

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

زهرا محمدی آبگرمی^۱، دکتر محمدحسن خادم انصاری^۲، دکتر بمان علی جلالی خان آبادی^۳، دکتر محمدحسین مصدق مهرجردی^۴، سیدمجید مهدوی^۵

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

چکیده

پیش زمینه و هدف: آترواسکلروز و بیماری عروق کرونر قلبی (CAD)، عامل مرگ و میر در کشورهای صنعتی و هم‌چنین کشورهای در حال توسعه می‌باشد. مالون دی آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهاست. روش‌های متعددی برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدها ارائه شده است هدف اصلی از این مطالعه تحقیق و ارزیابی روش‌های تیوباریتوریک اسید (TBARS) و کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) برای تعیین و مقایسه مالون دی آلدئید (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 سانتریفیوژ جدا گردید. محلول صاف شده رویی با اسید تیوباریتوریک در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵۰ دقیقه واکنش داده شد. برای تعیین MDA به روش تیوباریتوریک 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 به ترتیب بین ۹۲/۰۵ تا ۱۰۵/۲ و ۸۴/۷ تا ۱۰۲ درصد به دست آمد. ضریب تغییرات روش HPLC در حدود ۴-۶/۱۷ درصد و برای روش TBARS در حدود ۷/۲۷-۱۲/۲۲ درصد محاسبه گردید. حد تشخیص روش HPLC و روش TBARS به ترتیب ۰/۰۵ میکرومولار و ۰/۱ میکرومولار به دست آمد. سطح سرمی MDA تعیین شده با روش تیوباریتوریک اسید از سطح به دست 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 تیوباریتوریک اسید با نتایج حاصل از تعیین این ترکیب به روش HPLC به دست آمد ($r^2 = ۰/۳۲۵$ و P value = ۰/۰۰۲).

بحث و نتیجه‌گیری: 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 تیوباریتوریک 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 خطر ساز مستقل و یا به‌عنوان شاخصی از وجود آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی عروقی مطرح می‌باشد.

کلید واژه‌ها: مالون دی آلدئید، کروماتوگرافی با کارایی بالا، تیوباریتوریک 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 دانشیار گروه 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 دنیا است (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 مناسب‌ترین راه جهت مقابله با این بیماری شناخت درست و دقیق عوامل خطر ساز 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 آلدئید 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 IDL - OX می‌باشد که نیازمند روش‌های اختصاصی از قبیل الیزا 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 آلدئید می‌باشد که بسیار مورد توجه بوده و به‌طور وسیعی مورد سنجش قرار می‌گیرد (۱۶،۱۷).

روش‌های فوتومتری برای تعیین مالون دی آلدئید بسیار ساده و کم هزینه هستند. از جمله این‌گونه روش‌ها، واکنش تیوباربتوریک 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 آلدئید، 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 تیوباربتوریک اسید (TBARS) برای تعیین مقدار مالون دی آلدئید 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 $55/2 \pm 7/53$ و ۴۷ نفر گروه شاهد با میانگین سنی $53/10 \pm 9/62$ 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 ۳۷، ۲۲ و ۴۰ نفر، در نظر گرفته شد. افرادی که داروهای آنتی‌اکسیدان 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 -70°C درجه سانتی‌گراد تا یک ماه قبل از آزمایش نگهداری شد.

اندازه‌گیری مالون دی آلدئید: تحت شرایط اسیدی و دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد یک مولکول مالون دی آلدئید با دو مولکول تیوباربتوریک اسید واکنش داده و کمپلکس صورتی رنگی را ایجاد می‌کند. اندازه‌گیری مالون دی آلدئید به دو روش تیوباربتوریک 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 اسپکتروفوتومتری 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 مدل SPD - 6AV که مجهز به دکتور 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 بافر فسفات $0/05 \text{ M}$ با $\text{pH}=7$ و ۳۵ قسمت متانول خالص تشکیل شده بود.

در روش HPLC جهت مطالعه غلظت MDA از استاندارد ۱ و ۲ و ۲ - 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 ۰/۱ تا ۱۵ میکرومولار مورد استفاده قرار گرفت.

و با روش تیوباربیتوریک اسید $0/787 \pm 0/362$ میکرومولار به دست 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 ($p \text{ value} = 0/002$). فراوانی غلظت مالون دی‌آلدهید با روش HPLC در مبتلایان به تنگی عروق کرونر قلب، $0/219 \pm 0/57$ و در افراد شاهد، $0/488 \pm 0/266$ 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 ($p \text{ value} = 0/017$).

میانگین غلظت MDA سرم به روش تیوباربیتوریک اسید در مبتلایان به تنگی عروق کرونر قلب $0/893 \pm 0/414$ میکرومولار و در افراد شاهد $0/663 \pm 0/237$ 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 ($p \text{ value} = 0/001$).

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

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 $p \text{-value} < 0/05$ 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 $4-6/17$ و $7/27-12/22$ درصد به دست آمد. درصد بازیابی با روش HPLC و روش تیوباربیتوریک اسید به ترتیب، بین $92/05$ تا $105/2$ و $84/7$ تا 102 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 $0/05$ و 12 میکرومول بر لیتر بود، در حالی که با روش TBARS کمترین و بیشترین غلظت قابل سنجش $0/1$ و 10 میکرومولار بود.

