزایش یافته است (۲۲) در حالی که Santamaria و همکاران نشان دادند که دوزهای کم نمک سولفات مس (۵mg/kg) با اثر آنتی‌اکسیدانی خود آسیب‌های نوروکسیک اسید کوئینولینیک (quinolinic acid) را در موش کاهش می‌دهد (۲۰).

با توجه به اثر اکسیداتیو مس در غلظت‌های بالا و اثر آنتی‌اکسیدانی آن که در بعضی مطالعات دیده شده است و همراهی آن با فلز روی (۲،۱۴) این سؤال مطرح می‌شود که وضعیت اکسیداتیو افرادی که به علت شرایط شغلی در تماس مزمن با فلز مس هستند (۲،۱۴) چگونه است؟ از آنجا که هیچ نوع مطالعه *in vivo* در مورد اثر مس بر مارکرها‌ی آنتی‌اکسیدان در چنین افرادی گزارش نشده است، این مطالعه بر روی کارگران مجتمع مس سرچشمه کرمان انجام شد تا اثر مورد نظر بررسی شود.

روش بررسی

در این مطالعه ۱۴۰ مرد ۳۵ تا ۵۵ ساله مورد مطالعه قرار گرفتند. این افراد به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل ۷۰ نفر از کارکنان مجتمع مس سرچشمه کرمان بودند که در معرض مس قرار داشتند. گروه شاهد نیز شامل ۷۰ مرد از ساکنان شهر کرمان بودند. افراد مورد مطالعه در دو گروه، در یک محدوده سنی قرار داشتند. فشارخون و قندخون ناشتای افراد اندازه گرفته شد که هیچ‌یک سابقه فشارخون بالا و دیابت نداشتند (فشارخون کمتر یا مساوی ۱۴۰mmHg و قندخون ناشتا کمتر از ۱۱۰mg/dl) (۱۱).

برای اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر حدود ۵ سی‌سی خون از افراد در وضعیت ناشتا گرفته شد. حدود ۲ سی‌سی خون در لوله حاوی EDTA ریخته و بلافاصله غلظت هموگلوبین خون به وسیله دستگاه Sysmex اندازه گرفته شد. سپس نمونه سانتریفیوژ گردید و پلاسما و Buffy coat جداسازی شدند. از گلبول‌های قرمز پس از شستشو با بفر فسفات سالین جهت تهیه همولیزانت با آب استفاده گردید. از بقیه خون هم برای تهیه سرم استفاده شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در دمای ۷۰°C- نگهداری شدند (۲۳).

مقدار مس (Cu) و روی (Zn) در پلاسما به روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی اندازه گرفته شد. در این مطالعه از دستگاه جذب اتمی Varian مدل AA220 استفاده شد. نمونه‌های پلاسما با آب مقطر رقیق شدند و از

نتایج

افراد مورد مطالعه در دو گروه شاهد و مورد از نظر سن و مقدار نخ سیگار مصرفی جور شده بودند و محاسبات آماری نیز نشان داد که بین این پارامترها در دو گروه اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P > 0/05$).

بررسی غلظت فلزات مس و روی در گروه مورد و مقایسه آن با گروه شاهد نشان داد که میانگین غلظت مس و روی در گروه مورد (به ترتیب $113/8 \pm 2/2 \mu\text{g/L}$ و $148/3 \pm 3/2 \mu\text{g/L}$) بیش از گروه شاهد (به ترتیب $104/5 \pm 1/5 \mu\text{g/L}$ و $107/7 \pm 2/0 \mu\text{g/L}$) است و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0/001$).

فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT اریتروسیتهی در گروه مورد به ترتیب $1498/5 \pm 12/3 \text{U/gHb}$ و $7621/7 \pm 199/3 \text{U/gHb}$ و در گروه شاهد به ترتیب $1421/7 \pm 11/1 \text{U/gHb}$ و $7049/1 \pm 157/4 \text{U/gHb}$ بود که در مورد SOD افزایش معنی دار بود ($P < 0/001$ و $P = 0/026$). میانگین غلظت آنتی‌اکسیدان کل در سرم گروه مورد $1/6 \pm 0/03 \text{mmol/L}$ بود که نسبت به گروه شاهد $1/4 \pm 0/01 \text{mmol/L}$ بیشتر و اختلاف آنها از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0/05$). بررسی غلظت مالون‌دی‌آلدهید نشان داد که میانگین غلظت آن در گروه مورد $245/8 \pm 3/7 \text{nmol/g Hb}$ (بیش از گروه شاهد $205 \pm 3/2 \text{nmol/g Hb}$) است ($P < 0/001$) (جدول ۱).

