

DİABETİK RETİNOPATİDE OKSİDATİF VE ANTİOKSİDATİF AKTİVİTE Oxidative and antioxidative activity in diabetic retinopathy

Nevin İLHAN¹, Ahmet VAR¹, İhsan HALİFEOĞLU², Necip İLHAN³

Özet: Bu çalışmada, diabetik retinopatili hastalarda plazma lipit fraksiyonları ile lipit peroksit düzeyleri (LPO) ve antioksidan enzimlerden eritrosit glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri tayin edilmiştir. Total kolesterol, VLDL-kolesterol, trigliserit düzeyleri hasta grubunda, kontrol grubundan daha yüksek; HDL-kolesterol düzeyleri ise kontrol grubundan düşük ve istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur. Plazma LPO düzeyleri diabetik retinopati grubunda yüksek, eritrosit GPx ve SOD aktiviteleri ise aynı grupta daha düşük bulunmuştur. Diabetde, non-enzimatik glikolizasyondaki artış antioksidan enzim aktivitesinde değişiklik oluşturur. Diabetik hastaların eritrositlerinin oksidatif strese hassas olmaları antioksidan kapasitede azalma meydana getirir. Diabetin komplikasyonları sonucu oluşan hasar radikal oluşumunu artırırken oluşan radikaller sonucunda komplikasyonların artışı gerçekleşir. Artmış radikal oluşumu antioksidan enzim harcanması sonucu antioksidan stoklarını tüketerek azalmaya yol açar. Bu sonuçlar serbest radikal hasarının diabetik retinopati oluşumunda çok önemli bir faktör olduğunu ve serbest radikal hasarı ile diabetik retinopati arasında pozitif "feed back" bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon Peroksidaz, Lipid peroksidasyon, Süperoksit dismutaz

Diabetes mellitus, şiddetli insülin disfonksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan karbonhidrat, lipit ve

Abstract: In this study, erythrocyte superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) activities as antioxidant enzymes and plasma lipid fractions as well as levels of lipid peroxides (LPO) were determined in patients with diabetic retinopathy. Although plasma levels of total cholesterol and triglycerides in the patient group were higher and HDL-cholesterol levels lower than those of control group, all of these changes were statistically significant. While plasma LPO levels were significantly higher in diabetic retinopathy group, erythrocyte GPx and SOD activities were significantly lower in the same group. In diabetes mellitus, non-enzymatically increased glycosylation may alter the activities of antioxidant enzymes. Due to decreased antioxidant capacity, the red cells of diabetic patients may become susceptible to oxidative stress. The damage caused by the complications of diabetes mellitus increases the formation of free radicals and the complications. Increased radicals result in the consumption and decrease of antioxidant stocks. Our results suggested that free radical damage is the most important factor in the pathogenesis of diabetic retinopathy and that a positive feed back interaction occurs between free radical damage and diabetic retinopathy.

Key Words: Glutathione Peroxidase, Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase

protein metabolizma bozukluğu ile karakterize bir hastalıktır. Retinopati, nefropati ve nöropati diabetes mellitusun başlıca komplikasyonları arasında sayılabilir(1,2).

Diabetin bu komplikasyonları, insülin homeostazisi ve enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin bir sonucu olarak

*XV. Gevher Nesibe Tıp Günleri, 27-30 Mayıs 1997, Kayseri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi ELAZIĞ
Biyokimya. Araş.Gör.Dr., Y.Doç.Dr., Doç.Dr.

