

## شاخصهای استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی تیپ ۲ بدون عوارض

دکتر جعفر نوروززاده<sup>۱</sup>، غلامعلی حفظی<sup>۲</sup>، دکتر محمد حسن خادم انصاری<sup>۳</sup>، دکتر کامران کیوان پژوه<sup>۴</sup>

۱- دانشیار بیوشمی، گروه بیوشمی و تغذیه، دانشکده علوم پزشکی ارومیه، (مؤلف مسئول) jnouroozzadeh@yahoo.co.uk

۲- کارشناس ارشد بیوشمی، دانشکده علوم پزشکی ارومیه

۳- استادیار بیوشمی، دانشکده علوم پزشکی ارومیه

۴- استادیار بیماریهای داخلی، دانشکده علوم پزشکی ارومیه

### چکیده

**زمینه و هدف:** مبتلایان به دیابت نوع ۲ در معرض افزایش خطر گسترش عوارض قلبی عروقی، نفropاتی و نوروفپاتی می‌باشند. این خطر بوسیله فاکتورهای شایع نظری فشار خون بالا و دیس لیپیدمی کاملاً قابل توصیف نیست. از این رو پیشنهاد شده است که استرس اکسیداتیو می‌تواند توضیحی را برای عوارض تسریع شده در دیابت تیپ ۲ ارائه دهد. هدف از این مطالعه تعیین وضعیت اکسیدانتی و آنتی اکسیدانتی بیماران دیابتی تیپ ۲ بدون عوارض می‌باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه مورد - شاهدی ۲۰ بیمار دیابتی تیپ ۲ فاقد هر گونه عوارض ( $44/2 \pm 0/7$  سال؛ ۷ مرد و ۱۳ زن) و هچنین ۲۰ فرد غیر دیابتی بعنوان گروه شاهد ( $43/2 \pm 0/9$  سال؛ ۱۲ مرد و ۸ زن) انتخاب شدند. برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید، توتال گلوتاتیون، آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از روش‌های اسپکتروفتومتری و برای اندازگیری ویتامین E از روش HPLC استفاده گردید. ارزیابی داده‌ها از طریق نرم افزار 10 SSPS-Win version انجام گرفت.

**یافته‌ها:** سطح توتال گلوتاتیون و همچنین نسبت ویتامین E به تری گلیسرید در بیماران دیابتی تیپ ۲ پائین‌تر از گروه کنترل بود، به ترتیب:  $148/8 \pm 15/5$   $\mu\text{mol}/\text{L}$  در مقابل  $192/9 \pm 54/4$   $\mu\text{mol}/\text{L}$ ;  $p < 0/05$  و  $14/4 \pm 1/6$   $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  در مقابل  $196/1 \pm 10/7$   $\text{nmol}/\text{L}$  در مقابله با  $0/05$   $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ . سطح مالون دی‌آلدئید در بیماران دیابتی بالاتر از گروه کنترل بود به ترتیب:  $175/2 \pm 20/4$   $\text{nmol}/\text{L}$  مقابله با  $175/2 \pm 20/0$   $\text{nmol}/\text{L}$ . مقدار کاتالاز و میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بیماران دیابتی با گروه کنترل متفاوت بود به ترتیب:  $571/9 \pm 65/3$   $\mu\text{g}/\text{L}$  در مقابل  $541/1 \pm 67/4$   $\mu\text{g}/\text{L}$  و  $0/29 \pm 0/06$  OD در مقابل  $0/26 \pm 0/01$  OD، البته این تغییرات معنی‌دار نبود.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی تیپ ۲ بدون عوارض در مقایسه با گروه کنترل تغییر یافته است و این فرضیه را که استرس اکسیداتیو قبل از بروز عوارض دیابتی ایجاد می‌گردد، تقویت می‌کند.

**کلید واژه‌ها:** استرس اکسیداتیو، دیابت نوع ۲، آنتی اکسیدانت، لیپید اکسیداسیون

وصول مقاله: ۸۵/۲/۱۸ اصلاح نهایی: ۸۵/۱/۳۰ پذیرش مقاله: ۸۴/۳/۲۹

### مقدمه

شده است که استرس اکسیداتیو می‌تواند در روند سرعت بخشیدن به بروز عوارض بالینی در مبتلایان به دیابت نوع ۲ نقش داشته باشد (۳-۶).