نمک‌های سولفات مس و روی نیز برای تهیه استانداردها استفاده گردید (۲۱). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در اریتروسیته‌ها به روش رنگ‌سنجی آنزیمی و با استفاده از کیت Randox اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) اریتروسیتهی نیز به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از کروموژن Purpald اندازه گرفته شد (۸). از مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به عنوان یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدی، برای بررسی شدت پراکسیداسیون استفاده شد و مقدار آن در اریتروسیته‌ها به روش اسپکتروفتومتری و به کمک تیوباریتوریک اسید اندازه‌گیری شد (۱۰). مقادیر مربوط به فعالیت SOD، CAT، MDA و نسبت به غلظت هموگلوبین گزارش شدند. غلظت آنتی‌اکسیدان کل (TAS) با استفاده از کیت (TAS) (Randox) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. به منظور مقایسه داده‌ها با توزیع نرمال در دو گروه از student t-test و برای بررسی برابری واریانس‌ها از Leven's test استفاده شد. بررسی ارتباط بین غلظت فلزات مس و روی با سایر فاکتورهای اندازه‌گیری شده به کمک Pearson's linear correlation test صورت گرفت. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش گردیدند و اختلاف در حد $P \leq 0/05$ از نظر آماری معنی دار منظور گردید.

جدول ۱. نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارامترهای مختلف در دو گروه مورد و شاهد

P	شاهد Mean (SEM)	مورد Mean (SEM)	گروه پارامتر
0/001	104/5 (1/5)	113/8 (2/2)	Cu($\mu\text{g/L}$)
<0/001	107/7 (2/0)	148/3 (3/2)	Zn($\mu\text{g/L}$)
<0/001	1421/7 (11/1)	1498/5 (12/3)	SOD(U/gHb)
0/026	7049/1 (157/4)	7621/7 (199/3)	CAT(U/gHb)
<0/001	1/4 (0/01)	1/6 (0/03)	TAS(mmol/L)
<0/001	205 (3/2)	245/8 (3/7)	MDA (nmol/gHb)

فلز اکسیداسیون LDL را تسريع می کند (۳). همچنین در یک مطالعه حیوانی که از مقادیر زیاد مس در رژیم غذایی استفاده شد افزایش MDA و محصولات پراکسیداسیون لیپیدی مشاهده گردید (۱۹).

در مطالعه حاضر مشخص شد که مقدار مس در گروه مورد با وجودی که در محدوده مقادیر طبیعی قرار دارد به طور معنی داری بیش از گروه شاهد است در حالی که مقدار فعالیت آنزیمهای SOD، CAT، غلظت TAS و نیز مقدار MDA افزایش نشان داد. افزایش مقدار مالوندی آلدئید در این گروه نشان دهنده بالا بودن سطح استرس اکسیداتیو نسبت به گروه شاهد است که می تواند به اثر اکسیداتیو مس مربوط باشد. اما افزایش سطح آنتی اکسیدانی ممکن است به علت القاء فعالیت سیستم آنتی اکسیدان در اثر افزایش استرس اکسیداتیو رخ داده باشد. غلظت روی در گروه مورد هم بیشتر از گروه شاهد بود. اثر آنتی اکسیدانی روی در مطالعات زیادی مشاهده شده است. بررسی اثر روی در پراکسیداسیون لیپیدی غشاء نشان داده که روی مانع اتصال فلزاتی چون آهن و مس به سطح غشاء و آغاز اکسیداسیون آن می شود (۲۷). در بررسی دیگری که با استفاده از مکمل های حاوی روی انجام شده مشخص شد که میزان محصولات پراکسیداسیون لیپیدی و سیتوکین های التهابی کاهش یافته است (۱۶). در حالی که استفاده از مکمل های حاوی هر دو فلز مس و روی سبب افزایش فعالیت آنزیم SOD در کبد و قلب موش گردید که این مسأله به افزایش تجمع آنها در این دو بافت ارتباط داده شد که با مطالعه حاضر هم خوانی دارد (۴). افزایش فعالیت آنزیم SOD در مطالعه حاضر هم می تواند به علت افزایش سطح مس و روی به صورت مزمن رخ داده باشد. گرچه هیچ ارتباط معنی داری مشاهده نشد.

به طور کلی، در مطالعه حاضر مشخص شد که در گروه مورد یعنی کارکنانی که در تماس با مس هستند هر چند میزان مس و روی در سرم کارگران در محدوده طبیعی است ولی ظرفیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته است که این یافته با سنجش مقدار آنزیمها تأیید شد. ولی افزایش فعالیت

بررسی آماری با استفاده از ارتباط خطی پیرسون (pearson's linear correlation) برای بررسی ارتباط بین غلظت فلزات و سایر فاکتورها نشان داد که هیچ نوع رابطه معنی داری بین آنها وجود ندارد ($P > 0/05$). از سوی دیگر بررسی ارتباط سایر متغیرها نشان داد که ارتباط معنی داری بین آنتی اکسیدان کل و آنزیم SOD در گروه مورد وجود دارد ($r = 0/06, P < 0/05$).

