

INCREMENTO DEI PEROSSIDI, DANNO RADICALICO ED EMOLITICO INDOTTO DAL FUMO DI SIGARETTA IN UNA POPOLAZIONE MISTA CALABRESE: INFLUENZA DELLO STILE DI VITA E DEL REGIME DIETETICO TIPICO DEL MEDITERRANEO

*S. Mazzulla, *V. Nicoletta, ⁺A. Costabile, *G. Esposito, *A. Mosello, ⁺F. Cipolla, *A.R. Carino, *G. Martino.

* Dip. Biologia Cellulare Università della Calabria - ⁺ Sezione Comunale AVIS Cosenza

INTRODUZIONE

In Italia, circa 15 milioni di abitanti, sono fumatori abituali (1). Sebbene, rispetto ad alcuni decenni fa il fenomeno sia complessivamente in diminuzione, il fumo è in crescita nel sesso femminile e tra i giovani. Il fumo di sigaretta è associato con una diminuzione della concentrazione di antiossidanti, con l'incremento dello stress ossidativo e espone a un maggior rischio di patologie (2). Molteplici sono i danni provocati dal fumo: danno epiteliale, danni a livello del DNA, riduzione della capacità antiossidante del plasma (3). Il tabacco, distruggendo la vitamina C, va ad indebolire le difese immunitarie, sicché i fumatori corrono più degli altri il rischio di ammalarsi anche delle più comuni patologie stagionali. Lo stress ossidativo, che nell'organismo del tabagista è all'origine di gravi patologie cronico-degenerative, può essere inoltre ridotto mediante uno stile di vita ascrivibile ad un regime dietetico di tipo mediterraneo, per l'azione di contrasto effettuata dagli antiossidanti presenti nella dieta (4).

I radicali liberi esplicano la loro attività tossica solo quando sono prodotti con una velocità o in una quantità tale da non poter essere inattivati dai sistemi di difesa della cellula. In questo caso sono in grado di reagire con tutti i costituenti della cellula e della matrice cellulare, determinando una condizione chiamata "stress ossidativo". La perossidazione lipidica è una fase importante del fenomeno dello stress ossidativo. Gli isoprostani e gli isoeicosanoidi sono composti simili alle prostaglandine, prodotte dall'azione dei radicali liberi su di esse, indipendentemente dalla ciclossigenasi. Questi composti si formano in situ sui fosfolipidi di membrana da cui sono clivati, presumibilmente, dalla fosfolipasi A2 (5.)

SCOPO DEL LAVORO

Il fumo di sigaretta è una miscellanea complessa di oltre 4700 composti chimici, incluse alte concentrazioni di ossidanti. La fase gassosa del fumo di sigaretta contiene alte quantità di ossidanti a breve vita quali l' $\cdot\text{O}_2$ e l'ossido nitrico (NO), i quali reagiscono per formare molecole di perossinitrico, altamente reattivo (ONOO \cdot). La fase corpuscolata del fumo contiene invece radicali a lunga vita come i radicali semichinone, che possono reagire con l' $\cdot\text{O}_2$ per formare radicale idrossile (O-H) e H_2O_2 . Il fumo di sigaretta ha la capacità di generare H_2O_2 anche se in soluzione acquosa (3). La dieta e lo stile di vita possono contribuire a ridurre significativamente lo stress radicalico, pertanto in questo lavoro sono state messe in relazione le abitudini nutrizionali dei soggetti fumatori e non fumatori, in funzione del sesso e dello stile di vita.

Tutti i soggetti partecipanti allo studio non presentano variazioni anomale del profilo lipidico, pertanto gli esperimenti condotti sulla componente eritrocitaria, mediante tecniche spettrofotometriche e di microscopia a contrasto di fase, ci consentiranno di valutare l'effettivo danno da stress ossidativo indotto dal fumo di sigaretta. Sarà inoltre valutato il profilo lipidico (C-HDL, C-LDL, trigliceridi e colesterolo totale), le modificazioni morfologiche e reologiche degli eritrociti dei due gruppi, al fine di individuare le eventuali correlazioni tra lo stress ossidativo, le dislipidemie e il danno strutturale di membrana.

MATERIALI E METODI

SOGGETTI PARTECIPANTI ALLA RICERCA

La nostra ricerca è svolta su un campione di popolazione mista tra i 20 e 55 anni di età suddivisi nei seguenti gruppi: fumatori (♀ ♂) e non fumatori (♀ ♂). I soggetti volontari sono stati sottoposti a un questionario anamnestico al fine di indagare sulle abitudini nutrizionali e lo stile di vita.

PREPARAZIONE DEGLI ERITROCITI

Il sangue è prelevato attraverso venopuntura dopo aver ottenuto il consenso informato. Successivamente è centrifugato a 1100g per 5 minuti al fine di separare il plasma dagli eritrociti. Si elimina il sovrantante e si prosegue effettuando tre lavaggi degli eritrociti con PBS (Phosphate Buffer Saline pH 7.4).

PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

La perossidazione lipidica è un importante meccanismo causato dai radicali liberi che provoca il danneggiamento cellulare (6). Esso rappresenta uno dei più importanti indicatori dello stress ossidativo cellulare (7). La perossidazione incide sulle proprietà biofisiche delle membrane attaccando quelle componenti che impartiscono alle membrane stesse le loro particolari proprietà: i PUFAs. Il processo di perossidazione lipidica decrementa la fluidità di membrana e compromette una delle più importanti funzioni delle membrane cellulari: la capacità di agire come barriera (6). Mediante il dosaggio della malondialdeide (MDA) è possibile valutare la perossidazione lipidica delle membrane eritrocitarie dei campioni presi in esame (8). Tale dosaggio è basato sulla reazione dell' MDA con il TBA (thiobarbituric acid) con formazione del complesso MDA-TBA rilevabile spettrofotometricamente a 532 nm (8, 9) .