Geliş tarihi: 28 Mayıs 1997

meydana gelmektedir. Oksidatif aktivitenin artması sonucu serbest radikal oluşumu diabetik komplikasyonların gelişimine zemin hazırlamaktadır. Aynı zamanda bu metabolik stres ve stres sonucu oluşan komplikasyonlar serbest radikal oluşumunu daha da artırmaktadır. Özellikle iyi kontrol edilmeyen diabette bu olay çok daha belirgindir (3-5). Diabetik komplikasyonların oluşumu iki mekanizma ile açıklanmaktadır:

İlk mekanizmada, özellikle iyi kontrol edilemeyen diabette proteinlerin nonenzimatik glikozillenmesinin arttığı ve bu glikozillenen proteinlerin oksidasyonu sonucu serbest radikallerin olduğu savunulmaktadır. Plazma membran proteinleri ve insülininden bağımsız glukoz alan dokuların (lens, seminal vezikül, sinir dokusu, aorta, pankreas, eritrositler, böbrekler ve kapiller damarlar) hücrelerindeki proteinler, uzun süre yüksek konsantrasyonda glukoz ile karşı karşıya kalırsa, glukoz hızla proteinlerin amino gruplarına nonenzimatik bir yolla bağlanır. Bunun tipik örneği glikozillenmiş hemoglobindir (6).

Glikozillenmiş proteinler, otooksidasyona uğrayabilir ve bu sırada serbest radikaller üretilebilir. Glukoza maruz kalan proteinin yapısal bozukluğunun önemli bir nedeni, otooksidasyon sonucu yavaşça oluşan serbest radikallerdir. Proteinlerin çapraz bağlanması ve degradasyonu sonucu diabette moleküler düzeyde hasarlar oluşur. Proteinleri nonenzimatik glikozillenme ile modifiye olan dokular, nöropati, nefropati, retinopati gibi diabetes mellitusun kronik komplikasyonlarının görüldüğü dokulardır (7-9).

İkinci mekanizmada, diabetes mellitusta artan kan glukozuna paralel olarak insülininden bağımsız glukoz alan dokuların hücrelerinde glukoz konsantrasyonunun yükseldiği ve bu dokulardaki artmış glukozun fosforile olmadan enzimatik olarak sorbitol üzerinden fruktoza fazla miktarda dönüştüğü ve bunları metabolize etmeye yetecek kadar ilgili enzim olmadığından hücre içinde sorbitol ve fruktozun biriktiği iddia edilmektedir. Hücre içinde sorbitol ve fruktozun aşırı miktarda

birikmesi ile meydana gelen osmotik değişimler bu doku ve organların yapısına bağlı olarak patolojik hallerin sebebi sayılmaktadır (10).

Diabette serbest radikal oluşumunun arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülmüştür. Bu gelişmeler diabet komplikasyonlarının patogenezinde serbest radikallere olan ilgiyi arttırmıştır (11).

Anjiyopatik lezyonlar, diabetiklerde, diabetik olmayanlara göre daha erken yaşlarda başlamakta, daha sık görülmekte ve hızla ilerlemektedir. Yapılan çalışmalarda anjiyopati patogenezinde toksik oksijen metabolitlerinin etkin rolü olduğu bildirilmiştir. Bunlar membran enzim ve reseptörlerine bağlanarak transport fonksiyonunu bozmakta, membranın poliansatüre yağ asidi / protein oranını değiştirerek poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonuna yol açmaktadırlar (6). Erişkin insanda reaktif oksijen metabolitlerini ve lipid kökenli ara ürünleri detoksifiye eden koruyucu antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemlerin en önemlileri süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx)' dir (12-14).

Bu çalışmada diabetik retinopatili hastalarda plazma lipid fraksiyonları ile lipid peroksit düzeyleri (LPO) ve antioksidan enzimler olan eritrosit GPx ve SOD enzim aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir.

HASTALAR VE YÖNTEM

Bu çalışma, Haziran-Eylül 1996 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Diabet Polikliniği'ne başvurup diabetik retinopati tanısı konmuş 23 Tip II diabetli ve 40 sağlıklı kişi üzerinde yapıldı. Hastalara retinopati tanısı fundus muayenesiyle konuldu. Kontrol grubunu oluşturan kişilerin 20'si erkek ve 20'si kadındı ve yaşları 30-65 (50.15±10.6) arasındaydı. Bu grubu oluşturanlar; sigara, alkol ve çalışılan parametreleri etkileyecek ilaç kullanmayan ve rutin biyokimya tetkikleri normal olan sağlıklı kişilerdi.

