بررسی تاثیر میوه هندوانه ابوجهل [*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad.] بر فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دوم

حسن فلاح‌حسینی[1]*، بمانعلی زارعی[2]، رامین حشمت[3]، باقر لاریجانی[4]، حسین فخرزاده[5]، رضا رضایی شریف‌آبادی[6]، غلامعلی نادری[7]، جلال زرین‌قلم[8]، امیرهوشنگ شیخ‌سامانی[9]

۱- استادیار پژوهش، گروه فارماکولوژی و طب کاربردی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)
۳- دستیار اپیدمیولوژی، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٤- استاد، گروه بیماری‌های داخلی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٥- پزشک عمومی، محقق مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٦- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)
۷- استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
۸- دستیار فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی
۹- کارشناس ارشد بیوشیمی، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، خیابان قدس، خیابان بزرگمهرغربی، شماره ۹۷
صندوق‌پستی: ١٤٤٦- ١٣١٤٥، تلفن: ٦٦٩٥٠٤٤٧، ٦٦٤٦٢١٧٩ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٤٦٥٥٥٤ (٠٢١)
پست الکترونیک: huseini_fallah@yahoo.com

تاریخ دریافت: ٨٤/١/٢٨ **تاریخ تصویب:** ٨٤/٦/٣٠

چکیده

مقدمه: تاثیر افزایش میزان قند خون بر تشدید استرس اکسیداتیو و کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در بیماران دیابتی گزارش شده است. هم چنین احتمال داده می‌شود که کاهش میزان قند خون در بیماران دیابتی با مصرف گیاهان دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش استرس اکسیداتیو شود.

هدف: در مطالعه حاضر اثر عصاره هندوانه ابوجهل بر مارکرهای استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی در مقایسه با دارونما بررسی شد.

روش بررسی: تعداد ٤٤ بیمار دیابتی نوع دوم مراجعه‌کننده به درمانگاه بیمارستان شریعتی انتخاب و در دو گروه ۲۲ نفری تقسیم شدند. به گروه اول روزانه ۳۰۰ میلی‌گرم هندوانه تلخ در سه دوز منقسم و به گروه دوم به طور مشابه دارونما به مدت ۲ ماه تجویز شد. در این بیماران فاکتورهای خونی از قبیل هموگلوبین گلیکوزیله و قند خون در حالت ناشتا و فاکتورهای استرس اکسیداتیو از قبیل میزان مالون‌دی‌آلدیید، گلوتاتیون و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز خون قبل و بعد از دو ماه در پایان مطالعه بررسی شد.

نتایج: نتایج طرح حاکی از آن بود که تجویز هندوانه ابوجهل به بیماران دیابتی موجب کاهش معنی‌دار در میزان هموگلوبین و گلیکوزیله قند خون ناشتا شده است، ولی میزان مالون‌دی‌آلدیید، گلوتاتیون و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز خون قبل و بعد از دو ماه و همچنین بین دو گروه هیچ تفاوت معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: در بیماران دیابتی کاهش میزان قند خون با تجویز هندوانه ابوجهل تاثیری بر میزان غلظت مارکرهای استرس اکسیداسیون ندارد.

گل‌واژگان: هندوانه ابوجهل، استرس اکسیداتیو، دیابت، کارآزمایی بالینی

مقدمه

در بیماری دیابت، به دلیل اختلال در عملکرد انسولین توانایی متابولیسم گلوکز کاهش می‌یابد و موجب اختلالات بالینی متعددی در بیماران می‌شود. افزایش میزان استرس اکسیداتیو و تشکیل رادیکال آزاد در بافت‌های افراد دیابتی همراه با کاهش میزان گلوتاتیون خون و بافت‌ها از جمله این اختلالات است. تصور می‌شود که افزایش استرس اکسیداتیو، گلوتاتیون بافتی را تخلیه می‌کند و چون گلوتاتیون فاکتور اصلی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد است، تخلیه آن منجر به افزایش رادیکال‌های آزاد می‌گردد [۱،۲،۳].

