

Tip II Diabetes Mellitus'lu Hastaların Serumunda Vitamin A ve E Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Tayini

DETERMINATION OF LEVELS OF VITAMINS A AND E IN THE SERUM OF TYPE II DIABETES MELLITUS PATIENTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY(HPLC)

Fikret KARATAŞ*, Mustafa KARATEPE**, Bilal ÜSTÜNDAĞ***

* Yrd.Doç.Dr., Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,

** Araş.Gör., Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, ELAZIĞ

***Yrd.Doç.Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD, ELAZIĞ

Özet

Bu çalışmada yaşları 35-65 arasında tip II diabetes mellitus hastası 45 kişi ile yaşları 32-55 arasında 21 sağlıklı kişide açlık glukoz, glikolize hemoglobin (HbA_{1C}), A ve E vitamin miktarları tesbit edildi. Diabetes mellitus grubunda glukoz 168.69±7.93 mg/dl, %HbA_{1C} 7.80±0.16, A vitamini 671.42±42.66µg/L ve E vitamini 867.26±33.57µg/dl iken, kontrol grubunda, glukoz 94.86±2.80 mg/dl, %HbA_{1C} 4.04±0.05, A vitamini 702.72±48.74µg/L ve E vitamini 765.57±44.70 µg/dl olarak belirlendi. Glukoz (p<0.001), %HbA_{1C} (p<0.001), A vitamini (p<0.001) ve E vitamini düzeylerinde (p<0.01) Diabetes mellitus grubunda, kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı farklılıklar bulundu.

Anahtar Kelimeler: HPLC, Tip II diabetes mellitus, A ve E vitamini

T Klin Tıp Bilimleri 2000, 20:66-72

Summary

In this study, the amount of fasting glucose, glycated hemoglobin (HbA_{1C}), vitamins A and E have been investigated for 45 patients with type II diabetes mellitus, aging between 35 to 65 and 21 healthy subjects aging between 32 to 55. Glucose, HbA_{1C}%, vitamins A and E levels of patients were 168.69±7.93 mg/dl, 7.80±0.16, 671.42±42.66 µg/L, 867.26±33.57 µg/dl, whereas those of control group were 94.86±2.80 mg/dl, 4.04±0.05, 702.72±48.74 µg/L, 765.57±44.70 µg/dl, respectively. Glucose (p<0.001), HbA_{1C}% (p<0.001), vitamin A (p<0.001) and vitamin E (p<0.01) levels of patients group were found to be significantly different than those of the control group.

Key Words: HPLC, Type II diabetes mellitus, A and E vitamins

T Klin J Med Sci 2000, 20:66-72

Diabetes mellitus (DM), insülin disfonksiyonuna bağlı, kronik seyirli, kalıtsal kökenli, klinik tablo ve patogenezi açısından heterojen karakterli ve ciddi komplikasyonlarla seyreden multisistemik bir hastalıktır. Bu hastalıkta özellikle karbonhidrat metabolizması bozulmakla birlikte yağ ve protein metabolizmasında da bozukluklar olur (1,2) ve iyi kontrol edilemeyen diabette bu olay daha da artar. DM'da oksidatif ve nonenzimatik protein glikolizasyonu neticesinde, glukoz geçiş metallerinin katalize ettiği otooksidasyon ile O₂, H₂O, H₂O₂, OH gibi moleküllere dönüşür. Oksidatif aktivitenin artması serbest radikal oluşumunu ve proteinlerin glikozillenmesini artırır. Bu glikozillenmenin tipik bir örneği glikozillenmiş hemoglobindir (HbA_{1C}) (3,4).

Artan glukoz ve glikozillenmiş proteinler otooksidasyona uğrayarak serbest radikal oluşturmakta ve bu da sonuçta organizmada oksidatif strese neden olmaktadır. Son zamanlarda biyokimyasal ara ürünler ve stres sonucu oluşan serbest radikallerin diabet dahil birçok hastalıkla ilgisi olduğu belirtilerek, diabette serbest radikal

Geliş Tarihi: 16.08.1999

Yazışma Adresi: Dr.Fikret KARATAŞ

Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü, ELAZIĞ

oluşumunun arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülmüştür (5).

