مقاله پژوهشی

بررسی ارزش تشخیصی مالون دی آلدهید سرم به دو روش اسپکتروفتومتری تیوباربیتوریک اسید و کروماتوگرافی با کارایی بالا و بیماری عروق کرونر قلبی

زهرا محمدی آبگرمی[۱]، دکتر محمدحسن خادم انصاری[۲]، دکتر بمان‌علی جلالی خان‌آبادی[۳]، دکتر محمدحسین مصدق مهرجردی[۴]، سیدمجید مهدوی[۵]

تاریخ دریافت ۸۷/۰۶/۲۶ تاریخ پذیرش ۸۷/۰۸/۲۹

چکیده

پیش زمینه و هدف: آترواسکلرور و بیماری عروق کرونر قلبی (CAD)، عامل مرگ و میر در کشورهای صنعتی و هم‌چنین کشورهای در حال توسعه می‌باشد. مالون دی آلدهید محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهاست. روش‌های متعددی برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدها ارائه شده است هدف اصلی از این مطالعه تحقیق و ارزیابی روش‌های تیوباربیتوریک اسید (TBARS) و کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) برای تعیین و مقایسه مالون دی آلدهید (MDA) در گروهی از مبتلایان به تنگی عروق کرونر و افراد شاهد بوده است.

مواد و روش کار: افراد مورد مطالعه شامل ۴۷ نفر شاهد و ۵۳ نفر مبتلا به CAD بودند. نمونه خون بعد از یک شب ناشتا ماندن تهیه و سرم جدا گردید. برای اندازه‌گیری MDA ابتدا پروتئین‌های سرم با استفاده از محلول تری کلرواستیک اسید رسوب داده شده و با عمل سانتریفوژ جدا گردید. محلول صاف شده رویی با اسید تیوباربیتوریک در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵۰ دقیقه واکنش داده شد. برای تعیین MDA به روش تیوباربیتوریک اسید، مجموعه رنگی حاصل در طول موج ۵۳۲ نانومتر سنجش شد. برای روش HPLC، ۲۰ میکرولیتر از مجموعه رنگی حاصل به ستون فاز معکوس HPLC تزریق و پس از شستشو به روش ایزوکراتیک، مجموعه رنگی حاصل جداسازی و با دتکتور مرئی در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: درصد بازیابی روش‌های HPLC و TBARS به‌ترتیب بین ۹۲/۰۵ تا ۱۰۵/۲ و ۸۴/۷ تا ۱۰۲ درصد به‌دست آمد. ضریب تغییرات روش HPLC در حدود ۶/۱۷-۴ درصد و برای روش TBARS در حدود ۱۲/۲۲-۷/۲۷ درصد محاسبه گردید. حد تشخیص روش HPLC و روش TBARS به‌ترتیب ۰/۰۵ میکرومولار و ۰/۱ میکرومولار به‌دست آمد. سطح سرمی MDA تعیین شده با روش تیوباربیتوریک اسید از سطح به‌دست آمده به روش HPLC به‌طور معنی‌داری بالا بود (p value = ۰/۰۰۲). هم‌چنین میانگین سطح سرمی MDA در بیماران مبتلا به تنگی عروق کرونر قلب بالاتر از افراد گروه کنترل بود. همبستگی معنی‌داری بین نتایج حاصل از سنجش MDA به روش تیوباربیتوریک اسید با نتایج حاصل از تعیین این ترکیب به روش HPLC به‌دست آمد (r^2 = ۰/۳۲۵ و P value = ۰/۰۲).

بحث و نتیجه گیری: اگر چه روش HPLC روش دقیق و صحیحی برای اندازه‌گیری MDA در مایعات بیولوژیک می‌باشد، ولی این روش وقت گیر و پرهزینه است. بنابراین با ایجاد شرایط مناسب و بهبود کیفیت در روش تیوباربیتوریک اسید می‌توان نتایج قابل قبولی را از این روش انتظار داشت و از آن برای کارهای روتین آزمایشگاهی و مطالعات اپیدمیولوژیکی استفاده نمود. براساس این مطالعه و هم‌چنین مطالعات قبلی، سطح سرمی MDA در بیماران عروق کرونر بالاتر از افراد شاهد بوده و بدین ترتیب اندازه‌گیری MDA به‌عنوان یک عامل خطرساز مستقل و یا به‌عنوان شاخصی از وجود آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی عروقی مطرح می‌باشد.

