

میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز و مقدار کربونیل و مالون دی آلدئید در اریتروسیت موش‌های صحرایی دیابتی

دردی قوجق* PhD

گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

حمیده دیلم کتولی MD

گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

معصومه حبیبی نوده MD

گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

چکیده

اهداف: دیابت یکی از مشکلات سلامتی در جهان و درمان این بیماری در علوم پزشکی بسیار مهم است. هدف این پژوهش تعیین مقدار کربونیل، مالون دی آلدئید و میزان فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در اریتروسیت موش‌های صحرایی دیابتی بود.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش صحرایی در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم به ۲ گروه کنترل و دیابتی تقسیم شد. موش‌های صحرایی گروه دیابتی با تزریق آلوکسان به صورت داخل صفاقی دیابتی شدند. مقدار کربونیل، مالون دی آلدئید و میزان فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز با کمک کیت‌های اختصاصی اندازه‌گیری شد. میانگین و انحراف معیار داده‌ها با کمک نرم‌افزار آماري SPSS 18 محاسبه و با استفاده از آزمون T استودنت اختلاف بین گروه کنترل و دیابتی مشخص شد.

یافته‌ها: میانگین مقدار مالون دی آلدئید در اریتروسیت در گروه موش دیابتی $2/27 \pm 0/22$ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین) نسبت به گروه کنترل $1/16 \pm 0/15$ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین) افزایش یافت ($p < 0/05$). میانگین مقدار کربونیل در اریتروسیت گروه دیابتی $2/98 \pm 0/35$ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین) نسبت به گروه کنترل $1/12 \pm 0/16$ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین) افزایش یافت ($p < 0/05$). میانگین فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز نیز در اریتروسیت گروه دیابتی $5/73 \pm 0/45$ میکرومول NADPH در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) نسبت به گروه کنترل $2/98 \pm 0/33$ میکرومول NADPH در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) افزایش یافت ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: میانگین مقدار کربونیل، مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در موش‌های صحرایی دیابتی نسبت به موش‌های غیردیابتی افزایش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: مالون دی آلدئید، کربونیل، گلوکاتایون پراکسیداز، دیابت، آنتی‌اکسیدان، رادیکال‌های آزاد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۵/۲۸

* نویسنده مسئول: d.qujeq@mubabol.ac.ir

مقدمه

میزان اندکی از انواع اکسیژن فعال همانند رادیکال‌های هیدروکسیل، آنیون‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن به طور دائم توسط آرگانسیم‌های هوازی بدن تولید می‌شوند. اگرچه تولید میزان کمی از انواع اکسیژن‌های فعال در فرآیندهای سلولی لازم است، اما تجمع انواع اکسیژن فعال ممکن است به ماکرومولکول‌های زیستی آسیب برساند [۱]. متابولیسم اکسیژن در آرگانسیم‌های هوازی آثار مفیدی دارد، اما به موازات آن عوارض جانبی ایجاد می‌شود [۲]. رادیکال‌های آزاد تولیدشده در پراکسیداسیون لیپیدها عامل اصلی شروع تغییر میزان اسیدچرب هستند [۳]. آرگانسیم‌های هوازی دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی هستند که انواع اکسیژن فعال تولیدشده را حذف می‌کند [۴].

