

# DIYABETİK SIÇANLARDA ASKORBİK ASİT UYGULAMASININ KARACİĞERDE OKSIDAN OLAYLARA ETKİSİ

Çiğdem ÖZER, Bilge GÖNÜL

**Amaç:** Diyabetin kronik komplikasyonlarının etyopatogenezinde artmış oksidan stres önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda diyabetik sıçanlarda C vitamini tedavisinin karaciğerde oksidan ve antioksidan olaylara etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Wistar Albino sıçanlar 4 gruba ayrıldı. 1.Kontrol, 2.Askorbik Asid (AA, Vitamin C) 3.Diyabet, 4.Diyabet+AA. Diyabet gruplarına sitrat tamponunda çözünen 45 mg/kg Streptozotosin, tek doz, intraperitoneal olarak uygulandı. 48 saat sonra açlık kan şekerleri 200 mg/100 ml üzeri olanlar diyabet gruplarına alındı. AA ve Diyabet+AA gruplarına musluk suyunda çözünen AA (20 mg/kg) kontrol ve Diyabet gruplarına ise musluk suyu intragastrik yoldan, günde tek doz, 21 gün süre ile uygulandı. Deney sonunda hayvanlar Tiyoental Sodyum anestezisi altında feda edildi. Karaciğer dokusunda Malondialdehit, glutatyon ve total nitrik oksit (NOx) düzeyleri ölçüldü. Farkları belirlemede ANOVA ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı.

**Bulgular:** Kontrol ve AA gruplarına göre Diyabet gruplarında malondialdehit yüksek, glutatyon ve NOx düşük olarak gözlemlendi. Kontrol ile karşılaştırıldığında AA grubunda, Diyabet ile karşılaştırıldığında Diyabet+AA grubunda malondialdehit düşük, glutatyon yüksek olarak tespit edildi. NOx değerleri arasında anlamlı fark görülmedi.

**Sonuç:** Diyabetiklerde C vitamini karaciğerde yükselmiş malondialdehit düzeylerini düşürürken, glutatyon düzeylerini arttırması, diyetle C vitamini zengin yiyecekler eklenmesi veya C vitamini preparatları kullanımının önerilebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabet, askorbik asid, karaciğer, lipid peroksidasyon.

## THE EFFECTS OF ASCORBIC ACID ADMINISTRATION ON THE LIVER OXIDANT PROCESSES IN DIABETIC RATS

**Purpose:** Increased oxidant stress plays an important role in the etiopathogenesis of the chronic complications of diabetes. The aim of this study was to examine the effects of vitamin C treatment on the oxidant and antioxidant processes in the liver of diabetic rats.

**Materials and Methods:** Wistar Albino rats were divided into 4 groups: 1-Control, 2-Ascorbic Acid (AA, vitamin C), 3-Diabetes, 4-Diabetes+AA. For induction of diabetes, the rats were treated with a single dose of Streptozotocin (45 mg/kg, i.p.). After 48 hours, rats whose fasting blood glucose levels were over 200 mg/100 ml were included in the diabetes groups. Rats in the AA and Diabetes+AA groups were treated with AA (20 mg/kg/day), which was administered intragastrically for 21 days. At the end of the experiment, malondialdehyde, glutathione and NOx levels in the liver tissues were determined. ANOVA and Mann-Whitney U tests were used for statistical analyses.

**Results:** In the diabetes groups, malondialdehyde levels were increased, while glutathione and NOx levels were decreased. Malondialdehyde levels were decreased while glutathione levels were increased in the AA and Diabetes+AA groups in comparison with the controls. There were no significant differences amongst the groups in terms of NOx levels.

**Conclusion:** The malondialdehyde and glutathione levels in vitamin C supplemented rat livers indicate that diets rich in vitamin C or vitamin C preparations might be beneficial in the treatment of diabetic patients.

