

Stress oxydant

Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant

P. Therond

Résumé. Les radicaux libres centrés sur l'oxygène ou le peroxy-nitrite, issu de la réaction du radical monoxyde d'azote avec le radical superoxyde, sont des oxydants puissants vis-à-vis des lipides, des protéines et de l'ADN. Les produits formés pour chaque biomolécule sont complexes et nombreux. Selon le radical libre produit (radical superoxyde, radical hydroxyle, peroxy-nitrite) et la cible moléculaire (phospholipides, cholestérol, acides aminés aromatiques ou aliphatiques, bases puriques ou pyrimidiques) la réactivité, les modes d'action et les produits terminaux d'oxydation formés seront différents.

Parmi les produits terminaux obtenus, certains sont devenus des marqueurs du stress oxydant. C'est le cas du malondialdéhyde et des isoprostanes pour les lipides, des protéines carbonylées pour les protéines et de la 8-oxo-guanine ou 8-oxo-désoxyguanosine pour l'ADN. Il faut cependant noter que ces produits ne sont pas les seuls, en particulier l'action des peroxy-nitrites sur la tyrosine conduit à la formation de 3-nitrotyrosine, qui posent en pratique des problèmes analytiques. La très grande diversité des produits d'oxydation, selon le radical initiateur pour chaque classe de biomolécule, rend compte de la difficulté de choisir tel ou tel marqueur en pathologie.

Summary. Reactive oxygen species or peroxy-nitrite, coming from the reaction of nitric oxide and superoxide anion, are strong oxidants capable of damaging lipids, proteins and DNA. The oxidative products issuing from each biomolecule are complex and multiple. Reactivity, the mechanism of production and the products formed vary depending on the free radical (superoxide anion, hydroxyl radical, peroxy-nitrite) and the molecular target (phospholipids, cholesterol, aromatic or aliphatic amino acids, puric or pyrimidic bases).

Some of these oxidative products are markers of oxidative stress. For example malondialdehyde and isoprostanes are oxidative markers of lipids, carbonylated proteins of proteins and 8-oxo-guanine or 8-oxodeoxyguanosine of DNA. However other products are also produced, as is the case of the reaction of peroxy-nitrite with tyrosine which leads to the formation of 3-nitrotyrosine. The quantification of 3-nitrotyrosine is labor-intensive and requires specific equipment.

The major problem when searching for the most appropriate marker for a given disease is the great diversity of oxidative products formed depending on the nature of the free radical involved.

Key-words: DNA, Lipids, Proteins, Free radicals, Oxidative stress.

Mots-clés : ADN, Lipides, Protéines, Radicaux libres, Stress oxydant.

Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). P. Therond. *Ann Pharm Fr* 2006, 64: 383-389.

De très nombreuses espèces oxydantes (molécules électrophiles et radicaux libres) sont générées physiologiquement mais également capables d'induire des dommages cel-

lulaires lors de processus pathologiques. Les conséquences cellulaires de ces attaques sont à l'origine d'une augmentation du taux de mutation de l'ADN, d'une altération des signaux de transduction et de la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. D'une manière générale, les agents initiateurs oxydants convertissent les constituants cellulaires en des produits secondaires capables à leur tour d'induire des dommages. Toutes les

Laboratoire de biochimie métabolique et clinique, EA 3617, Ufr de Pharmacie, Faculté de pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, F 75270, Paris Cedex 06.

Correspondance : P. Therond, à l'adresse ci-dessus.

biomolécules de notre organisme (lipides, protéines, acides nucléiques) sont susceptibles d'être oxydées et selon la nature chimique de l'agent initiateur (radical hydroxyle, peroxy-nitrite...) les produits primaires et secondaires d'oxydation formés seront différents. De plus, les produits d'oxydation issus de chaque classe de biomolécule ne sont pas indépendants entre eux et peuvent interagir pour former des adduits. Cet article s'attachera à donner une vue générale des modifications oxydatives des lipides, des protéines et des acides nucléiques en fonction du radical oxydant et définira brièvement les méthodes analytiques utilisées et les conséquences cellulaires de telles modifications.

