

ALLOKSAN-DİABETİK TAVŞANDA POLİOL YOLU

Baysal KARACA*, İ. Ruhi TÖRE**

S.S.K. Buca Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı*

D.E.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı**

ÖZET

Karaciğer ve böbrekte poliöl yolu metabolizmasının olası değişimlerini gözlemleyebilmek amacıyla, tavşanlarda, vena içine alloksan enjeksiyonuyla deneysel diabet elde edildi. Bu uygulama öncesinde, ortalama 105 mg/dl olarak belirlenen açlık kan glukozu, ikinci ve dördüncü haftalar sonunda, sırasıyla, 298 ve 366 mg/dl düzeyine ulaştı. Dördüncü hafta sonunda, tavşanlar öldürülerek doku örnekleri alındı ve homojenize edildi. Homojenatlarda, glukoz, sorbitol ve früktoz konsantrasyonları ile sorbitol dehidrojenaz (SDH) aktiviteleri araştırıldı. Deney grubunda, doku örneklerinde glukoz, sorbitol ve früktoz düzeyleri artarken ($p < 0.01$), SDH aktivitesinde, anlamlı olmayan bir düşme ($p > 0.05$) gözlemlendi. Bu gözlemler, literatürdeki verilerle karşılaştırılarak tartışıldı.

Anahtar sözcükler: Alloksan-diabet, früktoz, sorbitol, sorbitol dehidrojenaz (SDH)

SUMMARY

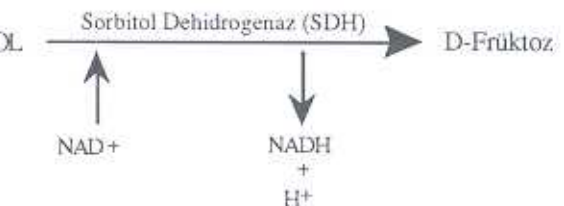
Experimental diabetes was induced, by alloxan injection via veins, in rabbits, in order to investigate the roles of hyperglycemia and sorbitol dehydrogenase activity in the mechanism of possible alterations of the polyol pathway in hepatic and renal tissues. While the mean fasting glycemia level was 105 mg/dl at the beginning, it was arrived to 298 and 366 mg/dl at the end of second and fourth week of experimentation, respectively. Then the animals were sacrificed and tissue samples collected and homogenated. The concentrations of glucose, sorbitol, fructose, and the activity of sorbitol dehydrogenase (SDH) were measured in their homogenates. In the test group, some moderate, and non significant decrease ($p > 0.05$) were noted in the activities of SDH for both tissues, while glucose, sorbitol and fructose levels were increased ($p < 0.01$). These observations were discussed with the references.

Key words: Alloxan-induced diabetes, fructose, sorbitol dehydrogenase (SDH)

Bilindiği üzere, glukoz metabolizmasının minor yollarından olan poliöl (sorbitol) yolu insülin'e bağımsız iki basamak tepkimeden oluşur. Glukoz'un sorbitol'e transformasyonu ile sonuçlanan ilk basamağı aldoz redüktaz (alditol: NADP^+ 1-oksidoredüktaz, EC 1.1.



1.21, AR) katalizlerken, sorbitol'ün früktoz'a dönüşümünü sağlayan ikinci basamağa, sorbitol dehidrojenaz (1- iditol: NAD^+ 5-oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14, SDH) aracılık eder. Her iki tepkime de reverzibldir (1).