**Key Words:** Diabetes, ascorbic acid, liver, lipid peroxidation.

## GİRİŞ

İnsüline bağımlı diyabet günümüzde yaşam koşullarının etkisi ile giderek daha sık rastlanan ve bu nedenle tedavisi ve etki mekanizmaları konusunda çok çalışılan bir patolojidir. Bu konudaki öncül çalışmalar deney hayvanlarında yapılarak elde edilen veriler insanlardaki uygulamalarda kullanılmaktadır. Streptozotosin (STZ) deneysel olarak diyabet oluşturmakta sıklıkla kullanılan bir ajandır. STZ'nin diyabetojenik etkisi pankreas  $\beta$  hücrelerinin tahribine dayanmaktadır (1). STZ glukoz oksidasyonunu bozarak (2), insülinin biyosentezini ve salınımını azaltır (3). Hipergliseminin şiddeti ve süresi ilacın dozuna ve laboratuvar hayvanının türüne bağlıdır (1). Serbest radikaller normal metabolik süreçler boyunca vücutta sürekli olarak sentezlenir. Diyabette protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonucu serbest radikallerin oluşumu artar. Diyabetin kronik komplikasyonlarının etyopatogenezinde artmış oksidan stresin önemli rol oynadığı düşünülmektedir (4). Serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biri membranlardaki lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu sonucu membranlarda yapısal ve fonksiyonel hücre hasarı oluşur. Malondialdehit (MDA) ölçümü, lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (5). Fizyolojik koşullarda serbest radikallerin yaptığı olumsuz etkiler antioksidan savunma tarafından azaltılır. Glutatyon endojen bir antioksidan olup serbest radikallerle reaksiyona girip hücre içindeki hidroperoksitleri indirgeyen temel mekanizmadır (6). Askorbik asit (AA), insanda sentezlenemeyen ancak dış kaynaklı olmasına karşın kanda, dokularda ve hücrenin su fazında eriyerek önemli miktarlarda ve etkilerde yer alan antioksidan vitamindir (7). Askorbik asitin antioksidan özelliği indirgenmiş glutatyon (GSH) ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) gibi diğer indirgen ajanların varlığında daha da güçlenmektedir. Glutatyon metabolizmasının bozulması, AA düzeylerinin azalması diyabetteki antioksidan savunmanın yetersizliğinin nedenleri arasındadır (8). Deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda AA gereksiniminin arttığı gösterilmiştir (9).

Çalışmamızda, STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda AA uygulamasının antioksidan etkisiyle, karaciğer antioksidanları arasındaki ilişkiyi saptamak amaçlandı.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmada ağırlıkları  $200 \pm 20$  gr olan 39 adet erişkin, erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanların her biri ayrı kafeslerde 12 saat aydınlık-karanlık siklusunda,  $24 \pm 2$  °C'lik ortamda, standart sıçan yemi ve musluk suyu ile serbest olarak beslendi. Denekler bir hafta süre ile laboratuvar ortamına uyum için bekletildikten sonra dört gruba ayrıldı.

1. Kontrol grubu (K, n=9), 2. AA grubu (AA, n=9), 3. Diyabet grubu (D, n=10), 4. Diyabet +AA grubu (D+AA, n=11)

\* Çalışma 27-30 Eylül tarihleri arasında Gaziantep'de düzenlenen Türk Fizyolojik Bilimler Derneği XXXI. Ulusal Fizyoloji Kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Beşevler, Ankara.