Dommages oxydatifs de l'ADN

Les dommages oxydatifs de l'ADN résultent de réactions avec les bases puriques et pyrimidiques, du désoxyribose ou du phosphodiester. L'importance de ces dommages a été évaluée sur des tissus et on estime que les adduits (réaction entre les bases aminées de l'ADN et des aldéhydes comme le malondialdéhyde ou le 4-hydroxy-2-nonénal provenant de la peroxydation lipidique) présents dans l'ADN sont de l'ordre de 3 à 3 000 par cellule ce qui correspond à un nucléotide modifié pour 10^9 ou 10^6 nucléotides [1].

Oxydation de l'ADN par le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est une espèce radicalaire de l'oxygène la plus délétère du stress oxydant en raison de son potentiel d'oxydoréduction très élevé et de ses constantes de vitesse très importantes. Il peut s'additionner sur les doubles liaisons des bases de l'ADN ou arracher un atome d'hydrogène des groupements méthyles ou des résidus désoxyribose [2].

Le radical hydroxyle réagit avec les purines en s'additionnant sur la double liaison en 7,8 et en formant le 8-oxo-7,8-dihydrodésoxyguanosine (8-oxo-dG) qui est plus abondant que 8-oxo-7,8-dihydrodésoxyadénosine (8-oxo-dA) [3].

Il peut aussi s'additionner sur la double liaison en 5,6 des pyrimidines pour former des pyrimidines glycols.

L'arrachement d'un atome d'hydrogène au groupement méthyle en 5 de la thymine peut produire un carbone centré qui réagit secondairement avec l'oxygène pour former un hydroperoxyde. Cet hydroperoxyde est ensuite réduit en 5-hydroxyméthyl-désoxyuracile. L'arrachement d'un atome d'hydrogène au désoxyribose peut aboutir simultanément à la formation d'une cassure simple brin et d'un aldéhyde [2]. Le 8-oxo-dG possède un fort pouvoir mutagène conduisant à des transversions de type G > T. Cependant, il existe des enzymes capables de réparer ces anomalies (système de réparation par excision de bases) comme par exemple les glycosylases [4].

Oxydation de l'ADN par le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote peut former de l'acide peroxy-nitreux (ONOOH), du nitrosoperoxy-carbonate ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$) ou du trioxyde d'azote (N_2O_3). Ces espèces réactives sont capables de réagir directement avec l'ADN en formant des dérivés nucléosidiques nitrés, le plus abondant d'entre eux étant le 8-nitro-désoxyguanosine (8-nitro-dG) [5]. Ce produit est instable et sa liaison glycosidique est hydrolysée pour former un site abasique.

Le 8-nitro-dG peut également se décomposer sous l'action d'une autre molécule de ONOOH en 8-oxo-dG. N_2O_3 réagit avec les amines exocycliques (désoxyadénosine, dA ; désoxycytidine, dC ; et désoxyguanosine, dG) pour former des dérivés nitrosylés puis des intermédiaires diazo qui sont hydrolysés en hypoxanthine, uracile et xanthine.

Formation d'adduits avec les aldéhydes

Les aldéhydes comme les α -énals peuvent réagir avec les groupements aminés exocycliques de la dG, de la dA et de la dC pour former des adduits « éthène ». Les α -énals les plus communs comme le malondialdéhyde (MDA), l'acroléine, le crotonaldéhyde et le 4-hydroxynonénal (4-HNE) sont capables de réagir avec l'ADN et de former ces adduits. Les α -énals sont des molécules électrophiles bifonctionnelles qui présentent donc deux sites potentiels de réactivité avec l'ADN. Les adduits les plus courants sont des adduits exocycliques formés à partir de la dA, de la dG ou de la dC [1]. Ces adduits « éthènes » sont mutagènes et peuvent être réparés par des systèmes de réparation par excision de base en particulier des glycosylases.

Stress oxydant et biomolécules

Signalons enfin que l'acide hypochloreux (HOCl) peut conduire à des produits d'halogénéation de l'ADN. Le 5-chloro-désoxycytidine (5-chloro-dC) est le produit majeur formé lors de la réaction de HOCl avec l'ADN et a été détecté dans les tissus humains (*fig. 1*) [6].

