

## EFFECT OF VITAMIN C AND VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON NONENZYMATIC GLYCATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ISOLATED ERYTHROCYTE MEMBRANES IN DIABETIC PATIENTS

WACZULIKOVA I, KRAHULEC B, SIKUROVA L, CARSKY J, ORSZAGHOVA Z, DURACKOVA Z

### VPLYV VITAMÍNU C A E NA NEENZÝMOVÚ GLYKÁCIU A FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ VLASTNOSTI IZOLOVANÝCH MEMBRÁN ERYTROCYTOV U DIABETICKÝCH PACIENTOV

#### Abstract

**Waczulikova I, Krahulec B, Sikurova L, Carsky J, Orszaghova Z, Durackova Z:**

**Effect of vitamin C and vitamin E supplementation on non-enzymatic glycation and physico-chemical properties of isolated erythrocyte membranes in diabetic patients**  
Bratisl Lek Listy 2000; 101 (3): 152–156

Non-enzymatic glycation, accompanied by the formation of free radicals, represents a serious problem in diabetes mellitus. It is supposed to be the cause of the development of long-term diabetic complications. The aim of this work was to estimate the effect of treatment with vitamin C (1 g per day) and E (600 mg per day) on selected biochemical parameters as well as to determine the physicochemical state of erythrocyte membranes in diabetics. The paper also compares the physicochemical state of diabetic and control erythrocyte membranes.

The changes in the values of glycaemia, glycated haemoglobin, and fructosamine were insignificant after three months of treatment. This points out that the doses used could be low or that the patient compliance was poor. An anionic fluorescent probe merocyanine 540 (MC540) was used to monitor possible changes in the physicochemical properties of isolated diabetic erythrocyte membranes. Significantly higher affinity of MC540 monomers to the membrane in diabetics treated with vitamin E was observed, which can be the result of the antioxidative effect of the vitamin ( $p < 0.02$ ). A comparison of absorption spectra of MC540 in diabetic and control membranes revealed significant changes in the position of the bands and in their absorbances ( $p < 0.01$  and less). They result from substantial alterations in the structure, surface charge, and the fluidity of erythrocyte membranes in diabetes mellitus. (Tab. 2, Fig. 3, Ref. 22.)

**Key words:** diabetes mellitus, free radicals, vitamin C, vitamin E, merocyanine 540.

Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava. [bec-waczulik@gtinet.sk](mailto:bec-waczulik@gtinet.sk)

2nd Department of Medicine, University Hospital, Bratislava, Department of Biophysics and Chemical Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Comenius University, Bratislava

**Address for correspondence:** I. Waczulikova, Mgr, Majernikova 56, SK-841 05 Bratislava, Slovakia.

Phone: +421.7.5935 7415

#### Abstrakt

Waczulíková I., Krahulec B., Šikurová L., Čársky J., Országhová Z., Ďuračková Z.:

Vplyv vitamínu C a E na neenzýmovú glykáciu a fyzikálno-chemické vlastnosti izolovaných membrán erytrocytov u diabetických pacientov  
Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 3, s. 152–156

Pri diabetes mellitus je závažným problémom potencovaná neenzýmová glykácia a tvorba voľných radikálov, ktoré sa dnes považujú za príčinu rozvoja neskorých komplikácií diabetu. Cieľom práce bolo sledovať vplyv liečby vitamínom C (1 g/deň) a E (600 mg/deň) na vybrané biochemické parametre a na fyzikálno-chemický stav membrán erytrocytov u diabetických pacientov a porovnať fyzikálno-chemický stav membrán diabetikov a kontroly.

Zmeny v glykémii, glykovanom hemoglobíne a fruktózamíne po troch mesiacoch liečby neboli významné, čo poukazuje buď na nízku liečebnú dávku alebo na nekomplianciu pacientov. Na monitorovanie možných zmien fyzikálno-chemických vlastností izolovaných membrán erytrocytov diabetikov sme použili aniónovú fluorescenčnú sondu merocyanín 540 (MC540). Vplyv vitamínovej liečby sa prejavil len v skupine liečenej vitamínom E, a to významným vzrastom monomérov farbiva naviazaných na membránu v dôsledku antioxidatívneho efektu vitamínu ( $p < 0,02$ ). Porovnaním absorpčných spektier MC540 v membránach diabetikov a kontroly sme zistili významné zmeny polohy maxim a ich absorbancií ( $p < 0,01$  a menej) v dôsledku podstatných zmien v štruktúre, povrchovom náboji a fluidite membrán erytrocytov pri diabetes mellitus. (Tab. 2, obr. 3, lit. 22.)