Poliol yolu'nun çeşitli dokularda, söz gelimi, prostat, placenta ve *Vesicula seminalis*'de, karaciğer, *Lens cristallina*' ve kaslarda (1), aorta başta olmak üzere kan damarlarında ve *myocardium*'da (1,2) ve sinir dokuda (3) gerçekleştiği bildirilmiştir. Sorbitol vb. heksitollerin, ekstrahepatik dokularda, hücre membranlarında transportlarının çok yavaş olduğu da gözlenmiştir (4). *Diabetes mellitus* vb. hiperglisemik durumlarda, hücre içi sıvısında, serbest aldoz'un fazlalığı, glukoz için Km değeri oldukça yüksek olan AR'ı etkileyerek poliöl yolu'nun uyarılmasına katkıda bulunur (5) ve fazla alkol (i.e. sorbitol) oluşumu yanında, bunun hücre dışına transportundaki güçlük (4), yığılma sonucu ozmotik dengesizliğe yol açar. Örneğin, periferik sinir sisteminde, AR'ın *Schwann* hücrelerinde lokalize olduğu gözlenmiş ve diabetik nöropati'den, bu hücrelerde sorbitol yığılmasının sorumlu olduğu bildirilmiştir (6). Tomiya ve arkadaşları (7) diabetik ratların renal korteksleri ve siyatik sinirlerinde glukoz, früktoz ve sorbitol artışını, HPLC tekniği ile belirlemişlerdir. Cameron ve arkadaşları (8), Hotta ve arkadaşları (9) ve Lu ve arkadaşları (10) siyatik sinirinde poliöl yolu metabolitlerinin (i.e. sorbitol ve früktoz'un) anlamlı biçimde arttığını bildirmektedir. Öte yandan, poliöl yolu'nun katarakt oluşumundaki rolü de, deneysel diabet olgularında, sorbitol artışını denetleyen AR inhibitörlerinin (i.e. aminoguanidin, p-hidroksimerkür benzoat, N- etilmaleimid vb.) bulunması ile kanıtlanmıştır

(11,12). Kashiwagi ve arkadaşları (13)'na göre, diabetik ratlarda *myocardium*'da GC-MS tekniği ile 60 kez artmış sorbitol ve früktoz değerleri görülür.

Bu çalışmada, alloksan ile diabet oluşturulmuş tavşanlar kullanılarak, karbohidrat metabolizmasında önemli yeri olan iki dokuda, poliöl yolu metabolitlerinin normal değerlerinin, ve deneysel diabet ile ilgili olası değişikliklerinin, incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, 12-18 aylık, 1400-2000 g ağırlıkta, sağlıklı albino tavşanlardan yararlanıldı. Toplam 20 tavşan, cinsiyet ve ağırlık yönünden eşleştirilerek Deney ve Kontrol gruplarına ayrıldı. Açlık kan glukoz değerleri belirlendikten sonra, Deney grubunu oluşturan 10 hayvana, 4 hafta süre ile, haftada bir kez, 120 mg/kg alloksan (0.5 ml fizyolojik tuzlu su içinde), kulak venası yolu ile verildi. Uygulamanın ikinci ve dördüncü haftaları sonunda alınan açlık kanı örneklerinde glukoz düzeyi saptandı ve deneysel diabetin gerçekleştiği kanıtlandı.

Dördüncü hafta sonunda, Deney ve Kontrol gruplarını oluşturan 10'ar tavşanın tamamı dekapite edilerek karaciğer ve böbrekleri çıkarıldı. Doku örnekleri, kandan temizlendikten sonra bir beherde tartıldı ve 1:2 fosfat tamponu (10 mM potasyum fosfat + 5 mM merkaptotanol, pH 7.0) ile Potter-Elvehjem tipi bir homojenizatörde (S.B.Braun), buzla

soğutularak, 5 dakika homojenize edildi. Homojenat, yine soğukta, 30 dakika 10.000 X G ile santrifüje edildi (R.S. Heraeus, Omni-fuge 2.0) ve üst sıvısı alınarak %40 amonyum sülfat çözeltisi ile 2:1 oranında karıştırıldıktan sonra, soğukta, 10.000 X G ile, yeniden, santrifüje edildi. Elde edilen berrak üst sıvısı, analiz edilene kadar, derin dondurucuda (-70°C'ta) saklandı (14).

