

ساخت نمونه بردار کندانس هوای بازدمی جهت مطالعه بیومارکرهای بازدمی استرس اکسیداتیو

علی فیروزی چاهک^۱، محمدجواد زارع سخویدی^{۲*}، امیر هوشنگ مهرپرور^۳، مهرداد مستغاثی^۳، جواد بیابانی اردکانی^۴، حمیده نیک‌نظر^۱، پریسا آزاد^۱

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت حرفه‌ای، گروه بهداشت حرفه‌ای، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۲. عضو هیأت علمی گروه بهداشت حرفه‌ای، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۳. متخصص طب کار و عضو هیأت علمی گروه طب کار و مرکز تحقیقات بیماریهای ناشی از صنعت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۴. مدیر آزمایشگاه مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۶/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۷/۱۱

چکیده

مقدمه: استفاده از بیومارکرهای هوای بازدمی طی سال‌های اخیر برای بررسی مواجهه و بیماری در سم‌شناسی شغلی و پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، سیستمی ساده جهت جمع‌آوری کاندانس هوای بازدمی تهیه شده و نمونه‌گیری و آنالیز مقدار مالون دی‌آلدهید با آن مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: طرح اولیه نمونه‌بردار بر اساس سیستم مبتنی بر چگالش با استفاده از آب انتخاب گردید. تاثیر طول نمونه‌بردار، زمان و دما در جمع‌آوری کندانس مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها از دو گروه سیگاری و غیرسیگاری برای تعیین مقدار مالون دی‌آلدهید با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در این مطالعه برای ساخت دستگاه نمونه‌برداری از هوای بازدمی از بین مبردهای با طول ۱۵، ۲۵ و ۴۰ سانتی‌متر و دمای صفر و ۵ درجه سانتی‌گراد، مبرد با طول ۲۵ سانتی‌متر و دمای صفر درجه به دلیل بازدهی بالاتر به منظور جمع‌آوری کاندانس هوای بازدمی انتخاب گردید. در این مطالعه میزان مالون دی‌آلدهید هوای بازدمی افراد سیگاری به طور معناداری بالاتر از افراد سالم بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه، ساخت ابزار نمونه‌برداری هوای بازدمی با یک تکنولوژی نه چندان پیچیده با کارایی مناسب می‌باشد. این مطالعه همچنین افزایش مقدار مالون دی‌آلدهید را به عنوان معیار پراکسیداسیون لپیدی در افراد سیگاری نشان می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: پراکسیداسیون لپیدی، نمونه‌برداری از هوای بازدمی، مالون دی‌آلدهید، بیومارکر

* نویسنده مسئول: آدرس پستی: گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، تلفن: ۰۳۵۱-۶۲۴۰۶۹۱

پست الکترونیکی: mjzs63@gmail.com

مقدمه

گونه‌های فعال اکسیژن، مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی طراحی شده است تا اثرات زیان بار این عوامل مهاجم را خنثی کرده و یا به حداقل برساند (۳). مطالعات نشان داده است که پس از مواجهه با پاره‌ای از آلاینده‌های هوا، مارکرهای استرس اکسیداتیو در ماتریس‌هایی مانند خون و بازدم افزایش پیدا می‌کند (۴، ۵). هرچند اغلب این مطالعات در مورد تاثیر آلودگی هوا بر جمعیت‌های غیرشغلی بوده است. وجود مارکرهای مختلف استرس اکسیداتیو از قبیل محصولات پر اکسیداسیون لیپیدی در هوای بازدمی در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است. برای اندازه‌گیری میزان پر اکسیداسیون لیپیدها روش‌های متعددی طراحی شده است. در بعضی از این روش‌ها با اندازه‌گیری محصولات حاصل از پر اکسیداسیون لیپیدها وضعیت پر اکسیداسیون لیپیدی سنجیده می‌شود. یکی از مهم‌ترین محصولات حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها، مالون دی‌آلدهید می‌باشد که بسیار مورد توجه بوده و به طور وسیعی مورد سنجش قرار می‌گیرد (۶). مطالعات متعددی تاکنون به بررسی میزان مالون دی‌آلدهید در هوای بازدمی افراد با بیماری‌های مختلف پرداخته‌اند (۷-۱۰، ۴).

