

تأثير العمر والتدخين وممارسة الرياضة في فعالية انزيم السوربيتول ديهيدروجينيز  
وعامل ارتباط فعاليته ببعض المتغيرات الكيموحيوية في مرضى داء السكري

ماهر عبدالستار الدباغ

د. وسن خيرالله علي

فرع الكيمياء الحياتية/كلية طب الموصل

قسم الكيمياء/كلية العلوم

جامعة الموصل

جامعة الموصل

### ABSTRACT

This research includes a biochemical study of sorbitol dehydrogenase (SDH) in the serum of the control and patient with diabetes mellitus. Their ages ranged between (8-65year) . It has been shown that the mean value of (SDH) activity is  $(0.015 \pm 0.010)$  of the control group and  $(0.516 \pm 0.017)$  of the patient groups .The result shown that significant increase in activiyof (SDH) patient groups and for each sexes when compared with control groups .There was a study of the relationship between (SDH) activity and clinical variables of the control and patient groups by finding the linear correlation was studied. Moreover , there was positive significant correlation between the activity of enzyme and each of glucose , total protein , albumin , globulin , in control and patient groups . Inverse significant correlation between the activity and  $Ca^{++}$  in control and patient groups .

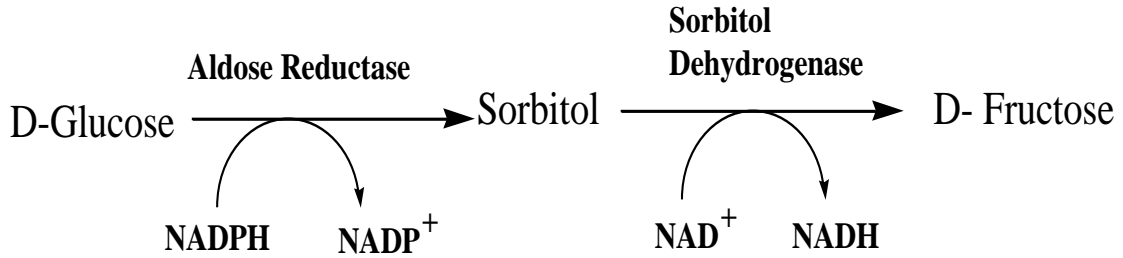
### الملخص

تضمن البحث دراسة كيموحيوية لانزيم السوربيتول ديهيدروجينيز(SDH) وبعض المتغيرات في مصل دم مجاميع السيطرة ومجاميع مرضى داء السكري تراوحت اعمارهم ما بين(8-65 سنة), اذ وجد ان المعدل الكلي لفعالية انزيم (SDH) في مصل دم مجموعة السيطرة هو  $(0.010 \pm 0.015)$  وحدة انزيمية/ مل ) وفي مصل دم مجموعة المرضى  $(0.516 \pm 0.017)$  وحدة انزيمية / مل) . اظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي لفعالية انزيم (SDH) في مجاميع مرضى داء السكري ولكلا الجنسين عند مقارنتهم مع مجاميع السيطرة . وعند دراسة العلاقة الخطية من خلال ايجاد معامل الارتباط الخطي بين فعالية الانزيم وبعض المتغيرات , تبين ارتباط انزيم (SDH) بعلاقة طردية مع كل من سكر الكلوكوز والبروتين الكلي والالبومين والكلوبيولين في مجاميع السيطرة ومجاميع المرضى , وارتباط الانزيم بعلاقة عكسية مع ايون الكالسيوم في مجاميع السيطرة ومجاميع المرضى .

\* Presented at the second conference on Chemistry, University of Mosul, college of Education, 17-18 Novamber-2013.

## المقدمة : Introduction

مسار البوليول (Polyol pathway) هو مسار ثانوي لأيض سكر الكلوكوز، ويتضمن أنزيمين من الأنزيمات المتعاقبة المُسماة (dehydrogenase) وهما على التوالي : Aldose reductase (AR) و Sorbitol dehydrogenase (SDH) (EC 1.1.1.21) و (EC 1.1.1.14). إن تدفق مسار البوليول في الظروف الطبيعية قليل ولكن أنزيم (SDH) سيزداد في حالة الإصابة بداء سكر الدم، أي أن تدفق مسار البوليول سيزداد وبمعنى آخر أن هنالك إرتفاعاً لعملية أيض الكربوهيدرات (Glycolysis) عن المستوى الطبيعي، إن هذه الزيادة قد تؤدي إلى تراكم وسطي لمادة السوربيتول والذي يكون غير قادر على عبور أغشية الخلايا. الزيادة الكبيرة في تركيز مسار البوليول يمكن أن يؤدي إلى إختلال التوازن التناضحي (Osmotic imbalance) والتي تعمل على تشرب الخلايا للماء من خارج الخلية إلى الداخل مسببة إنتفاخ الخلية (1)



### أنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز (SDH): Sorbitol dehydrogenase

يُصنف أنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز الذي يرمز له بالرمز (SDH) ضمن عائلة أنزيمات منزوعة الهيدروجين (dehydrogenase) وهي من أنزيمات الأكسدة والإختزال، وهو الأنزيم الثاني في مسار البوليول إذ يعمل على أكسدة مركب السوربيتول وتحويله إلى سكر الفركتوز بوجود (NAD<sup>+</sup>) (2)، لذا فإن إرتفاع فعالية أنزيم (SDH) تؤدي إلى زيادة في تكوين الفركتوز الذي يكون السبب الرئيس لمضاعفات داء السكر (3). ويُعد أنزيم (SDH) من الأنزيمات المعدنية (Metallo enzyme)، إذ يحتوي على عنصر الزنك (الخاصين) بوصفه عاملاً مساعداً (Catalyst) (4)، وإن الترتيب الهندسي للأنزيم الذي أشار إليه الباحث Thomas وجماعته (5) يؤكد إرتباط الأنزيم بأربع ذرات زنك (لكل وحدة من الأنزيم ذرة زنك واحدة) في المناطق الفعالة للأنزيم. يوجد الأنزيم بشكل رباعي الوحدات (Tetrameric) أكثر من الشكل الثنائي (Dimeric) (6)، وإن الوزن الجزيئي التقريبي للأنزيم (SDH) يتراوح ما بين (32000–38000 دالتون) (7)

## طريقة العمل

### النماذج المستخدمة: Specimens used

نماذج المصل : The serum samples

1. مجموعة السيطرة : Control group

جُمعت في الدراسة الحالية 97 عينة دم لمتبرعين أصحاء تراوحت أعمارهم ما بين 8-65 سنة، 52 عينة من الذكور و45 عينة من الإناث.

2. مجموعة المرضى : Patients group

جُمعت 180 عينة دم لمرضى مصابين بالسكري تراوحت أعمارهم ما بين 6-82 سنة، 104 عينة من الذكور و 76 عينة من الإناث، جُمعت من مركز الوفاء التخصصي لمرضى السكري ومستشفى الخنساء التعليمي في الموصل.

تقدير فعالية أنزيم السوربيتول ديهيدروجينيز في المصل :

### Estimation of sorbitol dehydrogenase activity in serum

تم تقدير فعالية الانزيم بطريقة الباحث (8).

تقدير مستوى الكلوكوز في المصل : Estimation of Glucose in Serum

قُدِّر مستوى الكلوكوز في مصل الدم باستخدام عِدَّة التحليل الخاصة (Kit) نوع RANDOX (United Kingdom) وهي طريقة أنزيمية.