Glukoz konsantrasyonlarının belirlenmesinde, glukoz oksidaz-peroksidaz tepkimesinin, Technicon RA/XT otoanalizöründe, 500 nm dalga boyunda okunmasına dayanan bir teknik (15) kullanıldı. Sorbitol konsantrasyonları, SDH tepkimesi ile oluşan NADH'nin 340 nm'de yol açtığı absorbans artışının (16,17) okunması ile; früktoz ve protein konsantrasyonları, Seliwanoff ve Lowry tepkimelerinde elde edilen kromoförlerin spektrofotometrede, 500 ve 750 nm'lerde, değerlendirilmesi ile belirlendi (16-19). SDH etkinlikleri, yine spektrofotometrik olarak, 340 nm'de ölçüldü

ve spesifik aktivite (u SDH/mg protein) biçiminde gösterildi (20). Tüm spektrofotometrik çalışmalarda, Boehringer 4010 modeli bir spektrofotometre kullanıldı.

Sayısal değerlerin ortalamaları, standart sapmaları, yüzde varyasyonları ve ortalama değerlerin standart hataları hesaplandı. Deney ve Kontrol gruplarına ilişkin ortalama değerlerin karşılaştırılması ve farkların istatistik anlamlılık düzeyinin araştırılmasında Student's t-testi kullanıldı.

BULGULAR

Deney öncesi ile deneyin ikinci ve dördüncü haftaları sonunda elde edilen açlık kanı glukoz değerleri Tablo I'de verildi. Kontrol ve Deney gruplarından, dördüncü hafta sonunda elde edilen doku homojenatlarında, glukoz, sorbitol ve früktoz konsantrasyonları ile SDH aktiviteleri ise, Tablo II ve Şekil 1'de gösterildi.

Tablo I. Tavşanda, alloksan ile oluşturulan diabetin açlık kanı glukoz değerlerine etkisi (mg/dl).

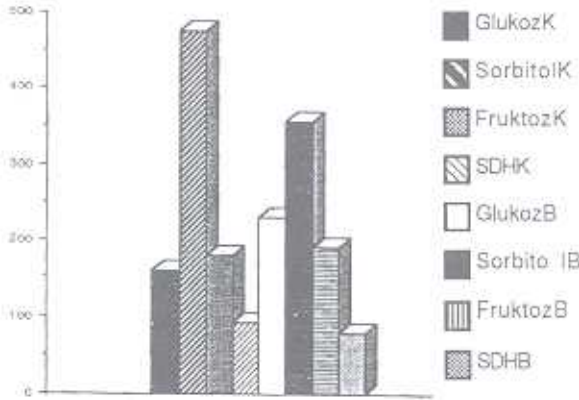
Deney öncesinde		Deney sırasında		P değerleri	
Kontrol	Deney	2. hafta	4. hafta	0. vs 2.	0. vs 4.
105	102	298	366	***	***

*** anlamlı (p<0.001 düzeyinde)

Tablo II. Tavşanda, alloksan diabetin, doku homojenatlarında glukoz, sorbitol ve früktoz konsantrasyonları (mg/dl homojenat) ile SDH aktivitelerine (u SDH/mg protein) etkisi

	Kontrol grubu		Deney grubu		P değerleri	
	Karaciğer	Böbrek	Karaciğer	Böbrek	Karaciğer	Böbrek
Glukoz	173±12.6	7.9±1.77	270±0.46	18.3±0.55	**	**
Sorbitol	27.8±13.4	15.9±3.1	133±19.1	56.7±6.8	**	**
Früktoz	10.4±0.68	1.58±0.44	18.7±0.32	3.01±0.13	**	**
SDH	8.52±0.25	0.94±0.40	7.7±0.42	0.75±0.23	ns	ns

** Anlamlı p<0.01 düzeyinde) ns Anlamlı değil p>0.05)



Şekil 1. Eksperimental diabetin tavşanda karaciğer (K) ve böbrek (B) glukoz, sorbitol ve fruktoz düzeyleri ile SDH aktivitesine etkileri (Değerler kontrol grubu ortalamasının yüzdesi cinsinden verilmiştir).