گزارش‌های مبنی بر تاثیر احتمالی ضعف سیستم آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون بر عوارض قلبی عروقی مشاهده شده است. این اثر در بیماران دیابتی افزایش و نقش مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در کاهش این عوارض پیشنهاد شده است. همچنین نقص سیستم ایمنی در بیماران دیابتی نیز به کمبود گلوتاتیون نسبت داده شده است [۲]. رادیکال‌های آزاد یا عامل اصلی استرس اکسیداتیو ترکیبات ناپایدار حاصل از متابولیسم بدن هستند که به دلیل تمایل به جذب الکترون می‌توانند به ملکول‌های بیوشیمیایی بدن از جمله پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA سلوی آسیب برسانند [۳]. در بیماری‌های مزمن مانند دیابت به دلیل اختلالات متابولیسمی غلظت رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابند و به عنوان یک عامل خطرزا مطرح می‌شوند. رادیکال‌های آزاد به طور طبیعی توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در بدن از بین می‌روند. آنتی اکسیدان‌ها خارجی از جمله ویتامین E، ویتامین C و کاروتنوییدها و آنتی‌اکسیدان‌های سلولی مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون و کاتالاز نقش اصلی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد را دارند [٤].

شدت استرس اکسیداتیو و یا میزان غلظت رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در ایجاد و یا تشدید بیماری‌های ثانویه در بیماران دیابتی دارند [۵]. با توجه به تاثیر مثبت آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش میزان قند خون و همچنین به اثربخشی هندوانه ابوجهل در کاهش قند خون و دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی، بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی عصاره هندوانه تلخ در بیماران دیابتی لازم است [۷،٦].

در این طرح جهت شناسایی نقش استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی میزان تغییرات غلظت خونی چند فاکتور مرتبط با استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی نوع دوم قبل و بعد از درمان با هندوانه تلخ و دارنما مورد مقایسه قرار گرفت. بررسی میزان غلظت گلوتاتیون، کاتالاز، مالون‌دی‌آلدیید و سوپر اکسید دیسموتاز در خون بیماران به عنوان مارکر استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

مواد: کپسول ۱۰۰ میلی‌گرمی هندوانه تلخ و دارونما از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تهیه شد. کلیه آزمایش‌های مربوط به هموگلوبین گلیکوزیله و قند خون ناشتا در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه تهران در بیمارستان شریعتی و کلیه آزمایش‌های مربوط به مارکرهای استرس اکسیداسیون در آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) انجام پذیرفت.

روش اجرا: تعداد ٤٤ بیمار دیابتی نوع دوم با سن ٦٠-٤٠ سال دارای قند خون ناشتا کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و حداقل مدت زمان دو سال ابتلا به دیابت انتخاب شدند. بیماران به طور تصادفی به دو گروه ۲۲ نفری هندوانه تلخ و ۲۲ نفر دارونما تقسیم شدند. به بیماران گروه هندوانه تلخ بعد از ورود به مطالعه روزانه ۳ عدد کپسول هندوانه تلخ ۱۰۰ میلی‌گرمی و به گروه دارونما روزی ۳ عدد کپسول دارونما تجویز شد. بیماران هر دو گروه از نظر میزان هموگلوبین گلیکوزیله و قند خون ناشتا، همچنین میزان غلظت گلوتاتیون، کاتالاز، مالون‌دی‌آلدیید و سوپر اکسید دیسموتاز به عنوان مارکر استرس اکسیداتیو قبل و در پایان مطالعه آزمایش شدند.

اندازه‌گیری میزان هموگلوبین گلیکوزیله و قند خون ناشتا: میزان هموگلوبین گلیکوزیله و قند خون ناشتا طبق روش استاندارد آزمایشگاه مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه تهران در بیمارستان شریعتی انجام شد.

اندازه‌گیری گلوتاتیون: میزان گلوتاتیون احیا براساس روش Tietze F تعیین شد [۱۰]. به طور اختصار برای تعیین

مقدار گلوتاتیون میزان ۷۳۰ میکرولیتر از محلول (۰/۳ M/L) Na2HPO4 و ۹۰ میکرولیتر DTNB (۴۰mg/dl در محلول سیترات سدیم ۱ gr/dl) به عنوان سوبسترا و ۱۸۰ میکرولیتر از سرم بیمار استفاده و تغییرات جذب محلول فوق را در nm ۴۱۲ و به مدت ٤ دقیقه خوانده شده آنگاه با استفاده از منحنی کالیبراسیون میزان گلوتاتیون سلولی بر حسب µmol/mg protein محاسبه گردید.