تقدير البروتين الكلي في المصل : Estimation of total protein in serum

قُدِّر البروتين الكلي في مصل الدم باستخدام عِدَّة القياس الجاهزة (Kit) من شركة (BIOLABO)

تقدير الألبومين في المصل : Estimation of albumin in serum

قُدِّر تركيز الألبومين باستخدام طريقة بروموكريسول الأخضر (Bromo cresol green method) التي إستخدمت فيها عِدَّة التحاليل القياسية الجاهزة من شركة (BIOLABO) الفرنسية

تقدير الكلوبولين في المصل : Estimation of globulin in serum

حُسِب مقدار الكلوبولين بعد إيجاد تركيز البروتين الكلي والألبومين وذلك حسب المعادلة الآتية:

الكلي. البروتين = الألبومين + الكلوبولين

تركيز الكلوبولين = تركيز البروتين الكلي - تركيز الألبومين (9)

## تقدير تركيز الكالسيوم في المصل :

### Estimation of calcium concentration in serum

قُدِّر تركيز الكالسيوم باستخدام الطريقة اللونية (Colorimetric methods) وإستخدمت لذلك عدة القياس الجاهزة من شركة (BIOLABO) الفرنسية  
تم تحليل جميع نتائج الفحوصات السريرية باستخدام البرنامج الإحصائي (SPSS10) (10; 11) وذلك باستخدام : - إختبار T (T-test) للمقارنة بين متغيرين ، وإيجاد الإختلاف بين القيم التي ظهرت من خلال القيمة الإحتمالية P (p-value) التي عُدَّت عند مستوى الإحتمالية ( $p \leq 0.05$ ) إختلافاً معنوياً (Significant) وعند ( $p > 0.05$ ) إختلافاً غير معنوي.

- إيجاد مُعامل الارتباط الخطي (Linear correlation coefficient) لإيجاد العلاقة بين أنزيم (SDH) والمتغيرات السريرية المقاسة لمجموعتي السيطرة ومجاميع المرضى طردية كانت أم عكسية.

## النتائج والمناقشة : Results and Discussion

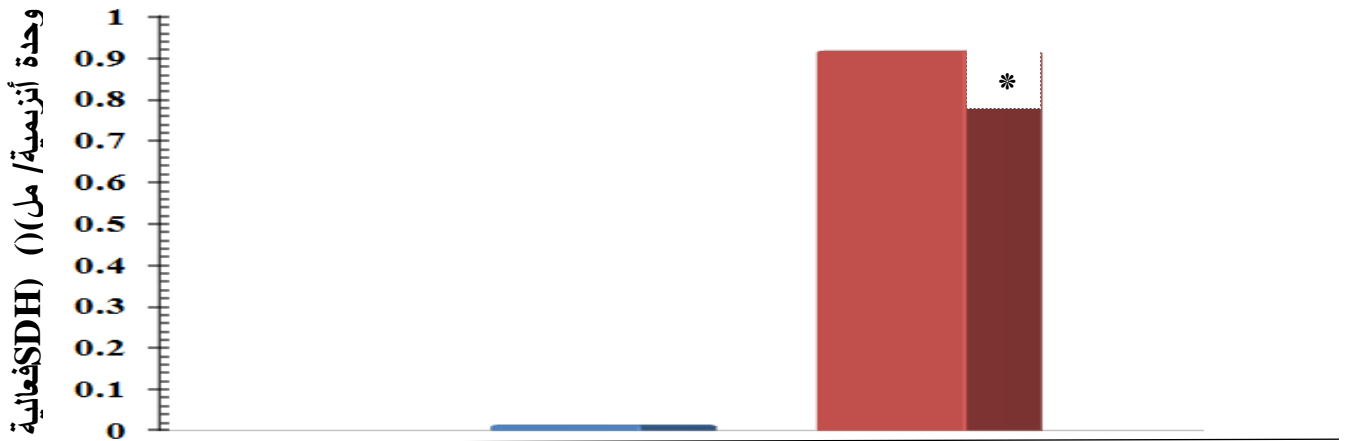
### فعالية أنزيم (SDH) في مصل مجموعة السيطرة ومجموعة المرضى :

دُونت المعلومات اللازمة في هذه الدراسة في إستمارة الاستبيان الخاصة وقُسمت نماذج مرضى السكري إلى اربعة مجاميع تراوحت أعمارهم ما بين 6-82 سنة من كلا الجنسين (104 عينة من الذكور و 76 عينة من الإناث) وإذ صُنفت المجموعة الأولى للمرضى الذين يعتمدون في علاجهم على حُقن الأنسولين فقط والمعروف بسكري النوع الأول، وصُنفت المجموعة الثانية للمرضى الذين يعتمدون في علاجهم على الحبوب فقط لعلاج داء السكر وهو المعروف بسكري النوع الثاني، في حين صُنفت المجموعة الثالثة لسكري الحمل حصراً، شملت المجموعة الرابعة للمرضى الذين يعتمدون في علاجهم على الحبوب والحُقن، إذ قُدِّرت فعالية أنزيم (SDH) في مصل أشخاص أصحاء غير مصابين بأي مرض يذكر إعتبروا مجموعة سيطرة، وكما هو موضح في الجدول (1) والشكل (1)، إذ لوحظ وجود إرتفاع معنوي في فعالية أنزيم (SDH) في مصل الأشخاص المصابين بداء السكري في المجاميع الأربعة عند مقارنتهم مع مجموعة السيطرة، قد يعود السبب في ذلك إلى زيادة تدفق سكر الكلوكوز إلى مسار البولبول في مرضى السكري مما يؤدي إلى زيادة في فعالية أنزيم (SDH) الذي يقوم بتحويل مُركب السوربيتول إلى سكر الفركتوز، وهذا يتفق مع ما ذكره كل من الباحثون : (15 ; 16 ; 14 ; 13 ; 12).

الجدول (1) : فعالية أنزيم (SDH) في مصل مجموعة المرضى مقارنة بمصل مجموعة السيطرة

تركيز الكلوكونز Mean ± (ملغم/100مل) S.D	فعالية أنزيم (SDH) (وحدة أنزيمية/مل) * Mean ± S.D	العدد N	المجاميع
6.078 ± 0.089	0.015 ± 0.01	14	المعدل الكلي لمجموعة السيطرة
12.381 ± 7.383	787.1.399 ± 0	12	مجموعة المرضى الأولى
11.329 ± 5.000	1.292 ± 0.545	11	مجموعة المرضى الثانية
7.522 ± 3.097	233.0.439 ± 0	10	مجموعة المرضى الثالثة
13.600 ± 5.259	0.538 ± 0.499	13	مجموعة المرضى الرابعة
11.223 ± 5.184	0.917 ± 0.516	12	المعدل الكلي لمجاميع المرضى

- الوحدة الأنزيمية (U): كمية الأنزيم التي تعمل على تحويل مايكرو مول واحد من مادة الأساس إلى ناتج في الدقيقة الواحدة لكل ملتر من المصل.