کلید واژه‌ها: مالون دی آلدهید، کروماتوگرافی با کارایی بالا، تیوباربیتوریک اسید، بیماری عروق کرونر قلبی

مجله پزشکی ارومیه، دوره نوزدهم، شماره چهارم، ص ۲۹۴-۲۸۹، زمستان ۱۳۸۷

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی و تغذیه، تلفن: ۰۴۴۱-۲۷۷۰۹۶۹

E-mail: mhansari@hotmail.com

[۱] کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

[۲] دانشیارگروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

[۴] استادیار گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

[۵] کارشناس ارشد آزمایشگاه گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

مقدمه

بیماری عروق کرونر قلبی مهم‌ترین عامل مرگ و میر در اغلب کشورهای پیشرفته و در حال توسعه می‌باشد (۱) و طبق آخرین گزارش موجود WHO هر سال ۱۶/۶ میلیون نفر در اثر بیماری‌های قلبی عروقی جان خود را از دست می‌دهند و به همین دلیل مورد توجه فراوان محققان سراسر دنیاست (۲،۳).

آترواسکلروز و ایجاد نارسایی در عروق قلبی یک فرایند تدریجی است و این فرایند زمانی مشکل ساز خواهد بود که به‌وسیله عوامل و یا شرایط خاصی تشدید شود. به‌نظر می‌رسد که مناسب ترین راه جهت مقابله با این بیماری شناخت درست و دقیق عوامل خطرساز آن از قبیل دیابت (۵،۴)، مصرف سیگار (۶) افزایش فشار خون (۸،۷) هیپرکلسترولمی (۱۰،۹،۴) و استرس اکسیداتیو (۱۲،۱۱) می‌باشد. مالون دی آلدهید محصول نهایی پراکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد (۱۳،۱۴). برای اندازه‌گیری میزان اکسیداسیون لیپیدها روش‌های متعددی طراحی شده است که بهترین و ارزشمندترین آن‌ها اندازه‌گیری مستقیم LDL اکسیده و OX – IDL می‌باشد که نیازمند روش‌های اختصاصی از قبیل الایزا می‌باشد (۱۵). در بعضی از روش‌ها با اندازه‌گیری محصولات حاصل از اکسیداسیون لیپیدها وضعیت پراکسیداسیون لیپیدی سنجیده می‌شود. یکی از مهم‌ترین محصولات حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها، مالون دی آلدهید می‌باشد که بسیار مورد توجه بوده و به‌طور وسیعی مورد سنجش قرار می‌گیرد (۱۶،۱۷).

روش‌های فتومتری برای تعیین مالون دی آلدهید بسیار ساده و کم هزینه هستند. از جمله این‌گونه روش‌ها، واکنش تیوباربیتوریک اسید می‌باشد که در بسیاری از کارهای روتین و تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۸). از جمله روش‌های غیرمستقیم و معتبر برای تعیین مالون دی آلدهید، استفاده از کروماتوگرافی با کارایی بالا برای جداسازی و تعیین مقدار ترکیب فوق در مایعات بیولوژیک می‌باشد (۱۹).