A tale scopo, è utilizzato il seguente protocollo sperimentale: 2,5 ml di acido tricloracetico (TCA) sono aggiunti a 500 µl di eritrociti e incubati per 15 min. Dopo l'incubazione, la miscela (eritrociti+TCA) viene centrifugata per 10 min a 1100g. Al sovrantante recuperato (2 ml) è aggiunto 1 ml di 0,67% di TBA (thiobarbituric acid). Il composto viene nuovamente incubato per 15 min. Al termine dei 15 min, viene misurata, con lo spettrofotometro Jasco V-630[®], l'assorbanza a 532 nm del sovrantante, contenente i TBARS (thiobarbituric acid-reactive substance).

DETERMINAZIONE DEI LIPIDI E DELLE LIPOPROTEINE

I livelli sierici di colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL e Trigliceridi, sono determinati attraverso i seguenti metodi enzimatici: colesterolo totale: *met. Col. Esterasi-Col. Ossidasi*; Colesterolo HDL e Colesterolo LDL: *met. Diretto senza precipitazione*; Trigliceridi: *met. Lipasi- Perossidasi*

SAGGIO DI EMOLISI

La valutazione del grado di emolisi delle membrane eritrocitarie è effettuata misurando la fragilità delle membrane indotta dall'agente radicalico AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride). L'AAPH è un azo composto solubile in acqua ed è utilizzato come generatore di radicali liberi (10, 11, 12). A tale scopo, si è proceduto con il seguente protocollo sperimentale: 1 ml di sangue è centrifugato a 1100g al fine di separare gli eritrociti dal plasma. Gli eritrociti sono successivamente risospesi in PBS (Phosphate Buffer Saline pH 7,4) ed il 5% della sospensione eritrocitaria è incubata a 37°C per 5 min. Alla sospensione è aggiunto Sodio Azide (NaN_3) (1mM), allo scopo di inibire la catalasi; dopo 5 min. viene aggiunto AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride a concentrazione 100mM.

Successivamente, la sospensione è incubata a 37°C per 4 ore. Ai tempi 20, 40, 80, 100, 120, 180 e 240 minuti, sono effettuate diluizioni con 20 vol. di PBS e centrifugate a 1100 g per 5 min. I sovranatanti sono sottoposti al dosaggio spettrofotometrico a 541 nm. Tale procedimento ci consente di valutare l'emolisi in condizioni isotoniche.

Allo scopo di valutare anche l'emolisi in condizioni ipotoniche si utilizza lo stesso procedimento mediante diluizione con 20 vol. di acqua distillata (13). La percentuale di emolisi è stata calcolata mediante il rapporto:

$$\frac{\text{Abs dell'emolisi in condizioni isotoniche}}{\text{Abs dell'emolisi in condizioni ipotoniche}} \times 100$$

MISURA DI EMOLISI ERITROCITARIA: COMPARAZIONE TRA FEMMINE NON FUMATRICI E FUMATRICI

La differenza di fragilità osmotica delle membrane eritrocitarie di femmine fumatrici, a confronto con femmine non fumatrici, è valutata per esposizione a stress ipotonico indotto da soluzioni a diversa forza ionica. A tale scopo è utilizzato il seguente protocollo sperimentale: A partire da una soluzione fisiologica (0.9% NaCl), sono preparate diluizioni allo 0.40, 0.45, 0.50 e 0.55 %. Aliquote di 0,1 ml di eritrociti sono esposti alle suddette soluzioni, ai tempi di 5' 20' 40' e 60'. Il 100% di emolisi è ottenuta per diluizione di 0,1 ml di eritrociti in acqua distillata. Successivamente si è costruita la curva di emolisi di tutti i campioni mediante dosaggio spettrofotometrico (Jasco V-630[®]) a 541 nm (14).

VALUTAZIONE MORFOLOGICA DEGLI ERITROCITI IN FEMMINE NON FUMATRICI E FUMATRICI DOPO ESPOSIZIONE A SOLUZIONI A DIVERSA FORZA IONICA

Allo scopo di valutare le eventuali variazioni nella morfologia degli eritrociti, in seguito all'induzione dello stress indotto dalla esposizione degli stessi nelle soluzioni a diversa forza ionica, viene effettuato uno striscio di sangue di campioni provenienti da fumatrici comparato con quello di non fumatrici. Partendo da un volume di sangue 0,1 ml, è stata eseguita una centrifugazione a 1100 g al fine di separare gli eritrociti dal plasma; successivamente sono stati effettuati tre lavaggi degli eritrociti per 5 min. a 1100 g con PBS. Il pellet, ottenuto dalle precedenti centrifugazioni, è risospeso fino a volume finale 0,1 ml con NaCl a diverse concentrazioni: 0, 0,45, 0,5 e 0,55 %. Aliquote di 10 µl sono strisciate su vetrini ai tempi 5', 20', 40' e 60' per osservare le modificazioni morfologiche degli eritrociti dopo l'esposizione degli stessi alle diverse concentrazioni di NaCl. Si è proseguito con l'indagine, utilizzando il microscopio a contrasto di fase ZEISS AXIOSKOP MC 100[®].