یکی از مراحل اصلی در به کارگیری هوای بازدمی جهت تعیین بیومارکرها، نمونه‌برداری و جمع‌آوری صحیح آن می‌باشد. تاکنون روش‌های متعددی جهت نمونه‌برداری و تغلیظ این ماتریس صورت پذیرفته است (۱۱-۱۳). در این مطالعه کارایی یک سیستم مبتنی بر چگالش هوای بازدمی و نمونه‌برداری از کندانس ایجاد شده (Exhaled breath condensate) در تعیین مقدار مالون دی‌آلدهید هوای بازدمی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

طرح اولیه نمونه‌برداری پس از مطالعه سایر طرح‌های موجود، بر اساس سیستم مبتنی بر چگالش با استفاده از آب انتخاب گردید (۱۵، ۱۴). بر این اساس سیستم مذکور

استفاده از بیومارکرها همواره به عنوان ابزاری در غربالگری و پایش زود هنگام بیماری‌ها و به ویژه مواجهه‌های شغلی و محیطی مورد توجه بوده است. در این میان همواره توجه محققان بر روی به کارگیری بیومارکرهایی بوده تا علاوه بر آن که به خوبی بتوانند گویای وضعیت فیزیولوژیک فرد باشند، غیرتهاجمی بوده و مورد مقبولیت بیمار نیز باشد. یکی از روش‌هایی که طی سال‌های اخیر برای بررسی بیومارکرهای مواجهه و بیماری در سم‌شناسی شغلی و پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است، آنالیز هوای بازدمی می‌باشد (۱). به طور کلی هوای بازدمی انسان مشتمل بر بیش از ۲۰۰ نوع ترکیب مختلف می‌باشد که بسته به وضعیت سلامتی و همچنین شرایط لحظه‌ای فرد از قبیل گرسنگی، انجام فعالیت ورزشی و ... تغییراتی در کیفیت و کمیت آنها ایجاد می‌شود. وجود تعدادی از ترکیبات در هوای بازدمی انسان می‌تواند بیانگر شرایط درونی و فیزیولوژیکی فرد بوده و اطلاعات ارزشمندی را در مورد سلامت فرد ارائه دهد (۲). استفاده از هوای بازدمی تاکنون به عنوان ابزاری در تشخیص پاره‌ای از بیماری‌ها از قبیل دیابت، عفونت‌های دستگاه گوارشی و مشکلات کلیوی مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه با ابداع روش‌های بسیار حساس و دقیق استخراج و جداسازی ترکیبات و همچنین وجود دستگاه‌های پیشرفته آزمایشگاهی، این تکنیک برای مطالعه بیومارکرها اهمیت زیادی یافته است (۳). یک دسته از بیومارکرهای بسیار مهم در حیطه سم‌شناسی و طب کار، بیومارکرهای استرس اکسیداتیو می‌باشند. عوامل زیان‌آور و مواجهات متعددی در محیط‌های شغلی وجود دارند که قادرند با ایجاد استرس اکسیداتیو عوارضی را در بدن ایجاد نمایند. استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن از یک سو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از سوی دیگر ایجاد می‌گردد. به عبارت دیگر در سیستم‌های بیولوژیک هوایی به منظور مقابله با رادیکال‌های آزاد و