با توجه به موارد مذکور هدف از این مطالعه ارزیابی ارزش تشخیصی دو روش HPLC و تیوباربیتوریک اسید (TBARS) برای تعیین مقدار مالون دی آلدهید به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی در بیماران قلبی می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه ۱۰۰ نفر شامل ۵۳ نفر مبتلا به تنگی عروق کرونر با میانگین سنی ۵۵/۲±۷/۵۳ و ۴۷ نفر گروه شاهد با میانگین سنی ۵۳/۱۰±۹/۶۲ سال انتخاب شدند. افراد بیمار کسانی بودند که برای آنژیوگرافی به مرکز تحقیقاتی - درمانی قلب و عروق بیمارستان افشار یزد مراجعه نموده بودند و نتایج آنژیوگرافی آن‌ها، گرفتگی عروق کرونر را حداقل در یکی از رگ‌های اصلی قلب به میزان بیش از ۵۰ درصد نشان می‌داد. برای برآورد حجم کل نمونه میانگین حجم نمونه در مطالعات مشابه به تعداد ۲۲، ۳۷ و ۴۰ نفر، در نظر گرفته شد. افرادی‌که داروهای آنتی اکسیدان و داروهای پایین آورنده چربی مصرف می‌نمودند و سابقه بیماری‌های کلیوی، کبدی و دیابت داشتند یا سیگار مصرف می‌کردند، از مطالعه حذف شدند.

یک نمونه خون بعد از ۱۲ ساعت ناشتا بودن اخذ گردید و بعد از ۱۵ دقیقه نگهداری در حرارت آزمایشگاه با یک سانتریفوژ رومیزی سرم را جدا نموده و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا یک ماه قبل از آزمایش نگهداری شد.

اندازه‌گیری مالون دی آلدهید: تحت شرایط اسیدی و دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد یک مولکول مالون دی آلدهید با دو مولکول تیوباربیتوریک اسید واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را ایجاد می‌کند. اندازه‌گیری مالون دی آلدهید به دو روش تیوباربیتوریک اسید و کروماتوگرافی با کارایی بالا (۲۴-۲۱) انجام پذیرفت. در ابتدا پروتئین سرم با استفاده از تری کلرواستیک اسید جدا و با سانتریفوژ رسوب جدا و از محلول صاف شده جهت اندازه‌گیری MDA استفاده گردید. با روش اسپکتروفتومتری جذب نوری کمپلکس رنگی در طول موج ۵۳۲ نانومتر پس از کسر جذب زمینه در طول موج ۵۷۲ نانومتر (۲۳) انجام گردید. جهت اندازه‌گیری با روش HPLC حدود ۲۰ میکرولیتر از همان کمپلکس رنگی تهیه شده به دستگاه HPLC تزریق شد.

در این مطالعه از دستگاه HPLC ساخت شرکت Shimadzu ژاپن مدل6AV - SPD که مجهز به دتکتور UV – VIS Spectrophotometr، پمپ "LC-6A"، یک سیستم کنترل کننده فاز متحرک با درجه کاهش فشار مدل "FCV-3AL" و ستون C_8 استفاده گردید. جریان فاز متحرک ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه بود که از ۶۵ قسمت بافرفسفات ۰/۰۵ M با pH=۷ و ۳۵ قسمت متانول خالص تشکیل شده بود.

در روش HPLC جهت مطالعه غلظت MDA از استاندارد ۱و۱و۲و۲ – تترا اتوکسی پروپان (TEP) محصول شرکت سیگما (۲۱)، غلظت‌هایی در محدوده ۱۰ – ۱ میکرومولار جهت ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد.

در روش HPLC برای بررسی صحت روش (درصد بازیابی) و مشخص کردن حد تشخیص روش (بررسی حساسیت) از روش‌های استاندارد (۲۴) استفاده گردید. برای بررسی خطی بودن روش رقت‌های متوالی از ۰/۰۱ تا ۱۵ میکرومولار مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری: نتایج حاصل از آنالیز بیوشیمیایی، با استفاده از نرم افزار آماری spss مورد آنالیز قرار گرفت. اختلافات بین غلظت‌های آنالیت در زیر گروه‌های تعریف شده دارای توزیع نرمال، با student t-test دو طرفه و در زیر گروه‌های تعریف شده با توزیع غیرنرمال با Mann-Whitney u-test مقایسه شدند. ارزش p-value < ۰/۰۵ از نظر آماری قابل قبول می‌باشد. برای تعیین همبستگی بین داده‌های با توزیع نرمال و غیرنرمال بترتیب از آزمون Pearson Correlation test و آزمون ضریب Spear - Mann استفاده گردید.