Hücrelerin metabolik fonksiyonları farklı olduğundan, organizmada sürekli olarak serbest radikal oluşur. Fakat bu radikallere karşı organizmada güçlü savunma sistemleri vardır. Biyolojik sistemleri etkileyen çeşitli peroksidatif faktörlerle, bunlara karşı gelen antioksidan sistem kapasitesi arasında bir denge oluşmaktadır. Eğer bu denge serbest radikal lehine bozulacak olursa patolojik bir durum ortaya çıkar (5,6). DM'da diabetik komplikasyonların gelişimi ve oksidatif hasarın arttığı ve antioksidan korumanın önemli derecede bozulduğu belirtilmektedir (7).

Organizmada süperoksit radikalleri enzimatik dismutasyonla temizlenirken, antioksidan olarak bilinen bileşikler de oksijen radikallerinin yok edilmesini sağlarlar. Bu kimyasal bileşikler arasında A, E ve C vitaminleri önemli bir rol oynamaktadırlar (8). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda diabetik hastalarda etkili olan insülin hormonu üzerine antioksidan vitaminlerin olumlu etkisi olduğu belirtilmektedir (9).

Vitamin düzeylerindeki değişiklikler diabetin bir özelliği olmamasına rağmen, yapılan araştırmalarda diabetiklerde serbest radikal aktivitesindeki artış bu hastalıkta antioksidanlara daha çok ihtiyaç duyulabileceğini gösterebilir (4). Serbest radikallerin diabette etkin olduğunun belirtilmesi dolaylı olarak bu hastalıktaki komplikasyonları önleme ve tedavisinde radikal oluşumunu önleyici antioksidan vitamin kullanılabileceği düşüncesinin oluşmasına neden olmuştur. Bu çalışmada diabetik hastalarda antioksidan vitaminlerden A ve E vitamin düzeyleri tesbit edilerek, bu iki vitamin arasında bir korelasyon olup olmadığı diabet hastalığının izlenmesindeki rolünü belirleyebilmek amaçlanmıştır.

Materyel ve Metod

Bu çalışma F.Ü. Araştırma ve Uygulama Hastanesi Dahiliye Polikliniğine müracaat edip diabetes mellitus (DM) teşhisi konulmuş 45 diabetli ve 21 sağlıklı kişi üzerinde yapıldı. Diabet grubu düzenli poliklinik takipleri yapılan; önceden tip II diabetes mellitus tanısı konmuş, yaş ortalaması 51±5.9 olan (35-62 yıl) 18 kadın ve yaş ortalaması 52±8.7 olan (36-65 yıl) 27 erkek hastadan oluş-

maktadır. Kontrol grubu; yaş ortalaması 40±2.7 olan (32-53 yıl) 10 kadın ve yaş ortalaması 43±5.12 olan (34-55 yıl) 11 erkekten oluşmaktadır. Kontrol grubu alkol ve sigara bağımlılığı olmayan, ilaç kullanmayan, rutin biyokimya tahlilleri normal olan ruhen ve bedenen hiç bir problemi olmayan kişilerden oluşturuldu.

Örneklerin Alınması ve Analize Hazırlanması

Çalışmada hasta ve kontrol grubuna alınan kişilerin 10-12 saat açlıktan sonra uygun şartlar sağlanarak 6 ml venöz açlık kanları alındı. Alınan kan örnekleri 4000 devir/dk'da 10 dakika santrifüjlenerek serumları ayrıldı. Serumda rutin biyokimyasal analizler hemen yapılırken elde edilen serumların 1ml'si A ve E vitamini üç gün içerisinde çalışılmak üzere alüminyum folyo ile kaplı polietilen tüplere alınarak -70°C'de derin dondurucuda bekletildi (10).