Retinopatili diabetik grup, 10 erkek ve 13 kadından oluşmuş olup, bu gruptaki kişilerin yaşları 46-70 (55.52 ± 9.6) ve hastalık süreleri 7-20 (12.21 ± 6.7) yıl arasında değişmekteydi.

Çalışmada hasta ve kontrol grubuna alınan kişilerden 10-14 saat açlıktan sonra 10 ml kan alınarak heparinli tüplere konuldu ve tam kan ile plazma olarak kullanıldı.

Plazmada lipit peroksit (malondialdehit) tayini Satoh (15) ve Yağı'den (16) modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak çalışıldı.

Eritrosit SOD enzim aktivitesi, Randox firmasının enzimatik metodla çalışan RANSOD adlı ticari kiti (katalog no:SD-125) kullanılarak ölçüldü.

Eritrosit GPx aktiviteleri, Randox firmasının enzimatik-UV metodla çalışan RANSEL adlı ticari kiti (katalog no:RS-504) ile Technicon RA-XT otoanalizöründe çalışıldı.

Plazma lipit fraksiyonlarının düzeyleri uygun yöntemler kullanılarak Technicon RA-XT otoanalizöründe ölçüldü (17).

Bu çalışmadaki bütün istatistiksel analizler SPSS istatistik programı ile yapıldı. Ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlılık

değerlendirmesinde Student's -t testi kullanıldı.

BULGULAR

Tablo I 'de kontrol ve retinopatili diabetiklerdeki plazma kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol düzeyleri görülmektedir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, retinopatili diabet grubunda kolesterol düzeylerinin anlamlı olarak ($p < 0.01$) arttığı saptanmıştır. Diabetik retinopatili grupta kontrol grubuna göre trigliserit ve VLDL-kolesterol düzeylerinde artma, HDL kolesterol düzeyinde ise düşme saptandı ve bu değişiklikler istatistiksel yönden anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Tablo II'de kontrol ve retinopatili diabetiklerdeki ortalama plazma LPO düzeyleri görülmektedir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında retinopatili diabetik grupta plazma LPO düzeylerinin anlamlı olarak arttığı saptandı ($p < 0.001$).

Tablo III'de kontrol ile retinopatili diabetik grup arasındaki ortalama eritrosit GPx ve SOD aktiviteleri görülmektedir. Hasta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında eritrosit GPx ve SOD düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p < 0.05, p < 0.001$).

Tablo I. Kontrol grubu ve retinopatili diabetiklerde plazma kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol düzeyleri

	Kontrol n: 40 X± SS	Retinopatili Diabetik n: 23 X± SS	t	p
Kolesterol(mg/dl)	197.45± 39.70	231.09± 45.40	4.75	<0.01
Trigliserid(mg/dl)	146.60± 66.70	185.72± 86.50	3.28	<0.05
HDL- Kolesterol(mg/dl)	40.72± 3.70	39.66± 2.30	3.15	<0.05
VLDL- Kolesterol(mg/dl)	29.30± 13.20	34.5± 16.8	1.85	<0.05

Tablo II. Kontrol grubu ve retinopatili diabetiklerde plazma LPO düzeyleri

	Kontrol n: 40 X ±SS	Retinopatili Diabetik n: 23 X±SS	t	p
LPO(nmolMDA/ml)	21±0.50	34.5±16.8	6.59	<0.001

Tablo III. Kontrol grubu ve retinopatili diabetiklerde eritrosit GPx ve SOD aktiviteleri