نتایج

میانگین ضریب تغییرات با روش HPLC و TBARS به ترتیب ۶/۱۷-۴ و ۱۲/۲۲-۷/۲۷ درصد به‌دست آمد. درصد بازیابی با روش HPLC و روش تیوباربیتوریک اسید به ترتیب، بین ۹۲/۰۵ تا ۱۰۵/۲ و ۸۴/۷ تا ۱۰۲ درصد را نشان داد.

در بررسی خطی بودن روش، پس از تهیه رقت‌های متوالی از استاندارد MDA، پایین‌ترین و بالاترین غلظتی که دستگاه HPLC قادر به سنجش آن بود به ترتیب ۰/۰۵ و ۱۲ میکرومول بر لیتر بود، در حالی‌که با روش TBARS کمترین و بیشترین غلظت قابل سنجش ۰/۱ و ۱۰ میکرومولار بود.

میانگین سطح سرمی مالون دی آلدهید در جمعیت مورد مطالعه (۱۰۰ نفر) با استفاده از روشHPLC ۰/۲۴۴±۰/۵۳۳ میکرومولار و با روش تیوباربیتوریک اسید ۰/۳۶۲±۰/۷۸۷ میکرومولار به‌دست آمد میانگین غلظت با دو روش فوق نشان می‌دهد که میزان MDA سنجش شده با روش تیوباربیتوریک اسید، به‌طور معنی‌داری از روش HPLC بیشتر است (p value = ۰/۰۰۲).

فراوانی غلظت مالون دی آلدهید با روش HPLC در مبتلایان به تنگی عروق کرونر قلب، ۰/۲۱۹ ± ۰/۵۷ و در افراد شاهد، ۰/۲۶۶±۰/۴۸۸ میکرومولار بود. مقایسه میانگین سرم در دو گروه نشان می‌دهد که غلظت سرم در مبتلایان به تنگی عروق کرونر، به‌طور معنی‌داری از افراد شاهد بیشتر می‌باشد (p value= ۰/۰۱۷).

میانگین غلظت MDA سرم به روش تیوباربیتوریک اسید در مبتلایان به تنگی عروق کرونر قلب ۰/۴۱۴±۰/۸۹۳ میکرومولار و در افراد شاهد ۰/۲۳۷±۰/۶۶۳ میکرومولار بود. مقایسه میانگین در دو گروه حاکی از آن است که غلظت MDA سرم در مبتلایان به تنگی عروق کرونر، به‌طور معنی‌داری از افراد شاهد بیشتر می‌باشد (p value = ۰/۰۰۱).

بین غلظت مالون دی آلدهید سنجش شده بروش HPLC – چه در گروه شاهد و چه در گروه بیمار– با غلظت مالون دی آلدهید سنجش شده با روش TBARS همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت (جدول شماره ۱).

جدول شماره (۱): ضریب همبستگی غلظت MDA سنجش شده با استفاده از دو روش HPLC و TBARS در دو گروه شاهد وبیمار

شاهد			بیمار		
تعداد (نفر)	ضریب همبستگی(r^2)	p value	تعداد(نفر)	ضریب همبستگی (r^2)	p value
۴۷	۰/۳۲۵	۰/۰۲۹	۵۳	۰/۳۱۷	۰/۰۲۱

بحث و نتیجه گیری

اختلال در لیپوپروتئین‌های پلاسما و متابولیسم چربی‌ها بیش از سایر عوامل خطرساز در آترواسکلروز بررسی شده و نقش آن به اثبات رسیده است (۲۵). تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که اکسیداسیون LDL تاثیر قابل ملاحظه‌ای در تشدید آترواسکلروز دارد (۱۳،۲۶).