Derin dondurucudan alınan serum örnekleri karanlıkta çözüldükten sonra, serum örneğinden 200 µL bir tüpe alınarak üzerine 400 µL etanol ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Daha sonra bunun üzerine 200 µL n-hekzan ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Karışım 4000 devir/dk'da 3 dakika santrifüjlenerek üstteki hekzan fazı ayrıldı. Her bir serum örneği için hekzanla ekstraksiyon işlemi en az iki defa tekrarlandı. Böylece, serum içindeki A ve E vitamininin tamamı hekzan fazına alındı. Ayrılan hekzan fazı azot gazı altında kuruluğa kadar uzaklaştırıldı. Daha sonra örnekler tekrar 400 µL % 100 metanolde çözülerek analiz hazır hale getirildi. HPLC'de hareketli faz olarak metanol: asetonitril: kloroform (47 : 42 : 11) karışımı kullanıldı. Vitamin A (retinol) 326, vitamin E (α-tokoferol) ise 296 nm'lik dalga boylarında tayin edildi (10,11).

Bu çalışmada, HPLC cihazı (CECIL 1100 series Cambridge England) ve C18 kolonu kullanıldı. %HbA_{1C} ve glukoz değerleri ise Olympus AU 600 oto analizör (Olympus AU 600 Autoanalyser, Olympus Corp. Tokyo, Japan) ile glukoz kitleri (olympus kiti) kullanılarak ölçüldü. Bulgular normal dağılım göstermekte olup aşırı uç değerler değerlendirmeye alınmadı. Ortalama ± standart deviasyon (SD) olarak verildi ve istatistiksel olarak "Student-t testi" kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 1. Diabet ve kontrol gruplarına ait açlık glukoz, %HbA_{1C}, A ve E vitamin düzeyleri

Grup	n	Glukoz (mg/dl)	%HbA _{1C}	Vitamin A (µg/L)	Vitamin E (µg/dl)
Tip 2 DM	45	168.69±7.93	7.80±0.16	671.42±42.66	867.26±33.57
Kontrol	21	94.86±2.80	4.04±0.05	702.72±48.74	765.57±44.70
P		P< 0.001	P< 0.001	P< 0.001	P< 0.01

Tablo 2. Kontrol ve hasta grubu kadın ve erkeklerdeki A ve E vitamin düzeyleri

Kontrol Grubu	n	Vitamin A (µg/L)	Vitamin E (µg/dl)
Erkek	11	691.34±37.32	751.56±30.64
Kadın	10	715.21±36.29	780.92±29.30
P		P>0.05	P>0.05
Hasta Grubu	n	Vitamin A (µg/L)	Vitamin E (µg/dl)
Erkek	27	651.42±22.63	852.74±19.05
Kadın	18	701.36±12.74	889.07±11.76
P		P< 0.01	P< 0.05

Bulgular

Kontrol ve diabetik olmak üzere iki grupta da kadınlarda A ve E vitamin düzeyleri erkeklerden daha yüksek gibi gözükmektedir. Bu nedenle cinsiyete göre vitaminlerin farklılığını belirleyebilmek için Tablo 2 oluşturuldu.