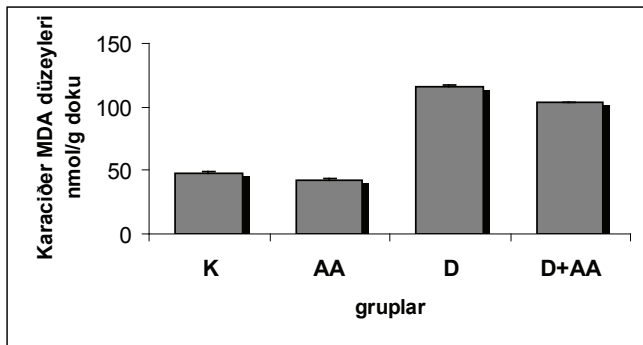
18 saatlik açlık sonrası hayvanların kuyruk veninden kan alınarak açlık kan şekerleri (AKŞ) ölçüldü. Aynı gün diyabet gruplarındaki hayvanlara 0.1 Molar (pH: 4.5) soğuk sitrat tamponun 1 ml'sinde çözünen, 45 mg/kg STZ (10), AA ve Kontrol gruplarındaki hayvanlara da 1 ml sitrat tamponu intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. Enjeksiyon uygulamasından 48 saat sonra AKŞ'leri 200mg/dl üzeri olanlar diyabet kabul edilerek diyabet gruplarına alındı. AA ve D+AA gruplarına ortalama 1,5 ml musluk suyunda çözünen AA (20 mg/kg), kontrol ve diyabet gruplarına ise aynı hacimde musluk suyu intragastrik (i.g.) yoldan günde tek doz olarak 21 gün süre ile uygulandı. Son uygulamadan 24 saat sonra denekler Tiyopental Sodyum (50 mg/kg) anestezisi altında kalplerinden kan alınarak feda edildi. Karaciğer dokusunda MDA (11) ve GSH (12) spektrofotometrik yöntemle, total nitrik oksit (NOx) düzeyleri ise Griess yöntemi (13) ile ölçüldü.

Gruplar arası farkları belirlemede ANOVA ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı.  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Karaciğer MDA düzeyleri Şekil 1, GSH düzeyleri Şekil 2, NOx düzeyleri Şekil 3. de gösterildi.

Kontrolle göre, diyabetik gruplarda karaciğer MDA düzeyleri yüksek, GSH düzeyleri düşük bulundu ( $p < 0.001$ ). AA uygulaması ile diyabete bağlı olarak artan MDA düzeyinde azalma ( $p < 0.001$ ), azalan GSH düzeyinde ise artma görüldü ( $p < 0.05$ ). En düşük MDA ve en yüksek GSH, AA grubunda ölçüldü. NOx düzeyleri ise diyabetik gruplarda düşük olarak gözlemlendi ( $p < 0.001$ ). AA uygulamasının gerek kontrol gerekse diyabetik grupta NOx düzeyinde anlamlı bir değişiklik yapmadığı tespit edildi.



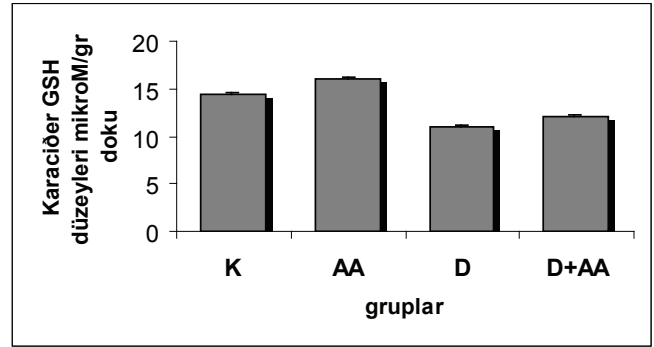
Şekil 1: K, AA, D ve D+AA gruplarına ait karaciğer MDA düzeyleri

Değerler ortalama  $\pm$  Standart hata olarak verildi.