سنجش غلظت مالون‌دی آلدیید: محصول لیپید پراکسیداسیون (LP) تحت عنوان مالون دی آلدیید با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد [۱۱]. میزان لیپید پراکسیداسیون از طریق اندازه‌گیری میزان واکنش تیوباربیتوریک اسید (TBA) با مالون‌دی آلدیید (MDA) تشکیل شده ضمن هیدرولیز لیپید پراکسیدها با استفاده از روش تغییر یافته‌ی Uchiyama & Mihara اندازه‌گیری شد. به طور مختصر ۰/۱ میلی‌لیتر از سرم با ۰/۳۷۵ میلی‌لیتر از اسید استیک ۲۰ درصد و ۰/۳۷۵ میلی‌لیتر از محلول تیو باربیتوریک اسید ۰/٦ درصد مخلوط و به مدت ٦۰ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با آب سرد و به آن ۱/۲۵ میلی‌لیتر (نرمال بوتانل / پیریدین ۱:۱۵) افزوده و به مدت ۵ دقیقه در rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس جذب فاز بوتانل در طول موج nm ۵۳۲ اندازه‌گیری شد. از ۱،۱،۳،۳ تترااتوکسی پروپان با روش مشابه به عنوان استاندارد استفاده و غلظت MDA و بر حسب µmol/ml sample گزارش گردید.

فعالیت کاتالاز: فعالیت کاتالاز از طریق تعیین میزان آب اکسیژنه تخریب شده به وسیله آنزیم سنجیده می‌شود [۱۲]. به طور مختصر محلول H_2O_2 به لوله‌های آزمایش حاوی نمونه افزوده شد و از یک لوله آب مقطر به عنوان بلانک و محلول H_2O_2 استاندارد استفاده شد. بعد از ۳ دقیقه انکوباسیون، با افزایش H_2SO_4 واکنش آنزیمی متوقف شده و ۱/٤ میلی‌لیتر $KMnO_4$ به هر لوله افزوده و جذب آن در nm ٤۸۰ خوانده شد.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD): فعالیت تام SOD براساس روش (Hermer-Lima & Story, 1995a) و تحت شرایط ذیل سنجیده شد [۱۳] ۵Mmol/l EDTA، ۲/۵ mmol/l Mncl2، ۰/۲۵ mmol/l NADH، ۲- مرکاپتو اتانل ٤ mmol/l در بافر پتاسیم فسفات ۵۰mmol/l، pH= ۷/۲. یک واحد فعالیت SOD برابر با مقدار آنزیمی که ۵۰ درصد اکسیداسیون NADH القا شده به وسیله سوپراکسید را مهار کند تعریف می‌شود (IC50).

آنالیز آماری داده‌ها

اطلاعات جمع‌آوری شده وارد نرم‌افزار آماری کامپیوتری spss شد. متغیرهای کمی به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند. برای مقایسه میان متغیرهای گروه تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل با توجه به نوع توزیع متغیر از آزمون‌های پارامتریک و غیر پارامتریک مناسب استفاده شد. مقادیر قبل و بعد از درمان در هر یک از گروه‌ها با استفاده از آزمون‌های زوج مقایسه شدند و $p<$ ۰/۰۵ به عنوان سطح اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه نتایج آزمایش‌های مربوط به هموگلوبین گلیکوزیله، قند خون ناشتا، گلوتاتیون، مالون‌دی آلدیید، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در روز اول و بعد از دو ماه تجویز عصاره هندوانه تلخ و دارونما در هر دو گروه در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

قند خون ناشتا و هموگلوبین گلیکوزیله: در بیماران گروه هندوانه تلخ میزان قند خون ناشتا و هموگلوبین گلیکوزیله قبل از درمان به ترتیب ۱۵ ± ۱۸۸ و ۰/۵ ± ۱۰/۵ درصد بود که بعد از ۲ ماه درمان این میزان به ترتیب ۱۵ ± ۱۷۲ و ۰/٦ ± ۹/۲ کاهش یافت. آنالیز آماری حاکی از آن بود که این کاهش معنی‌دار است.

در بیماران گروه دارونما میزان قند خون ناشتا و هموگلوبین گلیکوزیله قبل از درمان به ترتیب ۱۲ ± ۱٦۸ و ۰/٦ ± ۹/۰ درصد بود که بعد از ۲ ماه درمان این میزان به ترتیب ۱۳ ± ۱۷٦ و ۰/۵ ± ۹/۲ افزایش یافت. آنالیز آماری حاکی از آن بود که این افزایش معنی‌دار نبوده است.