RISULTATI E DISCUSSIONI

Analisi Statistica

Per la determinazione dei prodotti di perossidazione lipidica e di emolisi è stato applicato il test T di Student che prende in considerazione due distribuzioni con numerosità $n = 48$, sull'ipotesi che i nostri campioni si distribuiscono come due T di Student, con media X e varianza σ^2/n . Le due distribuzioni campionarie vengono assunte come indipendenti. Tutti i valori sperimentali sono rappresentati dalla media di 10 determinazioni indipendenti \pm S.D.

Nelle Figure sono riportati i prodotti di degradazione lipidica di membrana in eritrociti di soggetti non fumatori comparati con i fumatori e in soggetti (non fumatori e fumatori) che seguono uno stile di vita riconducibile alla dieta mediterranea. I prodotti di perossidazione lipidica sono espressi come equivalenti micromolari di MDA (malondialdehide).

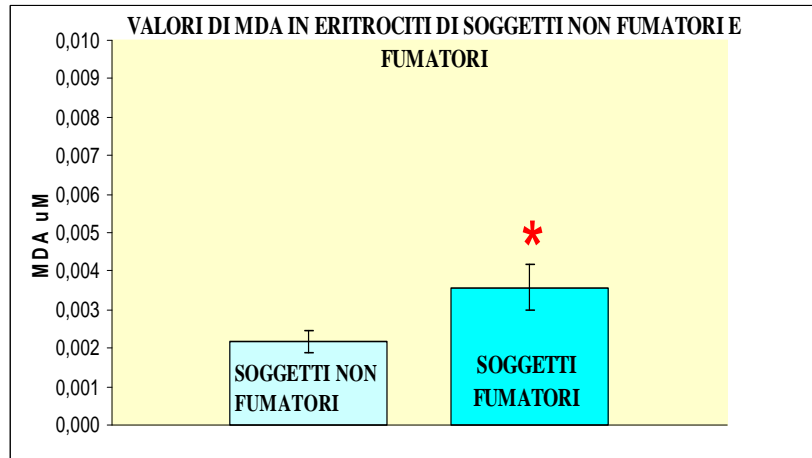


Fig. 1. Prodotti di MDA nelle membrane eritrocitarie di soggetti non fumatori (controllo) e da soggetti fumatori. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media \pm S.D.
* $p < 0.05$ ($n = 48$).

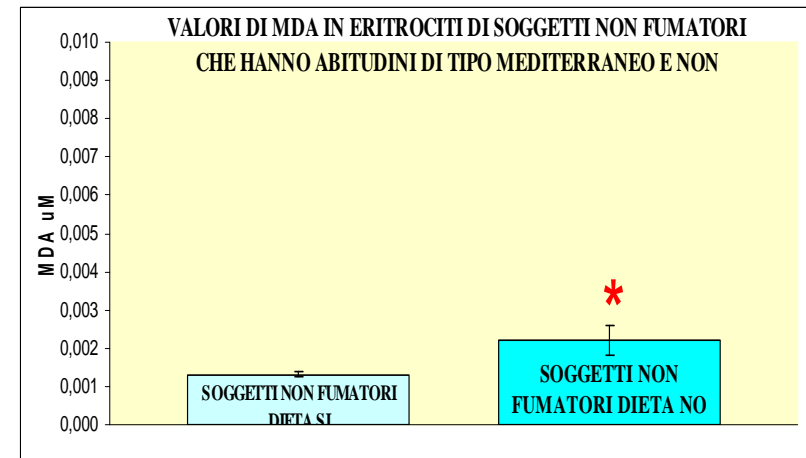


Fig. 2 Prodotti di MDA nelle membrane eritrocitarie di soggetti non fumatori che hanno abitudini nutrizionali di tipo mediterraneo e non. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media \pm S.D.
* $p < 0.05$ ($n = 24$).

Nella figura 1 sono riportati i valori di MDA di soggetti non fumatori comparati con i fumatori, i risultati ottenuti evidenziano un aumento dei prodotti di per ossidazione lipidica di circa il 50% nei soggetti fumatori. Nella Fig.2 sono riportati i valori di MDA di un campione di popolazione non fumatori che hanno abitudini nutrizionali di tipo mediterraneo e non. Il dato sperimentale ottenuto, mette in evidenza l'aumento dei prodotti di perossidazione lipidica, espressi come equivalenti micromolari di MDA anche nei soggetti non fumatori che non seguono uno stile di vita e regime dietetico alimentare ascrivibile a una dieta mediterranea. Tale aumento è di $\sim 40\%$. Si può ipotizzare pertanto, che l'assunzione di sostanze antiossidanti tipiche della dieta mediterranea, determina un' efficace azione di contrasto sugli effetti degenerativi del profilo lipidico di membrana eritrocitaria.

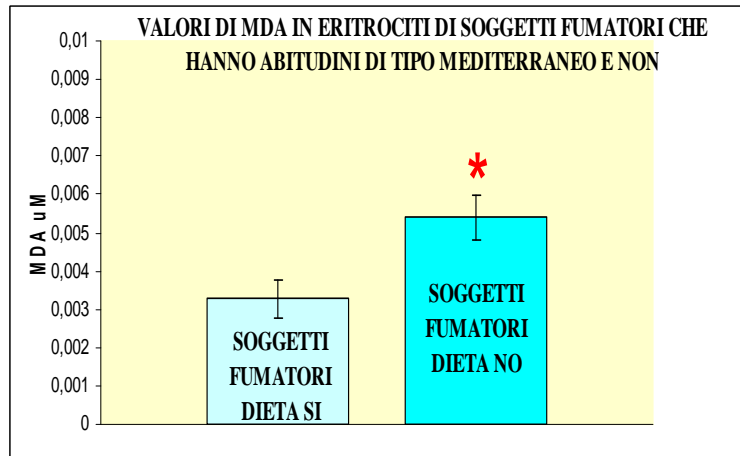


Fig.3 Prodotti di MDA nelle membrane eritrocitarie di soggetti fumatori -dieta si e soggetti fumatori -dieta no. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media \pm S.D. * $p < 0.05$ (n = 24)