مطالعات Uchidak در یک مقاله مروری نشان داد که آلدهیدها به‌طور اندوژن در اثر فرایندهای زوال مولکولی تولید می‌شوند، لذا در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های قلبی عروقی مثل آترواسکلروز دخیل می‌باشند (۳۳). هم‌چنین اثبات شده است که مالون دی آلدهید سرم یک عامل خطرساز مستقل برای بیماری عروق کرونر قلب می‌باشد (۲۷). مطالعات Dincer (۲۸)، Kavocas (۲۹) و Kostner (۳۰) Mc Murray (۳۲،۳۱) نیز افزایش سطح مالون دی آلدهید را در بیماران مبتلا به تنگی عروق کرونر قلب تایید نموده است.

از جمله روش‌های بررسی میزان اکسیداسیون لیپیدها، تعیین میزان اکسیداسیون لیپیدها، تعیین میزان حساسیت آن‌ها نسبت به اکسیداسیون و تعیین مقدار محصولات به‌دست آمده از فرایند فوق می‌باشد (۳۳) که یکی از این محصولات MDA می‌باشد.

در این مطالعه مناسب‌ترین روش جهت سنجش MDA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و همچنین HPLC در بیماران عروق کرونر به‌کار برده شده است. در روش HPLC مشتق شده، MDA و تیوباربیتوریک اسید از سایر ترکیبات جداسازی و سپس سنجش می‌شود و طبیعتا این روش اختصاصی‌تر و در نتیجه از صحت

بالاتری برخوردار است. در این مطالعه میانگین غلظت MDA سرم با روش تیوباربیتوریک اسید به‌طور معنی‌داری بالاتر از سنجش آن با روش HPLC برای گروه شاهد و بیمار بود.

Marcincak و همکارانش میزان مالون دی آلدهید را با دو نوع روش تیوباربیتوریک اسید و یک نوع روش HPLC (مشتق سازی با دی نیتروفنیل هیدرازین) اندازه‌گیری نمودند (۳۴). نتایج دو نوع روش تیوباربیتوریک اسید با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند درحالی‌که میانگین MDA سنجش شده با هر دو نوع روش تیوباربیتوریک اسید، به‌طور معنی‌داری بالاتر از مالون دی آلدهید سنجش شده با روش HPLC بود (۳۴). دلیل این اختلاف غیراختصاصی بودن روش اسپکتروفتومتری بوده است.

در مطالعه دیگری Tug و همکاران، غلظت مالون دی آلدهید سرم بیمارانی را که دچار انسداد مزمن ریوی بودند، با دو روش فوق، اندازه‌گیری نموده و نتایج حاصل را باهم مقایسه نمودند. در هر دو گروه شاهد و بیمار میزان مالون دی آلدهید سنجش شده با روش تیوباربیتوریک اسید، به‌طور معنی‌داری بالاتر از میزان مالون دی آلدهید سنجش شده با روش HPLC بود (۲۰).

نتایج حاصل از بررسی‌های ما در این مطالعه در مورد تعیین دقت روش برای سنجش مالون دی آلدهید نشان می‌دهد که ضریب تغییرات روش HPLC نسبت به روش تیوباربیتوریک اسید، کمتر بوده و لذا روش HPLC دقیق‌تر می‌باشد.

هم‌چنین در مطالعه ما بازیابی روش HPLC، بین ۸۵ تا ۱۰۵ درصد و بازیابی روش تیوباربیتوریک اسید بین ۹۲ تا ۱۰۲ درصد بود. پس می‌توان گفت که روش HPLC نسبت به روش تیوباربیتوریک از صحت بیشتری برخوردار است.

Tug و همکارانش، بازیابی روش HPLC برای MDA را در حدود ۹۵/۵ درصد و برای روش تیوباربیتوریک اسید ۸۴/۲ درصد به‌دست آوردند (۲۰). نتایج آنان نیز درصد بازیابی بالاتر را برای روش HPLC تایید کرد. ولی نتایج ما نسبت به نتایج آنان از صحت بیشتری برخوردار می‌باشد. در مطالعه دیگریRichard و همکاران روش فوق را توسعه داده و واکنش تیوباربیتوریک اسید را در پلاسما، اریتروسیت‌ها و فیبروبلاست‌های انسانی انجام دادند. آنان بازیابی روش را ۱۰۰ – ۷۰ گزارش نمودند (۳۵).