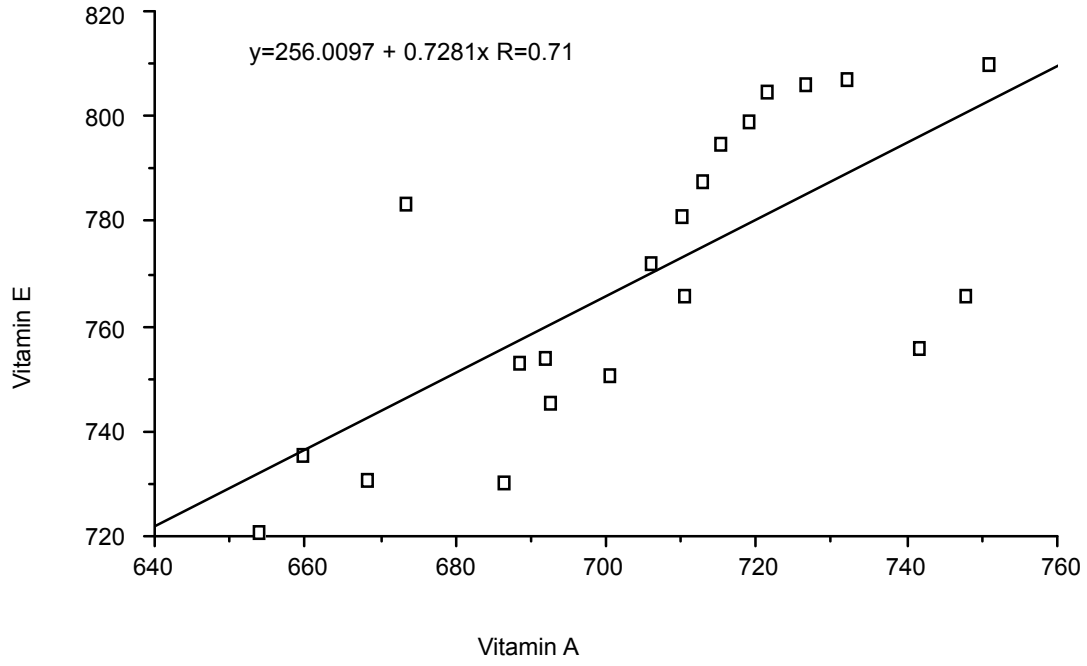
Özellikle kontrol grubunda E vitamini düzeyleri yüksek olan kişilerin A vitamin düzeyleri de yüksek gibi bulundu. Bu nedenle grup içerisinde A ile E vitamini arasında bir korelasyonun olup olmadığı belirlenmeye çalışıldı. Kontrol (Şekil 1) ve hasta gruplarında (Şekil 2) A vitamini değerlerine karşı E vitamini değerleri grafiğe alınarak doğru denklemleri ve regresyon katsayısı belirlendi. Bu doğru denklemler ve regresyon katsayıları kontrol grubu için $y=256.0097+0.7281x$ $R=0.71$, diabetikler için ise $y=734.7651+0.1979x$ $R=0.29$ olarak bulundu.

Yaptığımız bu çalışmada, ekstraksiyon işlemlerinde geri kazanma (Recovery), A vitamini için %98, E vitamini için %99.5 oranında gerçekleştirildi.