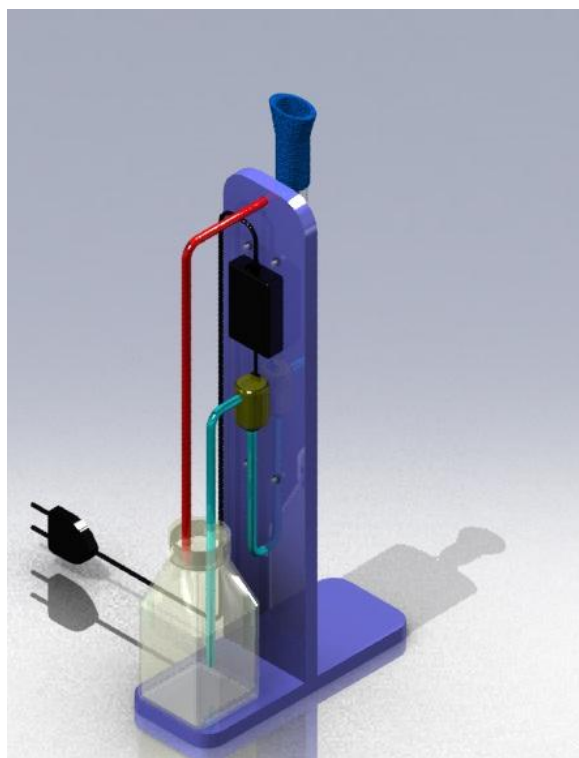
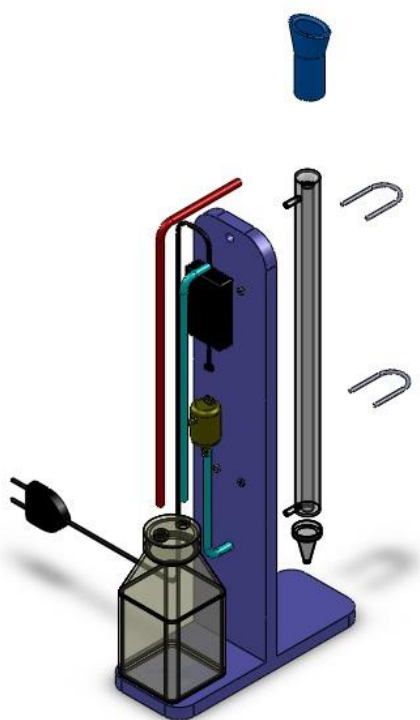
دریافت نمودیم، مبرد با طول ۲۵ سانتی متر و دمای صفر درجه به منظور جمع‌آوری کندانس هوای بازدمی انتخاب گردید. به منظور کنترل دما از دماسنج جیوه‌ای استفاده گردید، به نحوی که هنگامی که دمای مخلوط آب و یخ به صفر درجه می‌رسید پمپ را روشن نموده و نمونه‌برداری آغاز می‌شد.

به منظور بررسی کارایی دستگاه ساخته شده از ۵ فرد سالم و ۵ فرد سیگاری به منظور مقایسه میزان مالون دی آلدئید هوای بازدمی استفاده شد. در ضمن این افراد از لحاظ BMI، سابقه کاری و سن همانندسازی شده بود و تنها تفاوت در مصرف سیگار این افراد بوده است در ضمن تمامی افراد مورد مطالعه مرد بوده‌اند. مالون دی آلدئید بر اساس شرایط ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها، در دقیقه ۱ و ۴ استخراج گردید (شکل ۲).

مشکل از کندانسور غیرتماسی، پمپ جریان آب، دماسنج، محل جمع‌آوری نمونه، و منبع تغذیه الکتریسته بود. به منظور دمیدن درون دستگاه از یک لوله قابل انعطاف متصل به لوله شیشه‌ای و دهنی استفاده شد.

شکل ۱ نمای باز شده این سیستم را نشان داده است. هوای بازدمی با عبور از بخش داخلی کندانسور شیشه‌ای که با جریان آب خنک گردیده است، به حالت فوق اشباع رسیده و رطوبت خود را بر روی دیواره کندانسور از دست می‌دهد.

قطرات ایجاد شده در سطح داخلی کندانسور به پایین ظرف هدایت شده و در یک میکروتیوب نگهداری می‌گردند. با توجه به حجم نمونه مورد نیاز برای آنالیز مالون دی آلدئید طبق روش انتخابی در این پژوهش، به این دلیل که در این طول و دما بیشترین بازدهی را



شکل ۱- نمایی از دستگاه نمونه‌برداری هوای بازدمی

برای هر فرد به صورت جداگانه تعبیه شده بود بدمند. هوای بازدمی پس از مواجهه با دمای صفر درجه به صورت مایع و کندانس شده در انتهای دستگاه درون میکروتیوب جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از ۱۰ نفر جهت بررسی مالون دی آلدئید هوای بازدمی انجام گردید. ابتدا از افراد خواسته شد با کمک گیره‌ای بینی خود را بگیرند و سپس با یک فرکانس ثابت به مدت ۴ دقیقه درون دهنی که

دستگاه برابر با ۱۰۰ در نظر گرفته شد. بررسی پیکها توسط توسط نرم افزار Empower pro صورت گرفت. **آنالیزهای آماری:** نتایج بررسی مالون دی آلدهید در هوای بازدمی دو گروه سیگاری و غیرسیگاری با استفاده از آزمون T مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