**Kľúčové slová:** diabetes mellitus, voľné radikály, vitamín C, vitamín E, merocyanín 540.

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, II. interná klinika Fakultnej nemocnice v Bratislave a Katedra biofyziky a chemickej fyziky Matematicko-fyzikálnej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave

**Adresa:** Mgr. I. Waczuliková, Majernikova 56, 841 05 Bratislava 4.

Chronicky zvýšená koncentrácia glukózy v krvi pri diabete má za následok rozvoj štruktúrnych a funkčných zmien buniek, tkanív a orgánov — tzv. neskorých komplikácií diabetu. V podmienkach hyperglykémie sú akcelerované procesy glykácie, glykooxidácie a akumulácie produktov pokročilej glykácie (AGEs) v organizme (Baynes, 1996). Aduktívne vznikajúce glykáciou majú zmenené fyzikálno-chemické a funkčné vlastnosti a sú schopné zosieťovania (Brownlee, 1991). Autooxidáciu glukózy a glykovaných proteínov je potencionovaná tvorba voľných radikálov a vysokoreaktívnych dikarbonylových zlúčenín — prekursorov AGEs (Wolff, 1996). Keďže hladina odkyslíka odvodených voľných radikálov produkovaných glykooxidáciou je u diabetikov zvýšená a hladiny endogénnych antioxidantov v tkanivách a krvi sú znížené (Muchová a spol., 1999), liečenie antioxidantmi môže zlepšiť niektoré metabolické abnormality (Ďuračková, 1998). Glykácia a oxidačný stres súčasne narušujú architektúru a dynamiku bunkových membrán (Bryszewska a spol., 1995). Vhodnou metódou na štúdium fyzikálno-chemických zmien membrán je použitie fluorescenčných sond so známymi fotofyzikálnymi vlastnosťami. Perspektívnou sondou sa javí MC540, ktorý má solvatochrómne správanie (Šikurová a Janíková, 1987) a je citlivý k zmenám povrchového náboja, membránového potenciálu a štruktúrnej organizácie lipidovej dvojvrstvy (Williamson a spol., 1983; Lagerberg a spol., 1995).

V našom experimente sme sa zamerali na sledovanie možného vplyvu vitamínu C a vitamínu E na vybrané biochemické parametre a na fyzikálno-chemický stav membrán erytrocytov u diabetických pacientov a na porovnanie fyzikálno-chemického stavu membrán erytrocytov diabetikov a kontroly.

## Materiál a metódy

Do súboru sme zaradili 21 pacientov s DM typu 1 a 2 z diabetologickej poradne II. internej kliniky FN v Bratislave. Pacienti boli rozdelení do troch skupín ( $n=3 \times 7$ ). Prvú skupinu (0) tvorili pacienti bez vitamínovej liečby, pacienti druhej skupiny (E) dostávali denne  $3 \times 2$  kapsule vitamínu E (600 mg/deň) a v tretej skupine (C) 10 tabliet vitamínu C (1 g/deň). Odber krvi sa robil na začiatku experimentu, po 6 týždňoch liečby a po 3 mesiacoch liečby. Po každom odbere boli stanovené hodnoty glykémie, glykovaného hemoglobínu a glykovaného plazmového proteínu (fruktózamínu). Glykémia a glykovaný hemoglobín boli stanovené v diabetologickej poradni na OKB FN v Bratislave. Fruktózamín v sére sme stanovili podľa Johnsona a spol. (1983).

Kontrolné vzorky pre porovnanie fyzikálno-chemického stavu membrán erytrocytov poskytla Klinika hematológie a transfúziológie Fakultnej nemocnice v Bratislave.