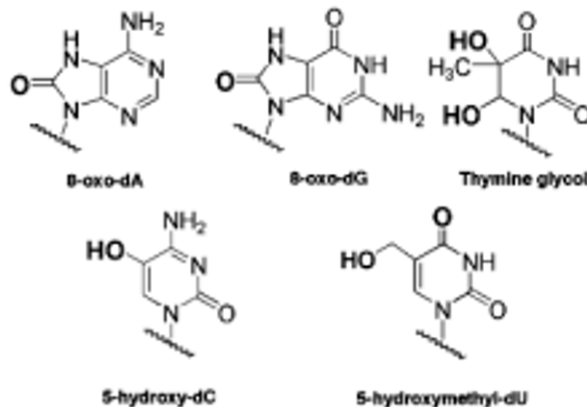
Du point de vue biologique, les dosages du 8-hydroxy-désoxyguanosine (8-OHdG) dans les cellules (leucocytes) et de sa base libre dans les urines sont les plus utilisés pour apprécier l'importance du stress oxydant (dosage urinaire) et la balance entre les dommages et les systèmes de réparation (dosage cellulaire). Les méthodes chromatographiques couplées à une détection électrochimique sont parmi les plus employées mais elles nécessitent au préalable des phases de purification et il faudra prendre soin de minimiser les risques d'oxydation artéfactuelles [7]. La chromatographie couplée à la spectrométrie de masse est également utilisée.

Dommages oxydatifs des protéines

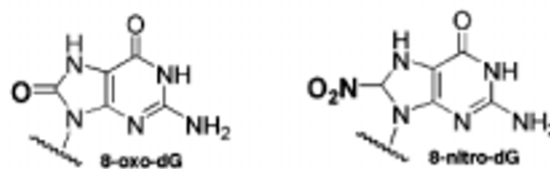
Les modifications oxydatives des protéines par les espèces réactives de l'oxygène peuvent avoir lieu sur la chaîne polypeptidique et les chaînes latérales nucléophiles ou redox sensibles des acides aminés.

Les radicaux libres produits au cours du stress oxydant peuvent modifier la chaîne polypeptidique et générer des protéines carbonylées. Ce mécanisme est initié par l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur le carbone en α de la liaison peptidique. Si deux radicaux protéines ainsi formés sont proches l'un de l'autre ils peuvent interagir entre eux et former des liaisons croisées. Sinon l'oxygène peut attaquer ce radical centré sur le carbone et former un intermédiaire peroxyde qui après un réarrangement et clivage de la liaison peptidique donnera deux peptides contenant une fonction carbonyle [8]. Les protéines carbonylées peuvent aussi être formées par oxydation de la chaîne latérale de plusieurs acides aminés comme la lysine, l'arginine et la proline et par la formation d'adduit de Michael entre des résidus nucléophiles et des aldéhydes α,β -insaturés. Les protéines carbonylées sont considérées comme des marqueurs du stress oxydant

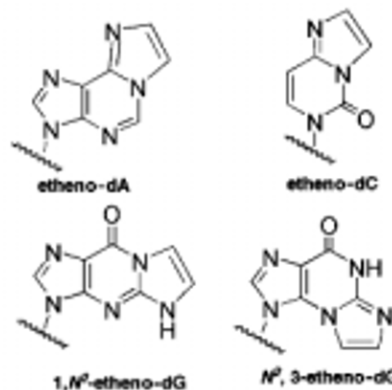
Radicaux hydroxyles



Peroxynitrite



Enals



Halogènes

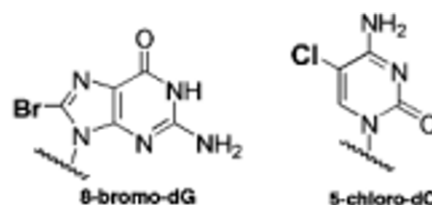


Figure 1. Produits endogènes de l'ADN [1].
Endogenous products of DNA [1].

des protéines et s'accumulent au cours du vieillissement ou de diverses pathologies liées à l'âge.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les oxydants intracellulaires et les ERO peuvent

attaquer les chaînes latérales des acides aminés des protéines. Bien que la plupart des acides aminés puissent être modifiés, certains d'entre eux comme la cystéine, la tyrosine et la méthionine sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux hydroxyles et nitrosoperoxycarbonates, de l'acide peroxy-nitrique et de l'acide hypochloreux.