برای تعیین پارامترهای بهینه نمونه برداری هوای بازدمی ۳ نوع میرد با اندازه‌های ۱۵، ۲۵ و ۴۰ سانتی متری انتخاب و در دو دمای ۵ و صفر درجه سانتی گراد از هوای بازدمی نمونه برداری گردید (جداول ۱ و ۲). زمان تشکیل اولین قطره در میرد با طول کوتاه تر، کم تر می باشد؛ اما حجم نهایی جمع آوری کندانس در میرد با طول بزرگ تر، بیشتر می باشد. در دمای صفر درجه حجم نهایی بازدمی جمع آوری شده نسبت به دمای ۵ درجه بیشتر می باشد و همچنین زمان تشکیل اولین قطره نیز کوتاه تر می گردد (نمودار ۱).

در ظرف آب یخ نگهداری شد و بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه در یخچال با دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند.

تجزیه و تعیین مقدار MDA: جهت آماده سازی و تجزیه نمونه‌ها، تیوباریتیک اسید (TBA) از شرکت سیگما و نمک مالون دی آلدهید تترا بوتیل آمونیوم (TBA-MDA) با درجه خلوص بالای ۹۶٪ از شرکت سیگما و اتانول ساخت مرک آلمان خریداری گردید. آماده سازی با استفاده از مشتق گیری و بر اساس شیوه ارائه شده توسط Larstad و همکارانش صورت گرفت (۱۰).

تجزیه نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به دکتور فلورسانس همراه با ستون C18 صورت پذیرفت. به منظور تجزیه نمونه‌ها ۵۰ میکرولیتر از TBA-MDA به دستگاه HPLC تزریق گردید. فسفات بافر ۲۰ میلی مولار با pH ۶/۸ به همراه استونیتریل با نسبت (۸۰/۲۰) به عنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار گرفت. دکتور فلورسانس در طول موج تهییج ۵۳۲ و نشر ۵۵۳ تنظیم گردید. مقدار gain در

جدول ۱- کندانس جمع آوری شده از هوای بازدمی در دمای صفر درجه سانتی گراد

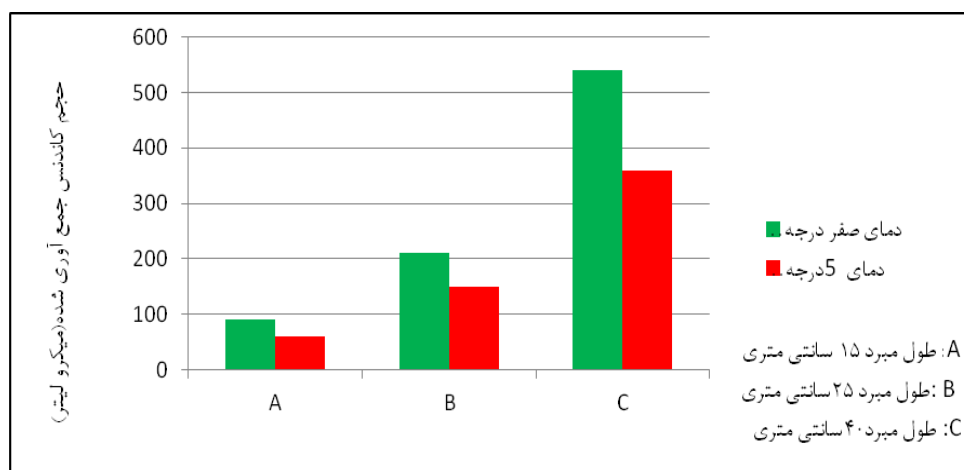
طول میرد (سانتی متر)	زمان تشکیل اولین قطره (ثانیه)	حجم کندانس جمع آوری شده پس از ۵ دقیقه (میکرو لیتر)
۱۵	۱۲۳	۹۰
۲۵	۱۵۷	۲۱۰
۴۰	۲۴۲	۵۴۰

جدول ۲- کندانس جمع آوری شده از هوای بازدمی در دمای ۵ درجه سانتی گراد

طول میرد (سانتی متر)	زمان تشکیل اولین قطره (ثانیه)	حجم کندانس جمع آوری شده پس از ۵ دقیقه (میکرو لیتر)
۱۵	۱۷۰	۶۰
۲۵	۲۲۰	۱۵۰
۴۰	۳۴۹	۳۶۰

همانطور که از آزمون بر آورد می شود بین افراد سیگاری و سالم از نظر مقدار مالون دی آلدهید تفاوت معناداری وجود دارد ($Pvalue < 0.05$) و این موضوع در نمودار ۲ نیز به وضوح مشخص می باشد.