● معدل مجموعة السيطرة ● معدل مجاميع المرضى ●

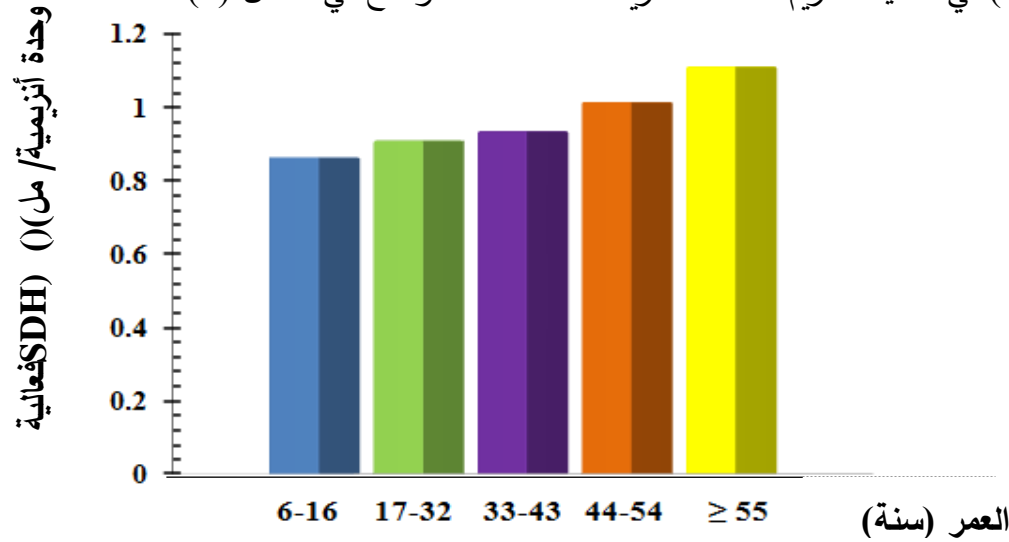
\* (P ≤ 0.05) Significant

الشكل (1) : فعالية أنزيم (SDH) في مصل مجموعة المرضى مقارنة بمصل مجموعة السيطرة

## دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية أنزيم (SDH) في مصل مجموعة السيطرة والمرضى :

### تأثير العمر : Effect of age

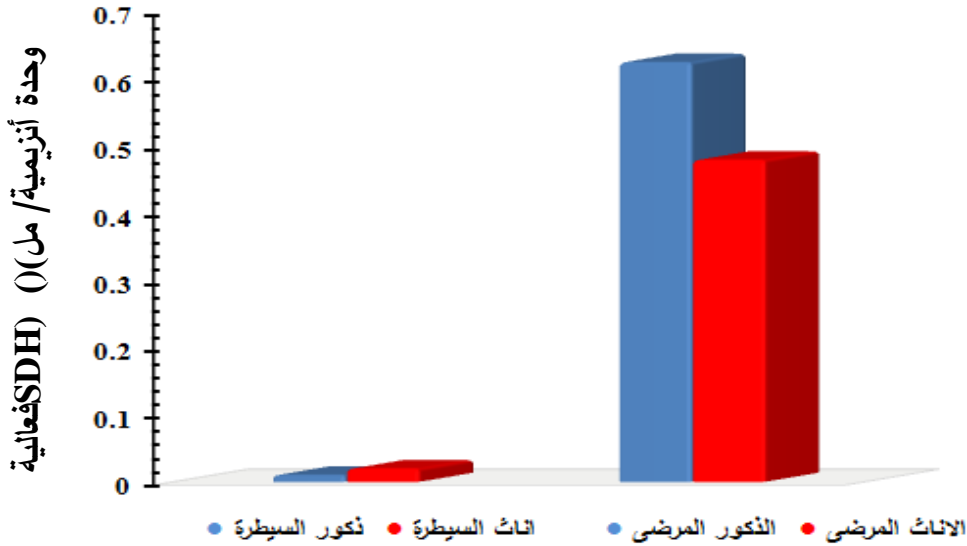
تم تقسيم المرضى المصابين بداء السكري إلى خمس فئات عمرية وقد لوحظ زيادة قيم فعالية الأنزيم مع التقدم بالعمر، في حين لم يظهر وجود فرق معنوي عند مستوى الإحتمالية ( $P \leq 0.05$ ) في فعالية الأنزيم للفئات العمرية الخمسة، كما موضح في الشكل (2).



الشكل (2) : فعالية أنزيم (SDH) في مصل مجموعة المرضى حسب العمر

### تأثير الجنس : Effect of Gender

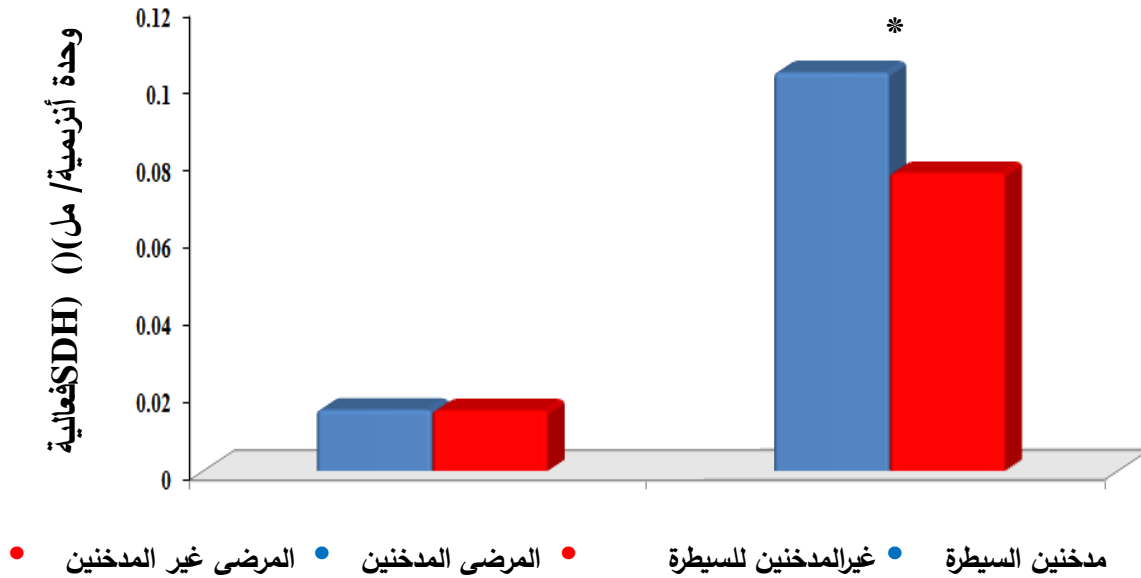
أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (3) عدم وجود فرق معنوي عند مستوى الإحتمالية ( $P \leq 0.05$ ) في فعالية أنزيم (SDH) في مصل مجموعة السيطرة ومجموعة المرضى بين الذكور والإناث، إذ كان معدل فعالية الأنزيم في مصل مجموعة السيطرة للذكور والإناث على التوالي  $(0.019 \pm 0.010)$  و  $(0.010 \pm 0.007)$ ، في حين كان معدل فعالية أنزيم (SDH) في مصل مجموعة المرضى للذكور والإناث  $(1.211 \pm 0.625)$  و  $(1.020 \pm 0.480)$  على التوالي، مما يدل على عدم تأثر فعالية أنزيم (SDH) بالجنس، وهذا يتفق مع ما ذكره (17) من أن فعالية الأنزيم لا تتأثر بالجنس.



الشكل (3): فعالية أنزيم (SDH) في مصّل مجموعة المرضى مُقارنة بمجاميع السيطرة حسب الجنس

#### تأثير التدخين : Effect of Smoking

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4) عدم وجود فرق معنوي عند مستوى الاحتمالية ( $P \leq 0.05$ ) في فعالية أنزيم (SDH) في مصّل مجموعة السيطرة للمُدخنين وغير المُدخنين. في حين لوحظ وجود إرتفاع معنوي في فعالية أنزيم (SDH) في مصّل مجموعة مرضى المُدخنين عن غير المُدخنين.



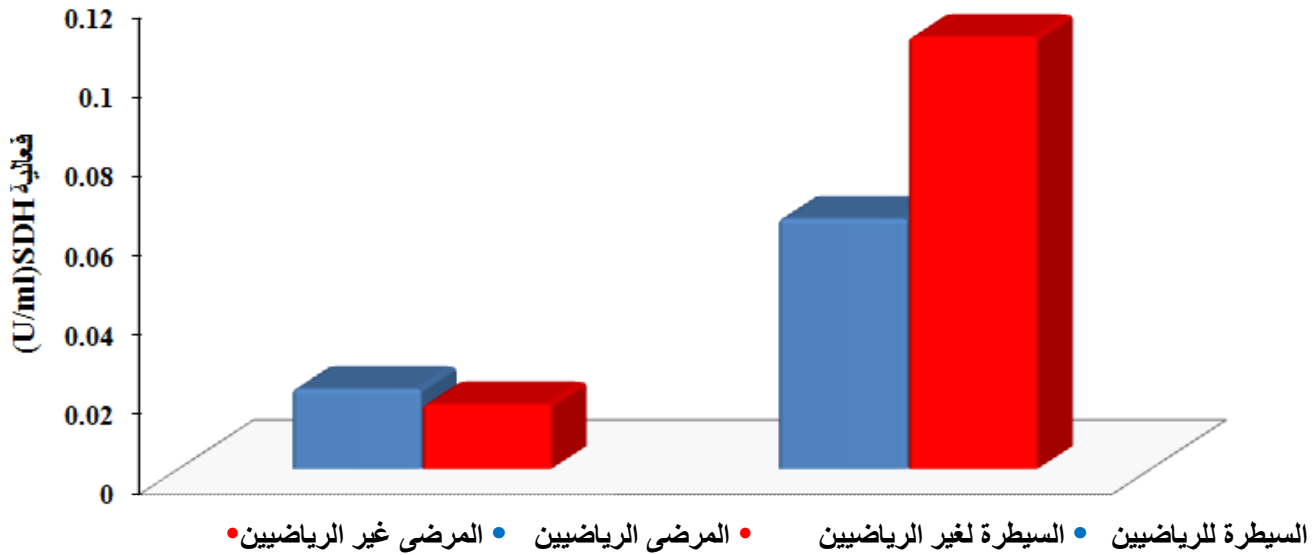
Significant at ( $P \leq 0.05$ ) \*

الشكل (4) : تأثير التدخين على فعالية أنزيم (SDH) في مصّل مجموعة المرضى مُقارنة بمجاميع السيطرة

