

## Produits de glycation avancée et statut antioxydant chez des diabétiques Tunisiens

H. CHAHED<sup>1</sup>,  
N. GAMMOUDI<sup>1</sup>  
A. SOUALHIA<sup>1</sup>,  
L. CHAIB<sup>2</sup>,  
S. FERCHICHI<sup>1</sup>,  
A. MILED<sup>1</sup>.

**Résumé :** Des études récentes suggèrent que l'hyperglycémie chronique de diabète de type 2 est le principal acteur responsable des complications micro et macroangiopathiques. Parmi les altérations biochimiques caractéristiques de cette hyperglycémie figure la formation des produits de glycation avancée (AGEs) et la perturbation de la balance oxydants / antioxydants. Le but de ce travail était d'évaluer le taux des AGEs et le statut antioxydant (la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR), la catalase (CAT) et le statut antioxydant total (SAT)) chez des patients diabétiques de type 2 (DT2). Notre étude a concerné 70 patients DT2 d'âge moyen  $42 \pm 12$  ans et 50 sujets témoins d'âge moyen  $44 \pm 10$  ans. Nos résultats ont montré une élévation statistiquement significative des AGEs chez les DT2 comparé aux témoins ( $8,85 \pm 2,05 \cdot 10^3$  vs  $5,06 \pm 1,4 \cdot 10^3$  UA/g,  $p < 10^{-3}$ ). Nous avons aussi noté une élévation statistiquement significative des activités érythrocytaires antioxydantes (SOD, GPX, GR et CAT ;  $p < 0,05$ ). Cependant, le SAT était statistiquement diminué chez les DT2 par rapport aux témoins ( $p = 0,001$ ). L'augmentation des AGEs reflète un déséquilibre glycémique chronique, impliquée dans la genèse d'un stress oxydant qui est compensé par l'élévation des activités des enzymes antioxydantes.

**Mots Clés :** Diabète de type 2, Produits de glycation avancée (AGEs), statut antioxydant, stress oxydant, complications.

## Advanced glycation Endproducts and antioxydant status in Tunisian diabetics.

**Abstract :** Recent studies suggests that hyperglycemia is an important contributor to the development of micro and macroangiopathy. Among the biochemical alteration and characteristic furthers of this hyperglycemia, are the formation of advanced glycation endproducts (AGEs), increased oxidative stress and reduced antioxydant capacity. The present study was undertaken to evaluate the variation of advanced glycation end products and the parameters of antioxidant status in type 2 diabetic Tunisian patients. This study was included 70 type 2 diabetic patients (mean age  $42 \pm 12$  years) and 50 healthy control subjects (mean age  $44 \pm 10$  years). Compared with healthy control subjects, diabetic patients had significantly increase of AGEs ( $8.85 \pm 2.05 \cdot 10^3$  vs  $5.06 \pm 1.4 \cdot 10^3$  UA/g  $p < 10^{-3}$ ) and significant increase of antioxidant enzymes (SOD, GPX, GR and CAT;  $p < 0.05$ ). We found that diabetic patients had significantly lower total antioxidant status ( $p = 0,001$ ).

The increase of AGE showed a chronic disturbance of hyperglycemia involved

<sup>1</sup> Laboratoire de biochimie-  
CHU Farhat Hached-  
Sousse-Tunisie.

<sup>2</sup> Service d'endocrinologie -  
CHU Farhat Hached  
Sousse Tunisie

in the genesis of oxidative stress. The compensatory increase of the antioxidant enzymes is induced as a response to free radical overproduction in type 2 diabetes.

**Keywords :** Type 2 diabetes, advanced glycation end products (AGEs), antioxidant status, oxidative stress, complications.

## Introduction

Le diabète de type 2 est redoutable par ses complications dégénératives micro et macrovasculaires. Ces complications ne sont pas uniquement associées aux différents facteurs de risque classique (Tabac, hypertension artérielle, dyslipidémie...) mais elles étaient attribuées à l'hyperglycémie chronique [1]. Cette dernière est responsable de modifications biochimiques à savoir la formation des produits glycation avancée (AGEs, Advanced glycation end-products), l'exagération des voies des polyols et des hexosamines et l'activation de la voie de la protéine kinase C [2-4]. Ces mécanismes contribuent à un stress oxydant (un déséquilibre de la balance pro-oxydants/anti-oxydants en faveur des pro-oxydants) par augmentation de la production des superoxydes via la chaîne respiratoire mitochondriale. En outre, l'accumulation des AGEs, issus d'une réaction de glycation non enzymatique (processus de Maillard) entre les sucres réducteurs et les protéines, induit un stress oxydatif et inflammatoire via leurs récepteurs spécifiques RAGE [5]. Par conséquent, ces différents phénomènes intriqués contribuent à l'amplification des effets néfastes du stress oxydatif.