	Kontrol n: 40 X ± SS	Retinopatili Diabetik n: 23 X± SS	t	p
GPx(U/gHb)	39.75 ± 11.30	31.4± 10.00	7.76	<0.001
SOD(U/gHb)	1085.33± 191.50	866.62±134.50	19.16	<0.001

TARTIŞMA

Biyolojik sistemlerde hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de yabancı maddelerin etkisiyle meydana gelen serbest radikaller, hücre membranlarına zarar verir 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 tayınerini güçleştirmektedir. Bu nedenle serbest radikal reaksiyonlarının ürünleri ve savunma sistemlerinin incelenmesi pek çok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (18).Diabetin komplikasyonları metabolik stresin bir sonucu olarak gelişmekte, metabolik stres de, oksidatif stresin artmasına yol açmaktadır. Bu durum diabet komplikasyonlarının gelişimini kolaylaştıran

yapısal ve fonksiyonel hasarı oluşturmaktadır (5).

Serbest radikallerin en önemli etkisinin poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu olduğu kabul edilmektedir. Bu şekilde oluşan lipid peroksiditleri kolaylıkla yıkılarak, en önemlisi malondialdehit (MDA) olan reaktif karbon bileşiklerini meydana getirirler.

Plazma lipid peroksiditlerinin artması sağlam doku ve organlar üzerinde bozucu etkilere sebep olur. Diabetik hastalarda olan birçok mikro ve makrovasküler komplikasyondan lipid peroksidasyonunun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Lipid peroksidasyon artışı diabetik hastalarda uzun süreli komplikasyonların bir hazırlayıcı faktörü olabilmektedir. Diabetiklerde plazma lipid peroksiditlerinin artması bu bireylerde gözlenen retinopatinin nedenidir (19).

Uzel ve arkadaşları(20), retinopatisi olan diabetik bireylerde retinopatisi olmayan diabetiklere göre lipit peroksit düzeylerinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Gallou ve arkadaşları(21), Tip II diabeti ve mikroanjyopatisi olan hastalarda tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) miktarında önemli derecede artış rapor etmişlerdir. Bu artışın serbest radikal aşırı üretimi ve hücre içi antioksidan sistemin bozulmasından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Yapılan bir çalışmada, anjyopatisi olan hastalarda TBARS aktivitesinde artma, komplikasyonları olmayanlarda ise normal plazma TBARS düzeyleri bildirilmiştir (3). Oberley (22) de Tip II diabeti ve anjyopatisi olan hastaların plazmalarında, kontrol grubuna göre daha fazla TBARS olduğunu, fakat anjyopatisi olmayan hastalarda bu artışın olmadığını bulmuştur.

Bu çalışmada kontrol ve retinopatili diabetik grupların ortalama plazma MDA düzeylerini sırasıyla 2.10 ± 0.5 nmolMDA/ml, 3.20 ± 0.9 nmolMDA/ml bulundu ($p < 0.001$). Bu bulgular diğer araştırmacıların bulguları ile uyum göstermektedir.

Tho ve arkadaşları (23) , Uzel ve arkadaşları (20) diabet tanısı konmuş hastalarda eritrosit GPx aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır.

Walter ve arkadaşları (24), Strange ve arkadaşları (25), Kaji ve arkadaşları (26), Fujiwara ve arkadaşları (27) eritrosit GPx aktivitesinde diabet ile normal kişiler arasında bir fark olmadığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda kontrol ile retinopatili diabetik grupların ortalama eritrosit Gpx aktivitelerini sırasıyla 39.75 ± 11.2 U/gHb, 31.04 ± 10.0 U/gHb olarak bulduk. Elde ettiğimiz bu bulgu; Tho ve arkadaşları (23) ile Alataş ve arkadaşlarının (28) sonuçlarıyla da uyumludur. Eritrosit GPx aktivitesindeki bu azalmanın nedeni belki de enzimin nonenzimatik glikozilasyonu nedeniyle

olmaktadır.