بحث

مواد معدنی برای رشد و نمو و سلامت انسان از اهمیت زیادی برخوردارند و در تعداد زیادی از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بدن دخالت دارند. امروزه مشخص شده که درگیر کردن فلزات با چیلاتورهای اسید آمینه ای و پپتیدی به خصوص فلزاتی مثل مس و روی دسترسی حیاتی آنها را برای سلول بیشتر می کند (۱،۲۶). مس و روی کوفاکتور آنزیمهای بسیاری هستند که از آن میان می توان به یکی از آنزیمهای آنتی اکسیدان مانند سوپراکسید دیس میوتاز (SOD) اشاره کرد. هر چند این عناصر به مقدار کم در غذا ضروری هستند ولی مقادیر زیاد آنها می تواند مسمومیت ایجاد کند. در صورت عدم کنترل دقیق مقدار آنها، این خطر وجود دارد که واکنش های ناخواسته رادیکال های آزاد صورت گیرد. برخلاف اثر فوق روی و مس فعالیت های آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهند. در مورد روی این اثر از طریق سنتز متالوتیونین و نیز بازداری پراکسیداسیون چربی های وابسته به NADPH و جلوگیری از کاهش گلوکوتاتیون انجام می پذیرد (۵،۱۵). نشان داده شده که کمپلکس های مس - اسید آمینه می تواند از رهاسازی آهن از فریتین ممانعت کند که این پدیده نقش آنتی اکسیدانی مس را به اثبات می رساند (۱۷).

در مطالعه انجام شده بر روی تعدادی از افراد میانسال (۷۰-۵۰ ساله) مشخص شد که استفاده از مکمل های حاوی مس (Ymg/dl) نه تنها اثر پراکسیدانی ندارد بلکه گلبول های قرمز خون را نیز در برابر اکسیداسیون محافظت می کند (۱۸). از طرف دیگر بررسی اثر مس بر پراکسیداسیون لیپیدی به صورت *in vitro* نشان داد که این

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی کرمان و مرکز تحقیقات مجتمع صنایع مس سرچشمه کرمان که هزینه انجام این مطالعه را مشترکاً عهده‌دار بوده‌اند سپاسگزاری می‌کنیم. از مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی ماهان که در انجام آزمایشات عناصر کمیاب ما را یاری داده‌اند قدردانی می‌کنیم.

سیستم آنتی‌اکسیدان در این گروه نشانه تحریک این سیستم برای مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو در مقایسه با گروه شاهد بود که می‌تواند خنثی‌کننده استرس اکسیداتیو و حافظ سلامت کارکنان باشد. با توجه به بالا بودن سطح استرس اکسیداتیو در کارکنان، به نظر می‌رسد که استفاده از مکمل‌های غذایی آنتی‌اکسیدان مانند ویتامین‌های E و C در کاهش اثرات اکسیداتیو مفید باشد.

Summary

The Relationship between Copper & Zinc Concentration and Free Radical Markers in Copper Industry Workers

Gholamhoseinian A., Ph.D.¹, Mohammadi Gh., Ph.D.¹, Nazary M., B.Sc.², Yeganeh M., M.D.³, Zahmatkesh H., M.D.³, Torkzadeh M., M.Sc.⁴

1. Associate Professor of Biochemistry, School of Medicine and Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences Kerman, Iran 2. M.Sc. Student of Biochemistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 3. Expert, Occupational Health Office, Sarcheshmeh Copper Industry, Sarcheshmeh, Iran 4. Expert, Mahan International Center for Science & high Technology, and Environmental Sciences, Kerman, Iran

Introduction: Copper and zinc play a key role in oxidative reactions and *in vivo* studies have shown their different effects. In this study we examined the influence of exposure to copper and zinc on catalase and superoxide dismutase (SOD) activities in erythrocytes, total serum antioxidant capacity and malondialdehyde (MDA) production of copper industry workers.

Methods: In the present study, 70 workers in a Copper Industry and 70 healthy controls with the age range of 35-55 years were studied. The catalase assay and SOD activity in RBC lysate and total antioxidant were measured by spectrophotometric methods. Using thiobarbitoric acid reaction, MDA concentration was determined.