با توجه به مطالعات قبلی و یافته‌های کنونی چنین برداشت می‌شود که غلظت بالای مالون دی آلدهید سرم، یک عامل خطرساز برای بیماری تنگی عروق کرونر می‌باشد. با توجه به این‌که در مطالعه ما غلظت مالون دی آلدهید سرم در مبتلایان به تنگی عروق کرونر به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد شاهد بود، در شرایط جامعه مورد مطالعه ما نیز مالون دی آلدهید می‌تواند به‌عنوان عامل مهمی در بروز آترواسکلروز نقش داشته باشد. هم‌چنین روش HPLC برای تعیین MDA در مایعات بیولوژیک از روش فتومتری تیوباربیتوریک اسید اختصاصی تر بوده و از صحت بالاتری برخوردار است.

References:

1. Papadakis S, Moroz I. Population level interventions for coronary heart disease prevention; what have we learned since the North Karelia project? Curr Opin Cardiol 2008; 23: 452 -61.
2. Mieres JH. Review of the American associations guidelines for cardiovascular disease prevention in women. Heart 2006; 92 (Suppl 3): 10-30.
3. Zhang XL, Lu ZL, Liu L. Coronary heart disease in China. Heart 2008; 94: 1126-31.
4. Iwashita M, Matsushita Y, Sasaki J, Arakawa K, Kono S. Kushu lipid intervention study (KLIS) group. Circ J 2004; 68: 405-9.
5. Lee CM , Huxley RR , Lam TH, Martiniuk AL , Ushema H, Pan WH, et al. Prevalence of diabete mellitus and population attribution fractions for coronary heart disease and stroke mortality in WHO south-east Asia and west Pacific regions. Asia Pac J Clin Nutr 2007; 16: 187-92.
6. Jockel KH, Lehmann N, Jaeger BR, Moebus S, Mohlenkamp S, Schmermund A, et al. Smoking cessation and subclinical atherosclerosis- results from the Heinz Nixdorf recall study. Atheroscler 2008 (Eupb ahead of print)
7. Onata A, Yazici M, Can G, Kaya Z, Bulur S, Herqenc G. Predictive value of prehypertension for metabolic syndrome, diabetes and coronary artry disease among Turks. Am J Hypertens 2008; 28: 890-5.
8. Abdulle AM, Naqelkerke NJ, Abouchacra S, Obineche N. Potential benefits of controlling

coronary heart disease risk factors in the United Arab. Kidney Blood Press Res 2008; 31: 185-8.