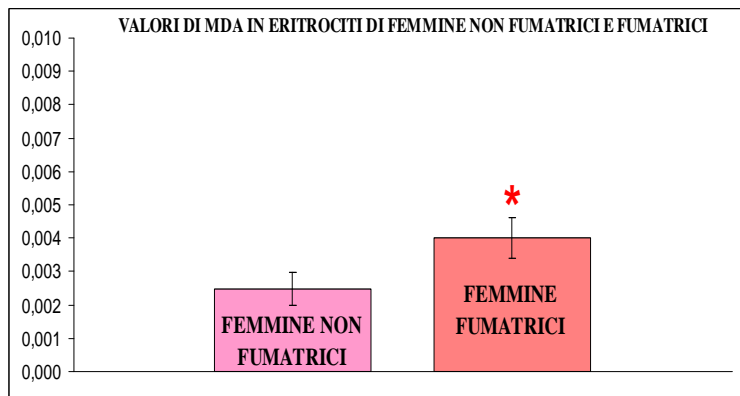


Fig.4 Prodotti di MDA nelle membrane eritrocitarie di femmine fumatrici e non . I valori ottenuti sono rappresentati dalla media \pm S.D. * $p < 0.05$ (n= 20)

L'istogramma evidenzia che i prodotti di perossidazione lipidica (espressi come equivalenti micromolari di MDA) risultano maggiori nei soggetti fumatori che non seguono uno stile di vita e un regime alimentare tipico della dieta mediterranea. L'aumento di tali prodotti è di circa il 45%. Dai risultati ottenuti si può ipotizzare che le abitudini alimentari corrette e lo stile di vita mediterraneo possono contrastare lo sviluppo dei prodotti perossidici anche nei soggetti fumatori

Nella figura 4 sono riportati i valori di MDA in un campione di popolazione di sesso femminile suddivisi in non fumatrici e fumatrici. Dai dati sperimentali ottenuti si evidenzia un aumento dei prodotti di perossidazione lipidica nelle membrane eritrocitarie provenienti da femmine fumatrici se comparate con quelle delle femmine non fumatrici. Tale aumento di ~80%, evidenziabile dall'incremento dei valori in assorbanza da 400 a 600 nm, è riconducibile allo stress radicalico indotto dal fumo di sigaretta.

INFLUENZA DELLO STRESS OSSIDATIVO SULL'EMOLISI ERITROCITARIA

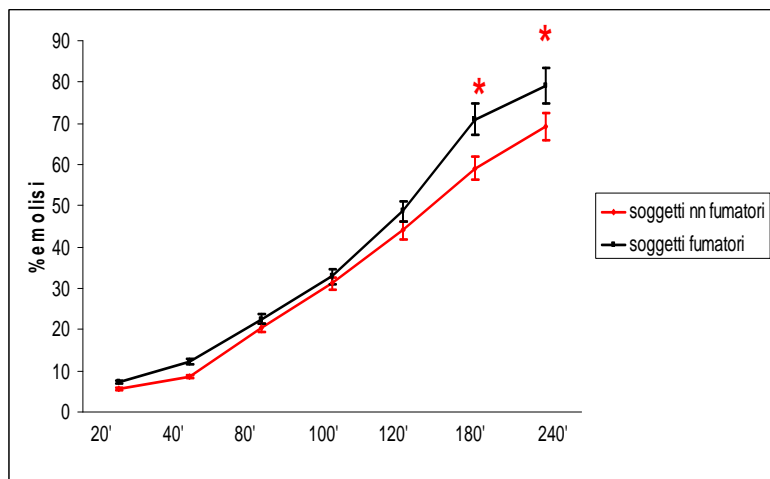


Fig. 6 Processo di emolisi in soggetti non fumatori comparati con soggetti fumatori. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media \pm S.D.

- $p < 0.05$ ($n = 48$). La significatività è evidente ai tempi 180' e 240'.

Allo scopo di monitorare l'emolisi dopo l'aggiunta dell'agente radicalico idrosolubile AAPH, sono state effettuate scansioni spettrofotometriche da 400 a 600 nm a diversi tempi. La fig. 6 mostra l'analisi effettuata sui soggetti non fumatori, comparati con soggetti fumatori; dal grafico si evidenzia un aumento della fragilità di membrana eritrocitaria riscontrabile come incremento della percentuale di emolisi ai tempi 180' e 240'

INFLUENZA DELLA DIETA MEDITERRANEA SULL'EMOLISI ERITROCITARIA

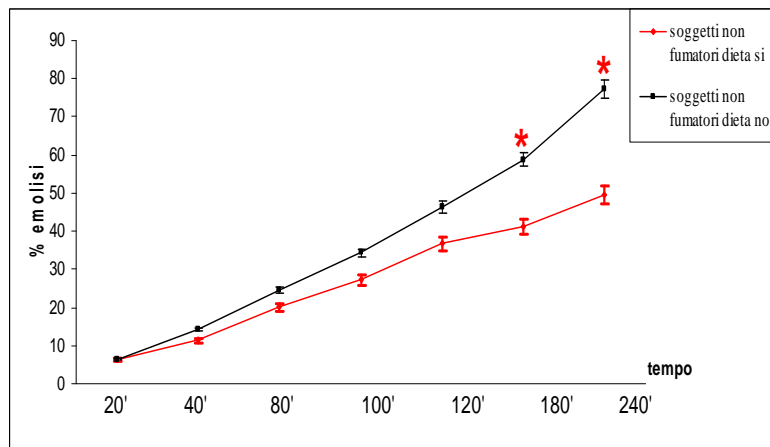


Fig.7 Processo di emolisi in soggetti non fumatori dieta si comparati con soggetti non fumatori dieta no. I valori ottenuti sono rappresentati