میانگین سطح سرمی مالون دی‌آلدهید در جمعیت مورد مطالعه (100 نفر) با استفاده از روش HPLC $0/533 \pm 0/244$ میکرومولار

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

بیمار			شاهد		
p value	ضریب همبستگی (r^2)	تعداد(نفر)	p value	ضریب همبستگی (r^2)	تعداد(نفر)
0/021	0/317	53	0/029	0/325	47

Kostner (۳۰) Mc Murray (۳۲،۳۱) نیز افزایش سطح مالون دی‌آلدهید 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 به دست 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 به کار برده شده است. در روش HPLC مشتق شده، MDA و تیوباربیتوریک اسید از سایر ترکیبات جداسازی و سپس سنجش می‌شود و طبیعتاً این روش اختصاصی‌تر و در نتیجه از صحت

بحث و نتیجه گیری

اختلال در لیپوپروتئین‌های پلاسما و متابولیسم چربی‌ها بیش از سایر عوامل خطر ساز 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 آلدئیدها به‌طور اندوزن در اثر فرایندهای زوال مولکولی تولید می‌شوند، لذا در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های قلبی عروقی مثل آترواسکلروز دخیل می‌باشند (۳۳). هم‌چنین اثبات شده است که مالون دی‌آلدهید سرم یک عامل خطر ساز مستقل برای بیماری عروق کرونر قلب می‌باشد (۲۷). مطالعات Dincer (۲۸)، Kavocas (۲۹) و

همچنین در مطالعه ما بازایی روش HPLC، بین ۸۵ تا ۱۰۵ درصد و بازایی 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، بازایی روش HPLC برای MDA را در حدود ۹۵/۵ درصد و برای روش تیوباربیتوریک اسید ۸۴/۲ درصد به دست آوردند (۲۰). نتایج آنان نیز درصد بازایی بالاتر را برای روش HPLC تایید کرد. ولی نتایج ما نسبت به نتایج آنان از صحت بیشتری برخوردار می‌باشد. در مطالعه دیگری Richard و همکاران روش فوق را توسعه داده و واکنش تیوباربیتوریک اسید را در پلاسما، اریتروسیت‌ها و فیبروبلاست‌های انسانی انجام دادند. آنان بازایی روش را ۱۰۰ - ۷۰ گزارش نمودند (۳۵). با توجه به مطالعات قبلی و یافته‌های کنونی چنین برداشت می‌شود که غلظت بالای مالون دی آلدئید سرم، یک عامل خطر ساز برای بیماری تنگی عروق کرونر می‌باشد. با توجه به این که در مطالعه ما غلظت مالون دی آلدئید سرم در مبتلایان به تنگی عروق کرونر به طور معنی‌داری بالاتر از افراد شاهد بود، در شرایط جامعه مورد مطالعه ما نیز مالون دی آلدئید می‌تواند به عنوان عامل مهمی در بروز آترواسکلروز نقش داشته باشد. همچنین روش HPLC برای تعیین MDA در مایعات بیولوژیک از روش فتومتر تیوباربیتوریک اسید اختصاصی تر بوده و از صحت بالاتری برخوردار است.

بالاتری برخوردار است. در این مطالعه میانگین غلظت MDA سرم با روش تیوباربیتوریک اسید به طور معنی‌داری بالاتر از سنجش آن با روش HPLC برای گروه شاهد و بیمار بود. Marcincak و همکارانش میزان مالون دی آلدئید را با دو نوع روش تیوباربیتوریک اسید و یک نوع روش HPLC (مشق سازی با دی نیترو فنیل هیدرازین) اندازه‌گیری نمودند (۳۴). نتایج دو نوع روش تیوباربیتوریک اسید با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند در حالی که میانگین MDA سنجش شده با هر دو نوع روش تیوباربیتوریک اسید، به طور معنی‌داری بالاتر از مالون دی آلدئید 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 آلدئید 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 آلدئید سنجش شده با روش تیوباربیتوریک اسید، به طور معنی‌داری بالاتر از میزان مالون دی آلدئید سنجش شده با روش HPLC بود (۲۰). نتایج حاصل از بررسی‌های ما در این مطالعه در مورد تعیین دقت روش برای سنجش مالون دی آلدئید نشان می‌دهد که ضریب تغییرات روش HPLC نسبت به روش تیوباربیتوریک اسید، کمتر بوده و لذا روش HPLC دقیق تر می‌باشد.

References:

- 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.
- Mieres JH. Review of the American associations guidelines for cardiovascular disease prevention in women. *Heart* 2006; 92 (Suppl 3): 10-30.
- Zhang XL, Lu ZL, Liu L. Coronary heart disease in China. *Heart* 2008; 94: 1126-31.
- Iwashita M, Matsushita Y, Sasaki J, Arakawa K, Kono S. Kushi lipid intervention study (KLIS) group. *Circ J* 2004; 68: 405-9.
- Lee CM, Huxley RR, Lam TH, Martiniuk AL, Ushema H, Pan WH, et al. Prevalence of diabetes 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.
- 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. *Atherosclerosis* 2008 (Epub ahead of print)
- Onata A, Yazici M, Can G, Kaya Z, Bulur S, Herqenc G. Predictive value of prehypertension for metabolic syndrome, diabetes and coronary artery disease among Turks. *Am J Hypertens* 2008; 28: 890-5.
- 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 comparale 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 Hemorheol 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 monoclonal antibody and antihuman apolipoprotein B antibody. *Clin Biochem* 2000; 33:243-53.
 16. Guentsch A, Preshaw PM, Bremer Streck S, Glockmann E, Siquusch 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 fluorometric 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 artery 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 artery 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 artery 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? A study 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 malondialdehyde 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.