وجود مقدار کمی آنتی‌اکسیدان در فرآیندهای بیوشیمیایی در مقابل میکروآرگانسیم‌ها ضروری است [۴]. اثر دوزهای مختلف اسپرین بر پراکسیداسیون چربی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اریتروسیت‌ها و کبد مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که اسپرین اثر کمی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پر اکسیداسیون چربی دارد. [۵]. تصور بر آنست که پراکسیداسیون لیپید در پاتوفیزیولوژی تعداد زیادی از بیماری‌ها دخیل باشد [۶]. هایپرتری‌گلیسریدمی با افزایش غلظت لیپوپروتئین‌های شیلومیکرون، VLDL و IDL همراه است [۷]. IDL ریسک فاکتور شناخته‌شده‌ای در آترواسکلروزیس است [۷]. اما نقش شیلومیکرون‌ها و VLDL در آترواسکلروزیس برای سال‌های زیادی مبهم مانده است [۷]. زمانی که MDA-LDL به‌عنوان شاخص اکسیداسیون LDL ارزیابی شد، این نسبت در مبتلایان به دیابت و هایپرتری‌گلیسریدمی نسبت به افراد سالم بیشتر بود [۷، ۸]. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از افراد سالم که مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی دریافت می‌کنند، افزایش می‌یابد [۹]. یکی از این آنتی‌اکسیدان‌ها ویتامین C است [۹]. در بیماران دیابتی وابسته به انسولین، خطر پیشرفت آترواسکلروزیس به‌طور وسیعی افزایش پیدا می‌کند [۱۰]. تغییرات در سیستم فیبرینولیتیک در هر دو نوع دیابت ملیتوس مشاهده شده است [۱۱]. در بیماری‌های کلیوی، آنتی‌اکسیدان‌ها پاسخ به آسیب کلیوی را تعدیل می‌کنند [۱۲]. برای کنترل جریان رادیکال‌ها، سلول‌های هوازی، سیستم آنتی‌اکسیدان را که شامل اجزای آنزیماتیک و غیرآنزیماتیک است، گسترش می‌دهند [۱۳]. سرولوپلاسمین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند [۱۳]. مطالعات نشان می‌دهند که سطح سرمی و کبدی فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی در بیماران مبتلا به هپاتیت C مزمن کاهش می‌یابد، رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیژن نقش اساسی در آسیب کبدی بازی می‌کنند [۱۴] و افزایش فیروز با کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها همراه است [۱۴].

میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز و مقدار کربونیل و مالون دی آلدئید در اریتروسیت موش‌های صحرائی دیابتی ۱۸۱ نمونه‌ها و نمونه‌های استاندارد اندازه‌گیری شد، به طوری که مقدار ۱۰ میکرولیتر از سرم یا استاندارد به ۱ میلی‌لیتر محلول کار اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه قرار داده شد و در طول موج ۵۲۰ نانومتر جذب هر یک از نمونه‌ها قرائت شد. براساس جذب نمونه‌های آزمایش و جذب استاندارد و ضریب ۱۰۰، غلظت گلوکز نمونه‌ها محاسبه شد.

جداسازی اریتروسیت‌ها: به هر لوله آزمایش با نوک اسپاتول مقدار ۰/۲ میلی‌گرم EDTA (Sigma؛ آلمان) و سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر از خون تهیه‌شده از دم یا قلب موش صحرائی اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰ rpm سانتریفیوژ (۲۰۰۰، Clement؛ استرالیا) و گلیول‌ها ۳ بار توسط محلول ایزوتونیک ۰/۹ NaCl٪ شسته شدند. پس از شست‌وشوی نهایی، سلول‌های قرمز خون توسط شوک هیپوتونیک، با آب مقطر سرد لیز [۲۰، ۲۱] و برای انجام آزمایش‌های بعدی ذخیره‌سازی و نگهداری شدند.

محاسبه فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز: ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات (Sigma؛ ایالات متحده) با pH ۷ و ۰/۱ میلی‌لیتر از همولیزات، ۰/۱ میلی‌لیتر از گلوکاتایون ردوکتاز (۰/۲۴ واحد) (Merck؛ آلمان) و ۰/۱ میلی‌لیتر از گلوکاتایون احیاشده (Merck؛ آلمان) با غلظت ۱۰ میلی‌مول به همولیزات اضافه شد. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷°C انکوبه (گالن کامپ؛ انگلستان) و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (Merck؛ آلمان) (NADPH) ۱/۵ میلی‌مول اضافه و اکسیداسیون NADPH در مدت ۳ دقیقه کنترل شد. واکنش با افزودن ۱/۵ میلی‌مول آب اکسیژنه (Sigma؛ ایالات متحده) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر شروع و کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر برای مدت ۵ دقیقه با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل CE1020 (سیسیل؛ انگلستان) کنترل شد. فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز بر حسب میکرومول NADPH در دقیقه در میلی‌لیتر همولیزات محاسبه شد [۱، ۶، ۱۳].

