

## ارزیابی وضعیت هموسیستین پلاسما در بیماری دیابت ملیتوس القاء شده با استرپتوزوتوسین در خرگوش

کاوه عظیم زاده<sup>۱\*</sup>، سیامک عصری رضائی<sup>۲</sup>، شهاب الدین صافی<sup>۱</sup>، ایرج سهرابی حقدوست<sup>۱</sup>، مجید ابراهیمی حامد<sup>۳</sup>

۱. گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲. گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه اورمی، اورمی، ایران

۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اورمی، اورمی، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات: [kn\\_az@yahoo.com](mailto:kn_az@yahoo.com)

(دریافت مقاله: ۸۷/۹/۵، پذیرش نهایی: ۸۸/۷/۶)

### چکیده

در این تحقیق مقادیر هموسیستین پلاسما، به‌عنوان یک ریسک فاکتور مستقل در بیماری‌های قلبی-عروقی، در دیابت القائی ناشی از استرپتوزوتوسین در خرگوش سفید نیوزیلندی مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق ۱۲ سر خرگوش نر سفید نیوزیلندی انتخاب و به ۲ گروه مجزا (تیمار و شاهد) تقسیم گردید. پس از اطمینان از سالم بودن خرگوش‌ها (طبیعی بودن مقادیر گلوکز، اوره و کره‌آنتینن پلاسما)، به گروه تیمار استرپتوزوتوسین با دوز ۶۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به‌صورت تک دوز و از طریق ورید مارژینال تزریق گردید و به گروه تیمار نیز سالین نرمال با دوز مشخص تزریق شد. در ادامه ۴۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و سپس هر هفته یکبار تا ۱۲ هفته از ورید مارژینال خرگوش‌ها خونگیری به‌عمل آمد و مقادیر هموسیستین، انسولین و گلوکز پلاسما مورد سنجش و ارزیابی آماری قرار گرفت. نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار ( $p < 0/01$ ) هموسیستین و گلوکز و کاهش معنی‌دار ( $p < 0/01$ ) انسولین پلاسمای گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه بود. در این مطالعه علی‌رغم کاهش انسولین پلاسما، افزایش هموسیستین پلاسما به‌عنوان ریسک فاکتور مستقل در بیماری‌های قلبی-عروقی در خرگوش سفید نیوزیلندی مشاهده شد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۲، ۴۵۰-۴۴۵.

کلمات کلیدی: دیابت ملیتوس، استرپتوزوتوسین، هموسیستین، خرگوش

### مقدمه

سلول‌های آندوتلیال عروق همراه است (۱۴). چندین فاکتور در بروز آترواسکلروزیس ناشی از دیابت مؤثر است که یکی از اساسی‌ترین و مهم‌ترین آنها ترکیبی بنام هموسیستین می‌باشد. هموسیستین برای اولین بار توسط Butz و Du Vigneaud در سال ۱۹۳۲ کشف شد. هموسیستین هومولوگ اسید آمینه

دیابت ملیتوس (نوع I و II) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های متابولیکی است که نقش بسیار مهمی در بروز عوارض مختلف دارد (۱۵). یکی از مهم‌ترین عوارض ناشی از دیابت ملیتوس نوع I، بیماری‌های قلبی-عروقی بوده که عامل اصلی آن نیز آترواسکلروزیس می‌باشد که با اختلال در کارکرد

