BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2016, 6, 40-44
http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/

STĘŻENIE DIALDEHYDU MALONOWEGO WE KRWI JAKO WSKAŹNIK PRZY PRZESZCZEPIE WĄTROBY

Jadwiga Piwowarska*, Jolanta Felczak, Jacek Łukaszkiewicz

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

* autorka korespondująca, tel: +48 22 5720 737, e-mail: jadwiga.piwowarska@wum.edu.pl

Otrzymany 23.05.2016, zaakceptowany 15.09.2016, zamieszczony 2.11.2016

STRESZCZENIE

Przeszczepianie wątroby i choroby nowotworowe są związane ze stresem oksydacyjnym, którego biologicznym markerem jest dialdehyd malonowy (MDA), produkt peroksydacji lipidów. Celem pracy była próba określenia, czy poziom MDA u dawcy może być przydatnym wskaźnikiem prognozującym przeżywalność przeszczepu po transplantacji. Oznaczono stężenia wolnego MDA w surowicy krwi u 20 biorców z rakiem wątrobowokomórkowym i u 20 dawców przed przeszczepem wątroby przy użyciu metody HPLC-UV. Walidacja zastosowanej metody badawczej wykazała jej przydatność do oznaczania stężenia wolnego MDA w surowicy krwi. Oznaczone stężenia MDA były zróżnicowane w obydwu badanych grupach i mieściły się w zakresie: 0–48 μmol/L dla biorców, oraz 0–3,54 μmol/L dla dawców. Ze względu na zbyt małą liczebność badanych grup pacjentów nie można na podstawie uzyskanych wyników wyciągnąć jednoznacznych wniosków dotyczących różnic pomiędzy grupami dawców i biorców, chociaż średnie wartości u dawców były niższe niż u biorców. Dlatego też oznaczenie stężenia MDA u dawcy jako przydatnego wskaźnika prognozującego przeżywalność przeszczepu po transplantacji wymaga dalszych badań.

SŁOWA KLUCZOWE: MDA, HPLC, stres oksydacyjny, przeszczepianie wątroby, rak wątrobowokomórkowy

ABSTRACT

CONCENTRATION OF MALONDIALDEHYDE IN BLOOD AS AN INDICATOR IN LIVER TRANSPLANTATION

Liver transplants and tumors are associated with oxidative stress and its biological marker malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation. The aim of the study was to determine whether the level of MDA in the donor is useful as a prognostic marker of graft survival following transplantation. Using HPLC-UV, the concentration of free MDA was determined in blood serum of 20 transplant recipients suffering from hepatocellular carcinoma, and 20 donors prior to transplantation. Validation of the analytical method demonstrated its usefulness in the determination of free MDA concentration in blood serum. The measured MDA concentrations varied within either group, with a range of 0–48 μmol/L in recipients and 0–3.54 μmol/L in donors. Because of the low number of patients in both groups, the results are inconclusive with regard to possible differences between donors and recipients, even though the mean values were lower in donors than in recipients. Therefore, further studies are needed to decide whether the determination of MDA concentrations in donors constitutes a useful prognostic indicator of graft survival following liver transplantation.

KEYWORDS: MDA, HPLC, oxidative stress, liver transplantation, cancer hepatocellular carcinoma

1. Wstęp

Przeszczepianie wątroby stanowi uznany sposób leczenia i jednocześnie postępowanie z wyboru w terapii przewlekłej krańcowej niewydolności wątroby oraz ostrej niewydolności tego narządu [1,2]. Jednym ze wskazań do przeszczepu wątroby jest choroba nowotworowa wątroby. Zarówno przeszczepianie wątroby, jak i choroby nowotworowe są związane ze stresem oksydacyjnym. Zaburzenia hemodynamiki i metabolizmu w organizmie dawcy prowadzą do powstawania reaktywnych form tlenu (RFT), które są przyczyną stresu oksydacyjnego dla komórek przeszczepianego narządu. RFT wywołują ponadto mutacje materiału genetycznego, inicjujące proces kancerogenezy. Wiele publikacji wskazuje na to, iż dialdehyd malonowy (MDA), główny drugorzędowy produkt peroksydacji lipidów, można traktować jako biologiczny marker stresu oksydacyjnego. Istnieje wiele doniesień o cytotoksycznym, mutagennym i kancerogennym działaniu tego związku [3,4]. Brakuje jednak danych literaturowych dotyczących poziomu MDA u dawców wątroby. Kosieradzki w badaniach dotyczących nerek wykazał, że stężenie MDA w surowicy dawcy może ułatwić wczesne rozpoznanie ostrego odrzucania nerek i dostarczyć informacji pozwalających prognozować odległą czynność nerek [5]. Natomiast niewiele jest prac na ten temat w odniesieniu do wątroby.