اندازه‌گیری مقدار کربونیل: ۰/۵ میلی‌لیتر از همولیزات در یک لوله آزمایش تهیه و سپس ۲ میلی‌لیتر ۲-۴ دی‌نیترو فنیل هیدرازین (Merck؛ آلمان) ۱۰ میلی‌مول به ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲/۵ مولار اضافه شد. در یک لوله آزمایش دیگر فقط ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲/۵ مولار به ۰/۵ میلی‌لیتر همولیزات اضافه شد. هر ۲ لوله آزمایش در محیط تاریک و درجه حرارت اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه به هم زده شد. سپس مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر از تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ اضافه شد و لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه در یخ قرار داده شد و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰ rpm سانتریفیوژ و پروتئین‌ها جداسازی و با ۲ میلی‌لیتر از محلول ۱۰٪ تری کلرواستیک اسید شسته شد؛ سپس با ۲ میلی‌لیتر اتانول (Sigma؛ ایالات متحده) - اتیل استات (Merck؛ آلمان) (۱:۱) ۳ بار شسته شد. ماده حاصل در ۱ میلی‌لیتر از

فاکتورهای دخیل در افزایش استرس اکسایشی در بیماران دیابتی شامل کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها (کاهش آسکوربات، گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز)، گلیکاسیون پروتئین و افزایش تولید انواع اکسیژن فعال (سوپراکسید و پراکسید هیدروژن) است [۱۵]. در افراد سالم، مقدار مالون دی‌آلدئید به میزان کم و مقدار گلوکاتایون و گلوکاتایون پراکسیداز به میزان زیاد، بیشتر از افراد دیابتی است [۱۶]. ۶ هفته پس از ابتلا به دیابت افزایش قابل توجهی در پراکسیداسیون لیپید و اکسیداسیون پروتئین رخ می‌دهد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددسموتاز افزایش و فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز کاهش می‌یابد [۱۷]. مطالعات نشان می‌دهد که مقدار مالون دی‌آلدئید و کربونیل در بیضه موش دیابتی شده با تزریق استرپتوزوتوسین تغییری نمی‌کند [۱۸].

با توجه مطالعات قبلی، انجام این پژوهش برای شناخت تغییرات بیوشیمیایی در سیستم دفاع مولکولی بدن در رابطه با بیماری دیابت ضروری است. هدف این پژوهش تعیین مقدار کربونیل، مالون دی‌آلدئید و میزان فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در اریتروسیت موش‌های صحرائی دیابتی بود.

روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش صحرائی در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم از محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بابل تهیه و به ۲ گروه کنترل و دیابتی تقسیم شد. حیوانات در قفسه‌های پلاستیکی جداگانه و در شرایط استاندارد یکسان از نظر نور، آب و غذای فشرده، نگهداری شدند و شرایط کار و اصول اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی رعایت شد. در تمام مراحل انجام آزمایش، موش‌ها ابتدا توسط اتر بیهوش شدند.

موش‌های صحرائی گروه دیابتی با تزریق آلوکسان (Merck؛ آلمان) با دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی دیابتی شدند. دیابتی شدن موش‌های صحرائی با اندازه‌گیری گلوکز سرم به روش آنزیمی تایید شد [۲۲]. زمان دیابتی شدن موش‌های صحرائی ۴ هفته پس از تزریق بود. در انتهای هر ماه برای تهیه نمونه خون، ابتدا موش‌های صحرائی کنترل و دیابتی توسط اتر (Sigma؛ ایالات متحده) بیهوش شدند، سپس از طریق بریدن دم و در نهایت در انتهای آزمایش از طریق بیهوشی و کشتن آنها و خونگیری از قلب نمونه خون تهیه شد. مقدار گلوکز خون اندازه‌گیری (Merck؛ آلمان) و در صورت افزایش گلوکز سرم به بیش از ۱۳۹/۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر، حیوان دیابتی در نظر گرفته شد. گلوکز سرم در حضور آنزیم گلوکز اکسیداز و آب و اکسیژن به گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه تبدیل می‌شود. سپس آب اکسیژنه تولیدشده در حضور بافر ترکیب ۴- آمینوآنتی‌پیرین و آنزیم پراکسیداز، به کینون و آب تبدیل می‌شود. شدت جذب کینون با مقدار گلوکز سرم متناسب است و در طول موج ۵۲۰ نانومتر جذب

جمله روش‌های اندازه‌گیری، میزان دوز مصرفی آلوکسان، روش دیابتی کردن و زمان دیابتی کردن موش‌ها باشد. زمان دیابتی شدن موش آزمایشگاهی و شرایط اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید پژوهش حاضر با پژوهش بور و همکاران اختلاف دارد؛ علت این تفاوت، به‌کارگیری روش‌های مختلف و زمان دیابتی شدن موش آزمایشگاهی است. در پژوهش حاضر، زمان دیابتی شدن موش ۴ هفته پس از تزریق آلوکسان بود که با گزارش سایر محققان ۲ هفته اختلاف دارد. این اختلاف ممکن است به شرایط فیزیولوژیک تغذیه‌ای و محیطی موش‌های صحرایی مرتبط باشد.