## مواد و روش کار

در این تحقیق، تعداد ۱۲ سر خرگوش نر آزمایشگاهی (نژاد سفید نیوزیلندی) با وزن تقریبی  $1/452 \pm 132$  کیلوگرم از دانشکده دامپزشکی دانشگاه اورمی خریداری شدند. سپس خرگوش‌های مورد نظر، به صورت تصادفی به دو گروه ۶ تایی تیمار و شاهد تقسیم شدند و در مکانی مناسب و آرام و درجه حرارت  $20-24$  درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با هدف عادت کردن خرگوش‌ها به محیط به مدت ۲ هفته نگاه‌داری گردیدند. جهت تغذیه خرگوش‌های مذکور، از جیره استاندارد (پلیت، گندم و ذرت) به میزان ۱۵۰-۱۲۰ گرم در روز به‌ازای هر خرگوش استفاده می‌گردید. در این تحقیق از داروی استرپتوزوتوسین جهت القای دیابت استفاده شد که به صورت ویال قهوه‌ای رنگ یک گرمی ساخت شرکت آمریکائی Sigma Aldrich بود. به گروه تیمار داروی استرپتوزوتوسین با دوز ۶۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۳ و ۶) به صورت داخل وریدی و از طریق ورید مارژینال تزریق شد. البته قبل از هر گونه تزریق، از کلیه خرگوش‌ها خونگیری به عمل آمد و آزمایش CBC صورت گرفت و با مقایسه نتایج آزمایشگاهی با مقادیر نرمال از سلامتی خرگوش‌ها اطمینان حاصل شد. پس از تزریق دارو توسط سرنگ‌های انسولینی به گروه تیمار، به گروه شاهد بر اساس وزن خرگوش حجم مشخصی سالی‌ن نرمال استرید قابل تزریق، با همان روش تزریق شد. سپس در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق و بعد، هر هفته یک بار تا ۱۲ هفته (۳ ماه) از ورید مارژینال خونگیری انجام شد و بلافاصله بعد از خونگیری، خون به لوله‌های حاوی EDTA منتقل و پلاسما توسط دستگاه سانتریفیوژ و با دور ۳۰۰۰ در مدت ۱۰ دقیقه جدا گردید.

هموسیستین پلاسما توسط کیت انسانی (Diazyme Laboratories USA, 1288, Gregg Court, Poway, CA, 92064) و با

سیستئین بوده که اختلاف آن در زنجیره جانبی، وجود یک گروه  $-CH_2-$  اضافی قبل از گروه تیول ( $-SH-$ ) می‌باشد. این ترکیب ضمناً می‌تواند از اسید آمینه ضروری متیونین نیز مشتق شود (۱، ۲، ۴، ۵، ۱۱ و ۱۶).

جهت بررسی وضعیت هموسیستین پلاسما می‌توان از حیوانات آزمایشگاهی اعم از موش سوری، موش صحرائی و خرگوش سفید نیوزیلندی برای القاء دیابت استفاده نمود که در موش صحرائی به طور وسیع انجام گرفته ولی در خرگوش مقاله منتشر شده‌ای در رابطه با تغییرات هموسیستین در دیابت نوع I (ناشی از داروی استرپتوزوتوسین) مشاهده نگردید بدین جهت تصمیم گرفته شد مطالعه‌ای در خرگوش سفید نیوزیلندی انجام گیرد.

فرضیه ارتباط هموسیستین پلاسما با بیماری‌های قلبی-عروقی توسط McCully و همکارانش در سال ۱۹۶۹ مطرح گردید و در مطالعات بعدی اپیدمیولوژیک نیز فرضیه ایشان توسط Nehler و همکارانش در سال ۱۹۹۷ به اثبات رسید، به طوری که هموسیستین به عنوان ریسک فاکتور مستقل در بروز بیماری‌های قلبی-عروقی و آترواسکلروزیس ناشی از دیابت مورد تأیید قرار گرفت (۱۰ و ۱۲).

برای القاء دیابت نوع I اکثراً از ترکیباتی که در گروه داروهای شیمی درمانی هستند، استفاده می‌شود که شامل آلوکسان و استرپتوزوتوسین می‌باشد (۱۳). استرپتوزوتوسین یا همان استرپتوزوسین (streptozocin) (STZ) (zonosar) با فرمول شیمیایی از مشتقات آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی بوده و توسط قارچی به نام استرپتومایسس آکروموژنز (*Streptomyces achromogenes*) سنتز می‌شود (۶، ۷ و ۹). از این ترکیب جهت درمان کارسینومای جزایر لانگرهانس و تومورهای کارسینوئید و لنفوماها استفاده می‌شود. این ترکیب، پودری است به رنگ زرد لیمویی که به صورت لیوفیلیزه و در ویال‌های مختلف (۵ mg تا ۱۰۰۰ mg) وجود دارد (۷).