K:Kontrol, AA: Askorbik asit, D:Diyabet, D+AA: Diyabet+AA

$P < 0.0001$ : K/D, K/D+AA, AA/D, AA/D+AA,

$P < 0.001$ : K/AA, D/D+AA



Şekil 2: K, AA, D ve D+AA gruplarına ait karaciğer GSH düzeyleri

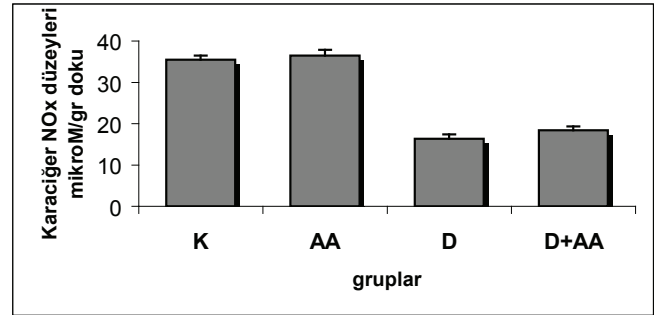
Değerler ortalama  $\pm$  Standart hata olarak verildi.

K:Kontrol, AA: Askorbik asit, D:Diyabet, D+AA: Diyabet+AA

$P < 0.0001$ : K/D, AA/D, AA/D+AA,

$P < 0.001$ : K/AA, K/D+AA

$P < 0.01$ : D/D+AA



Şekil 3: K, AA, D ve D+AA gruplarına ait karaciğer NOx düzeyleri

Değerler ortalama  $\pm$  Standart hata olarak verildi.

K:Kontrol, AA: Askorbik asit, D:Diyabet, D+AA: Diyabet+AA

$P < 0.0001$ : K/D, K/D+AA, AA/D, AA/D+AA,

## TARTIŞMA

Araştırmamızda öncelikle az denek kaybı ile diyabet oluşturmak hedeflendiğinden, diyabet oluşturma yöntemlerinden STZ seçilerek tek ve kullanılabilir en küçük doz uygulanmıştır. Sonuçlarımız tek doz i.p. 45 mg/kg STZ'nin literatürle uyumlu olarak diyabet oluşturmak için yeterli olduğu göstermektedir (10, 14).

Oksidatif stresin metabolik veya vasküler hastalıklarla bağlantısı olduğu bilinmektedir (15). Diyabette artan glukoz konsantrasyonları, prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasına ve dolayısıyla oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır (16). Bu arada özellikle Tip II diyabette sık rastlanan yükselmiş açlık trigliserit, serbest yağ asidi ve kolesterol düzeyleri de reaktif oksijen ürünleri artışının bir nedenidir (17). Haluzik ve Nedvidkova STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda böbrek MDA konsantrasyonları artarken, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitesinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir (18). Yine Yılmaz ve arkadaşları da 8 haftalık STZ diyabetik sıçanlarda karaciğer dokusunda

MDA düzeyinin attığını göstererek, artan oksidan stresi diyabetik kardiyomyopati, nefropati ve vasküler komplikasyonlarından sorumlu tutmuşlardır (19). Deneylerimizde diyabet oluşturulduktan 21 gün sonra yapılan ölçümlerde lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeylerinin tedavi uygulanmayan diyabetik sıçanlarda artmış olduğunu tespit ettik. Bulgularımız literatürde bu konuda yapılan çalışmalarla uyumlu görülmektedir.

Literatürde 15 günlük STZ-diyabetik sıçanlarda karaciğer ve böbrekte Glutasyon-S-Transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi antioksidan düzeylerinde azalma olduğu rapor edilmiştir (20). Yine diyabetik hastalarda plazma MDA düzeyleri yüksekken, GSH, SOD ve katalaz düzeyleri düşük tespit edilmiştir (21). Çalışmamızda antioksidan savunmanın göstergesi olarak GSH düzeyi ölçüldü. GSH antioksidan savunmadan, hücre çoğalmasına kadar pek çok fonksiyonu olan önemli bir moleküldür ve karaciğer en yüksek miktarda GSH içeren organlardan biridir (22). Deneylerimizde en düşük GSH düzeylerinin tedavi uygulanmayan diyabetik grupta tespit edilmesi, diyabete bağlı antioksidan savunmanın azaldığı yönündeki çalışmaları destekler niteliktedir. Khamaiishi ve arkadaşları GSH eksikliğinde oksidan stres bulgularının olmadığı durumda bile glukoz toleransının bozulduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar göre, GSH depleksiyonundan sonra görülen bozulmuş glukoz toleransı karaciğerde GSH eksikliğinin direkt nedenidir (23). Çalışmamızda da glukoz toleransının bozuk olduğu diyabetik deneklerde GSH'nın düşük, MDA düzeylerinin yüksek olması oksidan stresin artıp, antioksidan kapasitenin azaldığını göstermektedir.