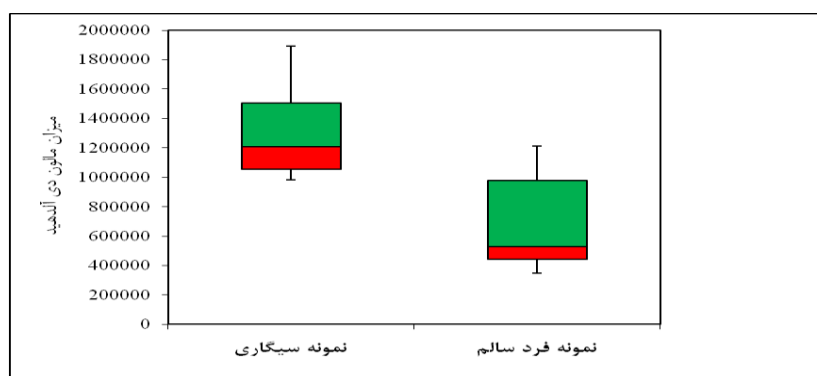
همانطور که در جدول ۳ مشاهده می گردد، میانگین سطح پیک مالون دی آلدهید در افراد سالم برابر با $70.2323/2$ و در افراد سیگاری برابر با $1328153/6$ می باشد.



نمودار ۱- مقایسه کندانس جمع آوری شده از هوای بازدمی در دمای صفر و ۵ درجه سانتی گراد

جدول ۳- مقایسه و توزیع میزان مالون دی آلدهید در دو گروه سالم و سیگاری

P value	df	t	میزان مالون دی آلدهید		نمونه
			انحراف معیار	میانگین	
۰/۰۲۹	۸	۲/۶۴	۳۷۳۳۳۹/۸۳	۱۳۲۸۱۵۳/۶	۵ سیگاری
			۳۷۳۶۳۶/۶۶	۷۰۲۳۲۳/۲	۵ سالم



نمودار ۲- مقایسه و توزیع میزان مالون دی آلدهید در دو گروه سالم و سیگاری

بحث

سرد و طول مبرد ۲۵ سانتی متری به منظور بهره‌وری بالاتر جهت جمع‌آوری کندانس هوای بازدمی استفاده شد. با این روش مدت نمونه‌برداری به ۵ دقیقه کاهش می‌یابد؛ به طوری که در این مدت به میزان ۲۱۰ میکرولیتر کندانس هوای بازدمی جمع‌آوری می‌گردد که نسبت به مطالعه Valenzuela و GÖKHAN راندمان بالاتری دارد. در

در این مطالعه جمع‌آوری EBC به عنوان یک مدیا در ارزیابی بیومارکرها، با استفاده از یک سیستم ساده مورد بررسی قرار گرفت. تعیین مقدار مالون دی آلدهید در نمونه‌های جمع‌آوری شده در دو گروه از افراد سیگاری و غیرسیگاری انجام شد. بر اساس مطالعات تجربی انجام گرفته توسط محقق از آب صفر درجه به عنوان منبع آب