Pour s'opposer à l'action du stress oxydatif, l'organisme dispose d'un système antioxydant en stimulant l'expression des systèmes enzymatiques. Cette défense permet de

prévenir la progression des réactions en chaîne des radicaux libres qui sont responsables de dommage tissulaire [6].

L'objectif de cette étude est d'évaluer le taux des AGEs (marqueur d'un dommage oxydatif) et le statut antioxydant (la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR), la catalase (CAT) et le statut antioxydant total (SAT)) chez des patients diabétiques de type 2 (DT2).

## Patients et méthodes

### Patients

Notre étude a concerné 70 patients DT2, 58 hommes et 12 femmes, âgés de  $42 \pm 12$  ans, et dont l'âge moyen de leur diabète est de  $7,47 \pm 5,77$  ans. Le groupe témoin est représenté par 50 sujets sains, 17 hommes et 33 femmes, âgés de  $44 \pm 10$  ans. Les patients et les témoins ont été sélectionnés conformément aux critères d'inclusion et d'exclusion établis par une fiche de renseignement. Tous les sujets présentant une inflammation aiguë, une maladie auto-immune, une pathologie hépatique et/ou prenant un traitement antioxydant ont été exclus de l'étude. Tous les sujets de notre étude ont signé un consentement. Les caractéristiques anthropométriques, les données cliniques de la population d'étude sont résumées dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Caractéristiques anthropométriques des malades et des témoins**

	Diabétiques (n=70)	Témoins (n= 50)	P
Age (ans)	42 ± 12	44 ± 10	NS
Sexe (F/H)	12/58	17/33	NS
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28,8 ± 3,0	23 ± 2,7	0,01
HTA (%)	12	0	-
Dyslipidémie (%)	35	0	-
Age du diabète (ans)	7,47 ± 5,77	-	-

H : homme ; F : femme, IMC : indice de masse corporelle, HTA : hypertension artérielle

### Prélèvements

Les prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau de la veine du pli de coude après un jeûne de 12 heures, le sérum et le sang total ont été conservé à - 20C° pour la détermination des AGEs et le statut antioxydant (SOD, GPX, GR, CAT, SAT).

### Méthodes biochimiques

Produits de glycation avancée : Les AGEs ont été déterminés par une méthode spectrofluorimétrique selon Munch et al [7]. Le taux des AGEs a été exprimé en unité arbitraire par gramme de protéine (UA/g protéine). Exploration du statut antioxydant : L'activité érythrocytaire de la SOD a été déterminée par une méthode enzymatique colorimétrique à la xanthine oxydase en utilisant des kits commercialisés par le laboratoire Randox (Randox Antrim, Royaume-Uni). Les activités érythrocytaires de la GPX et de la GR ont été déterminées par une méthode enzymatique à 340 nm (Randox Antrim, Royaume-Uni). L'activité érythrocytaire de la catalase a été déterminée par une méthode enzymatique colorimétrique selon Groth et al [8]. Le SAT a été dosé par une méthode colorimétrique à 600 nm (Randox Antrim, Royaume-Uni). Le taux d'hémoglobine a été déterminé par la méthode de Drabkin à 540 nm.

Autres analyses : La Glycémie, les triglycérides (TG), le Cholestérol total (CT) et le HDL-cholestérol (HDLc) ont été déterminés par des méthodes enzymatiques colorimétriques. Le LDL cholestérol (LDLc) était calculé en utilisant la formule de Friedewald et al [9]. L'HbA1c a été déterminée par la méthode d'immuno-inhibition sur latex (Randox Antrim, Royaume-Uni).

### Analyse statistique

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $M \pm \sigma$ ). La comparaison des moyennes a été faite à l'aide du test t de Student et les corrélations ont été exprimées par le coefficient r de Pearson. Le seuil de signification statistique a été fixé à 5%.

### Résultats

Les paramètres biochimiques de la population d'étude ont été résumés dans le Tableau 2.

La glycémie était significativement plus élevée chez les diabétiques par rapport aux témoins ( $p < 10^{-3}$ ). De plus, l'HbA1c était significativement plus élevée chez les diabétiques par rapport aux témoins ( $p < 10^{-3}$ ).

L'étude du bilan lipidique a montré une élévation statistiquement significative des TG et des LDLc chez les diabétiques par rapport aux témoins. Cependant, les HDLc étaient significativement diminués chez les diabétiques comparés aux témoins.