NO hem prooksidan hem de antioksidan rol oynayabilen bir moleküldür (15). Literatürde diyabette NO düzeyleri ile ilgili olarak farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Seif ve Youssef diyabetik hastalarda plazma NO miktarını yüksek bulmalarına karşın (21), Mohan ve arkadaşları sıçanlarda diyabetin plazma NO miktarını düşürdüğünü, insülin verilmesi ile NO'nun yükseldiğini ayrıca artan MDA değerlerinde de düşme olduğunu bildirmişlerdir (24). Khandelwal ve arkadaşları ise Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enziminin farklı izoformlarının yaşa, dokunun özelliğine ve diyabetin dokularda yaptığı metabolik değişikliklerin durumuna göre sentezinin artıp, azalabileceğini belirtmişlerdir (25). Normal fizyolojik durumlarda endotel den salınan NO vasküler tonus, koagülasyon ve inflamasyon gibi pek çok süreçte rol alır. Ancak diyabet gibi patolojik durumlarda NO yapımı ve aktivitesi bozulmaktadır. Diyabetteki NO düzeyi azalmasının en önemli nedenleri arasında endotel hasarı gösterilmektedir. Hiperglisemi ileri glikozilasyon ürünlerinin üretimine neden olan Protein Kinaz C (PKC) yapımını aktive eder. PKC aktivasyonu oksijen radikallerinin artmasına neden olarak endotel fonksiyon bozukluğuna sebep olmaktadır. NADPH, Nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin kofaktörlerindedir. Fizyolojik koşullarda NADPH pentoz fosfat yolundan sağlanır. Bu yol hiperglisemide inhibe olduğundan yine NO sentezinde bir azalmaya neden olacaktır (9). GSH da aynı zamanda NO sentezi için bir kofaktör olarak görülmektedir. Diyabette NADPH düzeyindeki azalmaya bağlı olarak GSH'un azalması ve oksidan stresin artışı yine endotel hasa-

rının olası bir diğer nedenidir (26). Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında diyabet gruplarında NO doku düzeyinin azalması yıkımının artışı veya yapımının azalması ile açıklanabilir. GSH'nın düşmesi ve oksidan stresin artmasına bağlı olarak NO oluşumunun azalması beklenebilir.