Krv určenú na izoláciu erytrocytových membrán sme odoberali do heparinizovaných skúmaviek. Erytrocyty sme trikrát premyli v 2–5-násobnom množstve PBS (PBS: 0,15 mol/l NaCl; 1,9 mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 8,1 mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,35–7,45) a hemolyzovali vo vychladenom roztoku Tris-HCl (10 mmol/l, pH 7,4) v pomere 1:14. Hemolyzát stál pred odstredovaním 40 minút pri 4 °C. Membrány sme premyli 3–5-krát hemolyzačným roztokom s následným odstredovaním (25 000 g, 20–30 minút pri 4 °C), kým nebol z membrán odstránený hemoglobín (Dodge a spol., 1963). Izolované sedimentované membrány sme bezprostredne použili pre meranie, alebo uchovali v chladničke pri 4 °C ako suspenziu v 10 mmol/l Tris najviac 3 dni.

Absorpčné spektrá fluorescenčnej sondy MC540 (Eastman Kodak, Co.;  $M_r=569,68$ ) sme snímali na prístroji Specord M40 pri izbovej teplote 20–24 °C v kremenných kvetách hrúbky 1 cm. Farbiaci roztok 0,5 mg MC540/1 ml PBS (pH 7,4) sme pripravili v redestilovanej vode bezprostredne pred meraním. Suspenziu membrán (80 µg proteínov na 1 ml) sme ofarbili pridaním 100 µl MC540 zo zásobného roztoku. Výsledná koncentrácia sondy bola  $7,8 \times 10^{-5}$  mol/l. Vzorku sme premiešali a inkubovali v tme 5 minút. Po piatich minútach sme merali závislosť absorpcie od vlnovej dĺžky proti referenčnej vzorke — suspenzii membrán bez sondy.

## Výsledky

Diabetických pacientov sme rozdelili do troch skupín s počtom probandov 7 (tab. 1): bez vitamínovej liečby, liečení vitamínom E a liečení vitamínom C. Na začiatku liečby, po šiestich týždňoch a po troch mesiacoch boli stanovené: glykémia, glykovaný hemoglobín a fruktózamín. Zmeny v biochemických parametroch (tab. 2) po troch mesiacoch liečby neboli významné (t-test).

Tab. 1. Characteristics of the diabetic groups.

Tab. 1. Charakteristiky skupín diabetikov.

Group	Age	Duration	BMI	PCH	TG
Skupina	Vek	Trvanie	( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	(mmol/l)	(mmol/l)
	(r)	(r)			
O	50,14	2*	28,07*	5,569	1,46
	12,25	1-13	26,66-32,4	0,449	0,456
C	45,43	4*	27,15*	5,74*	1,52*
	14,44	2-10,5	24,51-29,68	5,22-7,43	1,09-3,06
E	46,7	14*	27,46	5,331	1,611
	14,9	12,5-26	2,94	0,659	1,722

\* — median and interquartile range, without sign — mean and SD.

Abbreviations used: DM — diabetes mellitus, BMI — body mass index, PCH — plasma cholesterol, TG — triglycerides

\* — medián a príslušné medzikvartilové rozpätie (IQR), bez znaku — stredná hodnota a smerodajná odchýlka. Použité skratky: DM — diabetes mellitus, BMI — „body mass“ index, PCH — plazmový cholesterol, TG — triacylglyceroly

Tab. 2. Biochemical parameters assessed in diabetics.

Tab. 2. Biochemické parametre stanovené v skupinách diabetikov.

	Glykémia	Glykovaný	Fruktózamín
	(mmol/l)	hemoglobín	(mmol/l)
		(mmol/l)	
		%	
0 1.	8,7±3,08	7,13±1,12	2,59±0,42
2.	9,1±2,98	7,5±2,33	2,58±0,36
3.	8±2,94	6,75±1,11	2,41±0,62
C 1.	8,3±1,89	7,6±1,69	2,71±0,65
2.	9,46±3,43	7,7±1,89	2,47±0,76
3.	7,79±2,05	7,59±1,79	2,55±0,45
E 1.	9,77±5,53	8,09±1,62	3,08±1,1
2.	10,87±4,61	8,92±3,08	2,98±0,53
3.	12,38±4,75	7,42±1,4	2,94±0,46

Results are expressed as mean±SD.

Označenie skupín diabetikov: 0 — bez vitamínovej liečby, C — liečba vitamínom C, E — liečba vitamínom E. Výsledky všetkých troch odberov sú vyjadrené ako priemer a smerodajná odchýlka.