Diabetik hastalarda artmış oksidatif stres sonucu serbest radikal üretiminin artması eritrosit SOD ölçümüne olan ilgiyi artırmıştır. Biz çalışmamızda kontrol ile retinopatili diabetik grupların ortalama eritrosit SOD aktivitelerini sırasıyla 1085.33 ± 191.5 U/gHb, 866.62 ± 134.5 U/gHb olarak bulduk ($p < 0.001$). Bu sonuç, Selvam ve arkadaşları(29), Tho ve arkadaşları(23), Fujiwara ve arkadaşları(27) Sakurai ve arkadaşları (30) Alataş ve arkadaşlarının(28) bulgularını desteklemektedir.

Diabetiklerde görülen SOD aktivitesindeki azalma, SOD'un nonenzimatik glikozilasyonundan dolayı olabilir(31). Nonenzimatik glikozilasyon düzeyinin daha yüksek olmasının nedeni eritrositlerin glukoz transportunu insülden bağımsız olarak gerçekleştirmeleri ve glukozun kolaylıkla sitoplazmaya taşınmasıdır (1,32).

Diabetiklerde lipit profili değişikliğinin lipit peroksidasyonu üzerine etkisi olup olmadığı araştırılmış ve değişik fikirler ileri sürülmüştür. Blackman ve arkadaşları (33) plazma LPO düzeyleri ve plazma lipitleri arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır. Biz de bu çalışmada Blackman gibi, plazma LPO düzeyleri ile kolesterol, trigliserit, HDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol arasında herhangi bir ilişki saptayamadık. Altomare ve arkadaşları(34), MDA/kolesterol ve MDA/trigliserit ilişkileri üzerinde çalışmış ve diabeti kontrol altına alınmamış bireylerde bu oranlar daha yüksek bulmuşlardır. Diabetes mellitusta lipit peroksidasyonu, lipit fraksiyonlarının herhangi birisinin artışından bağımsız bir mekanizma olduğu şeklinde yorumlanmıştır(34). "TBA reaktif materyal"ın normal kişiler ve diabetiklerde LDL fraksiyonunda yoğunlaştığı bildirilmiştir(35).