Il dato sperimentale conferma la protezione dallo stress ossidativo, grazie alla presenza di composti di natura antiradicalica presenti nella dieta mediterranea. La percentuale di emolisi e quindi la fragilità delle membrane eritrocitarie risulta più evidente nei soggetti non fumatori che non conducono uno stile di vita ed una alimentazione ascrivibile ad un regime dietetico tipico della dieta mediterranea

dalla media \pm S.D. * $p < 0,05$ ($n = 24$). La significatività è evidente ai tempi 180' e 240'

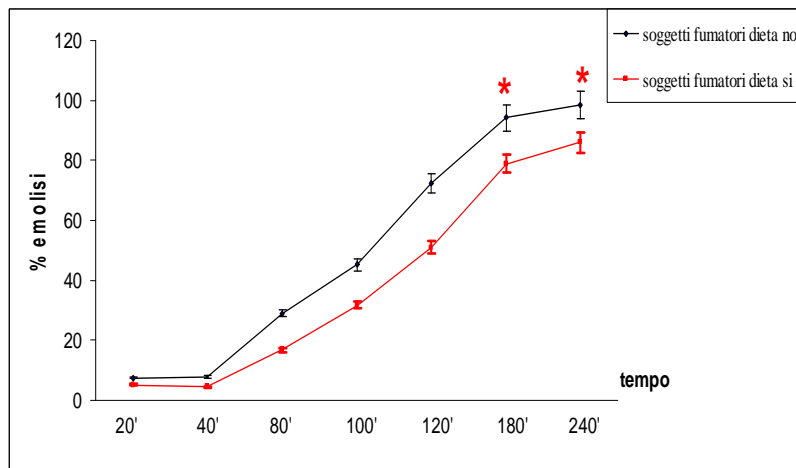
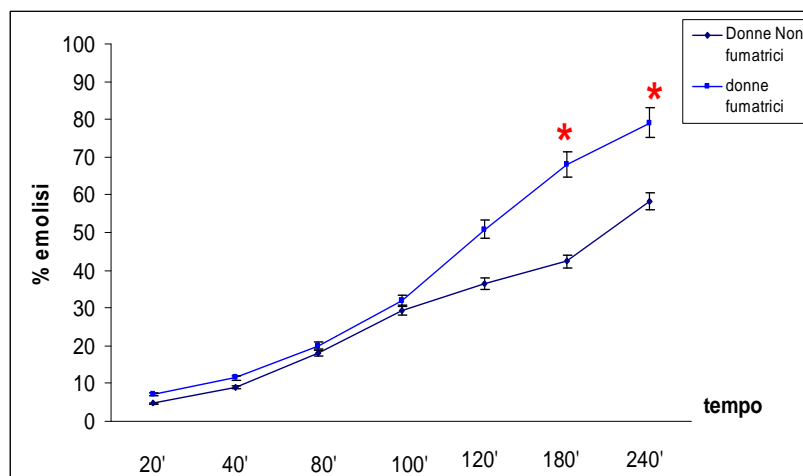


Fig.8. Processo di emolisi in soggetti fumatori dieta no comparati con soggetti fumatori dieta si. I valori ottenuti sono rappresentati dalla media \pm S.D. * $p < 0,05$. ($n = 24$)
La significatività è evidente ai tempi 180' e 240'.



La fragilità eritrocitaria è maggiormente evidenziabile nei soggetti fumatori che non seguono uno stile di vita mediterraneo. Tale risultato sperimentale conferma che la dieta mediterranea è in grado di ridurre i prodotti perossilici anche nei soggetti con maggiore predisposizione allo stress ossidativo come i fumatori

La stessa procedura sperimentale è stata condotta con un campione di popolazione di sesso femminile suddiviso in fumatrici e non fumatrici

La fragilità eritrocitaria e la relativa emolisi percentuale nei campioni esaminati indotta dal radicale AAPH è dipendente dal tempo ed è maggiormente evidenziabile dopo i 100 min nelle fumatrici, tale aumento è riscontrabile ai tempi 180' min e 240' min.

Fig.9 Processo di emolisi in femmine non fumatrici comparate con le femmine fumatrici . I valori ottenuti sono rappresentati dalla media± S.D. (n= 20). La significatività è evidente ai tempi 180' e 240' * $p<0,05$.

DETERMINAZIONE DEI LIPIDI E DELLE LIPOPROTEINE

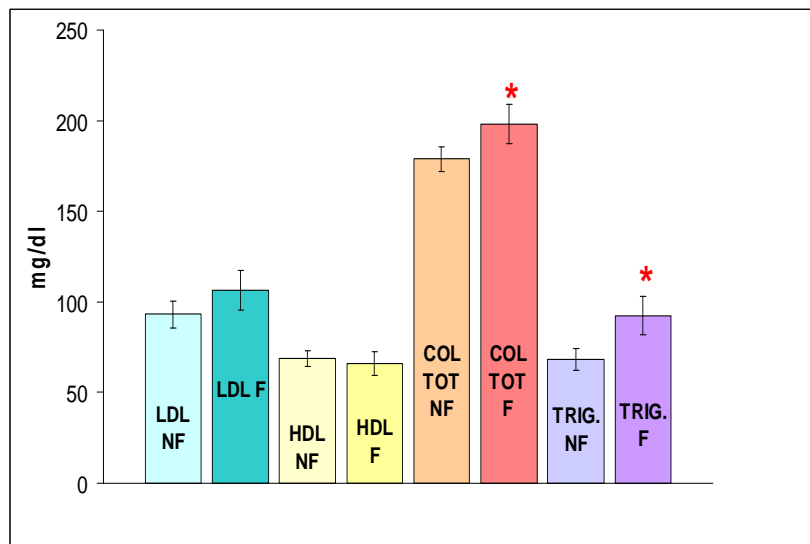


Fig.10 Rappresentazione grafica della variazione del profilo lipidico in femmine non fumatrici comparate con femmine fumatrici * $p<0,05$.