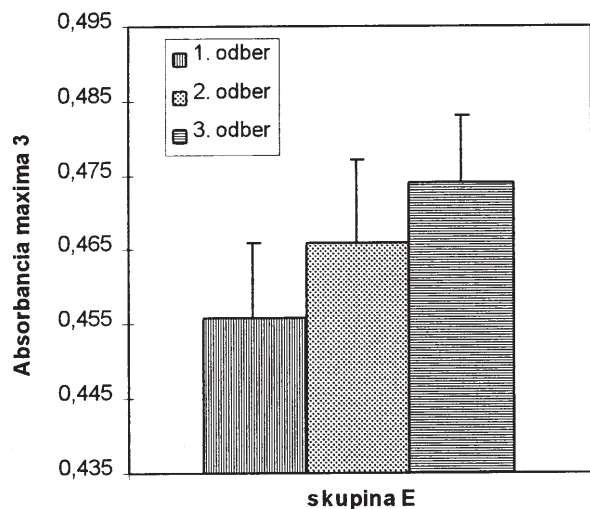


Fig. 1. Changes in the absorption spectrum of MC540 in the diabetic erythrocyte membranes after treatment with vitamin E for three months. Obr. 1. Zmeny v absorpčnom spektre MC540 v membránach erytrocytov u diabetikov po troch mesiacoch liečby vitamínom E.

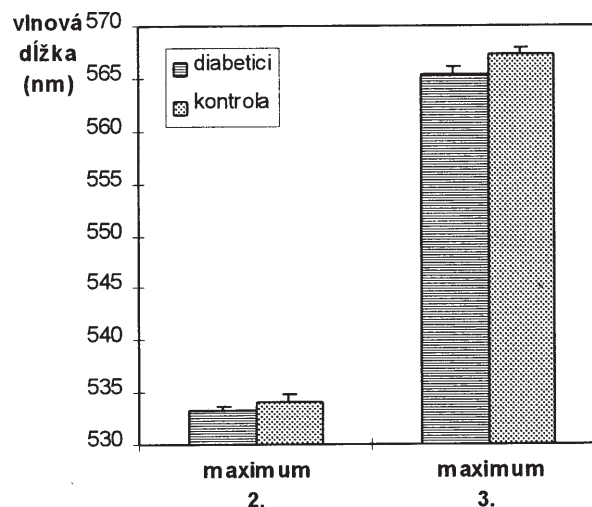


Fig. 2. Comparison of the band positions in MC540 absorption spectra in diabetic and control erythrocyte membranes. Obr. 2. Porovnanie polohy absorpčných maxim spektra MC540 v membránach erytrocytov u diabetikov a kontroly.

Po každom odbere sme v izolovaných membránach erytrocytov merali absorpčné spektrum MC540. Maximum 1, ktoré zodpovedá dimérom farbiva vo vodnom prostredí (Waggoner a Grinwald, 1977), bolo prítomné ako deformácia spektra ( $501 \pm 3$  nm). Porovnali sme hodnoty optických parametrov: poloha maxima 2 a maxima 3, ako aj absorpcie maxim 2 a 3 po všetkých odberoch u probandov v skupinách diabetikov (0, C a E). Takisto sme porovnali tieto parametre po 1. odbere všetkých diabetikov (21) s kontrolou (10).

Vplyv vitamínovej liečby sa prejavil len v skupine E malým posunom maxima 2 aj 3 do červenej oblasti spektra (1 nm) a signifikantným vzrastom absorpcie v maxime 3 ( $p < 0,02$ ) po treťom odbere v porovnaní s prvým odberom o 4 % (obr. 1). Súčasne maximum 2 nesignifikantne pokleslo o 1,1 %. Pri vitamíne C sme pozorovali nesignifikantný vzrast absorpcie v maxime 3 o 2 %.