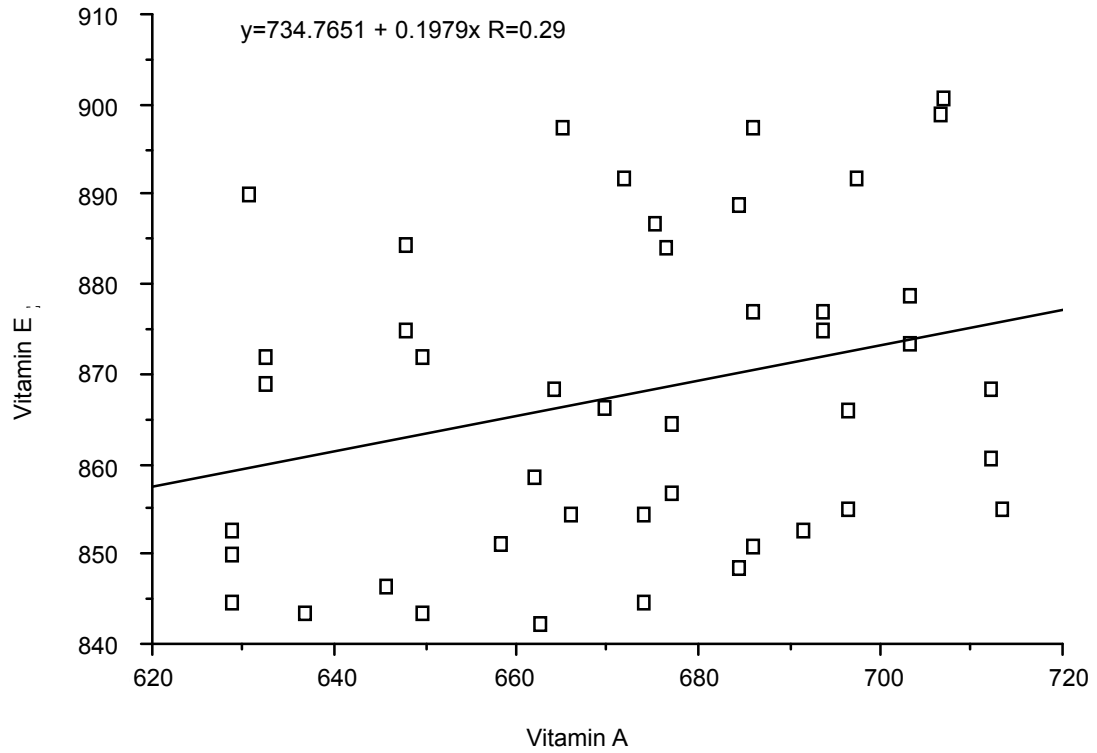
Tartışma

Diabetes mellitusta görülen vasküler patolojilerin oluşmasında geçiş metalleri tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarının ve ortaya çıkan oksidatif stresin etkili olduğu ileri sürülmektedir. Oksidatif stresin biyolojik yapılar üzerinde belirgin bir şekilde zarar verici potansiyeli vardır. Düşük molekül ağırlıklı redüktanlar (örneğin glukoz, askorbat ve poliansatüre yağ asitleri) in-vivo olarak geçiş metallerinin katalizlediği oksidasyon ile H₂O₂ ve lipit peroksitleri oluşturarak oksidatif strese katkıda bulunmaktadır (3). Diabetin komplikasyonları metabolik stresin bir sonucu olarak gelişmektedir. Metabolik stres ise, oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır. Bu durum diabet komplikasyonlarının gelişimini kolaylaştıran yapısal ve fonksiyonel hasarı oluşturmaktadır. Bu hasar sonucu oluşan HbA_{1C} kan glukozunun kısa süreli değişimlerinden etkilenmediği ve kanın alınmasından önceki ortalama 4-6 haftalık sürenin kan glukoz düzeyini yansıttığı ve bu yüzden diabetik hastalardaki glukoz regülasyonunun bir göstergesidir (3,12). Tablo 1'de görüldüğü gibi çalışmamızda diabetiklerin HbA_{1C} düzeylerinin (7.80±0.16) kontrol grubuna (4.04±0.05) göre daha yüksek olduğu tesbit edildi (p<0.001).

Yine kan glukoz düzeyleri diabetiklerde (168.69±7.93) iken kontrol grubunda bu değer (94.86±2.80) olarak bulundu (p<0.001). Diabetik hastaların takiplerinde kullanılan ve tedavinin



Şekil 1. Kontrol Grubu A ve E vitaminlerinin karşılaştırılması ($p < 0.01$).



Şekil 2. Diabetiklerde A ve E vitaminlerinin karşılaştırılması ($p > 0.05$).

düzenini sağlayan HbA_{1C} düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olması diabetiklerin iyi kontrol edilemediklerini düşündürmektedir.

Glikozillenmiş proteinler otooksidasyona uğrayabilir ve bu sırada serbest radikaller üretilir. Biyolojik sistemlerde hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de yabancı maddelerin etkisiyle meydana gelen serbest radikaller hücre membranlarına zarar verirler ve değişik hastalıklarla etkilerini gösterirler. Organizmada bu bileşiklerin zararlı etkilerine karşı küçük molekül ağırlıklı radikal tutucuları ve enzimlerden oluşan savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikallerin reaktif yapıları ve çok kısa ömürlü olmaları doğrudan tayinlerini güçleştirmektedir. Bu nedenle serbest radikal reaksiyonlarının ürünleri ve savunma sistemlerinin incelenmesi pek çok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (13,14).