مطالعات فوق زمان نمونه برداری بین ۱۵-۱۰ دقیقه ذکر شده است که در این مدت به میزان ۱/۵-۱ میلی لیتر کندانس هوای بازدمی جمع آوری می گردد (۱۵، ۱۴). مطالعات مختلف روش های متعددی را برای سرد نمودن و در نهایت جمع آوری EBC استفاده نموده اند؛ اما عموماً برای اهداف پژوهشی که تا کنون مورد بررسی قرار گرفته اند، جمع آوری با یخ یا آب سرد کفایت می کند. هر چند در مطالعه Valenzuela از سیستم سرد و گرم برای جمع آوری هوای بازدمی استفاده شده است (۱۴). از مشکلات دستگاه مورد استفاده در این پژوهش می توان وارد شدن بزاق به کندانس هوای بازدمی نام برد، در صورتی که این مشکل در مطالعه Valenzuela و همکارانش که به منظور بررسی و ارائه طرحی برای ساخت یک نمونه بردار برای EBC پرداختند، حل شده است. آنها با استفاده از یک چگالنده و یک سیستم حذف بزاق توانستند سیستمی را برای این هدف طراحی کنند (۱۴). همچنین Mutla و همکارانش در پژوهشی، به بررسی ویژگی های یک سیستم بهینه نمونه برداری از EBC پرداخته اند. از جمله معایبی که برای روش های کنونی نمونه برداری EBC در این مطالعه به آنها اشاره شده است، می توان به عدم وجود متدولوژی استاندارد برای نمونه برداری از این مواد اشاره کرد. آنها در نهایت ابزاری برای این هدف معرفی نموده اند (۱۵). به طور خلاصه، دستگاه در مطالعه حاضر مربوط به یک سیستم کم هزینه است که قطعات آن ارزان و یک بار مصرف می باشد و این امکان را به وجود می آورد تا با استفاده از یک تکنولوژی نه چندان پیچیده به کارایی مورد نظر دست پیدا کرد. نتایج به دست آمده از آنالیز نمونه ها در این مطالعه نشان داد که میزان مالون دی آلدهید در کندانس بازدمی گروه مورد بالاتر از گروه شاهد می باشد. در مطالعه رنجبر و همکاران، میزان پر اکسیداسیون لپیدی در افراد سیگاری بالاتر از افراد غیرسیگاری بوده است. در مطالعه آنها ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و گروه های تیول پلاسما در افراد سیگاری، پایین تر از افراد

غیرسیگاری بوده است. با توجه به کاهش گروه های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسما چنین استنباط می شود که در افراد سیگاری، تولید رادیکال های آزاد افزایش داشته است (۱۹). در مطالعه Block و همکاران نیز میزان پر اکسیداسیون لپیدی و f2-ایزو پروستان ها در افراد سیگاری در مقایسه با افراد غیرسیگاری، افزایش معنی داری داشته است (۲۰). در مطالعه Rouzbahani و همکاران، میزان مالون دی آلدهید در افراد سیگاری بالاتر از افراد غیرسیگاری بوده است (۲۱). همچنین در مطالعه Rostami و همکاران ۶۰ نفر از افراد سیگاری و ۶۰ نفر از افراد غیرسیگاری انتخاب و سطح سرمی نیتريت، نیترات و مالون دی آلدهید آنها تعیین و با هم مقایسه شدند. در این مطالعه سطح سرمی مالون دی آلدهید در گروه سیگاری $11/7 \pm 2/6$ و در گروه غیرسیگاری $8/3 \pm 1/9$ میکرو مول در لیتر بود که به طور معناداری در گروه افراد سیگاری بالاتر از گروه افراد غیرسیگاری بود (۲۲). در کل، نتایج این مطالعه با نتایج سایر مطالعات همخوانی دارد (۲۴، ۲۳).

تعیین مقدار مالون دی آلدهید در هوای بازدمی در مطالعات مختلفی انجام شده است؛ به عنوان مثال Larstad و همکارانش مطالعه ای را با هدف تعیین مالون دی آلدهید در کندانس هوای بازدمی افراد مبتلا به آسم انجام دادند (۱۰)، و یا Romieu و همکارانش میزان مالون دی آلدهید هوای بازدمی را به عنوان یک بیومارکر مواجهه با آلودگی های ناشی از ترافیک در مکزیک در کودکان آسمی اندازه گیری نمودند (۵).

نتیجه گیری

هر چند در این مطالعه کارایی روش پیشنهادی برای بررسی بیومارکرهای کندانس هوای بازدمی مورد تایید قرار گرفت، اما محدودیت هایی نیز در شیوه آزمایشات وجود دارد که پیشنهاد می گردد در مطالعات بعدی حذف گردد.

قرار دادن سنسوری در انتهای سیستم جهت تخمین حجم هوای بازدمی می‌تواند باعث طبیعی شدن مقدار بیومارکر جمع‌آوری شده و به دست آمدن نتایجی گردد که قابلیت مقایسه بهتر با سایر مطالعات را داشته باشد.