2. Przeszczepianie wątroby

Najczęstszym wskazaniem do przeszczepu wątroby u osób dorosłych jest marskość (łac. *cirrhosis*), najczęściej wywołana przez wirusowe zapalenia wątroby (WZW), czyli tzw. marskość niecholestatyczna. Zazwyczaj wskazaniem jest zapalenie wątroby typu C, natomiast w przypadku za-

palenia typu B taki zabieg jest kontrowersyjny wg danych amerykańskiej organizacji UNOS (United Network for Organ Sharing). Dobór dawcy i biorcy odbywa się na podstawie zgodności grup krwi, co wynika z niskiej immunogenności wątroby [6].

2.1. Uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne narządu podczas przeszczepiania

Reperfuzja jest przywróceniem przepływu krwi przez organ. Uszkodzenie niedokrwienno- reperfuzyjne możemy podzielić na dwie fazy:

- faza wczesna, czyli faza ostrego uszkodzenia (1-6 h po reperfuzji),
- faza późna, czyli faza odpowiedzi podostrej.

Po długim okresie niedokrwienia do komórek wraz z krwią zaczynają docierać duże ilości tlenu. Na skutek zmian biochemicznych, które zaszły w poprzednich etapach przeszczepiania, fizjologiczna funkcja łańcucha oddechowego jest zaburzona. Powstają wielkie ilości RFT, które uszkadzają komórki. RFT generowane przez komórki Kupffera odgrywają kluczową rolę w niedokrwienno-reperfuzyjnym uszkodzeniu watroby. Może to być powodem braku pierwotnej czynności wątroby po przeszczepie [7].

3. Stres oksydacyjny

3.1. Reaktywne formy tlenu

Reaktywne formy tlenu to produkty reakcji redukcji tlenu, wykazujące większą reaktywność niż cząsteczka tlenu w stanie podstawowym. Do RFT należą także wolne rodniki tlenowe, które posiadają niesparowane elektrony. We wczesnej fazie reperfuzji (ostrego uszkodzenia) zaktywowane komórki Kupffera są głównym źródłem reaktywnych form tlenu uszkadzających naczynia. RFT generowane przez komórki Kupffera odgrywają kluczową rolę w niedokrwienno-reperfuzyjnym uszkodzeniu wątroby. RFT są uważane za najbardziej szkodliwy czynnik odpowiedzialny za uszkodzenia narządów w reperfuzji i stanowią przyczynę stresu oksydacyjnego dla komórek przeszczepianego narządu. Stres oksydacyjny jest zachwianiem równowagi między procesami prooksydacyjnymi i antyoksydacyjnymi na korzyść tych pierwszych [8,9].

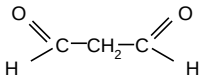
3.2. Peroksydacja lipidów błon biologicznych

Szczególnym typem reakcji generowanej przez RFT jest peroksydacja, czyli proces tworzenia nadtlenków. Lipidy są klasą cząsteczek najbardziej podatną na proces peroksydacji. Peroksydacja lipidów to typowy łańcuchowy proces wolnorodnikowy. Dotyczy on głównie reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT), posiadających wiązania podwójne przedzielone mostkami metylenowymi. Fosfolipidy są składnikami błon biologicznych [10].

4. Dialdehyd malonowy (MDA)

MDA (ryc. 1) jest głównym produktem peroksydacji WNKT i można uznać go za biologiczny marker stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny jest źródłem wielu chorób, m.in. raka, miażdżycy, udarów i zawału serca. Odgrywa także kluczową rolę w niedokrwienno-reperfuzyjnym uszkodzeniu narządów przy przeszczepach.

MDA powstaje w organizmie w wyniku nieenzymatycznej autooksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, a także enzymatycznego utleniania, np. podczas przemian eikozanoidów [3].