Porovnanie diabetickej skupiny po 1. odbere s kontrolnou skupinou ukázalo signifikantný rozdiel vo všetkých optických parametroch (t-test). Pozorovali sme signifikantný posun v polohe maxima 2 ( $p < 0,01$ ) aj maxima 3 ( $p < 0,001$ ) u diabetikov smerom ku kratším vlnovým dĺžkam (obr. 2), čo svedčí o zabudovaní farbiva v menej hydrofóbnej oblasti membrány (maximum 3), resp. o väčšom príspevku od farbiva z vodnej fázy (maximum 2) (Šikurová a Janíková, 1987). Absorbancia maxima 2 bola vyššia ( $p < 0,001$ ) ako v kontrole, čo svedčí o väčšom podiele dimérovej formy MC540 v membráne, resp. monomérovej formy MC540 vo vode. Súčasne bola znížená absorpcia maxima 3 ( $p < 0,001$ ), teda podiel monomérovej formy farbiva zabudovanej v membráne bol znížený v prospech dimérovej formy, lokalizovanej na povrchu membrány (obr. 3).

## Diskusia

Náš experiment bol zameraný na sledovanie vplyvu vitamínu C a vitamínu E na vybrané biochemické parametre (glykémia, gly-

kovaný hemoglobín, fruktózámin) a fyzikálno-chemické parametre membrán erytrocytov u 21 diabetikov. Je známe, že bolo urobených mnoho experimentov zameraných na skúmanie možného pozitívneho účinku zmienovaných vitamínov pri rôznych patologických stavoch, najmä v súvislosti s ich antioxidantnou aktivitou v organizme (Đuračková, 1998). Eriksson a Kohvakka (1995) zistili priaznivý efekt vitamínu C v dávke 2 g/deň na zníženie cholesterolu, triacylglycerolov, glykémie a glykovaného hemoglobínu. Vinson a Howard (1996) pozorovali inhibíciu glykácie sérových proteínov u diabetikov po trojtýždňovom podávaní vitamínu C v dávke 1 g na deň. Účinok bol výraznejší pri súčasnom podávaní vitamínu E. Sato a spol. (1995) zistili, že vitamínom C blokována oxidácia transmembránového proteínu band 3 v membránach erytrocytov inhibuje hemolýzu napriek pozorovanej lipoperoxidácii. Jain a Palmer (1997) pozorovali inhibíciu tvorby glykovaného hemoglobínu indukovanej oxidačným stresom v erytrocytoch predinkubovaných s vitamínom E. Reaven a spol. (1995) však nezistili ovplyvnenie glykácie intracelulárnych a plazmových proteínov po podávaní vitamínu E.

V našom experimente sme po troch mesiacoch liečby vitamínom E v dávke 600 mg/deň (skupina E) a vitamínom C v dávke 1 g/deň (skupina C), ani v skupine diabetikov bez vitamínovej liečby (skupina 0) nezaznamenali signifikantné zmeny v uvedených biochemických parametroch (tab. 2) napriek publikovaným pozitívnym účinkom vitamínovej liečby. Je možné, že dávka vitamínov pre pacientov nebola dostatočná, aby významne ovplyvnila glykáciu. V literatúre sa uvádza pre vitamín E denná dávka okolo 800 mg, keď začína v tkanivách stúpať jeho koncentrácia (Đuračková, 1998). Svoju úlohu mohla mať aj tzv. nekompliancia u niektorých pacientov, čo však ťažko objektivizovať.

Na monitorovanie možných zmien fyzikálno-chemických vlastností izolovaných membrán erytrocytov diabetikov sme použili fluorescenčnú sondu MC540. Optické charakteristiky absorpčných

spektier MC540 tvorili: poloha a absorbanca maxima 2 a poloha a absorbanca maxima 3. Maximum 2 (532 nm) bolo priradené monomérom farbiva vo vode a dimérom v membráne a maximum 3 (568 nm) zodpovedá monomérom farbiva v membráne (Waggoner a Grinwald, 1977). Optické charakteristiky sme analyzovali z dvoch aspektov. Jednak sme sa sústredili na rozdiel medzi diabetickými a kontrolnými membránami, jednak sme sledovali účinok vitamínovej liečby na optické parametre v skupinách diabetikov.