رادیکالهای آزاد بطور مداوم طی متابولیسم هوایی تولید می‌شوند و برای عملکرد مکانیسمهای دفاعی

مبتلایان به دیابت نوع ۲ در معرض خطر بالایی از عوارض عروقی، نفropاتی و نوروفپاتی می‌باشند. این خطر افزایش یافته تنها تا حدودی بوسیله ریسک فاکتورهای شایع نظری مصرف سیگار، فشار خون بالا و دیس لیپیدمی قابل توجیه است (۱,۲) از این رو پیشنهاد

مت فورمین به تنها بی و یا همراه با رژیم غذایی برای کنترل گلوکز بود. کلیه افراد گروه بیمار غیر سیگاری و طی سه ماه گذشته هیچگونه آنتی اکسیدانتی مصرف نکرده بودند. ۲۰ فرد غیر دیابتی (محدوده سنی ۳۵ تا ۵۰ سال) بعنوان گروه شاهد از بین کارمندان دانشکده علوم پزشکی ارومیه بصورت تصادفی انتخاب شدند. افراد گروه کنترل سیگاری نبودند و از نظر بیماریهای عفونی، قلبی عروقی، کلیوی و سرطان سالم بودند. آنها هیچگونه آنتی اکسیدانتی مصرف نمی کردند و تحت رژیم غذایی خاصی نبودند.

نمونه های خون بمقدار ۵ میلی لیتر برای تهیه سرم و همچنین ۵ میلی لیتر برای تهیه پلاسما با ماده ضد انقاد EDTA-K پس از یک ناشتاپی ۱۲ ساعته جمع آوری شدند. برای اندازه گیری گلوکز (FBS)، توتال کلسترول (Total-C)، کلسترول لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL-C)، کلسترول لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL-C)، کلسترول لیپوپروتئین با دانسیته بسیار پایین (VLDL-C) و تری گلیسرید (TG) از نمونه سرم و برای اندازه گیری مالون دی آلدید، آلفا توکوفرول، توتال گلوتاتیون و آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از نمونه پلاسما استفاده گردید. نمونه های پلاسما تا زمان آنالیز در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

**غلظت آلفا- توکوفرول به روش HPLC فاز معکوس با استفاده از دتکتور ماورای بنسن (UV) در طول موج ۲۸۲ nm ۲۸۲ اندازه گیری شد (۱۰).** سطح توتال گلوتاتیون نیز با استفاده از دی تیونیترو بنزوئیک اسید (Dinitrobenzoic acid; DTNB) به عنوان ماده رنگزا در طول موج ۴۱۲ nm تعیین شد .(11)

میزبان مانند نوتروفیلهای، ماکروفازها و منوسيتها و دیگر مولکولهای سیستم ایمنی نیز ضروری می باشد (۷). به منظور جلوگیری از تجمع بیش از حد رادیکالهای آزاد، بدن مجهر به یک سری سیستمهای آنتی اکسیدانی می باشد که می تواند آنها را خنثی کند (۸). این سیستمهای آنتی اکسیدانی شامل ویتامینهایی مانند C و E، آنزیمهایی مانند سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase; SOD) و کاتالاز (CAT) و مولکولهایی مانند گلوتاتیون (یا گاما- گلوتامیل سیستئن گلیسن) هستند. در هنگام افزایش تولید رادیکالهای آزاد، بعلت کشمکش بین رادیکالهای آزاد و آنتی اکسیدانها، ممکن است سطح آنتی اکسیدانها کاهش یابد و بدن با کمبود آنها مواجه شود. در این شرایط، پاکسازی ناقص این رادیکالها موجب اکسیداسیون لپیدها، پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و قندها می شود. این امر ممکن است در نهایت موجب پی آمدهای گسترده پاتولوژیک در دیابت شود (۹).

هدف از این مطالعه ارزیابی شاخصهای استرس اکسیداتیو (مالون دی آلدید، ویتامین E، توتال گلوتاتیون و آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) در بیماران دیابتی نوع ۲ فاقد عوارض در مقایسه با گروه شاهد است.