Deney grubunda, deneyden önce elde edilen ortalama açlık kan glukoz değerleri ile ikinci ve dördüncü haftalar sonunda elde edilenler arasındaki farkın, istatistik açıdan, ileri ölçüde anlamlı ($p<0.001$) bulunduğu Tablo I'de görülmektedir. Öte yandan, Kontrol ve Deney grupları arasında, karaciğer ve böbrek doku homojenatlarında glukoz, sorbitol ve früktoz değerleri açısından, istatistik açıdan anlamlı ($p<0.01$) bir fark ortaya çıktığı da Tablo II ve Şekil 1'den anlaşılmaktadır. Buna karşı, homojenat SDH değerlerinde, Kontrol ve Deney grupları ortalamaları arasında, anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Poliol yolu, ve bu yolun enzimleri, ilk kez 1955 yılında, *Vesicula seminalis*'te karakterize edilmiş ve işlevinin, sperm sıvısında bulunan früktoz'un üretilmesi olduğu düşünül-

müştür. Diğer bir çok dokunun da poliol yolu enzimlerini içerdiği, sonraları ortaya çıkarılmıştır (1-3,13). Polyol yolu ile diabet komplikasyonları arasındaki olası ilişkiler ise, son yıllarda, diabetik farelerin lenslerinde sorbitol birikiminin gösterilmesi ile dikkati çekmiş ve bunu izleyen çalışmalar, diabette çeşitli dokularda sorbitol birikimini kanıtlamıştır (7-10, 21-26).

Çeşitli araştırmacılar, belirli türlerde, değişik kimyasal etkenler kullanarak deneysel hiper-glisemi modelleri elde etmişlerdir (6,27). Bizim çalışmamızda, 12-18 aylık, 1400- 2000 g ağırlığında albino tavşanlara, birer hafta ara ile 4 kez, vena içine verilen 120 mg/kg alloxan'ın, açlık kanı glukoz konsantrasyonlarını 102 mg/dl'den, ikinci hafta sonunda 298, dördüncü hafta sonunda 366 mg/dl'ye çıkardığı belirlenmiştir. Deneme başlangıcı ile ikinci ve dördüncü haftalar sonunda belirlenen ortalama değerler arasında gözlenen farklar, ileri ölçüde anlamlıdır ($p<0.001$). Çeşitli çalışmalar arasındaki minor sayısal farklılıkların, deneylerde kullanılan hayvanların ırk ve ağırlıkları ile kullanılan kimyasal bileşiklerin ve dozlarının değişik olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Karaciğer ve böbrek homojenatlarında, Deney grubunda, ortalama glukoz değerleri açısından gözlenen anlamlı ($p<0.01$) artışların, hücre dışı sıvısında glukoz birikimine bağlı olarak, glukoz'un basit diffüzyonla membranı geçişindeki olası artış yanında, hücre içinde glukoz kullanılmasının gerilemiş olmasın-

dan da kaynaklanabilmesi olasıdır.

Poliol yolunun, glukoz'dan sonraki metaboliti sorbitol'dür. Sener ve Hutton (28), farelerde, streptozotosin ile elde ettikleri deneysel diabet modelinde, böbrek dokusunda, sorbitol konsantrasyonunun, normale göre 2.2 kat artmış bulunduğunu (1307 vs 597 nmol/g doku) gözlemlemişlerdir. Aloksan ve streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ratlarda, beyin dokusu, *Medulla spinalis*, *Nervus sciaticus*, *Lens cristallina* ve böbrekte benzer bulgular çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (10,23,24,27,29-31).

Bu çalışmada, doku sorbitol değerlerinin karaciğerde yaklaşık 4.8 kez (133 vs 27.8 mg/dl), böbrekte 3.6 kez (56.7 vs 15.9 mg/dl) artmış olması da, esas itibarıyla, yukarıda belirtilen çalışmaların sonuçları ile aynı yöndedir. Bu artışlar, istatistik açıdan anlamlıdır ($p<0.01$). Sayısal farklılıkların tür ve model farklılıklarını yansıtması doğaldır.