V sledovaných optických parametroch sa skupiny diabetikov (0, E, C) po 1. odbere navzájom signifikantne nelíšili. Porovnali sme skupinu diabetikov po 1. odbere ako celok ( $n=21$ ) s kontrolnou skupinou t-testom a zistili sme signifikantný rozdiel vo všetkých sledovaných parametroch. Pozorované zmeny tvaru a polohy absorpčného spektra (distribúcie monomérovej a dimérovej formy farbiva v membráne) poukazujú na zmenenú schopnosť farbiva preniknúť do membrán diabetikov. Vzhľadom na záporný náboj MC540 a jeho citlivosť k zmenám povrchového náboja môžeme tieto zmeny vysvetliť:

1. Vzrastom záporného náboja na povrchu membrán diabetikov v dôsledku:

- neenzýmovej glykácie, čo podporuje zistenie van Boekela (1991), že neenzýmová glykácia znižuje kladný náboj membrány,
- zvýšenia oxidačných procesov (Rice-Evans a spol., 1985), čo môže znemožniť farbivu kontakt s hydrofóbnou oblasťou,
- zvýšeného množstva neesterifikovaných mastných kyselín v krvi pri zle kompenzovanom diabete. Väzba voľných mastných kyselín k membráne erythrocytov vedie k relatívnemu vzrastu záporného povrchového náboja (Lapshina a spol., 1995).

2. Krížovými väzbami medzi membránovými proteínmi, ktoré môžu prekryvať väzbové miesta MC540 a viesť k zvýšenej rigidite, a tým k zníženej afinite farbiva k membráne. Zvýšený plazmový cholesterol (tab. 1) zvyšuje počet a rozsah cholesterolových domén v membránach diabetikov, čo tiež môže znižovať afinitu farbiva k membráne, pretože MC540 v membráne uprednostňuje menej usporiadané bezcholesterolové oblasti (Williamson a spol., 1983; Muriana a spol., 1996).

Vplyv vitamínovej liečby sa prejavil len v skupine E signifikantným vzrastom absorbanca v maxime 3 ( $p<0,02$ ) po treťom odbere v porovnaní s prvým odberom (obr. 1). Ako pravdepodobné sa zdá ovplyvnenie lipoperoxidácie a iných oxidačných procesov v membráne, čím sa znížil záporný povrchový náboj erythrocytov, a tým aj elektrostatická repulzia a farbivo mohlo preniknúť do membrány vo väčšej miere v porovnaní s 1. odberom. Samotná inkorporácia vitamínu E najprv zvyšuje rigiditu membrány (podobne ako cholesterol) (Patel a Edwards, 1988), no jeho účinok na lipoperoxidáciu sa prejaví inhibične na zníženie fluidity indukované lipoperoxidáciou, čo ľahko kompenzuje jeho rigidizujúci účinok. Pri vitamíne C sme nepozorovali výraznejší vplyv na optické parametre.

Môžeme uzavrieť, že napriek tomu, že vitamínová liečba neovplyvnila glykáciu proteínov, signifikantne zvýšila koncentráciu monomérov MC540 v membránach erythrocytov diabetikov liečených vitamínom E, čo svedčí o ovplyvnení fyzikálno-chemického stavu membrán v dôsledku jeho antioxidantného účinku. Zistené rozdiely v absorpčných spektrách MC540 v membránach diabetikov a kontroly kvalitatívne charakterizujú zmeny v povrchovom náboji, štruktúre a fluidite membrán diabetikov. Použitie

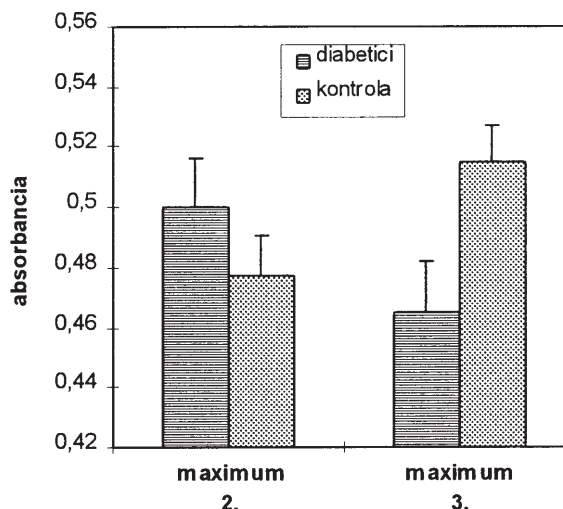


Fig. 3. Comparison of the band absorbances in the MC540 spectra in diabetic and control erythrocyte membranes.

Obr. 3. Porovnanie veľkosti absorpčných maxim spektra MC540 v membránach erythrocytov u diabetikov a kontroly.

spektroskopických metód tak poskytuje nový pohľad na možnosti monitorovania a analyzovania zmien fyzikálno-chemických vlastností bunkových membrán v podmienkach diabete.