## روش بررسی

در این مطالعه مورد- شاهدی ۲۰ فرد مبتلا به دیابت نوع ۲ که فاقد هرگونه عارضه دیابتی بودند بنا به تشخیص پزشک متخصص بیماریهای داخلی انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه محدوده سنی ۳۵ تا ۵۰ سال، گلوکز ناشتا  $\geq ۱۱۰/۷ \text{ mg/dl}$ ، تری گلیسرید  $\geq ۱۵۰/۶ \text{ mg/dl}$  و استفاده از قرصهای گلی بنگلامید و

mg/dl  $142/5 \pm 11/6$  و mg/dl  $35/9 \pm 2/7$  در مقابل mg/dl  $125/1 \pm 13/9$ . ویژگیهای آزمایشگاهی افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ و گروه کنترل در جدول ۱ ارائه شده است.

سطح توتال گلوتاتیون در بیماران دیابتی تیپ ۲ پائین‌تر از گروه کنترل بود ( $148/8 \pm 15/5$   $\mu\text{mol/L}$  در مقابل  $192/9 \pm 54/4$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p < 0.05$ ). از نظر سطح آلفا - توکوفرول و نسبت آن به توتال کلسترول تفاوت معنی‌داری بین گروههای بیمار و شاهد وجود نداشت به ترتیب:  $38/6 \pm 2/4$   $\mu\text{mol/L}$  در مقابل  $36/7 \pm 2/1$   $\mu\text{mol/L}$  و  $6/8 \pm 0/5$   $\mu\text{mol/mmol}$  در مقابل  $7/7 \pm 0/8$   $\mu\text{mol/mmol}$  ولی نسبت آلفا - توکوفرول به تری‌گلیسرید در بیماران دیابتی پائین‌تر از گروه کنترل بود به ترتیب:  $14/4 \pm 1/6$   $\mu\text{mol/mmol}$  و در مقابل  $17/0 \pm 1/1$   $\mu\text{mol/mmol}$ ;  $p < 0.05$ . سطوح مالون دی‌آلدئید، میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و مقدار آنزیم کاتالاز در بیماران دیابتی بالاتر از افراد کنترل بود به ترتیب:  $10/7$   $\pm 10/1$  nmol/L در مقابل  $4/2 \pm 0/4$  nmol/L OD در مقابل  $0/29 \pm 0/06$  nmol/L OD و  $571/9 \pm 65/3$   $\mu\text{g/L}$  در مقابل  $541/1 \pm 67/4$   $\mu\text{g/L}$ ، این تفاوتها هیچگذام معنی‌دار نبود. نمودار ۱ سطوح توتال گلوتاتیون و مالون دی‌آلدئید و هچنین نسبت آلفا - توکوفرول به تری‌گلیسرید در بیماران دیابتی و گروه کنترل را نشان می‌دهد.

بین سطوح گلوکز و MDA در دیابتی‌ها همبستگی وجود داشت ( $r = 0.69$ ;  $p < 0.01$ ; Pearson); در حالیکه در گروه شاهد چنین ارتباطی مشاهده نگردید ( $r = -0.21$ ;  $p = 0.38$  Pearson).

سطح مالون دی‌آلدئید بر اساس واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید (TBA) در طول موج  $532 \text{ nm}$  تعیین شد (۱۲, ۱۳). مقدار کاتالاز به روش رنگ‌سنگی با استفاده از پرپالد (Purpald) به عنوان ماده رنگ‌گزرا در طول موج  $550 \text{ nm}$  اندازه‌گیری شد (۱۴). فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به روش رنگ‌سنگی با استفاده از نیتروبلو ترازاولیوم (Nitroblue tetrazolium; NBT) به عنوان ماده رنگ‌گزرا در طول موج  $560 \text{ nm}$  ارزیابی گردید (۱۵).

نرم افزار آماری SPSS version 10 برای تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت و از آمارهای توصیفی (میانگین و انحراف معیار)، آزمون آماری T-test و همبستگی پیرسون برای آزمون داده‌ها استفاده شد.