Ceriello ve arkadaşları (15) yaptıkları çalışmada E vitamini uygulamasının diabetiklerde protein glikozillenmesinin azaltabileceğini belirtmiş olmalarına rağmen, Shoff ve arkadaşları (16) ise, aksine diabetiklerde E vitamini alımıyla glikohemoglobin arasında herhangi bir ilişki gözlemediklerini bildirmektedirler. Vatassery ve arkadaşları (17) diabetiklerin plazma total α -tokoferol düzeylerinin sağlıklı kişilerden istatistiki olarak önemli derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ceriello ve arkadaşları (18) tip II diabetiklerin plazmalarında kontrol grubuna göre radikal tutucu antioksidan parametreler ve vitamin A miktarının anlamlı bir azalma gösterdiğini vitamin E'nin ise anlamlı miktarda arttığını belirtmişlerdir.

Caye-Vaugien ve arkadaşları (19) diabetiklerde kontrol grubuna göre, plazma α -tokoferol seviyesinin önemli derecede arttığını fakat trombosit ve eritrositlerde ise önemli bir farklılık olmadığını belirtmektedirler. Cinaz ve arkadaşları (20) diabetik çocukların ortalama plazma E vitamini (870.80±220.51 μ g/dL) ile kontrol grubu (891±221.21 μ g/dL) $p>0.05$ arasında önemli bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir.

Gürbilek ve arkadaşları (4), yaptıkları çalışmada diabetli hastalarda plazma E vitamini düzeylerini 472.6±183 μ g/dl, kontrol grubunda ise 422.7±145 μ g/dl olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda ise diabetiklerin vitamin E düzeylerinin

(867.26±33.57 μ g/dl) kontrol grubuna (765.57±44.70 μ g/dl) göre anlamlı olarak yüksek olduğu tesbit edildi ($P<0.01$). Çoğu araştırmalarda, diabetiklerde E vitamini düzeyinin kontrol grubuna göre düşük olduğu, bazı araştırmalarda ise E vitamini düzeyinde değişme olmadığı belirtilmektedir. Bir kısım araştırmacılar da E vitaminin diabetiklerde kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Bulgularımız ise kontrol grubuna göre diabetiklerde E vitamini düzeylerini daha yüksek bulanlar ile uyuşmakta ve 4, 17,18, 19, 22 nolu literatürlerle uyumluluk göstermektedir.

A vitamini için ise Martinoli ve arkadaşları (21) genç diabetik hastaların plazma retinol seviyesinde anlamlı bir azalma, nefropatili diabetiklerin plazma α -tokoferol seviyesinin ise önemli derecede değiştiğini ileri sürmektedirler. Krempf ve arkadaşları (22) kontrol grubuna göre tip I diabetiklerin kanında A vitamini konsantrasyonunda azalma olmasına rağmen tip II de artma, E vitamininde ise her iki tipte de önemli miktarda artma olduğunu belirlemişlerdir.

Granado ve arkadaşları (23) diabetik hastaların serumlarında provitamin A karotenoidlerin daha yüksek olmasına rağmen serum retinol düzeyinin daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Rautalahti, ve arkadaşları (24), β -karoten, A ve E vitamininin serum konsantrasyonlarının mevsimlere bağlı olarak değişimini inceleyerek, vitamin A, β -karoten düzeylerinin mevsimlerdeki besin kaynaklarına göre çeşitli değerlerde değiştiği halde, vitamin E düzeyinin önemli derecede değişmediği ve ortalama olarak 27.6 μ mol/L'de kaldığı göstermişlerdir. Canfield ve arkadaşları (25), farklı kronik hastalıklarla karotenoidler arasındaki ilişkiyi belirtmiştir. Yüksek dozlardaki karotenoidler, bağışıklık sistemini uyarır. rutin biyokimya tahlilleri normal olan vitamin A'nın da içinde bulunduğu karotenoidlerin biyolojik aktiviteleri oldukça karmaşıktır. Yapılan bu çalışmada yine Tablo 1'de görüleceği üzere diabetiklerin vitamin A düzeyleri (671.42±42.66) iken kontrol grubunda bu değerler (702.72±48.74) arasında bulunmuştur. Bulgularımız 23 ve 24 nolu literatürle uyumluluk sağlamaktadır. A vitaminin diabetiklerde düşük olmasının nedeni diabet ile ilişkili olabileceği gibi A vitamininin antioksidan özelliğinin E vitaminine göre daha az olması ya da A vitamininin mevsimsel beslenmelerdeki değişimine de bağlı olabileceği ileri sürülebilir.