وجود همبستگی بین متغیرها انسولین و هموسیستین از آزمون آماری پیرسون استفاده شد.

### نتایج

در این تحقیق افزایش معنی داری ( $p < 0/01$ ) در هموسیستین و گلوکز و کاهش معنی دار ( $p < 0/01$ ) در انسولین در گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه و ارتباط معنی دار منفی بین انسولین و هموسیستین مشاهده گردید (نمودار ۱).

نتایج حاصل از اندازه گیری هموسیستین پلاسما در گروه های تیمار و شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه در جدول ۱ درج شده است. همان گونه که قابل مشاهده است، مقادیر هموسیستین پلاسما در گروه شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه، بین ۵-۸ واحد در لیتر پلاسما در نوسان بوده در حالی که در گروه تیمار به طور معنی داری افزایش یافته است.

استفاده از دستگاه RA1000 به صورت اتوماتیک اندازه گیری گردید. انسولین پلاسما به روش الکتروکمی لومینسانس (ECL) توسط دستگاه Elecsys 2010، محصول کمپانی Roche (محصول مشترک آلمان و ژاپن) و کیت انسانی ساخت همان شرکت، اندازه گیری شد. گلوکز نیز توسط دستگاه اتوآنالایزر ساخت شرکت Hitachi با استفاده از کیت Elitech فرانسه اندازه گیری شد. وزن تقریبی نهایی خرگوش های گروه شاهد در پایان دوره ۱۲ هفته  $1/729 \pm 94$  کیلوگرم و وزن تقریبی نهایی گروه تیمار  $1/925 \pm 56$  کیلوگرم شد. در این تحقیق داده ها با استفاده از نرم افزار spss ویرایش ۱۵ تحت ویندوز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آماره های مربوط به داده ها شامل میانگین و انحراف معیار بودند. عملیات مقایسه میانگین هر یک از پارامترها در گروه های بیمار و سالم توسط آزمون  $t$ -Test مستقل در سطح خطای  $\alpha = 0/01$  انجام گرفت. برای ارزیابی

جدول ۱- مقادیر هموسیستین پلاسما در گروه های تیمار و شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه

هوسیتین	ساعت ۲۴	ساعت ۴۸	ساعت ۷۲	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم	هفته نهم	هفته دهم	هفته یازدهم	هفته دوازدهم
تیمار		۸۰۸۵۷۳	۸۷۸۱۶۸	۹۰۶۱۷۲	۹۰۸۱۶۱	۱۰۳۸۱۷۰	۱۰۰۸۱۷۹	۱۰۸۸۱۹۲	۱۰۳۸۱۷۲	۱۱۰۶۱۷۳	۱۰۶۸۱۷۳	۱۱۰۸۱۷۳	۱۰۶۸۱۷۳	۱۱۰۸۱۷۳	۱۱۰۸۱۷۳
شاهد		۷۰۸۱۷۳	۷۱۸۱۷۳	۷۲۸۱۷۳	۷۳۸۱۷۳	۷۴۸۱۷۳	۷۵۸۱۷۳	۷۶۸۱۷۳	۷۷۸۱۷۳	۷۸۸۱۷۳	۷۹۸۱۷۳	۸۰۸۱۷۳	۸۱۸۱۷۳	۸۲۸۱۷۳	۸۳۸۱۷۳
$P < 0/01$		$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$	$< 0/01$

گروه شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه، بین ۷۴-۵۹ میلی گرم در صد میلی لیتر پلاسما در نوسان بوده در حالی که در گروه تیمار به طور معنی داری افزایش یافته است.