Il dato sperimentale ottenuto, conferma l'aumento dei prodotti di perossidazione lipidica, soprattutto per i parametri colesterolo totale e trigliceridi nelle femmine fumatrici se paragonate con quelle non fumatrici. Il parametro HDL, pur essendo in concentrazione maggiore nelle femmine non fumatrici rispetto a quello delle fumatrici, non presenta valori significativi per il test del T di Student. Il valore delle LDL risulta essere maggiore nelle femmine fumatrici rispetto a quelle delle non fumatrici; anche in questo caso non si ha una significatività apprezzabile poiché i valori sono lontani dal

MISURA DI EMOLISI ERITROCITARIA: COMPARAZIONE TRA FEMMINE NON FUMATRICI E FUMATRICI E VALUTAZIONE MORFOLOGICA DEGLI ERITROCITI DOPO ESPOSIZIONE A SOLUZIONI A DIVERSA FORZA IONICA

I seguenti grafici rappresentano la curva di emolisi percentuale degli eritrociti di femmine non fumatrici comparate con femmine fumatrici a diverse concentrazioni di NaCl e ai tempi 5' 20' 40' e 60' minuti.(fig.11,12)

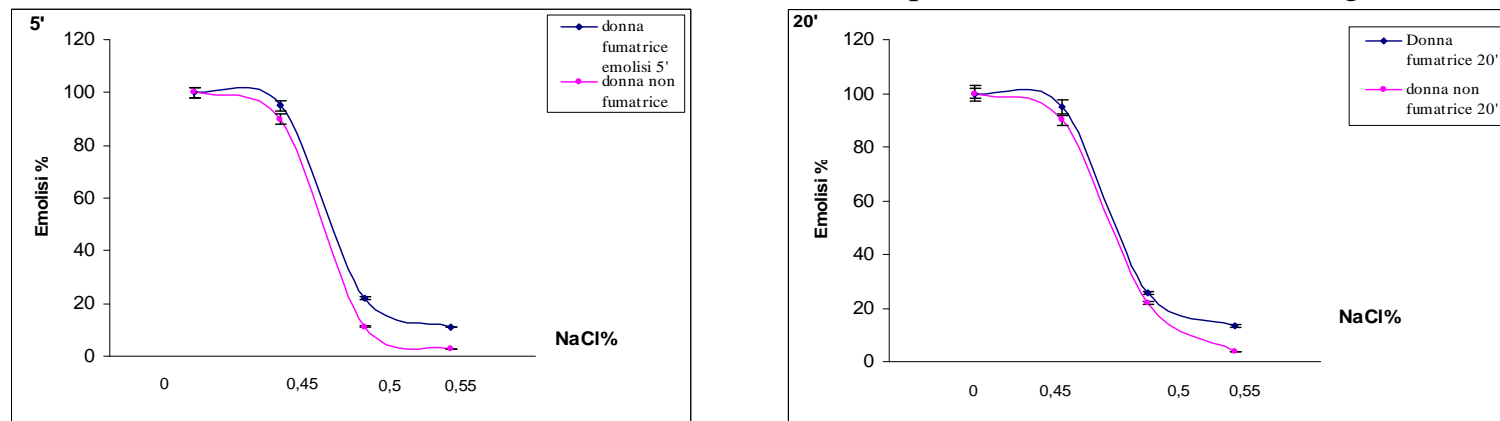


Fig 11. (confronto tra soggetti fumatrici e non)- Rappresentazione grafica della variazione della fragilità osmotica degli RBC. Eritrociti esposti a una serie di diluizioni NaCl da 0 a 0,55 % al tempo 5 e 20 min.