#### Literatúra

**Brownlee M.:** Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Ann. Rev. Med.*, 42, 1991, s. 159—166.

**Baynes J.W.:** The role of oxidation in the Maillard reaction *in vivo*. S. 55—72. In: Ikan R. (Ed.): *The Maillard reaction: Consequences for the chemical and life sciences*. John Wiley Sons Ltd. 1996.

**Bryszewska M., Zavadnik I.B., Niekurzak A., Szosland K.:** Oxidative processes in red blood cells from normal and diabetic individuals. *Biochem. and Mol. Biol. Int.*, 37, 1995, č. 2, 345—354.

**Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.:** The preparation and chemical characteristic of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 1963, s. 119—130.

**Đuračková Z.:** Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (I). Bratislava, Slovak Academic Press 1998, 220 s.

**Eriksson J., Kohvakka A.:** Magnesium and ascorbic-acid supplementation in diabetes-mellitus. *Ann. Nutr. Metab.*, 39, 1995, č. 4, s. 217—223.

**Jain S.K., Palmer M.:** The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 1997, č. 4, s. 593—596.

**Johnson R.N., Metcalf P.A., Baker J.K.:** A new approach to estimation of serum glycosyl protein. An index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta*, 127, 1983, s. 87—95.

**Lagerberg J.W.M., Kallen K.-J., Haest C.W.M., VanSteveninck J., Dubbelman T.M.A.R.:** Factors affecting the amount and the mode of merocyanine 540 binding to the membrane of human erythrocytes. A com-

- parison, with the binding to leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1235, 1995, s. 428–436.
- Lapshina E.A., Zavodnik I.B., Bryszewska M.:** Effect of free fatty acids on the structure and properties of erythrocyte membrane. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 55, 1995, s. 391–397.
- Muchová J., Liptáková A., Országhová Z., Garaiová I., Tisoň P., Čársky J., Ďuračková Z.:** Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.*, 16, 1999, s. 74–78.
- Muriana F.J.G., Montilla C., Stiefel P., Villar J., Ruíz-Gutiérrez V.:** The rate of transbilayer movement of erythrocyte membrane cholesterol is correlated with sodium-lithium countertransport. *Life Sci.*, 59, 1996, č. 23, s. 1945–1949.
- Patel J.M., Edwards D.A.:** Vitamin E, membrane order, and antioxidant behaviour in lung microsomes and reconstituted lipid vesicles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 96, 1988, č. 1, s. 110.
- Reaven P.:** Dietary and pharmacological regimens to reduce lipid-oxidation in non-insulin-dependent diabetes-mellitus. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 62, 1995, č. 6, s. S1483–S1489.
- Rice-Evans C., Baysal E., Pashby D.P., Hochstein P.:** t-Butyl hydroperoxide-induced perturbations of human erythrocytes as a model for oxidant stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 815, 1985, s. 426–432.
- van Boekel M.A.M.:** The role of glycation in aging and diabetes mellitus. *Mol. Biol. Rep.*, 15, 1991, s. 57–64.
- Sato Y., Kamo S., Takahashi T., Suzuki Y.:** Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes – hemolysis by water-soluble radical initiator. *Biochem.*, 34, 1995, č. 28, s. 8940–8949.
- Šikurová L., Janíková T.:** Effect of solvent on the absorption spectra of merocyanine 540. *Studia Biophys.*, 118, 1987, č. 3, 189–196.
- Vinson J.A., Howard T.B.:** Inhibition of protein glycation and advanced glycation end product by ascorbic acid and others vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem.*, 7, 1996, č. 12, s. 659–663.
- Waggoner A.S., Grinwald A.:** Mechanism of rapid optical changes of potential sensitive dyes. *Ann. New York Acad. Sci.*, 303, 1977, s. 217–242.
- Williamson P., Mattocks K., Schlegel R.A.:** Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *Biochim. Biophys. Acta*, 732, 1983, s. 387–393.
- Wolff S.P.:** Free radicals and glycation theory. S. 73–88. In: Ikan R. (Ed.): *The Maillard reaction: Consequences for the chemical and life sciences*. John Wiley Sons Ltd, 1996.

Received November 2, 1999.

Accepted January 11, 2000.