فعالیت آنزیم گلوکوتائون پراکسیداز در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد که با یافته‌های سایر محققان منطبق است [۵]. یکی از دلایل افزایش فعالیت این آنزیم در گروه دیابتی می‌تواند فعال شدن سیستم ایمنی و دفاعی بدن و آزاد کردن آن‌تی‌اکسیدان در برابر تولید بالای رادیکال‌های آزاد پس از دیابتی شدن باشد. براساس نتایج سایر پژوهش‌ها که از طریق تزریق استرپتوزوتوسین به مقدار ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی انجام شد، ۱۰ هفته دیگر پس از تزریق استرپتوزوتوسین، مقدار مالون‌دی‌آلدئید و کربونیل در گروه دیابتی و غیردیابتی تغییری نمی‌کند [۱۸، ۱۹]. مقایسه یافته‌های پژوهش حاضر با پژوهش انجام‌یافته قبلی و اختلاف نتایج حاصل از این کار با وجود تشابه مقدار تزریق آلوکسان و دیابتی کردن موش آزمایشگاهی ممکن است به دلیل تفاوت سنجش این ترکیبات در بافت‌های مختلف باشد، چون توزیع بافتی آنزیم مورد نظر و تغییرات آن در بافت‌های مختلف و همچنین متابولیسم این ترکیبات متفاوت است. در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم در خون و اریتروسیت‌ها سنجیده شد، در صورتی که در مطالعه کروک و همکاران، بافت بیضه اندازه‌گیری شده است.

مقدار گلوکز سرم در موش صحرایی دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که با گزارش سایر محققان منطبق است [۱۰].

نتیجه‌گیری

میانگین مقدار کربونیل به‌عنوان شاخص اکسیداسیون پروتئین‌ها و میانگین میزان مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص اکسیداسیون چربی‌ها و فعالیت آنزیم گلوکوتائون پراکسیداز به‌عنوان شاخص فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی در موش‌های صحرایی دیابتی نسبت به موش‌های غیردیابتی افزایش می‌یابد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از همکاری کارکنان محترم آزمایشگاهی بخش بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بابل تشکر و قدردانی می‌شود.

محلول گوانیدین‌هیدروکلراید (۶مولار) (Merck؛ آلمان) حل و به‌مدت ۱۰ دقیقه در 37°C همراه با به‌هم‌زدن انکوبه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در 1400rpm سانتریفیوژ شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول بالایی جدا و مقدار کربونیل در طول موج ۳۹۰-۳۵۵ نانومتر قرائت شد. مقدار کربونیل بر حسب نانومول در میلی‌لیتر همولیزات محاسبه شد [۱].

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید: ۰/۲۵ میلی‌لیتر از همولیزات تهیه‌شده به ۰/۵ میلی‌لیتر از تری‌کلرواستیک‌اسید (Sigma؛ ایالات متحده) سرد ۱۰٪ اضافه شد؛ پس از رسوب پروتئین‌ها، از محلول بالایی ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته و به ۰/۷۵ میلی‌لیتر تیوباریتوریک‌اسید (Merck؛ آلمان) ۰/۶۷٪ اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از سرد نمودن، جذب نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد [۱، ۷، ۱۳].

میانگین و انحراف معیار داده‌ها با کمک نرم‌افزار آماری SPSS 18 محاسبه و با استفاده از آزمون T استودنت اختلاف بین گروه کنترل و دیابتی مشخص شد.

نتایج

میانگین مقدار مالون‌دی‌آلدئید در اریتروسیت در گروه موش دیابتی ($2/27 \pm 0/22$ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین) نسبت به گروه کنترل ($1/16 \pm 0/15$ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین) افزایش یافت ($p < 0/05$). میانگین مقدار کربونیل در اریتروسیت گروه دیابتی ($2/98 \pm 0/35$ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین) نسبت به گروه کنترل ($1/12 \pm 0/16$ میلی‌مول در میلی‌گرم پروتئین) افزایش یافت ($p < 0/05$). میانگین فعالیت آنزیم گلوکوتائون پراکسیداز نیز در اریتروسیت گروه دیابتی ($5/73 \pm 0/45$ میکرومول NADPH در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) نسبت به گروه کنترل ($2/98 \pm 0/33$ میکرومول NADPH در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) افزایش یافت ($p < 0/05$).