Nos résultats ont aussi montré une augmentation significative des taux des AGEs chez les diabétiques comparés aux témoins ( $8,85 \pm 2,05$  Vs  $5,06 \pm 1,4$ ,  $p < 10^{-3}$ ). En outre, chez les patients diabétiques, les AGEs étaient positivement corrélés à l'HbA1c ( $r = 0,651$ ,  $p < 10^{-3}$ ) (figure1), pour les témoins on n'a pas trouvé cette corrélation.

La mesure de l'activité érythrocytaire de la SOD a montré une augmentation statistiquement significative chez les diabétiques comparés aux témoins ( $2257,60 \pm 452,02$  U/g Hb Vs  $1793,93 \pm 842,85$  U/g Hb,  $p = 10^{-3}$ ). L'activité érythrocytaire de la GPX était aussi statistiquement plus élevée chez les patients par rapport aux témoins ( $88,60 \pm 15,72$  U/g Hb vs  $67,56 \pm 13,6$  U/g Hb,  $p < 10^{-3}$ ).

De même, il y a une élévation statistiquement significative de l'activité érythrocytaire de la GR ( $9,04 \pm 2,78$  U/g Hb Vs  $7,68 \pm 2,62$  U/g Hb,  $p = 0,007$ ) chez les diabétiques comparés aux témoins.

L'activité érythrocytaire de la catalase était aussi statistiquement augmentée ( $613,10 \pm 156,38$  kU/g Hb Vs  $299,34 \pm 122,99$  kU/g Hb,  $p < 10^{-3}$ ) chez les diabétiques par rapport aux témoins.

Cependant, le SAT était statistiquement diminué chez les diabétiques par rapport aux témoins ( $1,27 \pm 0,38$  mmol/l Vs  $1,51 \pm 0,41$  mmol/l,  $p = 10^{-3}$ ).