Par exemple, l'oxydation réversible du groupement thiol de la cystéine conduit à la formation d'un acide sulfénique qui peut, dans un deuxième temps, réagir avec un autre thiol ou subir une oxydation irréversible en formant respectivement un disulfure ou un acide sulfonique [9]. Dans le cas de la formation de ponts disulfures, ils peuvent être réduits en thiols par la thiorédoxine réduite ou des agents réducteurs (glutathion).

La méthionine est très sensible à l'oxydation. Elle est alors convertie en sulfoxyde de méthionine puis en sulfone de méthionine. Cette oxydation en sulfoxyde peut être rendue réversible par l'action d'une enzyme : la méthionine sulfoxyde réductase (MSRA) [10], enzyme à NADPH, ou par la sélénoprotéine R. Il a été proposé que l'oxydation de la méthionine pourrait constituer un moyen de protection contre l'oxydation des autres acides aminés compte tenu de la réversibilité de son oxydation.

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) sont également la cible des agents oxydants. La phénylalanine est sensible aux radicaux hydroxyles et aux métaux de transition qui provoquent sa conversion en *ortho* et *méta*-tyrosine. La tyrosine peut être oxydée par l'acide hypochloreux, l'acide peroxy-nitrique et le nitrosoperoxy-carbonate [11]. Parmi les produits formés, on peut citer le *o,o'*-dityrosine, la 3,4-dihydroxyphénylalanine, la 3-nitrotyrosine et la 3-chlorotyrosine.

Ces modifications sont irréversibles et peuvent ainsi inactiver de nombreuses protéines. D'un point de vue analytique, la 3-nitrotyrosine et la 3-chlorotyrosine sont difficilement quantifiables du fait d'une génération *ex vivo* lors de la conservation des prélèvements.

Comme pour les acides nucléiques, les acides aminés peuvent être modifiés par des aldéhydes, insaturés sur les sites nucléophiles de la cystéine, de l'histidine ou de la lysine. Par exemple, le MDA réagit avec la lysine selon une réaction d'addition de Michael. Le 4-hydroxynonène donne des réactions d'addition de Michael avec

la cystéine, la lysine et l'histidine mais aussi des bases de Schiff lorsque la fonction amine réagit avec l'aldéhyde (fig. 2) [12].

Les conséquences biologiques de telles modifications sont multiples et ne peuvent être envisagées dans leur ensemble. Cependant, les modifications des protéines que nous venons de citer toucheront à la fois des protéines de structure, des enzymes ou des facteurs de transcription. Citons, par exemple, la nitration de la tyrosine au niveau du site actif de la tyrosine hydroxylase par l'acide peroxy-nitrique qui conduira à l'inhibition de la synthèse de dopamine. La formation de S-nitrosothiols sur les cystéines de la tubuline ou sur les facteurs de transcription (AP-1, NF-KB) entraînera, respectivement, des anomalies sur la formation du réseau des microtubules, une inhibition de la liaison de l'AP-1 à l'ADN et une inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF-KB [1].

Il est actuellement admis que les cellules eucaryotes possèdent deux voies principales de dégradation des protéines : les lysosomes et les protéasomes [13]. La première dégrade essentiellement les protéines extracellulaires et la seconde les protéines intracellulaires. Les protéasomes jouent un rôle

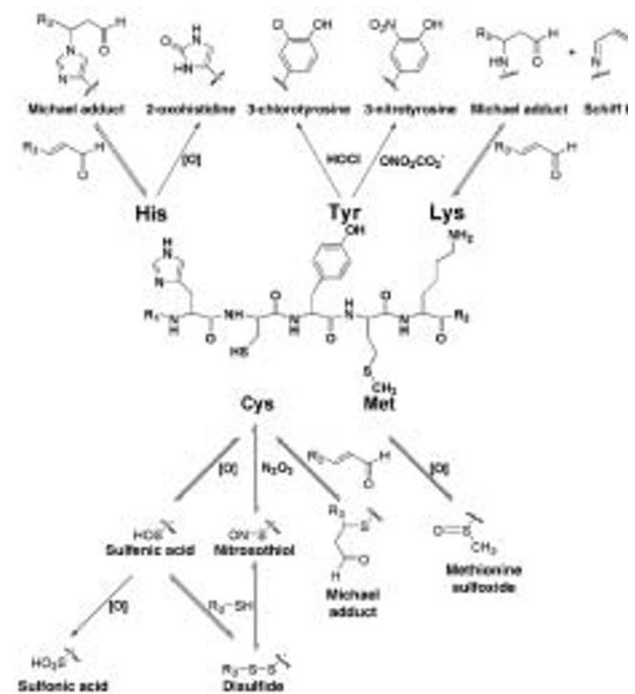


Figure 2. Produits endogènes de la chaîne latérale des acides aminés [1].