أوضح الباحثون (19 ; 18)، أن ظاهرة مُمارسة التدخين قد تزيد من أخطار ومضاعفات مرض السكري، وكذلك مايرتبط بها من أمراض القلب والأوعية الدموية (20; 21) وأمراض الشريان التاجي والإعتلال العصبي والجلطة الدماغية (22, ; 23 ; 24). بالنسبة لمرضى السكر، يؤدي دخان السكائر إلى التقليل من مستوى السيطرة على سكر الكلوکوز بالدم ويزيد من مقاومة هورمون الأنسولين (insulin resistance)، كذلك يعمل على زيادة إرتباطه بالبروتينات (Glycosylation) وبالتالي زيادة مستوى الهيموكلوبين المُسكر في بعض من اجزاء الجسم والمُسمى (HbA1C) (25 ; 26).

#### تأثير ممارسة الرياضة : Effect of exercise

يُبين الشكل (5) وجود انخفاض معنوي في فعالية أنزيم (SDH) في مصل مجموعة الأشخاص الذين يُمارسون الرياضة عند مقارنتهم مع مجموعة الأشخاص غير الممارسين للرياضة، قد يعود سبب ذلك إلى زيادة إستهلاك سكر الكلوکوز لدى الأشخاص الرياضيين أكثر من الأشخاص غير الرياضيين، ومن ثَمَّ تقل نسبة تدفق سكر الكلوکوز إلى مسار البوليلول وبالنتيجة تنخفض فعالية أنزيم (SDH)، وهذا ما أوضحه الباحثون: (27 ; 28 ; 29).



Significant at (P≤0.05)\*

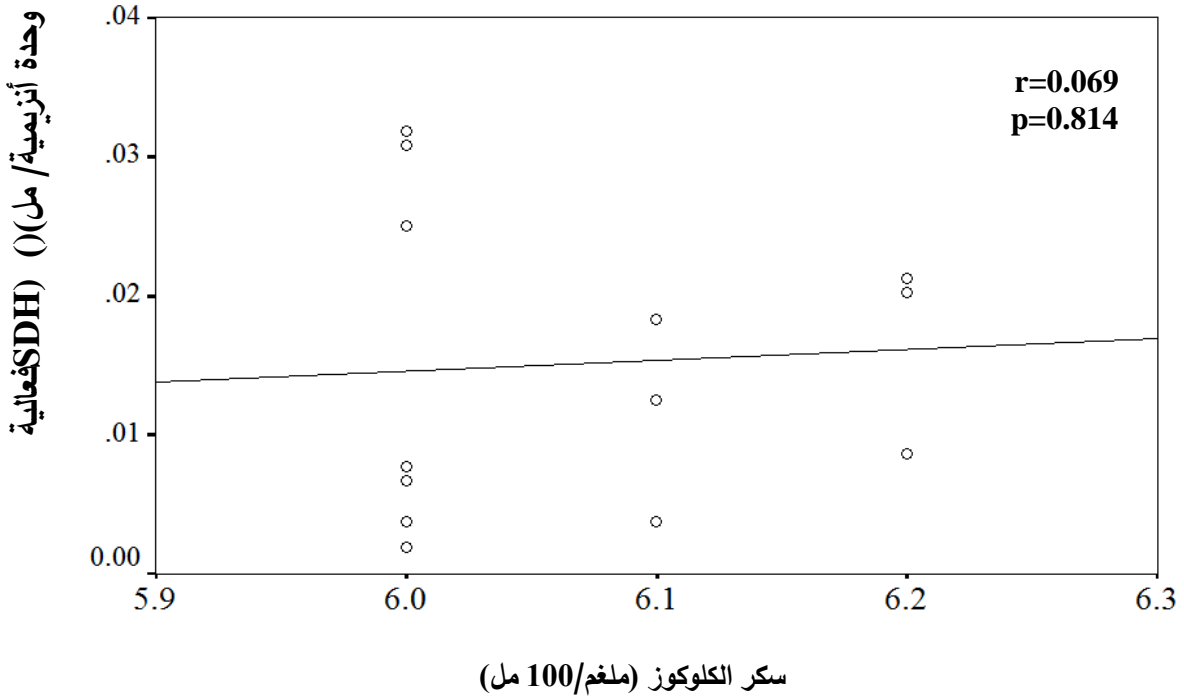
الشكل (5) : تأثير ممارسة الرياضة في فعالية أنزيم (SDH) في مصل مجموعة المرضى مقارنة بمصل مجاميع السيطرة



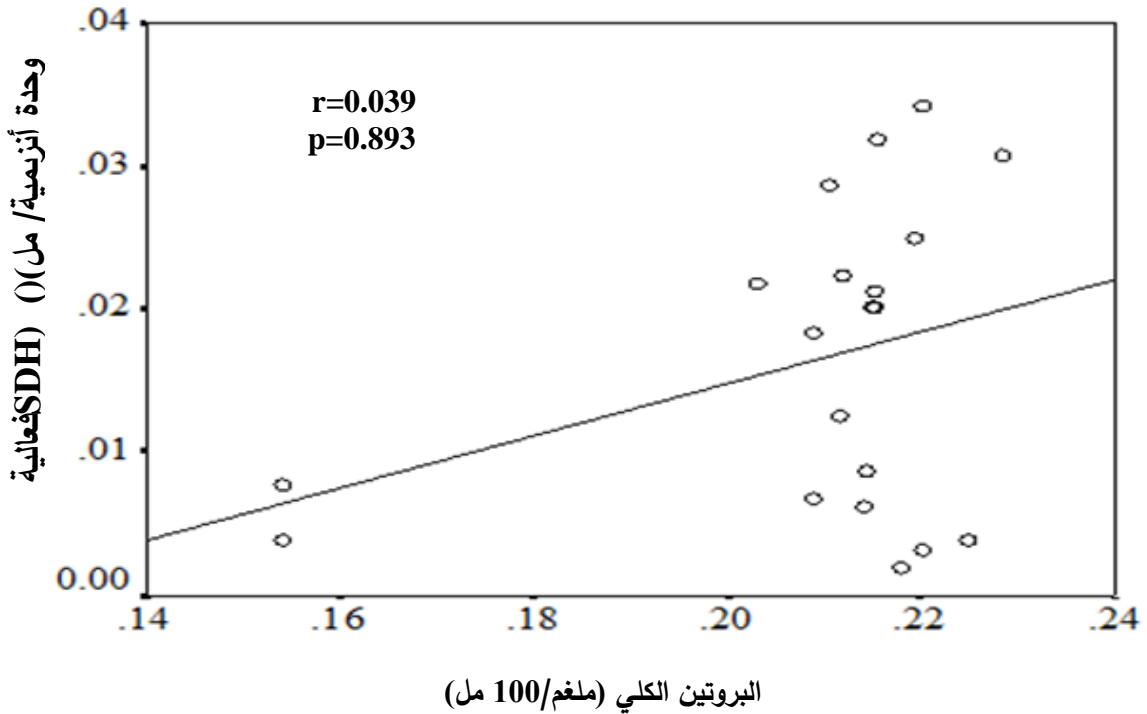
إن ممارسة الرياضة مهمة جداً في التنظيم والسيطرة على مستوى سكر الكلوكوز في الدم وخاصة المرضى المُصابين بالسكري النوع الثاني، إذ تُساعد هذه التمارين على تطوير وتحسين عمل الأنسولين بالجسم، حرق الدهون الزائدة في الجسم وبالتالي تُساعد على خفض وزن الجسم، وكذلك تحسين حساسية الأنسولين (Insulin sensitivity)، وتطوير قوة العضلات، وزيادة كثافة العظام وقوتها، وخفض ضغط الدم، والمُساعدة على توفير المناعة والحماية اللازمة ضد امراض القلب والدم عن طريق خفض الكوليسترول الضار (LDL)، وتحسين الدورة الدموية وخفض حالات الاصابة بالازمات القلبية، بالاضافة إلى زيادة مستوى الطاقة وتعزيز قدرة نشاط الجسم، الحد من الاجهاد وتعزيز حالة الاسترخاء والتقليل من حالات التوتر والقلق والكآبة (30). حيث ان ممارسة الرياضة تتطلب توفير طاقة إضافية (على شكل كلوكوز) لكي يتم تجهيزها إلى العضلات لإجراء عمليات النقل والانبساط، إذ ان ممارسة التمارين الرياضية المكثفة تعمل على إطلاق هورمونات الإجهاد (Stress hormones). تجدر الاشارة، ان مُمارسة الرياضة يُمكن أن يكون لها تأثير عكسي إذ تزداد مستويات الكلوكوز بالدم وبشكل مؤقت بالنسبة للأشخاص المصابين بالسكري بعد إنقطاعهم عن ممارسة الرياضة (31).

### العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) وعدد من المتغيرات لدى مجموعتي السيطرة والمرضى:

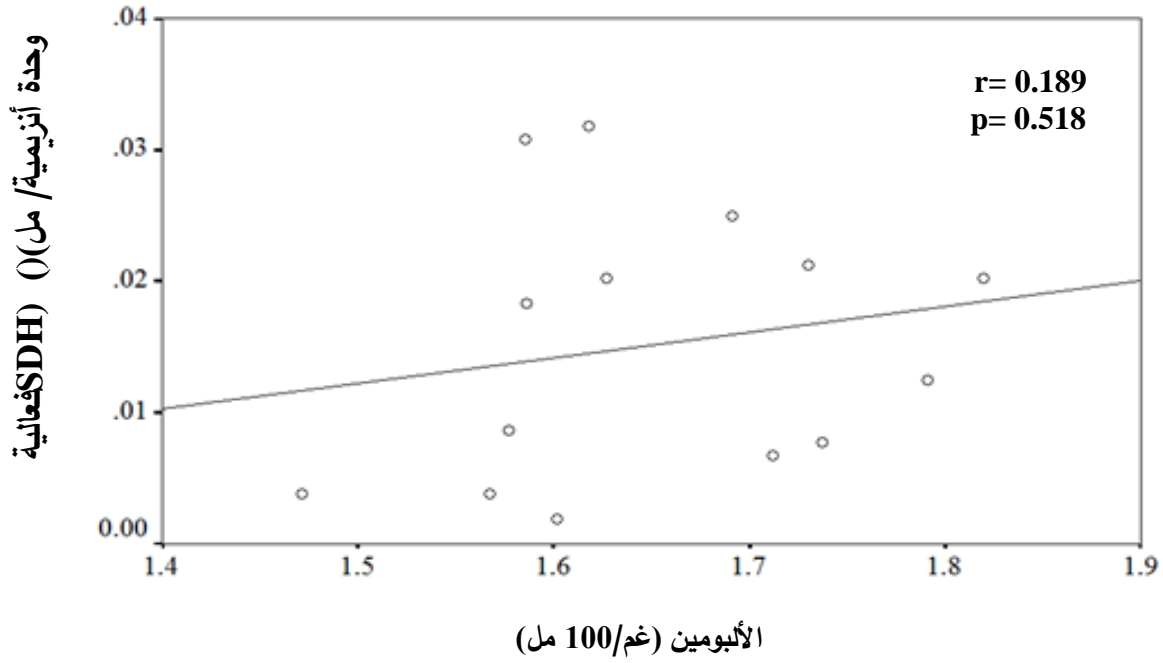
لإيجاد العلاقة بين فعالية أنزيم (SDH) وعدد من المتغيرات السريرية المقاسة لدى مجموعتي السيطرة والمرضى، تم إيجاد مُعامل الارتباط الخطي ("Correlation").  
r " coefficient إذ لُوحظ وجود علاقة طردية بين فعالية أنزيم (SDH) مع كل من مُستوى الكلوكوز والبروتين الكلي والألبومين والكلوبيولين في مصل مجموعة السيطرة، كما مُوضح في الأشكال (6) و (7) و (8) و (9) على التوالي.



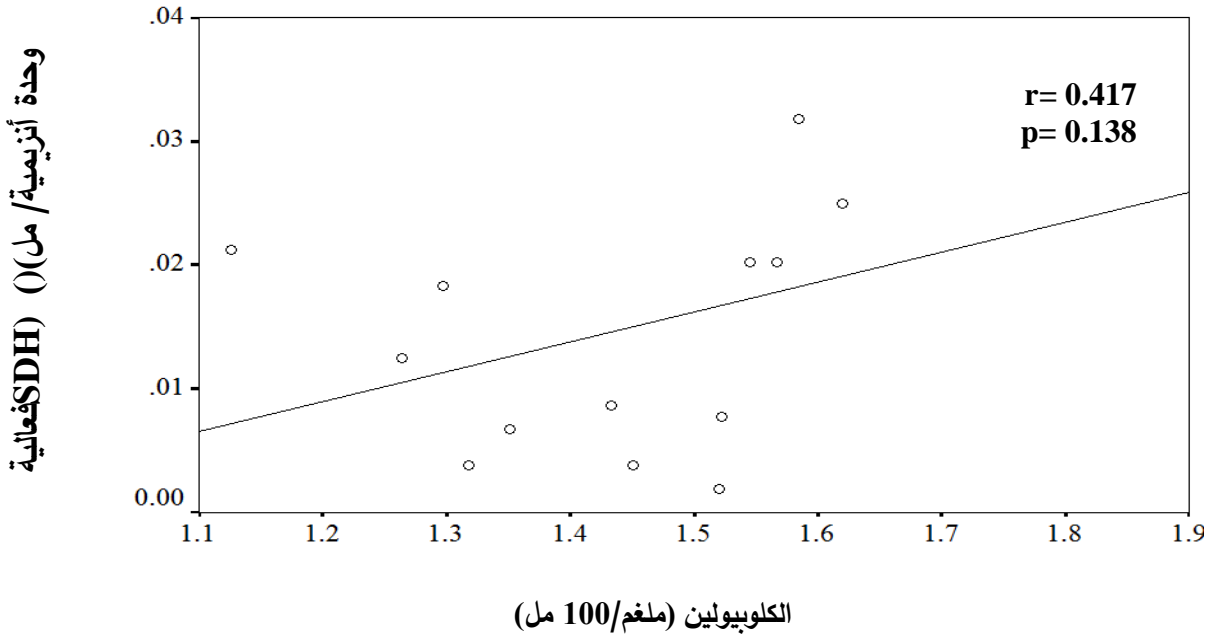
الشكل (6) : العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى الكلوكوز في مصل مجموعة السيطرة



الشكل (7) : العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى البروتين الكلي في مجموعة السيطرة