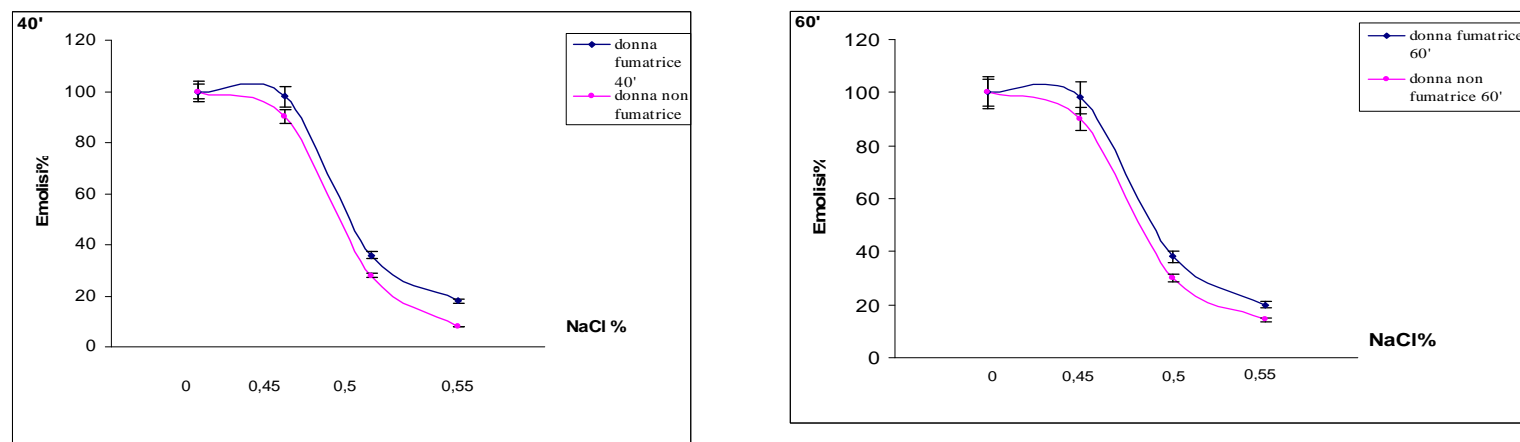


Fig 12. (confronto tra fumatrici e non) -Rappresentazione grafica della variazione della fragilità osmotica degli RBC.) Eritrociti esposti a una serie di diluizioni NaCl da 0 a 0,55 % al tempo 40 e 60 min.

Si ritiene che la membrana dell'eritrocita sia poco estensibile, pertanto in condizioni ipotoniche raggiunge la forma sferica, con conseguente emolisi. L'aumento dei prodotti perossidici nelle membrane eritrocitarie, in seguito allo stress indotto dal fumo di sigaretta, conferisce diminuzione della proprietà di barriera per irrigidimento del doppio strato lipidico con conseguente incremento della fragilità osmotica. I dati ottenuti confermano tale ipotesi, mostrando a tutti i tempi di emolisi una diminuzione delle proprietà viscoelastiche di membrana nelle fumatrici

STRESS OSSIDATIVO E VARIAZIONE MORFOLOGICA DEGLI ERITROCITI.

Lo stress, indotto dalle soluzioni a diversa forza ionica, è confermato dalle immagini ottenute in microscopia a contrasto di fase.

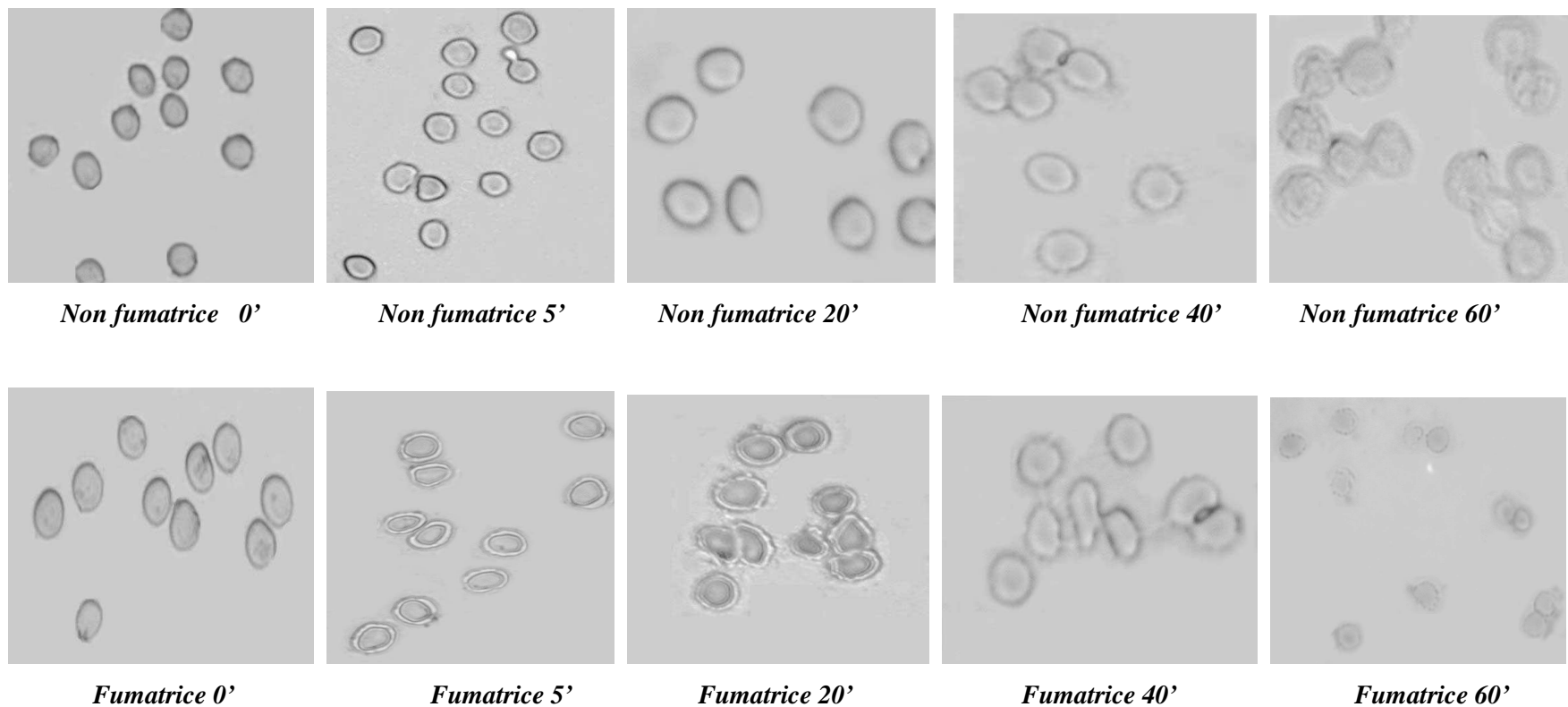


Fig.13. anomalie morfologiche degli eritrociti provenienti da soggetti fumatrici e non, dopo l'esposizione a soluzioni a diversa forza ionica (Na Cl – 0, 0,45, 0,5, 0,55 %).