Endogenous products of amino acid side chains [1].

majeur dans la dégradation des protéines oxydées. Le protéasome 26S est un complexe protéasique qui dégrade les protéines après qu'elles soient ubiquitinylées. Cependant, ce système ne fonctionne que pour des protéines faiblement oxydées qui ne sont pas agrégées.

Domages oxydatifs des lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont caractérisés par un ou plusieurs éléments de structure chimique ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) sont très abondants dans la nature. La position d'un ou plusieurs groupements méthylène entre deux doubles liaisons les rend particulièrement sensibles à l'oxydation par les métaux, les radicaux libres oxygénés. Cette oxydation, appelée « peroxydation lipidique », est à l'origine de la formation de très nombreux produits primaires (hydroperoxydes) ou secondaires (aldéhydes) dont les activités biologiques sont multiples. Les acides gras polyinsaturés, estérifiés (phospholipides, esters de cholestérol, triglycérides) ou non (acides gras non estérifiés), sont des cibles majeures d'une attaque radicalaire.

Une autre cible importante est le cholestérol non estérifié qui, lors d'une oxydation, conduit à la formation des oxystérols.

Parmi ces espèces réactives de l'oxygène, les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes sont les plus réactifs vis-à-vis des acides gras polyinsaturés, l'anion superoxyde ne pouvant pas les oxyder. L'autoxydation des AGPI et monoinsaturés est un processus radicalaire de réaction en chaîne qui se décompose en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison. L'initiation de la peroxydation lipidique par des radicaux hydroxyles, alcoxydes, peroxydes, l'oxygène singulet ou le peroxynitrite consiste à arracher un atome d'hydrogène au niveau du groupement méthylène *bis*-allylique pour former un radical pentadienyl qui se combine ensuite avec l'oxygène pour former un radical peroxyde. En règle générale pour les phospholipides, cette attaque se situe au niveau des AGPI estérifiés en *sn*-2 alors que pour le cholestérol non estérifié l'hydrogène du carbone 7 est le plus réactif. Ce radical peut soit réagir avec un autre acide gras (phase de propagation) et former un hydroperoxyde, soit être

décomposé par -scission ou se cycliser. Une autre voie telle que la dimérisation entre deux radicaux peroxydes peut également se produire. Cependant, les radicaux peroxydes issus de l'acide linoléique ne peuvent pas se cycliser par réarrangement intramoléculaire, seuls les AGPI ayant plus de deux doubles liaisons (acide linoléique, acide arachidonique...) le peuvent.

Il existe donc une compétition entre l'arrachement d'un hydrogène, la -scission et/ou la cyclisation selon l'AGPI. De plus, les doubles liaisons diéniques peuvent être sous deux formes isomériques : *cis,trans* ou *trans,trans* [14]. Comme nous venons de le décrire, la première étape de la peroxydation lipidique aboutit à la formation des hydroperoxydes et ceci quel que soit l'agent initiateur. Au cours des processus biologiques de peroxydation lipidique, une très faible proportion de substrat est oxydée. On estime que le rapport substrat non oxydé sur oxydé est compris entre 50 : 1 et 10 000 : 1 même si l'on considère des états pathologiques.

Selon l'AGPI considéré, le nombre d'isomère d'hydroperoxydes varie. Alors que l'oxydation de l'acide linoléique (C18 : 2) génère deux isomères, l'acide linoléique (C18 : 3) en génère quatre et l'acide arachidonique (C20 : 4) six. Le carbone portant le groupement hydroperoxyde est chiral si bien que chaque radical peroxyde est un mélange racémique de deux énantiomères. De plus, l'isomérisation de la double liaison augmente encore le nombre d'isomères.