MDA

Ryc.1. Budowa cząsteczkowa dialdehydu malonowego (inne nazwy: aldehyd malonowy, 1,3-propanodial).

4.1. Wpływ MDA na organizm

MDA jest związkiem o dużej aktywności biologicznej, o okresie półtrwania rzędu kilku minut. Ma zdolność przemieszczania się na znaczne odległości, może działać z dala od miejsca powstawania, posiada zdolność inaktywacji enzymów, a także wpływa pośrednio na procesy syntezy białek. Wykazuje działanie cytotoksyczne, mutagenne, kancerogenne. Reaguje z grupami tiolowymi białek, a także ze związkami biologicznie czynnymi zawierającymi grupę NH_2, tworząc połączenia typu zasad Schiffa [3,11].

MDA ma właściwości aterogenne (miażdżycorodne), może wpływać toksycznie na naczynia krwionośne. Reaguje z aminami I-rzędowymi, formując Nε-(2-propenal)lizynę, powoduje tworzenie połączeń krzyżowych lizyna-lizyna z 1-amino-3-iminopropenem i pirydylo-dihydropirydyną typu mostkowego. Są to związki wykryte we frakcji apolipoproteiny B LDL, mające duży, potwierdzony doświadczalnie udział w powstawaniu miażdżycy [3]. Ponadto MDA modyfikuje właściwości fizyczne błon komórkowych, powoduje zaburzenie funkcji komórek, w konsekwencji prowadząc do dysfunkcji poszczególnych organów. Bierze udział w procesie starzenia, reagując z białkami i powodując tworzenie barwników lipofuscynowych, uczestniczy również w patogenezie stłuszczenia wątroby [3,12].

5. Oznaczanie MDA

Badania własne miały na celu podjęcie próby odpowiedzi na pytanie, czy pomiar i poziom stężenia MDA u dawcy może być przydatnym wskaźnikiem prognozującym przeżywalność przeszczepu po transplantacji. W tym celu wykonano następujące badania:

- optymalizację i walidację metody oznaczania stężenia wolnego MDA w surowicy,
- oznaczenie stężenia wolnego MDA w surowicy krwi biorców cierpiących na raka wątrobowokomórkowego i ocenę poziomu stresu oksydacyjnego u tych pacjentów,
- oznaczenie stężenia wolnego MDA w surowicy krwi dawców wątroby,
- analizę stopnia procesów oksydacyjnych zachodzących w wątrobie do czasu pobrania narządu, na podstawie poziomu stężenia MDA u dawcy.

5.1 Metody oznaczania

MDA można oznaczać jako wolny związek, który odzwierciedla świeżą produkcję, lub jego całkowite stężenie, które stanowi wskaźnik długookresowego stresu oksydacyjnego. Wolny MDA stanowi niewielką część całkowitego MDA obecnego w surowicy (10-15%), dlatego wolna frakcja jest bardzo trudna do wykrycia, szczególnie u osób zdrowych. Jest to wywołane tendencją MDA do tworzenia kompleksów z aminokwasami i białkami, a także jego szybką metaboliczną biodegradacją przy udziale dehydrogenazy wątrobo-

Tabela 1. Poziomy wolnego i całkowitego MDA u ludzi zdrowych wg różnych autorów.

Źródło	Derywatyzacja	Metoda oznaczania	Wolny MDA [Mmol/L]	Całkowity MDA [Mmol/L]
Steghens i inn. [14]	DAN	HPLC/UV	k:0,024 m:0,019	k:0,162 m:0,138
Carbonneau i inn. [15]	TBA	HPLC	0,043	0,429
Yeo i inn. [16]		GC-MS	0,025-0,038	
Mao i in. [17]	FMOC-hydrazyna	HPLC-florym.	0,153	0,426
Hong i inn. [18]	TBA	HPLC/Vis	0,07	1,45
Pilz i inn.[19]	DNPH	HPLC/UV	<0,05	2,16

DAN – diaminonaftalen; TBA – kwas tiobarbiturowy; FMOC-hydrazyna – 9-fluorenylometoksykarbonylohydrazyna; DNPH – dinitrofenylohydrazyna; k – kobiety; m – mężczyźni.

wej [13]. Wymusza to nanomolarną, a nawet pikomolarną czułość metod stosowanych do oznaczeń tego związku.