Çalışma kapsamına alınan gruplarda Tablo 2'de görüleceği üzere özellikle kontrol grubu erkeklerde A ve E vitamini sırasıyla (691.34±37.32), (751.56±30.64) iken kadınlarda ise (715.21±36.29), (780.92±29.30) olarak bulundu. Verilerden de görüleceği üzere kontrol grubunda cinsiyete göre anlamlı bir vitamin farklılığı (P>0.05) gözlenmedi. Diabetiklerde ise erkeklerde A vitamini (651.34±22.63) iken kadınlarda (701.36±12.74) olarak belirlendi (P< 0.01). E vitamini ise erkeklerde (852.74±19.05) iken kadınlarda (889.07±11.76) olarak bulundu (P<0.05). Verilerden de görüleceği üzere A ve E vitamini düzeyleri kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğu tesbit edildi.

Menopoz dönemindeki kadınların kan serumu lipit peroksidasyon düzeyleri, östrojen salgılanmasının olmamasına bağlı olarak, menopoz dönemi öncesine kıyasla yüksek bulunmuştur. Bilindiği gibi kadınlarda östrojen hormonu salgılanması erkeklerden yüksektir. Buna bağlı olarak da kadınların kan serumu lipit peroksidasyon düzeyleri erkeklerden azdır. A ve E vitamini ise antioksidan özelliklerinden dolayı kanda lipit peroksidasyonla ters ilişkilidir (26). Bu çalışmamızda Tablo 2'de görüleceği kontrol grubunda cinsiyete göre anlamlı bir farklılığın olmaması lipit peroksidasyonunun daha az olmasına, diabetiklerde ise kadınlara kıyasla erkeklerde kan serumu A ve E vitamin düzeylerini daha düşük olması kadınlarda östrojen hormonunun erkeklerden daha yüksek olmasına bağlanabilir.

Kontrol grubunda A ve E vitamini arasındaki korelasyon Şekil 1'de $r=0.71$ olarak, diabetiklerde ise Şekil 2'de $r=0.29$ olarak belirlendi. Bu verilerden de kontrol grubunda A ve E vitamini arasında daha iyi bir korelasyonun olduğu, diabetiklerde ise bu korelasyonun bozulmuş olabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak, uzun dönem çalışmalar diabet komplikasyonlarının önlenmesinde A ve E vitamininin ve belki de diğer antioksidan sistemlerin yararının saptanmasında yardımcı olabilir.

Çalışmada elde edilen verilerin ışığında diabetiklerde artmış olan E vitamini düzeylerinin bu hastalarda oluşan oksidatif hasarı engellemek amacıyla reaktif olarak yükseldiği ve ancak düşük dozlarda etki gösteren A vitamininin ise diabetiklerde