## یافته‌ها

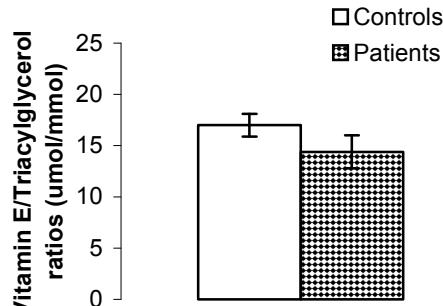
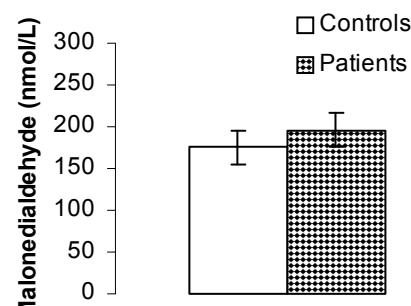
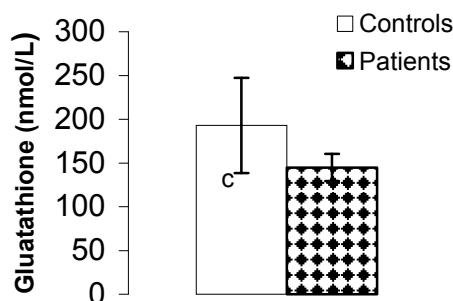
گروه کنترل شامل ۱۲ مرد و ۸ زن (سن  $43/2 \pm 0/9$  سال:  $39-48$  سال) و گروه بیمار از دیابتی‌های تیپ ۲ از ۷ مرد و ۱۳ زن (سن  $44/2 \pm 4/7$  سال:  $40-47$  سال) تشکیل شده بود.

سطح گلوکز، تری‌گلیسرید و کلسترول لیپوپروتئین با چگالی بسیار پائین در بیماران دیابتی نوع ۲ بالاتر از گروه کنترل بود (به ترتیب:  $196/4 \pm 13/8$  mg/dl در مقابل  $175/2 \pm 20/4$  mg/dl;  $571/9 \pm 65/3$   $\mu\text{g/L}$  در مقابل  $541/1 \pm 67/4$   $\mu\text{g/L}$ ;  $p < 0.001$ ؛ mg/dl  $86/7 \pm 2/2$  در مقابل  $20/5/3 \pm 17/7$  mg/dl در مقابل  $281/4 \pm 38/1$  mg/dl و  $37/8 \pm 3/0$  mg/dl در مقابل  $56/4 \pm 7/7$  mg/dl;  $p < 0.05$ ; mg/dl  $216/4 \pm 30/8$  در مقابل  $216/6 \pm 15/8$  mg/dl). اما از نظر سطوح توتال کلسترول، کلسترول لیپوپروتئین با چگالی بالا و لیپوپروتئین با چگالی پائین تفاوتی بین دیابتی نوع ۲ و گروه کنترل وجود نداشت به ترتیب:  $216/4 \pm 30/8$  mg/dl در مقابل  $216/6 \pm 15/8$  mg/dl.

جدول ۱: شاخصهای آزمایشگاهی افراد دیابتی تیپ ۲ فاقد عوارض و گروه کنترل

p	افراد کنترل		گلوکز (mg/dl)
	افراد دیابتی نوع ۲	میانگین ± خطای استاندارد	
<0.01	۸۶/۷±۲/۲	۱۹۶/۴±۱۳/۸	
<0.05	۲۰۵/۳±۱۷/۷	۲۸۱/۴±۳۸/۱	تری گلیسرید (mg/dl)
-	۲۱۶/۶±۱۵/۸	۲۱۶/۴±۳۰/۸	توتال کلسترول (mg/dl)
<0.05	۳۷/۸±۳/۰	۵۶/۴±۷/۷	VLDL-C (mg/dl)
-	۱۲۵/۱±۱۳/۹	۱۴۲/۵±۱۱/۶	LDL-C (mg/dl)
-	۳۵/۹±۲/۷	۳۹/۴±۵/۸	HDL-C (mg/dl)

نمودار ۱: سطوح توتال گلواتابون، مالوندی‌آلدئید و نسبت آلفا - توکوفروول به تری گلیسرید در بیماران دیابتی و گروه کنترل



## بحث

هیدروژن بالا است، وجود دارد مانند *peroxisomes* در حالیکه تجزیه پراکسید هیدروژن در جاهایی مانند پلاسمای خون که به مقدار کمی وجود دارد به عهده آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد.

سطح گلوتاتیون نیز در افراد دیابتی در مقایسه با گروه کنترل  $23\%$  کاهش را نشان داد ( $p < 0.05$ ) این امر حاکی از افزایش تولید رادیکالهای آزاد در بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲ است که باعث کاهش سیستم دفاعی بدن علیه رادیکالهای آزاد می‌شود. یافته‌های این بررسی با نتایج حاصل از مطالعه Nuttal و همکارانش که استرس اکسیداتیو را در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار داده بودند همخوانی دارد (۲۲).