نتایج حاصل از اندازه گیری مقادیر گلوکز پلاسما در گروه های تیمار و شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه در جدول ۲ درج شده است. همان گونه که قابل مشاهده است، مقادیر گلوکز در

جدول ۲- مقادیر گلوکز پلاسما در گروه‌های تیمار و شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه

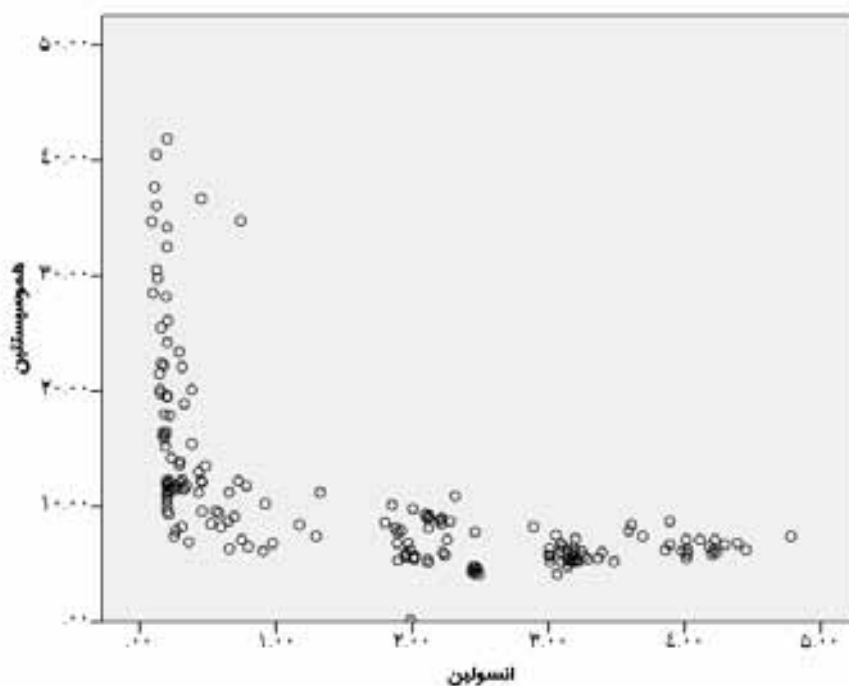
گروه	ساعت ۲	ساعت ۴	ساعت ۶	ساعت اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم	هفته نهم	هفته دهم	هفته یازدهم	هفته دوازدهم
تیمار	۱۲.۰۶±۰.۱۵	۱۳.۲۱±۰.۱۱	۱۳.۸۳±۰.۱۹	۱۴.۳۳±۰.۱۶	۱۵.۱۵±۰.۱۱	۱۵.۱۱±۰.۱۶	۱۵.۱۹±۰.۱۱	۱۵.۱۱±۰.۱۶	۱۵.۲۲±۰.۱۱	۱۵.۲۲±۰.۱۱	۱۵.۲۲±۰.۱۱	۱۵.۲۲±۰.۱۱	۱۵.۲۲±۰.۱۱	۱۵.۲۲±۰.۱۱	۱۵.۲۲±۰.۱۱
شاهد	۱۱.۳۳±۰.۱۸	۱۱.۸۲±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۰.۶۶±۰.۱۱	۱۰.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱	۱۱.۶۶±۰.۱۱
P<0/1	0/02	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000

میکرو واحد در میلی‌لیتر پلاسما در نوسان بوده در حالی که در گروه تیمار به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقادیر انسولین پلاسما در گروه‌های تیمار و شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه در جدول ۳ درج شده است. همانگونه که قابل مشاهده است، مقادیر انسولین پلاسما در گروه شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه، بین ۲-۴

جدول ۳- مقادیر انسولین پلاسما در گروه‌های تیمار و شاهد در طول ۱۲ هفته از مطالعه

گروه	ساعت ۲	ساعت ۴	ساعت ۶	ساعت اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم	هفته نهم	هفته دهم	هفته یازدهم	هفته دوازدهم
تیمار	۱.۲۹±۰.۱۱	۱.۱۲±۰.۱۶	۱.۸۲±۰.۱۶	۱.۶۹±۰.۳۸	۱.۵۰±۰.۲۷	۱.۶۸±۰.۱۲	۱.۶۵±۰.۱۱	۱.۶۵±۰.۱۱	۱.۶۵±۰.۱۱	۱.۶۵±۰.۱۰	۱.۶۵±۰.۱۰	۱.۶۵±۰.۱۰	۱.۶۵±۰.۱۰	۱.۶۵±۰.۱۰	۱.۶۵±۰.۱۰
شاهد	۱.۲۹±۰.۱۶	۱.۰۳±۰.۱۳	۱.۵۳±۰.۱۱	۱.۵۳±۰.۱۸	۱.۰۳±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳	۱.۱۸±۰.۱۳
P<0/1	0/01	0/01	0/01	0/01	0/01	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000



نمودار ۱- همبستگی انسولین و هموسیستین، که نشان دهنده ارتباط معنی‌دار منفی می‌باشد.