Results: The results showed a higher copper and zinc concentration in serum of worker group (113.8 ± 2.2 & $148.3 \pm 3.2 \mu\text{g/L}$ respectively, $P < 0.001$) in comparison with the control group (104.5 ± 1.5 & $107.7 \pm 2 \mu\text{g/L}$ respectively). Serum catalase and SOD activities in RBC were higher in workers (7621.7 ± 199.3 & $1489.5 \pm 12.3 \mu\text{l}$) than in the control group (7049.1 ± 157.4 & $1421.7 \pm 11.1 \mu\text{l}$ respectively, $P < 0.05$, for SOD only). Serum total antioxidant was significantly higher in workers than controls (1.6 ± 0.03 vs. 1.4 ± 0.01) and it was the same for MDA concentration ($245.5 \pm 3.7 \text{nmol/gHb}$ in the worker group compared to $205 \pm 3.2 \text{nmol/gHb}$ in the control group). No correlation were found between copper and zinc concentrations and the other factors ($P > 0.05$).

Conclusion: These results suggest that occupational exposure to copper and zinc induces oxidative stress followed by anti oxidative defense system

Key words: Copper, Zinc, Copper Workers, Malondialdehyde, Catalase, Super oxide dismutase, Total antioxidant capacity

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(3): 177-183

References

1. Baker DH, Ammerman CB. Copper bioavailability. In: Bioavailability of nutrients for animals. San Diego, Academic Press, 1995.
2. Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1990; 8(3): 281-91.
3. Burkitt MJ. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: Roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* 2001; 394(1): 117-35.
4. Buzadzic B, Korac B, Lazic T, Obradovic D. Effect of supplementation with Cu and Zn on antioxidant enzyme activity in the rat tissues. *Food Res Inter* 2002; 35: 217-20.
5. Gibbs PN, Gore MG, Jordan PM. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinate dehydratase. *Biochem J* 1985; 225(3): 573-80.
6. Haidari M, Javadi E, Kadkhodae M, Sanati A. Enhanced susceptibility to oxidation and diminished vitamin E content of LDL from patients with stable coronary artery disease. *Clin Chem* 2001; 47(7): 1234-40.
7. Hambidge M. Human zinc deficiency. *J Nutr* 2000; 130(5S suppl): 1344S-9S.
8. Johansson LH, Hakan Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1998; 174: 331-6.
9. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(5): 797S-811S.
10. Lykkesfeldt J. Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet visible spectrophotometry. *Clin Chem* 2001; 47(9): 1725-7.
11. Maxwell SR. Coronary artery disease-Free radical damage, antioxidant protection and the role of homocysteine. *Basic Res Cardiol* 2000; 95(suppl 1): 165-71.
12. McCall KA, Huang CA, Fierke C. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 2000; 130(5S suppl) : 1437S-46S.
13. Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG, Keen CL. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J Nutr* 1995; 125(4): 823-9.
14. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 2000; 130(5S suppl): 14447S-54S.
15. Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarka FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(8): 1182-90.
16. Prasad AS. The role of zinc in brain and nerve functions. In: Metals and oxidative damage in neurological disorders. New York, Plenum Press, 1997; pp95-111.
17. Reif DW. Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 1992; 12(5): 417-27.
18. Rock E, Mazur A, O'connor JM, Bonham MP, Rayssiguier Y, Strain JJ. The effect of copper supplementation on red blood cell oxidizability and plasma antioxidants in middle-aged healthy volunteers. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(3): 324-9.
19. Sansinanea AS, Cerone SI, Streitenberger SA, Garcia C, Auza N. Oxidative effect of hepatic copper

- overload. *Acta Physiol Pharmacol* 1998; 48(1): 25-31.
20. Santamaria A, Flores-Escartin A, Martinez JC, Osorio L, Galvan-Arzate S Pedraza-Chaverri J, *et al.* Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(4): 418-27.
 21. Smith JC, Butrimovitz GP, Purdy WC. Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy. *Clin Chem* 1979; 25(8): 1487-91.
 22. Sokol RJ, Devereaux M, Mierau G, Hambidge KM, Shikes RH. Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. *Gastroenterology* 1990; 99(4): 1061-71.
 23. Sudha K, Rao AV, Rao S, Rao A. Modification by vitamin E. Free radical toxicity and antioxidants in parkinson's disease. *Neurol India* 2003; 51(1): 60-62.
 24. Tate DJ, Miceli MV, Newsome DA. Zn protects against oxidative damage in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(5-6): 704-13.
 25. Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 1998; 97(5 suppl): 952S-9S.
 26. Wedekind KJ, Hortin AE, Baker DH. Methodology for assessing zinc bioavailability. *J Anim Sci* 1992; 70(1): 178-84.
 27. Zago MP, Oteiza PI. The antioxidant properties of zinc: Interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(2): 266-74.