Diyabette hastalığın başında serbest radikal artışını sağlayan pek çok faktör, hastalığın devamında da etkili olmaktadır ve bu nedenle antioksidanların tedaviye eklenmesi önerilmektedir (15). Deneylerimizde diyabet oluşumundan sonra 21 gün süre ile AA tedavisi uygulandı. Sıçan ömrü ile karşılaştırıldığında (27), bu süre 70 yaşına kadar yaşayan bir insanda yaklaşık 1,5 yıla karşılık gelmektedir. AA elektron donoru olarak kollagen ve katekolamin sentezi gibi çeşitli enzimatik reaksiyonlarda yer alır ve memeli dokusundaki suda eriyebilen en önemli antioksidanlardan biridir. AA insanda sentezlenemez ve dışarıdan alınması gerekir. AA sentezleyebilen canlılarda karaciğer hem GSH hem de askorbatın sentezinin ve salınımının yapıldığı başlıca kaynaktır. Bu iki bileşik arasında birbirlerinin sentezini ve salınımını düzenleme yönünde bir ilişki vardır (7). Hüresel AA alımı enerji bağımlı olup glukoz ve diğer monosakkaritler AA ile ortak taşıma sistemini paylaşmaktadır. Dolayısıyla kronik hiperglisemi, artmış plazma glukozu nedeniyle AA'nın membran transportunu yarışmalı inhibisyona uğratmaktadır (28). Aynı zamanda hiperglisemi AA'nın renal reabsorpsiyonunu inhibe etmektedir (29). STZ bağımlı diyabette plazma ve dokuda AA düzeyleri üriner atılım, oksidatif kayıp ve biyosentezindeki azalma gibi faktörler nedeniyle azalmaktadır (30). Hiperglisemi diyabetik hastalarda endotel disfonksiyonlarına zemin hazırlamaktadır. Bu hastalara C vitamini verilmesi ile endotel bağımlı vazodilatasyonda artış sağlandığı ve kan damarlarının stabilitesini arttırdığı rapor edilmiştir. (29). Yine STZ diyabetik sıçanlarda AA uygulaması ile hiperlipideminin ve kardiyak fonksiyonların büyük ölçüde düzeldiği görülmüştür (28). Cameron ve arkadaşları tarafından diyabetik sıçanlarda C vitamini takviyesinin plazma, kas ve karaciğerde lipid peroksidasyonu azalttığı, eş zamanlı olarak C vitamini takviyesinin diyabette azalan GSH düzeylerini yükselttiği rapor edilmiştir (31). Benzer şekilde Çay ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da diyabet öncesi 4, sonrası 21 gün olmak üzere toplam 25 gün süreyle C vitamini uygulamasının diyabetik sıçanlarda plazma, karaciğer ve kas dokusunda TBARS düzeylerini düşürdüğü, GSH-Px ve GSH düzeylerini yükselttiği bildirilmektedir (32).

Çalışmamızda diyabetik sıçanlara 21 gün süre ile 20 mg/kg dozda C vitamini yüklemesinin, karaciğer dokusunda diyabete bağlı olarak artan MDA düzeyini %10,5 oranında düşürdüğü, azalan GSH düzeyini ise %11 oranında yükselttiği görüldü. Bu sonuçların kontrol değerlerine ulaşamadığı, ancak diyabetik gruba göreceli olarak kontrole yaklaşmış olduğu görülmektedir. AA uygulaması gerek diyabetik, gerekse kontrol grubunda NO düzeylerini biraz arttırmakla birlikte bu artış anlamlı değildir. Elde edilen bu sonuçlar C vitamininin diyabette antioksidan etkisinin gösterilmesi açısından önemlidir ancak daha yüksek bir dozun denenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Uyguladığımız AA dozu 70 kg'lık bir insan için 1,4 gr'lık bir doza karşılık gelmektedir. İnsanlarda AA sen-

tezlenemediği ve diyabetik hastalarda da gereksinimin arttığı düşünüldüğünde bu dozun daha üstünde bir takviyeye ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, diyabetle ilgili daha önce yayınlanmış bilgiler ve karaciğerle ilgili bu çalışmamızın bulguları ışığında diyabetiklerde mutlaka C vitamini desteğinin ve özellikle de yüksek dozlarda yapılmasının uygun olacağı sonucuna varıldı.

#### Yazışma Adresi

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Özer

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Abd.,

Beşevler, Ankara.