Opracowano wiele metod służących wykrywaniu i oznaczaniu tego związku w materiale biologicznym, różniących się czułością i specyficznością. W tabeli 1 zebrano doniesienia literaturowe na temat poziomów stężenia wolnego i całkowitego MDA w surowicy u ludzi zdrowych wg różnych autorów.

W naszej pracy do oznaczenia stężenia wolnego MDA zastosowano metodę HPLC wykorzystując technikę faz odwróconych i detekcję w zakresie UV w oparciu o metodę C. Largilliere'a i S.B. Melancon'a [20], w której dokonano modyfikacji.

Użyto chromatografu firmy Shimadzu wyposażonego w pompę LC 10 AS, detektor UV/VIS SPD-10-AV i pętlę dozującą 100 µL. Rozdziału dokonano na kolumnie chromatograficznej Carbohydrate Cartridge Column 4,6 ×250 mm firmy Waters. Parametry rozdziału były następujace: faza ruchoma (acetonitryl : 0.03 M bufor Tris pH=7.4 (8:2 v/v)), przepływ 1.2 ml/min, długość fali: λ = 267 nm, temp. 12°C.

5.2. Materiał kliniczny

Materiałem klinicznym były surowice krwi dawców wątroby (n=20) i biorców wątroby (n=20) chorych na raka wątrobowokomórkowego, pobrane przed przeszczepem. Próbę kontrolną stanowiły surowice krwi zdrowych, młodych mężczyzn (n=6).

5.3 Wyniki

Walidacja stosowanej metody HPLC oznaczania wolnego MDA wykazała, że metoda ta jest liniowa, charakteryzuje się dobrą precyzją oraz dokładnością. Wyznaczona wartość granicy detekcji równa 0,03 µmol/L świadczy o dużej czułości metody i jest niższa od granicy wykrywalności pierwotnej metody opracowanej przez Largilliere'a i wsp. [20] wynoszącej 0,48 µmol/L. Ponadto metoda ta jest łatwa i szybka, co jest niezwykle istotne w przypadku procesu transplantacji, gdzie czas na zanalizowanie próbek pobranych od dawców jest niezwykle krótki. Opracowane parametry walidacji badanej metody HPLC wskazują na możliwość zastosowania jej do oznaczania stężenia wolnego MDA w surowicy krwi ludzkiej.

W próbkach zdrowych osób (grupa kontrolna) MDA nie został wykryty, za wyjątkiem jednego z ochotników, u którego stężenie aldehydu było podwyższone (0,7 µmol/L). Podwyższone stężenie malonyloaldehydu u jednego z ochotników może być uwarunkowane przez takie czynniki jak picie alkoholu, palenie papierosów, jak również intensywne uprawianie sportu związane z nagłymi wyczerpującymi wysiłkami fizycznymi [21]. Wg Pilz'a i wsp. wartości wyższe niż 0,2 µmol/L oznaczone w surowicy zdrowej osoby mogą być sumą wolnego i pewnej frakcji związanego MDA lub dodatkowego MDA uwolnionego z prekursorów nadtlenków lipidów [19].

Otrzymane wstępne wyniki stężeń MDA w surowicy krwi dawców i biorców wątroby są zróżnicowane w obrębie obu grup. Wartości te są zawarte w zakresie od 0 µmol/L do 48 µmol/L dla grupy biorców oraz od 0 µmol/L do 3,54 µmol/L dla dawców. Ponadto oznaczono wskaźnik ketonowy w badanych surowicach. W tabeli 2 przedstawiono średnie stężenia MDA w porównaniu z potencjałem oksydoredukcyjnym mitochondriów mierzonym jako wskaźnik ketonowy (AKBR) w obrębie badanych grup.

Tabela 2. Średnie stężenia MDA i AKBR w obrębie badanych grup.