جدول شماره ۱- میزان مارکرهای سرولوژیکی خون در بیماران گروه هندوانه تلخ و گروه دارونما

آزمایش‌های بیوشیمیایی	گروه هندوانه ابوجهل (Mean ± SD)		دارونما (Mean ± SD)	
	شروع	بعد از دو ماه	شروع	بعد از دو ماه
قند خون ناشتا (mg/dl)	۱۸۸± ٦۲	۱۷۱± ٦۱ *	۱٦۸ ± ٤۲	۱۸۰ ± ٤۷
هموگلوبین گلیکوزیله (%)	۱۰/٥ ± ۱/۹	۹/۲± ۲/۳ *	۹/۰ ± ۱/۹	۸/٦ ± ۱/۷
گلوتاتیون (umol/ml)	٤۹۸ ± ۱٥٦	٤۹۱ ± ۱۹۲	٥۰٦ ± ۱۸۰	٥۰٥ ± ۲۰۰
مالون دی آلدیید (um/ml)	٥/٤ ±۱/٦	٤/۸ ± ۱/۹	٤/٥ ± ۱/٤	٥/۰ ± ۲/۰
سوپراکسید دیسموتاز (u/l)	۱۹۸ ± ٥۱	۲۳۱ ± ٤٦	۲۳۳ ± ۹۰	۲٦۲ ± ۹٦
کاتالاز (u/l)	۷۹ ± ۲۷	۷۸ ± ۳۰	۸۷ ± ۲٤	۷۹ ± ۱۹

*p< ۰/۰٥ میزان قند خون ناشتا و هموگلوبین گلیکوزیله بعد از دو ماه درمان در گروه هندوانه تلخ در مقایسه با شروع مطالعه و در مقایسه با گروه دارونما به طور معنی‌داری کاهش یافت.

آزمایش‌های بیوشیمیایی مارکرهای استرس اکسیداتیو: در بیماران گروه هندوانه تلخ میزان گلوتاتیون، مالون دی آلدیید، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به ترتیب ۱٥٦ ± ٤۹۸، ۱/٦ ± ٥/٤، ٥۱ ± ۱۹۸ و ۲۷ ± ۷۹ بود که بعد از ۲ ماه درمان این میزان به ترتیب ۱۹۲ ± ٤۹۱، ۱/۹ ± ٤/۸، ٤٦ ± ۲۳۱ و ۳۰ ± ۷۸ تغییر یافت. آنالیز آماری حاکی از آن بود که این تغییرات معنی‌دار نیستند.

در بیماران گروه دارونما میزان گلوتاتیون، مالون دی‌آلدیید، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به ترتیب ۱۸۰ ± ٥۰٦، ۱/٤ ± ٤/٥، ۹۰ ± ۲۳۳ و ۲٤ ± ۷۸ بود که بعد از ۲ ماه درمان این میزان به ترتیب ۲۰۰ ± ٥۰٥، ۲/۰ ± ٥/۰، ۹٦ ± ۲٦۲ و ۱۹ ± ۷۹ تغییر یافت. آنالیز آماری حاکی از آن بود که این تغییرات معنی‌دار نیستند.

بحث

تولید رادیکال‌های آزاد یکی از فعالیت‌های عادی در واکنش‌های متابولیسمی سلولی می‌باشد که توسط سیستم دفاعی بدن بی‌اثر می‌شوند. گزارش شده است که افزایش غلظت قند خون در بیماران دیابتی موجب افزایش تولید رادیکال آزاد شده که این عمل موجب تشدید اختلالات متابولیسمی و بیماری‌های ثانویه در آنها می‌شود [۱٤،۱٥]. گلوتاتیون، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از جمله ترکیبات مهم درون و بیرون سلولی هستند که در بیماران دیابتی الزاماً باید افزایش حجم تولیدی رادیکال‌های آزاد را خنثی نمایند که این امر احتمالاً موجب کاهش غلظت آنها در خون این بیماران می‌شود [۱،۲]. رادیکال‌های آزاد همچنین با تاثیر بر لیپید موجود در بافت‌های بدن موجب تولید لیپید پراکسیداسیون می‌شود. مالون دی‌آلدیید از متابولیت‌های تولیدی این لیپید پراکسیداسیون است که میزان آن به عنوان شاخص غلظت اکسیداسیون لیپید در خون شناخته شده است [۱٦].

گزارش شده است که میزان غلظت خونی گلوتاتیون، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در خون و بعضی از بافت‌های بدن بیماران دیابتی در مقایسه با افراد سالم کاهش می‌یابد و برعکس غلظت مالون دی آلدیید که محصول لیپید پراکسیداسیون است افزایش می‌یابد [۱٦،۱۷]. اگر درمان بیماران دیابتی موجب بهبود این اختلالات شود می‌توان ادعا نمود که عوارض مزمن بیماری دیابت کاهش یابد [۱٤،۱٥].