دستگاه ساخته شده در این پژوهش فاقد سیستم موثری در حذف بزاق بوده که می‌تواند خطایی را در نتایج ایجاد نماید. توصیه می‌گردد سیستم‌های مورد استفاده در مطالعات بعدی، سیستمی را جهت حذف بزاق احتمالی در نمونه‌ها به دستگاه اضافه نمایند. علاوه بر این

منابع

1. Risby TH, Solga S. Current status of clinical breath analysis. *Applied Physics B*. 2006;85(2-3): 421-6
2. Predy V, Reilly M, Mantlc O, Peters T. Oxidative damage in liver diseases. *JIFCC*.1998; 10: 16-9
3. Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers*. 2002; 7(1): 1-32
4. Corradi M, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, Folesani G, Mozzoni P, et al. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicology letters*.2002;134(1):219-25
5. Romieu I, Barraza-Villarreal A, Escamilla-Nuñez C, Almstrand AC, Diaz-Sanchez D, Sly PD, et al. Exhaled breath malondialdehyde as a marker of effect of exposure to air pollution in children with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;121(4): 903-9
6. Guentsch A, Preshaw PM, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clinical oral investigations*. 2008; 12(4):345-52
7. Syslová K, Kačer P, Kuzma M, Najmanová V, Fenclová Z, Vlčková Š, et al. Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases. *Journal of Chromatography B*. 2009; 877(24): 2477-86
8. Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, et al. The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environmental health perspectives*. 2006; 114(4): 542-46
9. Gube M, Ebel J, Brand P, Göen T, Holzinger K, Reisgen U, et al. Biological effect markers in exhaled breath condensate and biomonitoring in welders: impact of smoking and protection equipment. *International archives of occupational and environmental health*. 2010; 83(7): 803-11
10. Lärstad M, Ljungkvist G, Olin AC, Torén K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2002; 766(1): 107-14
11. Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis-focus on volatile organic compounds. *Clinica Chimica Acta*. 2004; 347(1): 25-39
12. Pleil JD, Lindstrom AB. Measurement of volatile organic compounds in exhaled breath as collected in evacuated electropolished canisters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995; 665(2): 271-9
13. Von Basum G, Dahnke H, Halmer D, Hering P, Mürtz M. Online recording of ethane traces in human breath via infrared laser spectroscopy. *Journal of Applied Physiology*.2003;95(6): 2583-90
14. Araneda Valenzuela OF, Salazar Encina MP. Design and evaluation of a device for collecting exhaled breath condensate. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2009; 35(1): 69-72.

15. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001; 164(5): 731-7
16. Horvath I, Hunt J, Barnes P. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *European Respiratory Journal*. 2005; 26(3): 523-48
17. Amann A, Miekisch W, Pleil J, Risby T, Schubert J. Methodological issues of sample collection and analysis of exhaled breath. Chapter 7, Maney Publishing, Leeds, Uk, 2010; 49:96-114
18. Yao S, Rojanasakul LW, Chen Z, Xu Y, Bai Y, Chen G, et al. Fas/FasL pathway-mediated alveolar macrophage apoptosis involved in human silicosis. *Apoptosis*. 2011; 16(12): 1195-204
19. Saburi S, Mohtadinia J, Ali-Asgarzadeh A, Nomi-Gholzar S, Yusefirad E. Synergistic effects of vitamin A and extremely low frequency electromagnetic field (50HZ) on limb bud development in Balb/c mouse. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2010; 12 (2) :1-6
20. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *American Journal of Epidemiology*. 2002; 156(3): 274-85
21. Rouzbahani R, Asgary S, Naderi G, Dehghan Nejad M, Rezaei F . Comparison of Plasma Lipid Peroxidants, Glycosilated Hemoglobin, Conjugated Dienes and CPR Level in Smokers and Non-smokers Men, *Journal of Isfahan Medical School*, 2009; 27(93):115
22. Rostami M, Jarfi M. The Evaluation of Serum Nitrite, Nitrate and Malonyldialdehyde Levels in Smokers. *mljgoums*. 2009; 3 (2)
23. Mol MJ, de Rijke YB, Demacker PN, Stalenhoef AF. Plasma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking: effects of vitamin E treatment. *Atherosclerosis*. 1997; 129(2): 169-76
24. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical chemistry*. 1997; 43(7): 1209-14