	BIORCY (n=20)	DAWCY (n=20)
Średnia wieku Odchylenie standardowe	46 7	34 5
Stężenie MDA [µmol/L]		
Średnia arytmetyczna Odchylenie standardowe	4,41 11,76	0,36 0,89
Wskaźnik ketonowy (AKBR)		
Średnia arytmetyczna Odchylenie standardowe	0,58 0,11	0,92 0,22

6. Podsumowanie i dyskusja

Analiza wyników stężeń MDA w surowicach otrzymanych od biorców wykazuje duże zróżnicowanie w obrębie zbadanej grupy. U części biorców oznaczone stężenie MDA w su-

rowicy można uznać za podwyższone w stosunku do surowicy kontrolnej, co może świadczyć o nasileniu niekorzystnych procesów oksydacyjnych u tych pacjentów związanych z istniejącą chorobą nowotworową. W literaturze spotyka się wiele doniesień mówiących o zaangażowaniu reaktywnych form tlenu, a nawet samego MDA w przebieg kancerogenezy [22,23]. Udowodniono, że stężenie MDA w surowicy krwi w przebiegu raka wątrobowokomórkowego osiąga podwyższony poziom [22], stąd też autorzy wysuwają wniosek, że stres oksydacyjny może być zaangażowany w patogenezę i przyśpieszenie zaburzeń czynności wątroby. Tezę tą potwierdzają inni autorzy [24,25], którzy zaobserwowali zwiększony poziom MDA w tkance nowotworu w porównaniu z tkanką kontrolną. Czeczot i wsp. [24] w swojej pracy przedstawili wyniki, w których badano samych biorców i wykazano, że stężenie MDA w surowicy pacjentów przed przeszczepem było wyższe niż rok po przeszczepie.

Natomiast nasze badania dotyczyły stężenia MDA w surowicy krwi zarówno dawców, jak i biorców. Średnie stężenie MDA w surowicy otrzymane w grupie dawców jest niższe niż średnie stężenie otrzymane w grupie biorców przed przeszczepem, co mogłoby świadczyć o narażeniu na mniejszy stres oksydacyjny dawców i narządów od nich pobieranych. Wiadomo, że przeszczepione narządy od zbadanych dawców we wszystkich przypadkach podjęły funkcję i przeżyły 27 dni, co upoważnia do konkluzji, że niskie stężenia MDA w surowicy krwi mogłyby świadczyć o niewielkim stopniu uszkodzenia niedokrwiennego wątroby w organizmie dawcy i prognozować udany wynik przeszczepu. U części przebadanych pacjentów (15 biorców i 15 dawców) został oznaczony potencjał oksydoredukcyjny mitochondriów jako wskaźnik ketonowy AKBR [26]. Wskaźnik na poziomie 0,7 jest dolną granicą normatywną. Wartości poniżej 0,7 świadczą o zaburzeniu równowagi procesów pro- i antyoksydacyjnych w wątrobie, natomiast wskaźnik <0,4 wskazuje na bardzo silne uszkodzenie oksydacyjne. W naszych badaniach średnie wartości wskaźnika ketonowego są niższe w grupie biorców niż u dawców, co wydaje się zgodne z wyższym średnim stężeniem MDA u biorców w porównaniu z dawcami, co pozwala przypuszczać, że w przebiegu raka wątrobowokomórkowego wątroba poddana jest silnemu stresowi oksydacyjnemu i ma zaburzony potencjał oksydoredukcyjny.

Ze względu na zbyt małą liczebność badanych grup pacjentów, nie można na podstawie uzyskanych wyników wyciągnąć jednoznacznych wniosków dotyczących różnic pomiędzy grupami dawców i biorców, chociaż średnie wartości MDA u dawców były niższe niż u biorców. Zróżnicowany poziom indywidualny MDA może wskazywać na konieczność uwzględnienia przed analizą innych czynników, jak np. wysiłek fizyczny czy stosowanie używek [21]. Dlatego też oznaczenie stężenia MDA u dawcy jako przydatnego wskaźnika prognozującego przeżywalność przeszczepu po transplantacji wymaga dalszych badań.