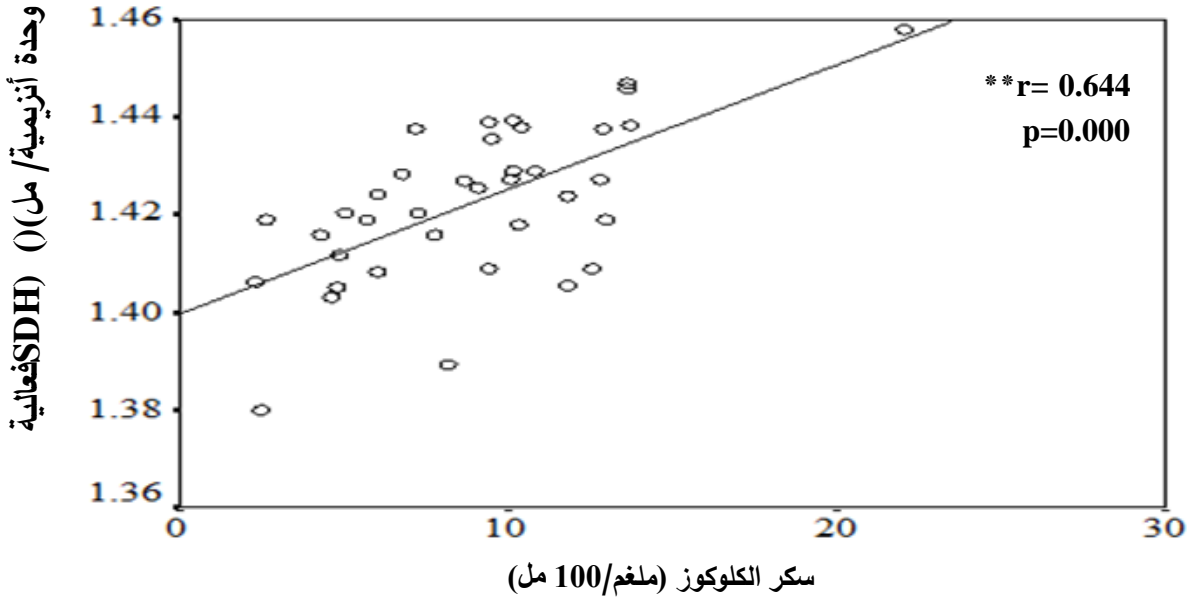


الشكل (8) : العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى الألبومين في مصم مجموعة السيطرة

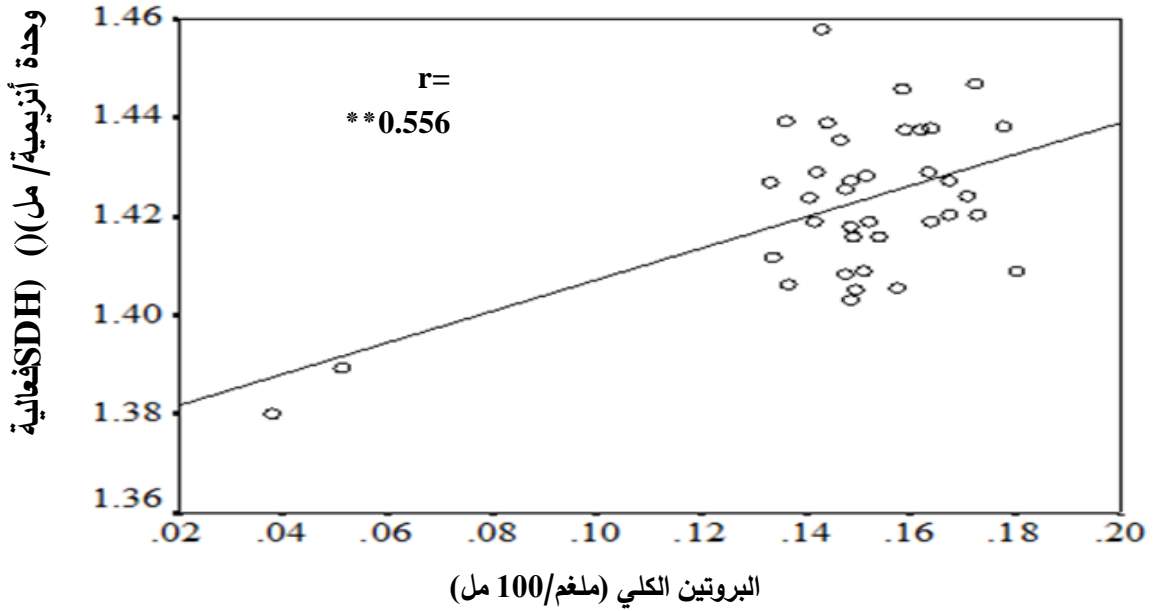


الشكل (9) : العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى الكلوبولين في مصم مجموعة السيطرة

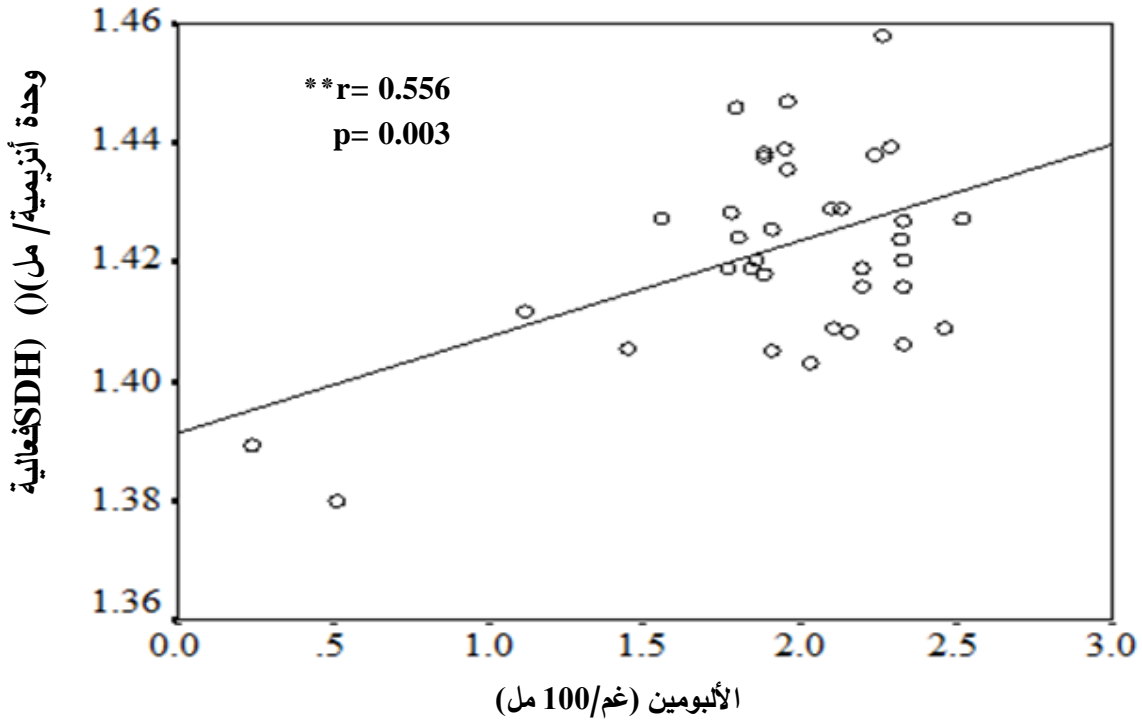
وقد لُوحظ في مجموعة المرضى وجود علاقة طردية معنوية عند مُستوى الاحتمالية ( $P \leq 0.001$ ) بين فعالية أنزيم (SDH) مع كل من الكلوكوز والبروتين الكلي والألبومين والكلوبولين، كما مُوضح في الأشكال (10) و (11) و (12) و (13) على التوالي.



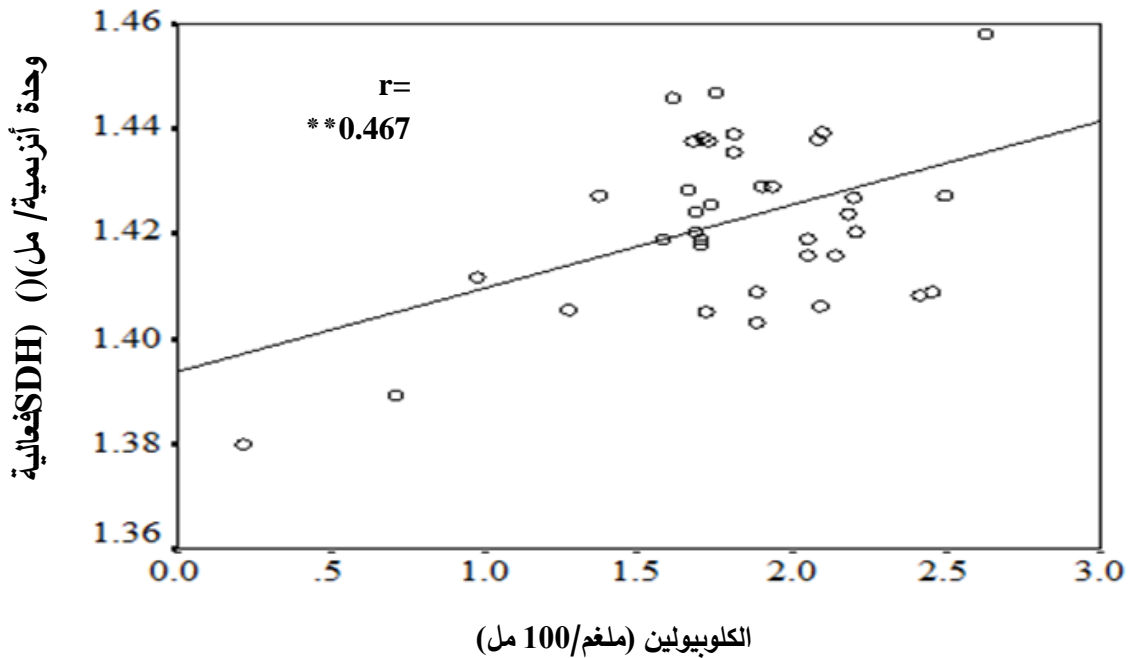
الشكل (10) : العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى الكلوكوز في مصل مجموعة المرضى