Candan (27), ratların aorta dokusunda, polioli yolunun incelenmesini amaçlayan çalışmaları sırasında, fruktoz konsantrasyonlarının da, diabetiklerde 6.4 kez (20.83 vs 3.28 mg/dl) artmış olduğunu belirlemiştir. Bir başka çalışmada, normal farelerin pankreas adacık dokusunda fruktoz konsantrasyonu 2.9 mg/dl olarak bildirilmiş bulunmaktadır (32). Bizim çalışmamızda ise, ortalama fruktoz değerleri, Kontrol grubunda, karaciğer için 10.4, böbrek için 1.58 mg/dl olarak belirlenmiştir.

Gözlemler arasındaki sayısal farklılıkların, incelenen tür ve doku ile kullanılan homojenizasyon tekniğinden ileri gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Deneysel grupta, karaciğer fruktoz değerlerinin 1.8 kez (18.7 vs 10.4 mg/dl) ve böbrek fruktoz konsantrasyonunun 1.9 kez (3.01 vs 11.58 mg/dl) arttığı gözlenmiştir. Her iki dokuda gözlenen artışlar istatistik açıdan anlamlıdır ($p<0.01$).

SDH etkinlikleri, Candan (27)'in rat aorta dokusundaki çalışmasında normal ve diabetik olgularda, hemen hemen eşit bulunmuştur (7.84 vs 8.11 IU/mg protein). Burnell ve arkadaşları (33), fare karaciğerinde normal SDH aktivitesini 0.752 IU/mg protein, Gerlach (20), post mortem alınan insan karaciğer dokusunda 5.73, böbrek dokusunda 1.24 IU/mg protein olarak belirlemişlerdir. Buna karşı, Cai (24) streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ratlarda, perifer sinir dokusunda, izositrat-, malat-, laktat- ve ∞ -gliserofosfat dehidrojenaz (ICDH, MDH, LDH ve ∞ -GPDH) aktivitelerinde, düşme yanında, SDH aktivitesinde artış gözlemiştir. Bizim çalışmamızda da, SDH aktivitesinde, Kontrol ve Deneysel grupları arasında, istatistik açıdan anlamlı farklılıklar gözlenmemiş olmakla birlikte ($p>0.05$), diabetik hayvanlarda, SDH spesifik aktivitesinde düşüş görülmesi (Karaciğerde 7.70 vs 8.52 u/mg protein; böbrekte 0.75 vs 0.94 IU/mg protein) ilginç bir bulgudur ve son ürün inhibisyonunun tipik bir örneği olarak düşünülebilir.

Bu çalışmanın sonuçları, poliol metabolizması açısından, şöyle yorumlanabilecektir:

Alloksan ile diabet oluşturulmuş tavşanlarda, açlık kanı glukoz düzeyi, normalin 3.48 katına ulaşmasına karşı, karaciğer ve böbrek dokularında glukoz düzeyi normalin yaklaşık 1.6-2.3 katı kadardır. Buna karşı, sorbitol konsantrasyonu, karaciğerde normalin 4.8 katını, böbrekte ise 3.6 katını bulmaktadır. Kanımızca bu durum, bir yandan, diabetlilerde poliol yolunun ağırlığının arttığını düşündürürken, bir yandan da, glukoz içim Km değeri yüksek olan AR'ın serbest aldoz (i.e. glukoz) fazlalığı nedeniyle, dokuda sorbitol yığılmasına neden olduğu yolundaki görüşleri (5) desteklemektedir.

Poliol yolu'nun ikinci basamağı için, durum biraz daha değişiktir. Diabetik tavşanların karaciğer ve böbreklerinde, fruktoz birikimi de söz konusu olmakla birlikte, bu birikim, öncülü olan sorbitol'ün bolluğunun düşürdüğü ölçüde değildir ve beklenen değer, karaciğerde ancak %35'ine, böbrekte %56'sına ulaşabilmektedir. Durumun açıklanabilmesi için üç ayrı varsayım kullanılabilir. Bu eksiklik, ya, (A) hiç olmazsa kısmen (karaciğerde %9, böbrekte %28'i), **SDH aktivitesi düşüklüğünü** ya, (B) SDH Km değeri-

nin parsiyel yüksekliği yüzünden, **yüksek sorbitol konsantrasyonunda enzimin doygunluğa ulaştığını** ya da, (C) **Früktoz kullanılmasındaki artışı** yansıtır olabilir.