Sonuç olarak; diabetin vasküler komplikasyonlarının patogenezinde, oksidatif strese bağlı lipit peroksidasyonu artışı ve antioksidan savunma sistemlerindeki yetersizliğin önemli etkenler olabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Alp H, Molvalılar S. *Endokrin Hastalıklar. Bayda Basın-Yayın-Dağıtım, İstanbul 1987, ss 207-290.*
2. Yenigün M. Her Yönü ile Diabetes Mellitus. Haseki Hastanesi Vakfı, İstanbul 1995, ss 3-45, 547-737.
3. Wolf SP. Diabetes mellitus and free radicals. In: Chessman KH, Slater TF(eds), *Free Radicals in Medicine. Medical Bulletin London 1993, pp 643-649.*
4. Dormandy TL. In praise of peroxidation. *Lancet 1988;34:1126-1128.*
5. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci 1990;15:129-135.*
6. Hatemi H, Omer A. Proteinlerin glikozillenmesi ve diabetes mellitus'taki önemi. *Pusula 1996;2:1-32.*
7. Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson MJ. Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. *Biochem J 1993;291:529-535.*
8. Şahin YN, Çavuşoğlu Z, Gökhan İH. Sorbitol metabolik yolu ve klinik önemi. *Doğa TU Sağlık Bilimleri 1989;13:529-535.*
9. Ha H, Kim KK. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int 1995;48:18-21.*
10. Dingiloğlu N, Özmen D, Bayındır O, Kutay F, Yılmaz C. Diabetiklerde eritrosit ve plazma lipit peroksidleri, eritrosit GSH ve glukoz-6- fosfat dehidrogenaz düzeyleri. *Biyokimya Dergisi 1993;18:13-18.*
11. Esterbauer H. Lipid peroxidation product: formation, chemical properties and biological activities. In: Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF(eds), *Free Radicals in Liver Injury. Irl Press, Oxford 1985, pp 29-47.*
12. McCay PB, Gibson DD, Fong K, Roger K. Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta 1976;431:459-468.*
13. McCord JM. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery 1983 ; 94:3:412-414.*
14. Fujii S. The role of glutathione peroxidase in the anti-oxidant system of erythrocytes. *Br J Haematol 1988;68:263-271.*
15. Porter A. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology 1984;105:273-282.*
16. Yagi K. Assay of blood plasma or serum. *Methods in Enzymology 1984;105:328-331.*
17. Bauer JD, Ackermann PG, Gelson T. *Clinical Laboratory Methods (8th ed). Mosby, Saint Louis 1974, pp 449.*
18. Mussalo RH, Poikolainen K, Karhkainen P. Decreased serum selenium and magnesium levels in drunkenness arrests. *Drug and Alcohol Dependence 1987;20:95-103.*
19. Türkalp I, Kaptanağası A. Plazma lipid peroxide levels in the type II diabetics: Relationship with long term diabetic complications. *Marmara Medical Journal 1994; 7:143-149.*
20. Uzel N, Sivas A, Uysal M, Öz H. Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm Metab Res 1987; 19: 89-90.*
21. Gallou G, Ruelland A, Legras B, et al. Plasma malondialdehyde in type I and type II diabetic patients. *Clin Chim Acta 1993; 214: 227-234*
22. Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine 1988; 5:113-124.*
23. Tho LL, Candlish JK, Thai AC. Correlates of diabetes markers with erythrocytic enzymes decomposing reactive oxygen species. *Ann Clin Biochem 1988; 426-431.*
24. Walter RM, Hare JU, Olin KL, Oster HM, Keen CL. Copper, zinc, manganese and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care 1991; 14:1050-1056.*
25. Strange RC, Jones P, Bieknell J, Scarpello J. Expression of Cu-Zn superokside dismutase and glutathione peroxidase in erythrocyte from diabetic and non diabetic subject. *Clin Chim Acta 1992; 207:261-263.*

26. Kaji H, Kurasaki M, Ito K, et al. Increased lipoperoxide value and glutathione peroxidase activity in blood plasma of type II diabetic women. *Klin Wochenschr* 1985; 63:765-768.
27. Fujiwara Y, Kondo T, Kawakami Y. Decrease of the inhibition of lipid peroxidation by glutathione-dependent system in erythrocytes of non-insulin dependent diabetics. *Klin Wochenschr* 1989; 67:336-341.
28. Alataş Ö, Inal M. Erythrocyte superoxide dismutase activity and reduced glutathione level in patients with diabetes mellitus. *Turkish Journal of Medical Sciences* 1994; 21:9-11.
29. Selvam R, Anuradha CV. Lipid peroxidation antiperoxidative enzyme changes in erythrocytes in diabetes mellitus. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 1988; 25:268-272.
30. Sakurai T, Tsuchiya S. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *Clin Chim Acta* 1988; 236:2:406-410.
31. Kennedy L, Baynes JW. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes. An overview. *Diabetologica* 1984; 26:93-98.
32. Kondo T, Murakami K, Ohtsuka Y. Estimation and characterisation of glycosylated carbonic anhydrase I in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1987; 166:227-236.
33. Blackman BC, White P, Tsou W. Peroxidation of plasma and platelet lipids in chronic cigarette smokers and insulin dependent diabetics. *Ann NY Acad Scien* 1989; 435:385-386.
34. Altomare E, Vandemiale G, Chicco D. Increased lipid peroxidation in type II poorly controlled diabetic patients. *Diabet and Metabolism* 1992; 18:264-271.
35. Nishihigaki I, Hotta N, Sabamoto N. Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fraction of diabetic patients. *Biochem Med* 1978; 25:373-378.