## بحث و نتیجه گیری

Jacob و همکاران در سال ۱۹۹۸ با مطالعه‌ای که بر روی موش‌های مبتلا به دیابت نوع I ناشی از استرپتوزوتوسین داشتند به این نتیجه رسیدند که غلظت هموستتین پلازما در موش‌های دیابتیک ارتباط مستقیم با غلظت انسولین پلازما دارد به طوری که در موش‌های مبتلا به دیابت نوع I که انسولین تزریق نشده بود مقدار هموستتین ۴۰ درصد کمتر از گروه شاهد بود و در گروهی که به آنها انسولین تزریق شد، افزایش غلظت هموستتین پلازما را داشتند. Jacob علت کاهش هموستتین را (متعاقب کاهش انسولین) نقش مهم انسولین در متابولیسم هموستتین بیان کرد (۸). در این مطالعه با وجود کاهش معنی‌دار انسولین در طول ۳ ماه از مطالعه، افزایش معنی‌دار هموستتین پلازما مشاهده گردید. بر اساس تحقیقاتی که Pavia در سال ۲۰۰۰ در دیابت نوع I انجام داد مشخص شد که با وجود کاهش انسولین و افزایش غلظت گلوکز، هیچ گونه تغییر معنی‌داری در غلظت هموستتین پلازما در گروه دیابتی و مقادیر مرجع وجود ندارد (۱۴). در بررسی‌های انجام شده توسط Robillon در سال ۱۹۹۴ و Cotellessa در سال ۲۰۰۱، کاهش معنی‌دار مقادیر هموستتین پلازما در مبتلایان به دیابت نوع I گزارش شد. Robillon علت کاهش هموستتین پلازما را تأثیر مستقیم انسولین در چرخه متیونین در نظر گرفت به این معنی که انسولین می‌تواند باعث تغییر فعالیت مسیر ترانس سولفوراسیون و دی‌متیلاسیون در چرخه متیونین شود. با کاهش انسولین پلازما در دیابت نوع I، مسیر ترانس سولفوراسیون فعال شده و هموستتین به ترکیبات واسطه غیر هموستتینی تبدیل گشته و بدین ترتیب از مقدار هموستتین خون کاسته می‌شود (۵) و (۱۵) که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی ندارد. با توجه به مطالب فوق، نتایج ضد و نقیضی در ارتباط با مقادیر هموستتین در دیابت نوع I در موش صحرایی استنباط می‌شود. این در حالی است که در رابطه با تغییرات

هموستتین در خرگوش‌های دیابتی تجربی نوع I، تحقیقی صورت نگرفته و یا مقاله‌ای منتشر نشده است ولی آنچه که مسلم است، بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق و مقایسه آن با نتایج به دست آمده در موش‌های صحرایی دیابتی لازم به ذکر است که برخلاف موش صحرایی که متعاقب دیابت القائی نوع I (توسط استرپتوزوتوسین)، کاهش و یا عدم تغییر غلظت هموستتین وجود دارد، در این مطالعه، با وجود کاهش انسولین، افزایش معنی‌دار هموستتین (به عنوان ریسک فاکتور مستقل در بیماری‌های قلبی-عروقی) مشاهده گردید. در رابطه با تغییرات گلوکز لازم به ذکر است که مقادیر گلوکز در گروه آزمایش از روز دوم سیر صعودی داشته و این افزایش تدریجی تا آخر ۱۲ هفته ادامه یافته است ولی در مطالعه Mir و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی دیابت ملیتوس نوع I در خرگوش، (۱) پس از افزایش در روز دوم، از آن روز به بعد تا پایان روز ۱۵ با سیر کاهشی گلوکز در گروه آزمایش مواجه هستیم که این وضعیت با مطالعه حاضر همخوانی ندارد (۲) افزایش گلوکز در روز دوم در مطالعه Mir و همکاران تقریباً ۲ برابر بیشتر از مقدار گلوکز در همان روز در مطالعه حاضر است که این حالت احتمالاً ناشی از تنوع در حساسیت به داروی استرپتوزوتوسین بر اساس گونه، سویه، وزن حیوان، شرایط تغذیه‌ای، شرایط محیطی و جنس می‌باشد. تغییرات انسولین از روز دوم تا پایان هفته ۱۱ با سیر کاهشی مواجه بوده ولی در پایان هفته ۱۲ با افزایش مواجه شده است که علت این امر احتمالاً ناشی از تجدید سلول‌های بتا باشد. در رابطه با تغییرات وزن لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر به طور میانگین با افزایش وزن خرگوش‌های گروه آزمایش در طول دوره مطالعه مواجه شدیم که این وضعیت با مطالعه Mir و همکاران همخوانی ندارد (۳).