Bu noktada, poliol yolu sonunda biriken früktoz'un früktoz-3 fosfat üzerinden 3-dezoksiglukozon'a dönüştüğü ve früktoz-3 fosfat ile bunun hidroliz ürünü olan 3-dezoksiglukozon'un *Lens cristallina*'daki diabetik komplikasyonların bir bölümünden sorumlu olduğuna diabetik dokuda, früktoz yanında, mannoz ve riboz gibi şekerlerin, ribitol ve eritritol gibi şeker alkollerinin, hatta gliserol'ün birikim gösterdiğine ilişkin yeni gözlemlerin de dikkate alınması gerekecektir (7,21,34). Ayrıca, (A) ve (C) varsayımları, karaciğer ve böbrek dokusunda **gözlenen birikim farklılıklarına da bir açıklama getirebilecektir**. Bu arada, myo-inositol konsantrasyonunda, AR, total, ouabain'e duyarlı ve dirençli ATPaz aktivitelerinde bildirilmiş olan ve özellikle, diabetik nöropati ile ilişkili olduğu varsayılan, düşük değerler üzerinde, ilerde önemle durulmasının gerekeceği de vurgulanmalıdır (7,8,10,13, 21,35-38).

KAYNAKLAR

1. Thomas JH, Guillham B. Will's Biochemical Basis of Medicine, Second Edition, London: Butterworth and Co. 1989; 217-9.
2. Clements RS, Morrison AD, Winegrad AI. Polyol pathway in aorta. Regulation by hormones. Biochem J 1969; 47: 1007.
3. Gabbay KH. Role of sorbitol pathway in neuropathology. Diabetes 1973; 2: 417-23.

4. Melfiore F. Enzyme Regulation and Metabolic Diseases. Colchester: Spottishwoods Ballantyne Ltd, 1980; 477-80.
5. Winegrad AI, Morrison AD. The polyol pathway: A model of biochemical mechanisms by which hyperglycemia may contribute to the pathogenesis of the complications of Diabetes mellitus. Diabetes 1974; 6: 387.
6. O'Sullivan JB, Gabbay KH. The sorbitol pathway. Diabetes 1979; 17: 300.
7. Tomiya N, Suzuki T, Awaya J, et al. Determination of monosaccharides and sugar alcohols in tissues from diabetic rats by high performance liquid chromatography with pulse amperometric titration. Anal Biochem 1992; 206: 98-104.
8. Cameron NE, Cotter MA, Dines K, et al. Effects of aminoguanidine on peripheral nerve function and polyol pathway metabolites in streptozotocine-diabetic rats. Diabetologia 1992; 35: 346-50.
9. Hotta N, Kakuta H, Fukosawa H, et al. Effects of niceritrol on streptozotocine - induced neuropathy in rats. Diabetes 1992; 41: 587-91.
10. Lu KM, Zhong XL, Zhu XX, et al. Alterations in the sorbitol pathway and Na^+ - K^+ ATPase activity of peripheral nerve of alloxan-induced diabetic rats. Sheng- Li-Hsueh-Pao 1990; 42: 401-5.
11. Camerini D, Harold S. Vascular and neurological changes in early diabetes. Diabetes 1973; 2: 48.
12. Winegrad AI, Clementi RS, Morrison AD. Insuline-independent pathways of carbohydrate metabolism. Endocrinology 1972; 1: 457-71.
13. Kashiwagi A, Obata T, Suzaki M, et al. Increase in cardiac muscle fructose content in streptozotocine-induced diabetic rats. Metabolism 1992; 41: 1041-6.
14. Burnell JM, Halmes RS. Purification and properties of sorbitol dehydrogenase from mouse liver. Biochemistry 1983; 15 (4): 507-11.
15. Andersen SC, Cockayne S. Clinical Chemistry: Concepts and Applications. Philadelphia: WB Saunders Company, 1993; 157.
16. Bergmeyer HU, Grubel W, Guttman I. D-Sorbitol. In: RH Williams, ed. Methods in Enzymatic Analysis. New York: Academic Press, 1963; 1323-6.
17. Stanberg JB. The Metabolic Basis of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill Book Company. A Blakiston Publication. 1972; 131-2.
18. Wander JD, Stangebye LA, Hunsakar LA. Purification of aldose reductase from human placenta and stabilization of the inhibitor binding site. Biochem. Pharmacol 1988; 37: 1051-6.
19. Lowry OH, Rosebourgh NJ, Fair AL, Rantoll RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-9.
20. Gerlach U. Sorbitol dehydrogenase. In: R.H. Williams, ed, Methods of Enzymatic Analysis, third edition. New York: Academic Press, 1965; 761-4.
21. Wang LN, Fukui M, Tomino Y, Koide H.