Dans la cellule, ces hydroperoxydes sont ensuite partiellement réduits par des enzymes (glutathion peroxydase) en hydroxydes qui peuvent à leur tour être oxydés en cétoacides par un radical peroxyde [15].

La fraction non réduite des hydroperoxydes d'AGPI se décompose facilement en raison de leur grande instabilité en milieu aqueux.

Par exemple, les hydroperoxydes de l'acide arachidonique se décomposent en isoprostanes et de nombreux autres produits (aldéhydes). Du fait de l'instabilité propre des hydroperoxydes ou de l'action consécutive d'autres radicaux, de très nombreux produits dits « secondaires » de la peroxydation lipidique seront formés. La décomposition des hydroperoxydes d'AGPI de phospholipides conduira, avant réarrangement en bis-cycloendoperoxyde, à la formation de

dérivés carbonylés. Les hydroperoxydes des AGPI de la série n-6 (acide arachidonique, acide linoléique) et n-3 (acide linoléique, acide docosahexaénoïque) seront transformés par scission, réarrangement, et oxydation en des carbonyles stables. Ces carbonyles (aldéhydes) qui seront alors à l'état libre sont du type : n-alkénals, 2-alkénals, 2,4-alkadiénals, alkatriénals, -hydroxyalkénals (4-hydroxynonénal, 4-HNE). Les principaux produits formés à partir des AGPI de la série n-6 sont l'hexanal et le 4-hydroxy-2,3-*trans*-nonenal. À partir des AGPI de la série n-3, on obtiendra principalement le propanol et le 4-hydroxy-2,3-*trans*-hexenal. Un autre aldéhyde, le malondialdéhyde (MDA) provient de la scission secondaire d'un biscycloendoperoxyde ou d'un hydroperoxy époxyde

[16]. D'autres aldéhydes restant estérifiés sur les phospholipides et provenant de la scission précédente seront du type oxovaléryl, glutaroyl, butanoyl ou butényl.

On obtiendra par exemple la 1-palmitoyl 2-oxovaléryl-*sn*-glycéro-3-phosphorylcholine (POVPC) qui comporte en *sn*-1 un acide palmitique (C16 : 0) et en *sn*-2 un groupement oxovaléryl liés à la phosphatidylcholine par des liaisons esters. Enfin, un autre groupe de molécules (les isoprostanes, isomères structuraux stables des prostaglandines) est issu de la réduction du biscycloendoperoxyde. Ces isoprostanes pourront soit restées estérifiées sur le phospholipide soit subir l'action d'une phospholipase A₂ et devenir libres (*fig. 3*).