## فهرست منابع

۱. ملک نیا، ن. و شهبازی، پ. (۱۳۷۵): بیوشیمی عمومی، چاپ دوازدهم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۱۷۱.
۲. محمد نژاد، ا. و پاسالار، پ. (۱۳۸۶): بیوشیمی مصور هارپر، (ترجمه)، تألیف: موری، آر. ویرایش بیست و هفتم، تهران، انتشارات اندیشه رفیع، صفحه: ۲۵۶.
3. Abdul Baqui, R.C. and Bhagat, M.M. (2008): Biochemical and Histomorphological Study of Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus in Rabbits. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7: 359-364.
4. Bolander, C. (2003): Homocysteine Review. *Journal of European Pharmacology*, pp:1-4.
5. Cotellessa, M., Minniti, M.S., Cerone, R., Prigione, F., Calevo, M.S. and Lorini, R. (2001): Low total plasma homocysteine concentration in patients with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Care*, 9:459.
6. Ganda, O.P., Rossi, A.A. and Like, A.A. (1976): Studies of streptozotocin diabetes. *Journal of diabetes*, 25:595-603.
7. Haskell, C.M. (2001): *Cancer Treatment*. 7<sup>th</sup> ed., Saunders, London, pp: 99-198.
8. Jacobs, R.L., House, J.D., Brosnan, M.E. and Brosnan, J.T. (1998): Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat diabetes. *Journal of Diabetes*, 47: 1967-1970.
9. Laviola, L., Belsanti, G., Davalli, A., Napoli, R., Perrini, S. and Weir, G.C., et al. (2001): Effects of streptozotocin diabetes and diabetes treatment by islets transplantation on *in-vivo* insulin signalling in rat heart. *Journal of Diabetes*, 50: 2709-2720.
10. Mc Cully, K.S. (1969): Vascular pathology of homocysteinemia: implication for the pathogenesis of arteriosclerosis. *American Journal of Pathology*, 56: 111-28
11. Miller, A.L., Gregory N.D. and Kelly, S. (1997): Homocysteine metabolism: Nutritional modulation and impact on health and disease. *Alternative Medicine Review*, 2: 234-254.
12. Nehler, M.R., Talor, L.M. and Porter, J.M. (1997): Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis: a review. *Journal of Cardiovascular Surgery*, 5: 559-567.
13. Nukatsuka, M., Yoshimura, Y., Nishida, M. and Kawada, J. (1988): Enhancement by Streptozotocin of Anion superoxide radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic beta-cells. *FEBS Lett.*, 239: 295-298.
14. Pavia, C., Ferrer, I., Valls, C., Artuch, R., Colome, C. and Vilaseca, M.A. (2000): Total homocysteine in patients with type 1 Diabetes. *Journal of Diabetes Care*, 23: 84-87.
15. Robillon, J.F., Canivet, B. and Candito, M. (1994): Type 1 diabetes mellitus and homocysteine. *Diabetes Metabolism*, 20: 494-496.
16. Wijekoon, E.P., Brosnan, M.E. and Brosnan, J.T. (2007): Homocysteine metabolism in diabetes. *Journal of Metabolism*, 1175-1179.