الشكل (11): العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى البروتين الكلي في مجموعة المرضى

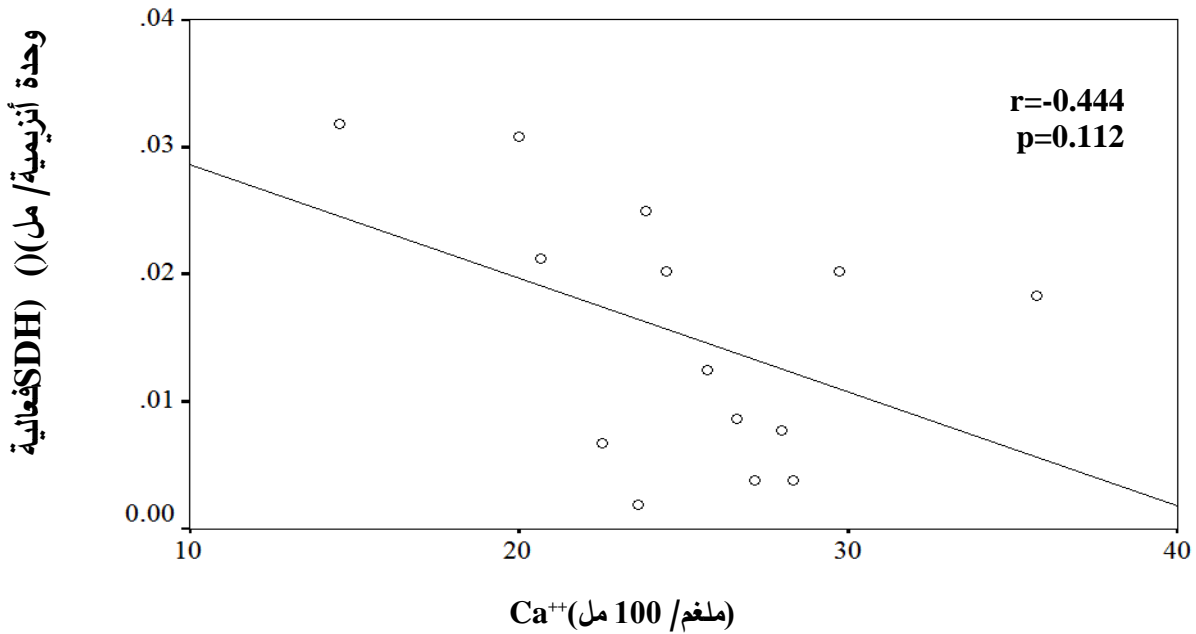


الشكل (12) : العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى الألبومين في مصل مجموعة المرضى

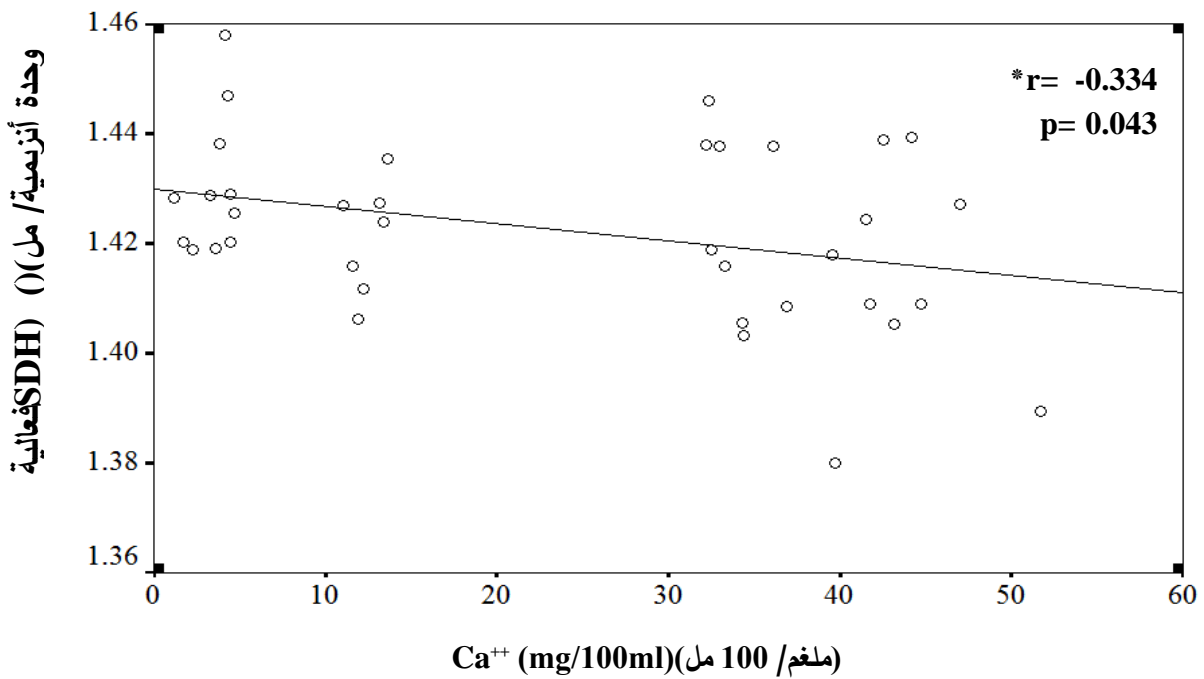


الشكل (13) : العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى الكلوبيولين في مجموعة المرضى

كما نلاحظ في الشكل (14) و (15)، وجود علاقة عكسية بين فعالية أنزيم (SDH) وتركيز أيون الكالسيوم ( $Ca^{++}$ ) في مصل مجموعة مرضى السكري مقارنة مع مستواه لدى مجموعة السيطرة .



الشكل (14) : العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى Ca<sup>++</sup> في مجموعة السيطرة



الشكل (15) : العلاقة الخطية بين فعالية أنزيم (SDH) ومستوى Ca<sup>++</sup> في مجموعة المرضى

وهذا يتفق مع ما وجدته كل من الباحثون (34, 33, 32)، كما فسّر الباحث Olukooa وجماعته (35) وذلك على أساس حدوث خلل أو تداخل في توازن سكر الكلوكوز (Glucose homeostasis) مع مخلفات أيض العناصر المعدنية (Mineral metabolism remains).

أشارت العديد من البحوث الحديثة إلى وجود تغير في عملية أيض الكالسيوم لدى مرضى داء السكر

(36 ; 37 ; 38). كما تم ملاحظة فرط كالسيوم الدم (Hypercalcemia) وخاصةً لدى مرضى النوع الثاني (39) بسبب وجود زيادة في تدفق الكالوكوز إلى خارج الخلية وذلك لحدوث تفاعلات عديدة بين ( $Ca^{++}$ ) والتمثيل الغذائي لهورمون الأنسولين عن طريق تحول (Pro-insulin) إلى هورمون الأنسولين أو إلى مايسمى بقبالية تحمل ألكوكوز Glucose (tolerance) في الانسان أو الحيوانات المختبرية (40)، كما أشار الباحثين (40 ; 41) إلى أن فرط كالسيوم الدم يحدث نتيجة لمقاومة هورمون الأنسولين.