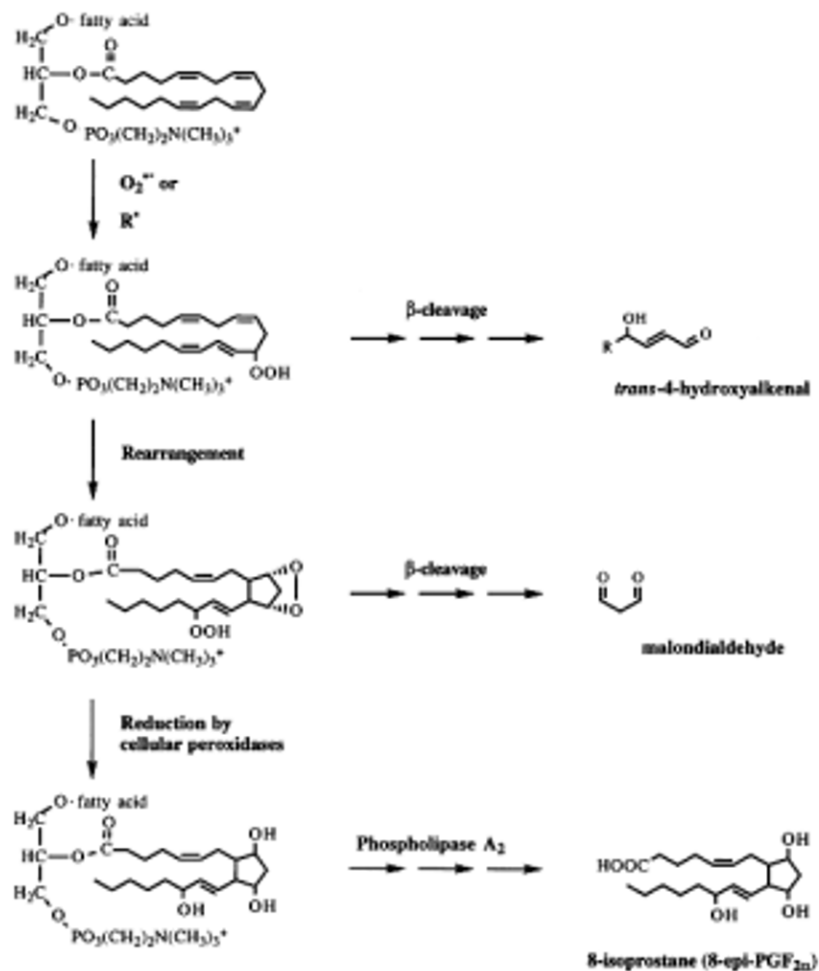


Figure 3. Produits formés à partir des phospholipides [16].
Products formed from phospholipids [16].

Le peroxy-nitrite est un initiateur de l'oxydation des lipides et est à l'origine de la formation de plusieurs produits : diènes conjugués, hydroperoxydes, oxystérols, malondialdéhyde, F₂-isoprostanes. De plus, il peut aussi former des dérivés nitrés des AGPI (LNO₂).

Les produits d'oxydation du cholestérol appelés « oxystérols » proviennent soit de l'alimentation soit de l'oxydation *in vivo* du cholestérol. Leur formation endogène est d'origine non-enzymatique (attaque de la molécule de cholestérol par les radicaux libres oxygénés, les radicaux alkoxy ou peroxy lipidiques ou l'acide hypochloreux) ou enzymatique (7 α -, 27-hydroxylases...). Le schéma réactionnel général de leur formation par attaque radicalaire est comparable à celle des AGPI. Le carbone 7 du cholestérol est particulièrement sensible à cette attaque oxydante pour former un radical peroxy en 7.

Ce dernier pourra arracher un hydrogène d'un AGPI pour donner du 7-hydroperoxycholestérol qui se décomposera en 7-cétocholestérol, 7-hydroxycholestérol ou 5,6-époxycholestérol [17].

Les isoprostanes sont utilisés comme biomarqueurs des niveaux d'oxydation au niveau plasmatique ou urinaire, en particulier la 8-iso PGF₂. En utilisant des méthodes chromatographiques (GC-MS) ou immunologiques (ELISA), la 8-iso PGF₂ est significativement augmentée *in vivo* dans des situations de stress oxydant [18] et normalisée par des traitements antioxydants.

Conclusion

Cette revue non exhaustive des dommages oxydatifs des biomolécules par le stress oxydant n'est qu'un aperçu de la complexité des mécanismes chimiques mis en jeu. Les effets cellulaires des produits formés, qui diffèrent selon l'agent oxydant, sont encore mal connus et nécessiteront de développer d'une part des méthodes analytiques de plus en plus performantes et d'autre part des expériences *in vivo* chez l'animal plus nombreuses. Le lecteur pourra, pour plus de précisions, se référer à un ouvrage général sur ce sujet [19].

Références

1. Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 2003; 111: 583-93.
2. Chatgililoglu C, O'Neill P. Free radicals associated with DNA damage. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1459-71.
3. Cadet J. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 1999; 424: 9-21.
4. Hazra TK, Hill JW, Izumi T, Mitra S. Progr. Nucleic Acid Res. *Mol Biol* 2001; 68: 193-205.
5. Burney S, Caufield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxy-nitrite. *Mutat Res* 1999; 424: 37-49.
6. Chen HJ, Row SW, Hong CL. Detection and quantification of 5-chlorocytosine in DNA by stable isotope dilution and gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 262-8.
7. Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: 373-84.
8. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1-18.
9. Claiborne A. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* 1999; 38: 15407-16.
10. Levine RL, Moskowitz J, Stadtman ER. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* 2000; 50: 301-7.
11. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1717-25.
12. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1685-96.
13. Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized in mammalian cells. *Faseb J* 1997; 11: 526-34.
14. Gardner HW. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 65-86.
15. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1998; 39: 1529-42.
16. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 202-26.
17. Spitteller G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? *Med Hypotheses* 2003; 60: 69-83.