در این مطالعه تفاوتی از نظر سطح ویتامین E در بین بیماران دیابتی و گروه کنترل دیده نشد. البته در این مورد گزارش‌های متفاوتی از نظر سطح ویتامین E در بیماران دیابتی وجود دارد. بعضی مطالعات تفاوتی را از نظر سطح ویتامین E در بین گروه دیابتی و گروه شاهد نشان ندادند در حالیکه در گزارش‌های دیگر افزایش و یا کاهش ویتامین E در بیماران دیابتی دیده شده است یا کاهش ویتامین E به میزان آنکه جذب ویتامین E به میزان پسیدهای خون بستگی دارد، گزارش نسبت سطح ویتامین E به میزان چربیهای خون مانند توatal کلسترول و تری‌گلیسریدها بعنوان یک مارکر برای بررسی وضعیت این آنتی اکسیدانت در بیماری و سلامتی پیشنهاد شده است (۲۵). در این مطالعه از نظر سطح نسبت ویتامین E به توatal کلسترول تفاوت معنی‌داری بین گروههای بیمار و کنترل وجود نداشت ولی نسبت ویتامین E به تری‌گلیسرید در بیماران دیابتی  $16\%$  پائین‌تر از گروه کنترل بود. از بین این دو شاخص به دلیل اینکه میزان

در این مطالعه از پنج شاخص استرس اکسیداتیو شامل مالون دی آلدئید،  $\alpha$ -توکوفرول، توatal گلوتاتیون و آنزیمهای کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز برای بررسی وضعیت اکسیدانتی و آنتی اکسیدانتی بیماران تیپ ۲ فاقد عوارض و افراد غیر دیابتی بعنوان کنترل استفاده گردید. سطح مالون دی آلدئید در بیماران دیابتی  $11\%$  بالاتر از گروه شاهد بود، گرچه این تفاوت چندان معنی‌دار نیست ( $p < 0.07$ ). ارتباط بین سطوح گلوکز و MDA در دیابتی‌ها نشان‌دهنده افزایش تولید رادیکالهای آزاد در اثر هیپر گلیسمی است که در نتیجه موجب اکسیداسیون چربیهای غیر اشباع می‌شود (۱۶, ۱۷). یافته‌های ما با مطالعات دیگران که استرس اکسیداتیو را در بیماران دیابتی تیپ ۱ و یا تیپ ۲ بررسی کردند همخوانی دارد (۱۸-۲۱).

همچنین میزان فعالیت آنزیم SOD در افراد دیابتی  $9\%$  بالاتر از گروه کنترل بود. گرچه این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نیست ولی با این حال مشخص است که میزان فعالیت این آنزیم در افراد دیابتی تا حدودی افزایش یافته است. این امر حاکی از وجود رادیکالهای آزاد حاصل از هیپر گلیسمی است که منجر به افزایش فعالیت این آنزیم شده است. از سوی دیگر به دلیل اینکه افراد مورد مطالعه ما در مراحل اولیه سیر پیشرفت بیماری خود بودند و هنوز تولید رادیکالهای آزاد در آنان شدت زیادی نگرفته بود، لذا توقعی برای وجود تفاوتی چشمگیر بین این دو گروه از نظر فعالیت آنزیم SOD وجود نداشت. در ضمن مقدار آنزیم CAT در دیابتی‌ها  $5\%$  کمتر از گروه کنترل بود و این تفاوت کم، به دلیل آن است که آنزیم CAT در جاهایی که مقدار پراکسید

### نتیجه‌گیری

استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی تیپ ۲ بدون عوارض در مقایسه با گروه کنترل تغییر یافته است. بهم خوردن تعادل اکسیدانتی/آنٹی اکسیدانتی بدن باعث القای یکسری سیگالهای سلولی می‌شود که در نهایت موجب پی‌آمدی‌های پاتولوژیک در بیماران دیابتی می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

از آقای کوکی به خاطر زحماتشان در نمونه‌گیری و انجام آزمایش‌های بیوشمی این پژوهه سپاسگزاریم.