## References

- 1) Hoeldtke, R.D. ; Bryner, K.D. ; McNeill, D.R. ; Warehime, S.S.; Van Dyke, K.; Hobbs, G. J. Clin. Endocrinol . Metab. 88, 1624–1628 (2003) .
- 2) Williams, MA. ; Qiu, C. ; Dempsey, JC. ; Luthy, DA. The Journal of Reproductive Medicine. 48 (12):955–962 (2003) .
- 3) Hoshi, A.; Takahashi, M.; Fujii, J.; Myint, T.; Kaneto, H.; Suzuki, K.; Yamasaki, Y.; Kamada, T.; Taniguchi, N. Biochem. J. 318: 119–123 (1996) .
- 4) Branden, C. I.; Jornvall,H.; Eklund, H. ; Furugren, B. in Boyer, P.D. (ed.), The Enzymes, 3rd edn., Vol. 11, Academic Press, NY, pp. 103–190 (1975) .
- 5) Thomas, A. P.; Jennifer, L.; Ekstrom, D. ;Beebe, A.; Boris, C.; David, C.; Matthew, G.; Ajith, K.; Edward, S. L.; Rebecca, M.; Dewitt, M. X-Ray Crystallographic and Kinetic Studies of Human Sorbitol Dehydrogenase. Exploratory Medicinal Sciences, Groton. California, Structure, Vol. 11, No. 9. pp. 1071–1085 (2003).
- 6) Jeffery,J. ; Cummins,L. ; Carlquist,M. ; Jornvall,H. Eur. J. Biochem. FEBS 120, 229–234 (1981) .
- 7) Maret, W. & Auld, D. S. Biochemistry. 27, 1622–1628 (1988) .
- 8) Gerlach, U. & Hiby,W. Analysis, 2, pp. 569–573 .Bergmeyer, H.U.,VCH, Weinheim, FRG(1974) .
- 9) Scimone, J. & Rothstein, R. Laboratory Manual of Clinical Chemistry.AVI publishing company, Inc., U.S.A., p. 60 –63(1978).
- 10) Hinton, P. R. Statistics explained. 2nd Eddition by Routledge. Printed in the USA and Canada. p.85,125 (2004) .

- 11) Indrayan, A. & Sarmukaddam, S. B. Medical Biostatics. Morcel Dekker, Inc, USA. : pp. 299,303,405 (2001) .
- 12) Dixon ,D. G. ; Hodson, P. V.; Kaiser, K. L. E. Environmental Toxicology and Chemistry. p 685–696( 2009) .
- 13) Wu, L. Y.; Juan, C. C.; Ho, L. T.; Hsu, Y. P.; Hwang, L.S. Taiwan Vol. 52, Issue 3, p 643– 648 (2004) .
- 14) Green, DA. & Stevens, MJ. The sorbitol – osmotic and sorbitol redox hypotheses. In Le Roith D, Taylor SI, Olefsky JM, (eds). Diabetes Mellitus. Lippincott– Raven Publishers, Philadelphia (1996) .
- 15) Tilton, RG. ; Baier, LD. ; Harlow, JE. ; Smith, SR. ; Ostrow, E. ; Williamson, JR. Kidney Int 41: 778–88 (1992) .
- 16) Dvornik, D. Aldose Reductase Inhibition: an Approach to the prevention of diabetic Complications. McGraw Hill , New York, p 368 (1987).
- 17) Manjunatha G. B.K.; Deepa,K.; Sarsina, D. O.; Poornima, A. M.; Nandini, M.; Asha, K. International Journal of Pharma and Bio Sciences. Vol.1/Issue (. 2010) .
- 18) Rimm, E. B.; Chan, J.; Stampfer, M. J.; Colditz, G. A.; Willett, W. C.. British Medical Journal 310: 555–559 (1995) .
- 19) Rimm,E.B.; Manson,J.E.; Stampfer,M.J.; Colditz,G.A.; Willett,W.C.; Rosner,B.; Hennekens,C.H.; Speizer,F.E. American Journal of Public Health Vol. 83, No. 2, pp. 211–214 (1993) .
- 20) Stamler, J.; Vaccaro, O.; Neaton, JD.; Wentworth, D. Diabetes Care 16:434–444 (1993) .
- 21) Moy, CS.; LaPorte, RE.; Dorman, JS.; Songer, TJ.; Orchard, TJ.; Kuller, LH.; Becker, DJ. Drash, AL. Insulin–dependent diabetes mellitus mortality: The risk of cigarette smoking. Circulation ; 82:37–43 (1990).
- 22) Meigs, J.B.; MPH, MD.; Daniel, E. S.; Lisa, M. S.; Kimberly, A. D.; Ralph, B. D.; David, M. N.; Edward, H. W.; Sherrie, H. K.; Sheldon G.. The American Journal of Medicine, Vol. 102, Issue 1, p 38–47 (1997) .



- 23) Tuomilehto, J.; Rastenyte, D.; Jousilahti, P.; Sarti, C.; Vartiainen, E..Diabetes Mellitus as a risk factor for death from stroke: prospective study of the middle- aged Finnish population. Stroke 27: 210 – 215 (1996).
- 24) Sawicki, P.. Smoking is associated with progression of diabeticnephropathy Diabetes Care 17: 126–131 (1994).
- 25) Solberg,L.I.; Desai,J.R.; O’Connor,P.J; Bishop,D.B; Devlin,H.M.. Annals of Family Medicine 2 (1)26–32 (2004) .
- 26) Ronnema, T.; Ronnema, EM.; Puukka, P.; Pyorala, K.; Laakso, M... Diabetes Care 19: 1229–1232 (1996).
- 27) Michaud, T. J. ; Bachmann, K. A. ; Andres, F. F. ; Flynn, M. G. Sherman, G. P. ; Rodriguez–Zayas, J. Med. Sci. Sports Exerc. 26:978–982 (1994) .
- 28) Frenkl, R. ; Gyore, A. ; Szeberenyi S. Eur. J. Appl. Physiol. 44: 135–140 (1980) .
- 29) Ducry, J. J. ; Howald, H.; Zysset, T. ; Bircher J. Dig. Dis. 24:192–196 (1979) .
- 30) Sigal, RJ.; Kenny, GP.; Wasserman, DH.; Castaneda–Sceppa, C.; White, RD. Diabetes Care. 29:1433–8 (2006) .
- 31) Bronwyn, P. Exercise Physiologist, Diabetes Australia – NSW, Sydney Prescribing exercise for diabetes. Vol.30:130–3 (2007).
- 32) Van Dam, RM.; Hu, FB.; Rosenberg, L. Diabetes Care.; 29 (10):p 2238–2243 (2006) .
- 33) Pittas, AG.; Dawson-Hughes, B.; Li, T. Diabetes Care.29 (3): 650–656 (2006).
- 34) McNair, P.; Madshad, S.; Christensen, M.S.; Faber, O.K.; Binder, C.; Transbol, I. Acta Endocrinol. 90: 463–9 (1979) .
- 35) Olukooa, A.O.; Adewoye, H.O.; Erasmus, R.Y. Cen Afr J Med, 34 (4): 378–83 (1989) .
- 36) Ishimura, E.; Nishizaw, R.; Koyama, H.; Shoji, S.; Inaba, M.; Morii, H. Miner Electrolyte Metab. 21(1–3): 205–10 (1995) .

- 37) Kawagishi, T.; Seklya, K.; Okuno, Y.; Miki, T.; Nishizawa, Y.; Morii, H. *J Nutr Sci Vitaminol*. 37 (suppl): 551–6 (1991) .
- 38) Auwera, J.; Deqacker, J.; Bouillon, R.; Geusens, P.; Nijs, J. *Diabetes*. 37: 8–12 (1988) .
- 39) Chen, M.D.; Lin, P.R.; Tsou, C.T.; Wang, J.J.; Lin, W.H. *Biol Trace Elem Res*. 50 (2): 119–24 (1995).
- 40) Resnick, L.M. *Diabetes Care*. 14 (6): 505–20 (1991).
- 41) Draznin, B.; Sussman, K.E.; Eckel, R.H.; Kao, M.; Rosi, T.; Sherman, N.A. *J Clin Invest*. 82: 1848–52 (1988) .