- Alteration of polyol metabolism in glomeruli of streptozotocine diabetic rats: Analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Nippon-Jinzo-Gakkai-Shi* 1990; 32: 401-8.
22. Suzuki K, Yen Chung H, Toyota T, et al. The significance of nerve sugar levels for the peripheral nerve impairment of spontaneously diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. *Diabetes Res* 1990; 14: 21-5.
23. Nishigami T. Effect of insulin on aldose reductase activity in the lens of rats with streptozotocine-induced diabetes. *Nippon-Ganka-Gakkai Zasshi* 1990; 94: 128-34.
24. Cai F. Pathogenesis of peripheral neuropathy in streptozotocine induced diabetes in rats. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* 1989; 69: 86-9.
25. Gaynes BI, Watkins JB. Comparison of glucose, sorbitol and fructose accumulation in lens and liver of diabetic and insulin treated rats and mice. *Comp Biochem Physiol (B)* 1989; 92: 685-90.
26. Lauro PN, Craven PA, De Rubertis FR. Two-step high-performance-liquid chromatography method for the determination of myo-inositol and sorbitol. *Anal Biochem* 1989; 178: 331-5.
27. Candan G. Sıçan Aorta Dokusunda Sorbitol Yolunun İncelenmesi. Yayınlanmamış Doçentlik Tezi. İstanbul Üniv 1983;
28. Sener A, Hutton JC. Relationship of endogenous to dietary sorbitol. *Diabetes and Metabolism* 1979; 5: 217-22.
29. Stewart MA, Sherman WR, Anthony S. Free sugar in alloxan diabetic rat nerve. *Biochemistry* 1966; 6: 488.
30. Ekström AR, Tomlinson DR. Impaired nerve regeneration in streptozotocine-diabetic rats. Effects of treatment with an aldose reductase inhibitor. *J Neurol Sci* 1989; 93: 231-7.
31. Craven PA, De Rubertis FR. Sorbinil suppresses glomerular prostaglandin production in the streptozotocine diabetic rats. *Metabolism* 1989; 38: 649-54.
32. Winegrad AI, Morrison AD, Fink CJ, Lacy PE. Sorbitol synthesis in isolated rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 1970; 38: 3.
33. Burnell JN, Halmes RS. Purification and properties of sorbitol dehydrogenase from mouse liver. *Biochemistry* 1983; 15: 507-11.
34. Szwegold BS, Kappler F, Brown TR. Identification of fructose-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science* 1990; 247: 451-4.
35. Regan TJ, Beyer-Mears A, Torres R, Fusilli LD. Myocardial inositol and sodium in diabetes. *Intern J Cardiol* 1992; 37: 309-16.
36. Williards GB, Calcutt NA, Compton AM, et al. Substance P levels in peripheral nerve, skin, atrial myocardium and gastrointestinal tract of rats with long-term diabetes mellitus. Effects of aldose reductase inhibition. *J Neurol Sci* 1989; 91: 153-4.
37. Gaynes BL, Watkins JB. Carbon tetrachloride and the sorbitol pathway in the diabetic mouse. *Comp Biochem Physiol (B)* 1989; 94: 213-7.
38. Dyck PJ, Minnerath SR, O'Brian PC. Nerve glucose, sorbitol, fructose and myo-inositol at various time after feeding in streptozotocine-induced diabetes in rats. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 905-10.