توتال کلسترول با مصرف غذا به سرعت تغییر نمی‌یابد، نسبت ویتامین E به توتال کلسترول معیار بهتری برای بررسی وضعیت این آنتی‌اکسیدانت بشمار می‌آید. نکته قابل توجه این است که در این مطالعه نسبت به سایر مطالعات، سطح ویتامین E در بیماران دیابتی و افراد کنترل بصورت چشمگیری بالاتر است (۲۶). اما از آنجایی که اطلاعاتی دراستان آذربایجان غربی و یا از نقاط دیگر ایران درباره سطح ویتامین E بعنوان رفائل در دسترس نیست امکان بحث در بالا بودن سطح ویتامین E پلاسمای افراد این منطقه فعلاً میسر نمی‌باشد، از این رو سطح ویتامین E در این منطقه باید دوباره بررسی گردد تا علت آشکار شود.

### References

- Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiological view. *Diabetes* 1987; 3: 463-524.
- Uusitupa MI, Niskanen LK, Siitonen O, Voutilainen E, Pyorala K: Five-years incidence of atherosclerotic vascular disease in relation to general risk factors, insulin level, and abnormalities in lipoprotein composition NIDDM and non-diabetic subjects. *Circulation* 1990, 82: 27-36.
- Oberley LW: Free radicals and diabetes. *Free Radical Biol Med* 1988; 5:113-124.
- Baynes JW. Perspectives in diabetes: role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.
- Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler HJ, Rosen P, Halliwell B and et al. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in non-insulin dependent diabetes. *Diabetologia* 1997; 40: 647-653.
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a congress series sponsored by UNESCO-MCBN, the American diabetes association and the German diabetes society. *Diabetes Metabolism Res Rev* 2001; 17: 189-212.
- Halliwell B, Gutteridge J M C (eds). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 2000:36-104.
- Halliwell B. Antioxidants and human disease; a general introduction. *Nutri Rev* 1997; 55: 44-52.
- Ceriello A. The emerging role of post-prandial hyperglycaemic spikes in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetic Med* 1998; 15:188-197.
- Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J, Birlouez-Aragon I, Wolff S P: Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylenol orange assay. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 17-21.
- Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giustranini D, Lusini L, Colombo R and et al. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem* 2002; 48: 742-753.
- Lepage G, Munoz G, Champagne J, Champagne J, Roy CC. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1991; 197: 277-283.

13. Yan LX, Chow CK. An improved method for the measurement of malondialdehyde in biological samples. *Lipids* 1994; 29: 73-75.
14. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C. Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis:Preliminary assessment. *Clin Chem* 1995; 41: 867-871.
15. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
16. Wierusz-Wysocka B, Wysocki H, Byks H, Zozulinska D, Wykretowicz A, Kazmierczak M. Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 27: 193-197.
17. Sampson MJ, Gopaul N, Davies IR, Hughes D, Carrier M. Plasma isoprostanes; Direct evidence of increased free radical damage during acute hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25:537-541.
18. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 1995; 44: 1054-1058.
19. Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram K R, Mohan V. Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin dependent diabetes. *Diabetic Med* 1996; 13: 715-719.
20. Sharma A, Kharb S, Chugh SN, Kakkar R, Singh GP. Evaluation of oxidative stress before and after control of glycaemia and after vitamin E supplementation in diabetes patients. *Metabolism* 2000; 49:160-162.
21. Mara G, Cotroneo P, Pitocco D, Manto A, DiLeo M, Ruotolo V and et al. Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25:370-375.
22. Nuttall SL, Dunne F, Kendall MJ, Martin U. Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *QJM* 1999. 92: 33-38.
23. Brigelius-Flohe R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E; Current knowledge and future research. *Am J Nutri* 2002; 76: 703-716.
24. Nourooz-Zadeh J, Halliwell B, Tritschler HJ, Betteridge DJ. Decrease lipid standardised plasma  $\alpha$ -tocopherol in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes and Stoffwechsel* 1997; 6 [Suppl 2] :20-23.
25. Leonhardt W. Concentration of antioxidative vitamins in plasma and low-density lipoprotein of diabetic patients in antioxidants. In diabetes management (eds: Packer P, Rosen P, Tritschler H J and Azzi A). New York: Marcel Dekker, 2000: 65-76.
26. Gross M, Yu X, Hannan P, Prouty C, Jacobs D: Lipid standardization of serum fat-soluble antioxidant concentrations; the YALTA Study. *Am J Clin Nutri* 2003; 77: 458-466.