9. Woowased M, Martiniuk A, Ying Lee CM, Lam TH, Vanderhoorn S, Ueshima H, et al. Elevated total cholesterol: its prevalence and population attribution fraction for mortality from coronary heart disease and ischemic stroke in the Asia – Pacific region. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2008; 15: 397-401.
10. Siierra Johnson J, Fisher RM, Romero Corral A, Somers VK, Lopez Jimnes F, Ohrvik J, et al. Concentration of apolipoprotein B is comparalele with the apolipoprotein A-I ratio and better than routin clinical lipid measurement in predicting coronary heart disease mortality. Finding from a multi-ethnic US population. Eur Heart J 2008 (Epub ahead of print)
11. Tismikas S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. Am J Cardiol 2006; 98: 9-17.
12. LO Presti R, Amico T, Montana M, Canino B, Amodeo G, Ciancarelli MG, et al. Evaluation of oxidative status in coronary heart disease at baseline and during exercise test. Clin Hemorheal Microcirc 2007; 37: 339-43.
13. Holvet P. Relationship between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. Verh K Acad Geneeskd Bleg 2008; 70: 193-219.
14. Rybus Kalinowska B, Zwirska Korczala K, Kalinowski M, Kukula M, Birkner E, Jochem J. Activity of antioxidative enzymes and concentration of malondialdehyde as oxidative status markers in women with newly diagnosed Graves – Basedow disease and after thiomazole thrapy loading to euthyroidism. Pol Arch Med Wewn 2008; 118: 420-5.
15. Kohno H, Sueshing N, Oguri K, Izumida H, Masunari T, Kawamura M, et al. Simple and partical sandwich-type enzyme immunoassay for human oxidatively modified low density lipoprotein using antioxidized phosphatidylcholine monocolonal antibody and antihuman apolipoprotein B antibody. Clin Biochem 2000; 33:243-53.
16. Guentsch A, Preshaw PM, Bremer Streck S, Glockmann E, Siqusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis. Effect of smoking and periodontal treatment. Clin Oral Investing 2008 (Epub ahead of print)
17. Tuter G, Kurti S, Serdar M. Interleukin – 1beta and thiobarbitoric reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. J Periodontal 2001; 72: 883-8.
18. Moore K, Robert LJ. Measurement of lipid peroxidation. Free Radic Res 1998; 28: 659-71.
19. Baily AL, Wortly G, Southon S. Measurement of aldehyde in low density lipoprotein by high performance liquid chromatography. Free Radic Biol Med 1997; 23: 1078-85.
20. Tuncer Tug, Fikret Karatas S, Murat Terazi S, Ozdemir N. Comparison of serum malondialdehyde levels determined by two different methods in patients with COPD: HPLC or TBARS methods. Lab Med 2005; 36:41-4.
21. Templar J, Kon SP, Milligan TP, Newman DJ, Raftery MJ. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by fully validated HPLC method. Nephrol Dial Transplant 1999; 14:946-51.
22. Volpi N, Tarug P. improvement in the high performance liquid chromatography of malondialdehyde level determination in normal human plasma. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 25: 433,713.
23. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid

reactivity and lipid peroxides in human plasma. Free Radic Biol Med 2001; 31:331-5.

24. Conti M, Morand PC, Levilla P, Lemonnier A. Improved flurometric determination of malondialdehyde. Clin Chem 1991; 37:1273-5.
25. Mendelsohn D, Hughes JK. Serum lipoprotein (a) levels in 'normal' individuals, those with familial hypercholesterolemia, and those with coronary artery disease. S Afr Med J 1990; 78:567-70.
26. Holvet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde – modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artry disease. J Circul 1998; 98: 1487-94.
27. Walter MF, Jacob RF, Jeffer B, Ghadanfar MM, Preston GM, Buch J, et al. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artry disease. J Am Coll Cardiol 2004; 44: 1996-2002.
28. Dincer Y, Akcay T, Konukoglu D, Hatemi H. Erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation in patients with coronary atherosclerosis. Acta Med Okayama 1999; 53:259-64.
29. Kavocas IB, Jahangiri M, Rees GM, Gorg P. Elevated plasma lipid hydroperoxides in patients with coronary artry disease. AM Heart J 1997; 134:572-6.
30. Kostner K, Hornykewycz S, Yang P, Neunteufl T, Glogar D, Weidinger F, et al. Oxidative stress causally linked to unstable angina pectoris? Astudy in 100 CAD patients and matched controls. Cardiovasc Res 1997; 36: 330-6.
31. McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. Eur Heart J 1993; 14:1493-8.
32. McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ. Evidence for oxidative stress in unstable angina. Br Heart J 1992; 68:454-7.
33. Uchidak K. Role of reactive aldehydes in cardiovascular disease. Free Radic Biol Med 2000; 28:1685-96.
34. Marcincak S, Sokol J, Turek P, Rozanska H, Disacova Z, Mate D, et al. Comparative evaluation to quantify malodialdehyde in broiler meat. Bull Vet Inst Puawy 2003; 47: 491-6.
35. Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. J Chromatogr 1992; 577: 9-18.