گیاهان دارویی که در طب سنتی جهت کاهش قند خون مصرف می‌شوند اگر دارای خواص آنتی‌اکسیدانی باشند دارای اهمیت بسزایی هستند و باید مورد توجه قرار گیرند. هندوانه ابوجهل در طب سنتی به عنوان یک داروی کاهش‌دهنده قند خون شناخته شده است لذا در طرح فوق ما تاثیر داروی گیاهی هندوانه ابوجهل را بر غلظت چهار شاخص استرس اکسیداسیون بررسی نمودیم. اگر چه در دو تحقیق آزمایشگاهی خواص آنتی‌اکسیدانی هندوانه ابوجهل گزارش شده است [۸،۹] ولی در تحقیق حاضر تجویز داروی گیاهی

هندوانه ابوجهل به بیماران دیابتی اگر چه موجب بهبود بیماری دیابت شد ولی هیچ‌گونه تغییری در غلظت مارکرهای استرس اکسیداسیون حاصل نشد. در توضیح این نتایج می‌توان ادعا کرد که احتمالاً اثر هندوانه ابوجهل در بهبود بیماری دیابت از طریق سیستم آنتی‌اکسیدانی نبوده و یا دوز مصرفی بالینی در آن حدی نیست که قادر به تاثیرگذاری برسیستم آنتی‌اکسیدانی باشد. به علاوه احتمالاً میزان کاهش قند خون در این بیماران دیابتی به حد کافی نبوده است تا بتواند بر سیستم آنتی‌اکسیدانی تاثیر گذار باشد.

نتیجه‌گیری: تجویز داروی گیاهی هندوانه ابوجهل به بیماران دیابتی موجب بهبود بیماری دیابت شد، ولی هیچ‌گونه تغییری در غلظت مارکرهای استرس اکسیداسیون حاصل نشد. احتمالاً ساز و کار اثر هندوانه ابوجهل در بهبود بیماری دیابت از طریقی غیر از سیستم آنتی‌اکسیدانی است.

منابع

1. Curcio F, Pegoraro L, Dello-Russo P, Falleti E, Perrella G and Ceriello A. 1995. SOD and GSH inhibit the high glucose-induced oxidative damage and PDGF increased secretion in cultured human endothelial cells. Thrombolysis and Hemustasis, 74: 969-973.

2. Dominguz C. Ruiz E, Gussinye M and Carrascosa A. 1998. Oxidative stress at onset and in early stages of type I diabetes in children and adolescents. Diabetes care 22, 870-3.

3. Donnini D, Zambito AM, Perrella G, Ambesi-Impiombato FS and Curcio F. 1996. Glucose may induce cell death through a free radical-mediated mechanism. Biochem Biophys Reasearch communications 219, 412-7.

4. Cignarella A, Nastasi M, Cavalli E and Puglisi L. 1995. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease, which role for oxidative stress? Metabolism 44: 363-8.

5. Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J and Sonksen PH 1996. Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. Clinical science 91, 575-582.

6. Packer L, Rosen P, Tritschler H, King GL and Azzi A (Eds): Antioxidants and Diabetes Management. New York, Marcel Dekker, 2000.

7. Abdel-Hassan IA, Abdel-Barry JA and Tariq Mohammeda S. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol*. 2000; 71: 325-330.

8. Barth A, Muller D and Durrling K. In vitro investigation of a standardized dried extract of *Citrullus colocynthis* on liver toxicity in adult rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2002; 54: 223-230.

9. Gebhardt R. Antioxidative, antiproliferative and biochemical effects in HepG2 cells of a homeopathic remedy and its constituent plant tinctures tested separately or in combination. Arzneimittelforschung. 2003; 53: 823-830.

10. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 1969; 27: 502-522.

11. Uichiyma M and Mihara M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analyt. Biochem.* 1978; 86: 217-278.

12. Cohen G, Dembiec D and Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem*. 1970; 24: 30 – 38.

13. Hermes- Lima M and Storey KB. Antioxidant defenses metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* 1995; 268: 1386-1393.

14. Valabhji J, Avril J. McColl AJ, Richmond W, Schachter M, Rubens MB, Elkeles RS, Total Antioxidant Status and Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes Diabetes Care 24:1608-1613, 2001.

15. Tsai E, Hirsch I, Brunzell J and Chait A Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and

increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes*. 1994; 43: 1010 - 1014.

16. Duman BS, Ozturk M, Yilmazeri S and Hatemi H. Thiols, malonaldehyde and total antioxidant status in the Turkish patients with type 2 diabets mellitus. *Tohoku J. Exp. Med.* 2003; 201: 147 - 155.

17. Dierckx N, Horvath G, Van Gils C, Vertommen J, Van de Vliet J, De Leeuw I and Manuel-y- Keenoy B. Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003; 57: 999-1008.