Tel: 0312 2024612

Fax: 0312 2124647

E-mail: ozercigdem@yahoo.co.uk

## KAYNAKLAR

- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50: 536-546.
- Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocine-induced double strand DNA break formation in pancreatic islets. *Experientia* 1996; 52: 344-347.
- Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawadw J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocine-induced cytotoxicity. *J Endocrinol* 1990; 127: 161-165.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complication: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
- Grisotto PC, dos Santos AC, Continho-Netto J, Cherri J, Piccinato CE. Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2000; 92: 1-6.
- Zhao X, Alexander JS, Zhang S, Zhu Y, Sieber NJ, Aw TY, Carden DL. Redox regulation of endothelial barrier integrity. *Am J Physiol* 2001; 281: 879-886.
- Banhegyi G, Braun L, Csala M, Puskas F, Mandl J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Rad Biol Med* 1997; 23: 793-803.
- Jennings PB, Chirico S, Jones AF, Linc J, Bennett AH, Vit C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus. *Diab Res* 1992; 6: 151-154.
- Honing MLH, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ESG, Rabelink TJ. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 241-249.
- Pari L, Venkateswaran S. Effect of an aqueous extract of phaseolus vulgaris on the properties of tail tendon collagen of rats with streptozotocine-induced diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2003; 39: 861-870.
- Casini A, Ferrali M, Pompella A. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol* 1986; 123: 520-531.
- Aykaç AG, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Öz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 1985; 36: 71-76.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite, Nitric Oxide. 2001; 5: 62-71.
- Gönül B, Demiröz AS, Özer Ç. The oxidant/antioxidant capacity of diabetic rat liver tissue treated with benfluorex. *Faseb J* 2005; 19: A1531.
- Wiernsperger NF. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes-Metabolism* 2003; 29: 1-14.
- Gmieniczek A, Hopkala H, Wojtowicz Z, Nieradko M. Differences in antioxidant status in skeletal muscle tissue in experimental diabetes. *Clin Chim Acta* 2001; 314: 39-45.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase c dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49: 1939-1945.
- Haluzik M, Nedvidkova J. The role of nitric oxide in the development of streptozotocine-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications. *Physiol Res* 2000; 49: 37-42.
- Yılmaz HR, Uz E, Yücel N, Altuntaş I, Özçelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 234-238.
- Anwar MM, Meki AMA. Oxidative stress in streptozotocine-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp Biochem Physiol* 2003; 135: 539-547.
- Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004; 346: 161-170.
- Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concepts and controversies. *The FASEB Journal* 1999; 13: 1169-1183.
- Kamaishi M, Kavel O, Rosenstock M, Porat M, Yuli M, Kaiser N, Rudick A. Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: in vivo and in vitro studies using buthionine sulfoximine. *Biocchem J* 2000; 349: 579-586.
- Mohan K, Das UN. Effect of L-arginine-nitric oxide system on the metabolism of essential fatty acids in chemical-induced diabetes mellitus. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids 2000; 62: 35-46.
- Khandelwal RL, Gupta D, Sulakhe PV. Decreased activity and impaired induction of nitric oxide synthase by lipopolysaccharides in streptozotocine-induced diabetic rats. *Bioc Biop Acta* 2003; 1620: 259-266.
- Tagliabue M, Pinach S, Bisceglie CDI, Brocato L, Cassader M, Bertagna A, Manieri C, Pescarmona GP. Glutathione levels in patients with erectile dysfunction, with or without diabetes mellitus. *Int J Andrology* 2005; 28: 156-162.
- Harkness JE, Wagner JE: The biology and medicine of rabbits and rodents. Williams-Wilkins, Baltimore 1995.
- Dai S, McNeill JH. Ascorbic acid supplementation prevents hyperlipidemia and improves myocardial performance in streptozotocine-diabetic rats. *Diabetes Res Clin Practice* 1995; 27: 11-18.
- Bsoul SA, Tarezhalmly GT. Vitamin C in health and disease. *J Contemp Dental Disease* 2004; 5: 1-14.
- Kashiba M, Will JC, Byer T. Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C. *Nutr Rev* 1996; 54: 193-202.
- Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK. Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocine-diabetic rats. *Diabetologia* 1993; 36: 299-304.
- Çay M, Naziroğlu M, Şimşek H, Aydılek N, Aksakal M, Demirci M. Effects of intraperitoneally administered vitamin C on antioxidative defense mechanism in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Res Exp Med (Berl)* 2001; 200: 205-213.