7. Wykaz skrótów

MDA dialdehyd malonowy (*ang.malondialdehyde*)

HPLC wysokosprawna chromatografia cieczowa (*ang. high-performance liquid chromatography*)

RFT reaktywne formy tlenu (*ang. Reactive oxygen species - ROS*)

WZW wirusowe zapalenia wątroby

ATP adenozynotrójfosforan

WNKT wielonienasycone kwasy tłuszczowe

AKBR potencjał oksydoredukcyjny mitochondriów mierzony jako wskaźnik ketonowy (*ang. Ketone bodies*)

8. Bibliografia

1. Polański J., Bardadin K.: Biblioteka po Dyplomie. Hepatologia: kompendium. Medical Tribune Group 2004.
2. Zhang W., Wang M., Xie H.Y., Zhou L., Meng X.Q., Shi J., Zheng S.: Role of Reactive Oxygen Species in Mediating Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. Transplant Proc 2007, 39, 1332-1337.
3. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N.: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 2005, 15(4), 316-328.
4. Gaweł S., Wardas M., Niedworok E., Wardas P.: Dialdehyd malonowy (MDA) jako wskaźnik procesów peroksydacji lipidów w organizmie. Wiad Lek 2004, 57(9-10), 453-45.
5. Kosieradzki M., Kuczynska J., Piwowarska J., Wegrowicz-Rebandel I., Kwiatkowski A., Lisik W., Michalak G., Danielewicz R., Paczek L., Rowinski W.: Prognostic significance of free radicals: mediated injury occurring in the kidney donor. Transplantation 2003, 75(8), 1221-1227.
6. Rowiński W., Wałaszewski J., Pączek L.: Transplantologia kliniczna. PZWL, Warszawa 2004.
7. Długosz A., Średnicka D., Boratyński J.: Wpływ takrolimusu na stres oksydacyjny i procesy wolnorodnikowe. Postępy Hig Med Dośw 2007, 61, 466-471.
8. Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, et al.: Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 2002; 282(6), 1140-1149
9. Li C, Jackson RM.: Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol Cell Physiol 2002; 282 (2), 227-241.
10. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
11. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA.: Malondialdrhyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. J Biol Chem 2003, 278, 31426-33.
12. Uchida K.: Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease. Int J Biochem Cell Biol 2000, 28, 1685-96.
13. Wilson D., Metz H., Graver L., Rao P.S.: Direct method for quantification of free malondialdehyde with high-performance capillary electrophoresis in biological samples. Clin Chem 1997, 43(10), 1982-1983.
14. Steghens JP., van Kappel AL., Denis I., Collombel C.: Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. Free Radic Biol Med. 2001, 31(2), 242-249.
15. Carbonneau MA., Peuchant E., Sess D.: Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. Clin Chem 1991, 37, 1423-1429.
16. Yeo HC., Helbock HJ., Chyu D.: Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography – mass spectrometry. Anal Biochem 1994, 220, 391-396.
17. Mao J., Zhang H., Luo J.: New method for HPLC separation and fluorescence detection of malonaldehyde in normal human plasma. J Chromatogr B 2006, 832, 103-108.
18. Hong YL., Yeh SL., Chang CY., Hu ML.: Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. Clin Biochem. 2000, 33(8), 619-625.
19. Pilz J., Meineke I., Gleiter Ch.H.: Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. J Chromatogr B 2000, 742, 315-325.
20. Largilliere C., Melancon SB.: Free Malondialdehyde determination in human plasma by High-Performance Liquid Chromatography. Anal Biochem 1988, 170(1), 123-126.

21. Bartosz G.: Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
22. Zhao J., Zhao Y., Wang H., Gu X., Ji J., Gao C.: Association between metabolic abnormalities and HBV related hepatocelluar carcinoma in Chinese: A cross-sectional study. Nutr J 2011, 10, 49-56.
23. Tsai S.M., Lin S.K., Lee K.T., Hsiao J.K., Huang J.C., Wu S.H., Ma H., Wu S.H., Tsai L.Y.: Evaluation of redox statuses in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. Ann Clin Biochem 2009, 46, 394-400.
24. Czeczot H., Scibior D., Skrzycki M., Podsiad M.: Glutathione and GSH-dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Acta Biochim Pol 2006, 53, 237-242.
25. Lorente L, Rodriguez ST, Sanz P, Abreu-González P, Díaz D, Moreno AM, Borja E, Martín MM, Jiménez A, Barrera MA.: Association between Pre-Transplant Serum Malondialdehyde Levels and Survival One Year after Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. Int J Mol Sci 2016, 17, 1-10.
26. Pilaszek Z.: Wpływ zmian nowotworowych w wątrobie na efektywność ektogenezy. Praca magisterska, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, 2008.