kontrolde göre azalmasının E vitaminin bu etkisini stimule etmek amacıyla kullanılmasından kaynaklandığı söylenebilir. Ayrıca yapılacak ileri çalışmalar ile diabetiklerde antioksidan vitaminlerin dışarıdan verilerek etkinliğinin araştırılması ve DM komplikasyonlarının kontrolünde etkili olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Yenigün M. Her yönü ile diabetes mellitus. (Editör: Yenigün, M.) İstanbul Haseki Hastanesi Vakfı. 1995: 3-45, 547-735.
2. Dods RF. Diabetes Mellitus. Editör: Bircher S, Kaplan JE. Clinical Chemistry, 2nd ed. The CV Mosby Company. 1989: 29; 436-54.
3. Wolf SP and Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification: The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. Biochem. J 1987; 245: 243-50.
4. Gürbilek M. Aksoy NH., Akkuş, İ, Kalak S, Çağlayan O, Aköz M, Zeren EM. Diabetiklerde eritrosit içi süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidan ile plazma E vitamininin araştırılması. SÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 1994; 10, (3); 311-6.
5. Cheesman KH and Slater TF. Introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 1993; 49, (3): 481-93.
6. Kılınç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. Biyokimya Dergisi. 1985; 10: 60-89.
7. Diplock AT. Antioxidant nutrients and disease prevention: An overview. Am J Chim Nutr 1991; 53: 1895-1935.
8. Join SK, Levine SN. Free radical biol. Med 1995; 18, (2): 337-41.
9. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Lenguen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH. Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin dependent diabetes mellitus. Ann Clin Biochem 1997; 34(Pt6):638-44.
10. Catignani GL. Simultaneous determination of retinol and tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. Clin Chem 1983; 29, 4: 708-12.
11. Miller KW, Lorr NA, Yang CS. Simultaneous determination of plasma retinol α -tocopherol, lycopene, α -carotene, and β -carotene by high performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry 1984; 138: 340-5.
12. Akgül E. Tip II diabetes mellituslu hastalarda oksidan ve antioksidan mekanizmaların incelenmesi. Elazığ: Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı. 1996: 4-13.
13. McCord JM. Mechanism of disease, oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. N Eng J Med 1985; 312: 159-63.
14. Packer, L. Interactions among antioxidants in health and disease: vitamin E and its redox cycle. Proc Soc Exp Biol Med 1992; 200: 271-6.
15. Ceriello A., Giugliano D, Quatraro A, Dello Russo P,

- Torello R. A preliminary note on inhibiting effect of a-tocopherol on protein glycation. *Diabet Metab* 1988; 14:40-52.
16. Shoff SM, Mares Perlman JA, Cadckshanks KJ, Klein R, Klein BEK, Ritter LL. Glycosylated hemoglobin concentrations and vitamin E, vitamin C and b-carotene intake in diabetic and nondiabetic older adults. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 412-6.
17. Vatassery GT, Morley JE, Kuskowski, M.A. Vitamin E in plasma and platelets of human diabetic patients and control subjects. *Am J Clin Nutr* 1983; 37: 641-4.
18. Ceriello A, Bortolotti N, Falleti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Bartoli E. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997; 20(2):194-7.
19. Caye-Vaugien C, Krempf M, Lamarche P, Charbonnel B, Pieri J. Determination of alpha-tocopherol in plasma, platelets and erythrocytes of type I and type II diabetic patients by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Vitamin Nutr Res* 1990; 60 (4): 324-30.
20. Cinaz P, Hasanoglu A, Bideci A, Biberoglu G. Plasma and erythrocyte vitamin E levels in children with insulin dependent diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999; 12 (2): 193-6.
21. Martinoli L, Di Felice M, Seghieri G, Ciuti M, De Giorgio LA, Fazzini A, Gori R, Anichini R, Franconi F. Plasma retinol and alpha-tocopherol concentrations in insulin-dependent diabetes mellitus : their relationship to microvascular complications. *Int J Vitamin Nutr Res* 1993; 63 (2): 87-92.
22. Krempf M, Ranganathan S, Ritz P, Morin M, Charbonnel B. Plasma vitamin A and E in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) adult diabetic patients. *Int J Vitamin, Nutr Res* 1991; 61(1): 38-42.
23. Granado F, Olmeddilla B, Gil-Martinez E, Blanco I, Millan I, Rojas-Hidalgo E. Carotenoids, retinol and tocopherols in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and their immediate relatives. *Clin Sci (Colch)* 1998; 94(2):189-95.
24. Rautalahti M, Albanes D, Haukka J, Roos E, Gref CG, Virtamo J. Seasonal variation of serum concentrations of β -carotene and α -tocopherol. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 551-556.
25. Canfield LM, Forage JW, Valenzuela JG. Carotenoids as cellular antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200: 260-5.
26. Ozawa T. *New Trends in Biological Chemistry*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press. 1991: 211-2.