Dal confronto con le femmine non fumatrici si osserva nelle fumatrici una modificazione delle membrane eritrocitarie

CONCLUSIONI

Sulla base dei dati ottenuti, si evince un significativo incremento, di circa il 50%, dei prodotti di perossidazione lipidica, espressi come equivalente in μM di MDA (fig.1), nei soggetti fumatori comparati con i soggetti non fumatori. Tali dati sono riscontrabili anche nei soggetti fumatori e non che non seguono un regime dietetico di tipo mediterraneo (fig.2,3). I risultati sperimentali confermano la capacità di protezione dallo stress ossidativo per la probabile azione di contrasto degli antiossidanti presenti nella dieta. Infatti, l'aumento dei prodotti perossilici nelle membrane eritrocitarie aumenta di circa il 45% nei soggetti fumatori e del 40% nei non fumatori.

Dai dati descritti in fig 4 si evidenziano significative differenze nella formazione di prodotti perossilici di circa l'80%, nelle membrane di eritrociti in femmine fumatrici rispetto alle non fumatrici. L'andamento dell'emolisi eritrocitaria, indotta dall'agente radicalico AAPH, è più veloce ed intensa in preparati eritrocitari di soggetti fumatori (♀ ♂) rispetto ai non fumatori(♀ ♂). Le misure di emolisi effettuate alle stesse condizioni sperimentali in soggetti fumatori che hanno abitudini nutrizionali di tipo mediterraneo, comparati con i soggetti che non seguono tale regime dietetico evidenziano una differenza del profilo emolitico più marcata già a 100' con incremento della significatività ai tempi 180' e 240'. Il profilo della composizione lipidica, espressa in mg/dl, dimostra significativi incrementi per il colesterolo totale ed i trigliceridi ematici delle fumatrici rispetto alle non fumatrici, anche se i valori di riferimento, in entrambi i casi, rientrano nel range della

normalità per una popolazione di sesso femminile standard. Le curve di emolisi dei preparati eritrocitari dei due gruppi esaminati mostrano, inoltre, che l'andamento della lisi degli eritrociti nelle femmine fumatrici avviene in un ambito di concentrazione salina più ristretto e con maggiore intensità rispetto a quella osservata nelle femmine non fumatrici (fig.11,12). Tali dati sperimentali sono confermati dalla indagine effettuata in microscopia a contrasto di fase dove si sono osservate modificazioni della membrane eritrocitarie, in particolare l'aumento del volume corpuscolare medio degli eritrociti con evidenti stati emolitici quando si espongono i preparati a forza ionica maggiore. In complesso, l'abitudine al fumo di sigaretta causa un significativo danno perossidativo dei lipidi di membrana eritrocitaria e plasmatici, rilevabile mediante tecniche fotometriche e di cinetiche enzimatiche ben consolidate ed affidabili, atte ad effettuare, quindi, screening su una popolazione più vasta.

BIBLIGRAFIA

- 1) Garattini S, La Vecchia C - *"Il fumo in Italia: prevenzione, patologie e costi"* - Editrice Kurtis - Milano - pp. 33 - 37- 2002
- 2) Goraca A, Skibska B, Bratisl Lek Listy ;106(10):301-306, 2005
- 3) . Melillo E.M. et al, Tabaccologia;1:29-33, 2004
- 4) Annemien Haveman-Nies, PhD, Lisette C.P.G. M. de Groot, PhD, and Wija A. van Staveren, American Journal of Public Health February 2003 Vol 93, No. 2
- 5) Picciolo S, Tabaccologia; 3:31-37, 2006
- 6) **Cheeseman K.H.**: *Mechanisms and effects of lipid peroxidation*. Molec. Aspects med., Vol. 14: 191-197, 1993.
- 7) **Sevanian A., Ursini F.**: *Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences*. Free radical biology & medicine, vol. 29, nos 3/4 : 306-311, 2000.
- 8) **Armutcu F., Coskun O., Sahin S., Kanter M., Cihan A., Numanoglu K.V. and Altinyazar C.**: *Vitamin E protects against acetone-induced oxidative stress in rat red blood cells*. Cell Biology and Toxicology, 21:53-60, 2005.
- 9) **Draper HH., Hadley M.**: *Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation*. Methods Enzymol., 186: 421-431, 1990.
- 10) **Noguchi, N., Takahashi M., Tsuchiya, J., et al.**: *Action of 21-aminosteroid U74006F as an antioxidant against lipid peroxidation*. Biochem Pharmacol, 55: 785-791, 1998.
- 11) **Liu Z., Yu W., Liu Z.**: *Antioxidative and prooxidative effects of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein*. Chem Phys Lipids, 103: 125-135, 1999.
- 12) **Liégeois C., Lermusieau G., Collin S.**: *Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid*. J Agric Food Chem, 48 1129-1134, 2000
- 13) **Feng N. Ko, George Hsiao, Yueh H. Kuo.**: *Protection of oxidative hemolysis by demethyldiisoeugenol in normal and β -thalassemic red blood cells*. Free radical Biology and Medicine, 22: 215-222, 1997.
- 14) **Rossi R., Iustarini D., Milzani A., Dalle - Donne** : *Membrane skeletal protein S- glutathionylation and hemolysis in human red blood cell*. Blood cell, Molecules & Diseases 37: 180-187; 2006.