بحث

مقدار کربونیل در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافت. افزایش میزان کربونیل شاخص افزایش رادیکال‌های آزاد و نشانه اثر آن بر پروتئین‌های بدن است. این یافته با نتایج گزارش سایر محققان همسو است [۵].

مقدار مالون‌دی‌آلدئید در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت. افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید شاخص افزایش رادیکال‌های آزاد و نشانه اثر آن بر چربی‌های بدن موش صحرایی است. این نتیجه با گزارش سایر محققان همسو است [۱۱، ۱۶]. تفاوت مقادیر مالون‌دی‌آلدئید در پژوهش بور و همکاران [۱۷] با یافته‌های پژوهش حاضر ممکن است به دلیل اختلاف روش‌ها، از

- 13- Taysi S, Demircan B, Akdeniz N, Atasoy M, Sari RA. Serum oxidant antioxidant status in patients with behcets disease. *Clin Rheumatol*. 2007;26(3):418-22.
- 14- Yadav D, Herten HI, Schweitzer P, Norkus EP, Pitchumoni CS. Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(10):2634-9.
- 15- Devaraj S, Hirany SV, Burk RF, Jialal I. Divergence between LDL oxidative susceptibility and urinary F2-isoprostanes as measures of oxidative stress in type 2 diabetes. *Clin Chem*. 2001;47(11):1974-9.
- 16- Ozdemir G, Ozden M, Maral H, Kuskay S, Cetinalp P, Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Ann Clin Biochem*. 2005;42(2):99-104.
- 17- Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell Boil*. 2004;36(1):89-97.
- 18- Unlucrci Y, Bekpinar S, Kocak H. Testis glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activities in aminoguanidine treated diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*. 2000;379(2):217-20.
- 19- Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patient, with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci*. 2004;34(1):57-62.
- 20- Naguib YM. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. *Anal Biochem*. 1998;265(2):290-8.
- 21- Prasad K, Kara J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. *Am Heart J*. 1993;125(4):958-73.
- 22- Felaco M, Grilli A, De Lutiis MA, Patruno A, Libertini N, Taccardi AA. Endothelial nitric oxide synthase (enos) expression and localization in healthy and diabetic rat heart. *Ann Clin Lab Sci*. 2001;31(2):179-86.
- 1- Mate JM, Aledo JC, Perez-Gomez C, Esteban del Valle A, Segura JM. Interrelationship between oxidative damage and antioxidant enzyme activities: An easy and rapid experimental approach. *Biochem Educ*. 2000;28(2):93-5.
- 2- Uslu C, Taysi S, Bakan N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in experimental maxillary sinusitis. *Ann Clin Lab Sci*. 2003;33(1):18-22.
- 3- Nigel Wardle E. Free radicals and lipid per oxidation in relation to path physiological mechanisms. *Saudi Med J*. 1990;11(3):180-1.
- 4- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human disease. *Clin Biochem*. 1999;32(8):595-603.
- 5- Kirkova M, Ivancheva E, Russanov E. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in aspirin-treated rats. *Gen Pharmacol*. 1995;26(3):613-7.
- 6- Delmas MC, Beauvieux A, Penuchant E, Dumon MF, Receveur MC, Lebras M. Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin Biochem*. 1995;28(2):163-9.
- 7- Kailash P, Jawahar K. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. *Am Heart J*. 1993;125(4):958-73.
- 8- Kondo A, Muranaka Y, Ohta I, Notsu K, Manabe M, Kotani K. Relationship between triglyceride concentrations and LDL size evaluated by malondialdehyde-modified LDL. *Clin Chem*. 2001;47(5):893-900.
- 9- Leonard SS, Cutler D, Ding M, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Antioxidant Properties of fruit and vegetable juices: More to the story than ascorbic acid. *Ann Clin Lab Sci*. 2002;32(2):193-200.
- 10- Maxwell S, Holm G, Bondjers G, Wiklund O. Comparison of antioxidant activity in lipoprotein fractions from insulin dependent diabetics and healthy controls. *Atherosclerosis*. 1997;129(1):89-96.
- 11- Skrha J, Hodinar A, Kvasnicka J, Hilgertova J. Relationship of oxidative stress and fibrinolysis in diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1996;13(9):800-5.
- 12- Hahn S, Krieg RJ, Hisano S, Chan W, Kuemmerle NB, Saborio P. Vitamin E suppresses oxidative stress and glomerulosclerosis in rat remnant kidney. *Pediatr Nephrol*. 1999;13(3):195-8.