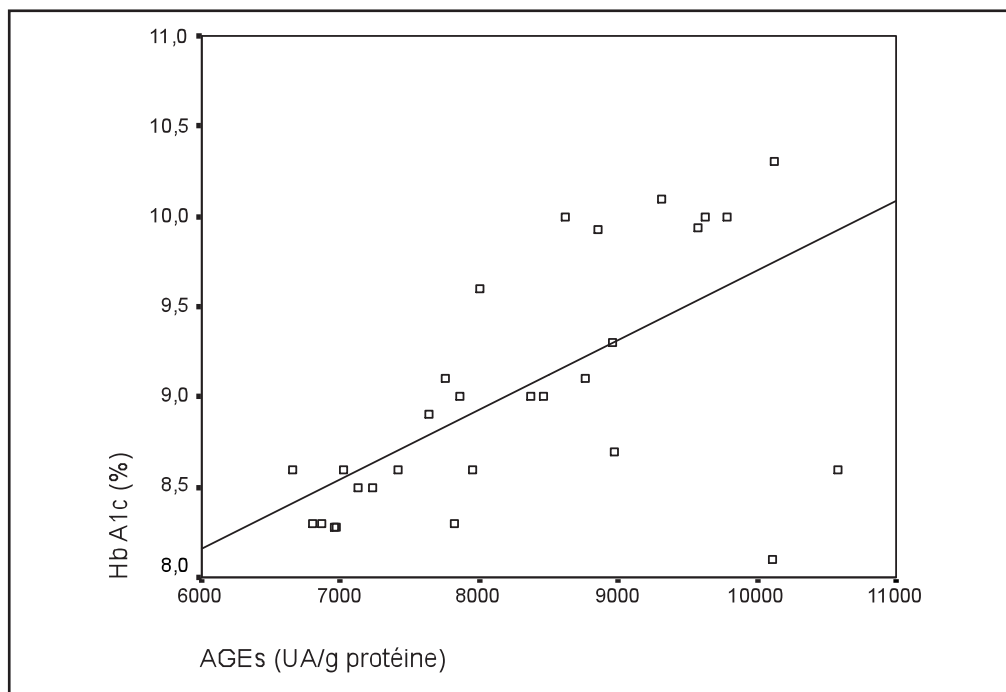
### Discussion

Au cours du diabète sucré, l'hyperglycémie chronique est

**Tableau 2 : Répartition des paramètres biochimiques chez les patients diabétiques et les témoins**

	<b>Diabétiques (n=70)</b>	<b>Témoins (n= 50)</b>	<b>P</b>
Glycémie (mmol/L)	10,35± 3,11	4,74± 2,56	<10 <sup>-3</sup>
HbA1c (%)	9,93± 1,65	5,96± 0,65	<10 <sup>-3</sup>
TG (mmol/L)	1,97± 1,19	1,31± 0,92	10 <sup>-3</sup>
CT (mmol/L)	4,22± 0,78	4,10± 1,03	0,46
HDLc (mmol/L)	1,15± 0,32	1,34± 0,34	10 <sup>-3</sup>
LDLc (mmol/L)	2,44± 0,63	1,84± 0,90	<10 <sup>-3</sup>
AGEs(103×UA /g protéine)	8,85 ± 2,05	5,06 ± 1,4	<10 <sup>-3</sup>
SOD (U/g Hb)	2257,60±452,02	1793,93±842,85	10 <sup>-3</sup>
GPX (U/g Hb)	88,60± 15,7	67,56± 13.6	<10 <sup>-3</sup>
GR (U/ g Hb)	9,04± 2,78	7,68± 2,62	0,007
CAT (kU/g Hb)	613,10± 156,38	299,34± 122,99	<10 <sup>-3</sup>
SAT (mmol/L)	1,27± 0,38	1,51± 0,41	10 <sup>-3</sup>

UA : unité arbitraire



**Figure 1 : Corrélation entre le taux des AGEs et l'HbA1c chez les patients diabétiques (r = 0,651, p <10<sup>-3</sup>).**

responsable d'un ensemble de modifications métaboliques, glucidique, lipidique et protéique [10]. En effet, ces modifications induisent un dysfonctionnement endothélial et un stress oxydatif qui jouent un rôle clé dans le développement des maladies vasculaires athéromateuses [2].

Nos résultats confirment que tous nos patients diabétiques présentaient un déséquilibre glycémique chronique. En effet la glycémie à jeun de ces patients était  $> 7,0$  mmol/L, de plus l'HbA1c reflétait ce déséquilibre puisque tous nos patients diabétiques avaient une HbA1c  $> 8\%$  limite proposée par l'ADA, soulignant un mauvais contrôle [11].

Nos patients présentaient une dyslipidémie secondaire objectivée par l'augmentation des TG et des LDLc avec une diminution des HDLc. Cette dyslipidémie consécutive à une insulino-résistance est en rapport avec l'augmentation de la libération des acides gras libres (AGL) à partir des adipocytes insulino-résistants [12]. Cette augmentation des AGL au niveau hépatique, avec une quantité suffisante en glycogène, favorise la production des TG ce qui stimulent la sécrétion des l'apolipoprotéine B (ApoB) et des VLDLc. Ces modifications sont responsables, par un mécanisme d'échange lipidique, de la diminution des HDLc et de l'augmentation des LDLc petites et denses. Nos résultats suggèrent que cette perturbation du profil lipidique contribue au développement de l'athérosclérose via l'élévation des LDLc (effet athérogène et pro-oxydant) et la diminution des HDLc (effet antiathérogène et antioxydant), ceci a été documenté par plusieurs études [13-14]. Parmi les troubles métaboliques de cette hyperglycémie toxique, figure la glycation non enzymatique des protéines, aboutissant à la formation des AGEs. Ces derniers, considérés comme des glycotoxines, jouent un rôle déterminant dans la genèse d'un stress oxydant et l'apparition des lésions micro-vasculaires et macro-vasculaires du diabète d'où l'importance d'explorer ce paramètre [15]. Notre étude a montré une élévation statistiquement significative des AGEs chez les diabétiques comparés aux témoins. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études, notamment celle de Bansal et al. [16], celle de Kilhovd et al. [17], et celle de Koyama et al. [18], qui

ont rapporté une augmentation statistiquement significative des AGEs totaux, de la N $\epsilon$ -carboxyméthyl-lysine et de la N $\epsilon$ -carboxyméthyl-arginine chez les diabétiques. De travaux récents [5, 19] ont montré que la production et l'accumulation des AGEs sont impliquées dans l'initiation et le développement des complications micro et macro vasculaires observées chez les patients diabétiques. Ces produits de glycation induisent un désordre cellulaire à travers la liaison des AGEs à leurs récepteurs spécifiques (RAGE). En effet, cette interaction entraîne une activation cellulaire en particulier endothéliale et macrophagique, qui produit des cytokines et des facteurs tissulaires. Les AGEs induisent aussi la production des formes réactives de l'oxygène [5, 18]. L'augmentation du taux des AGE contribue donc à l'augmentation du statut oxydant via ces récepteurs RAGE et participe ainsi dans l'aggravation du déséquilibre oxydant-antioxydant [4, 20]. Le rôle des AGEs dans l'accélération de développement des maladies artérielles, observé chez le diabète, a été démontré [21] ; en effet, une association entre l'augmentation du collagène et la rigidité artérielle, ainsi qu'une augmentation de la tension artérielle systolique et diastolique ont également été rapportées. Ces altérations biomécaniques sont associées à une augmentation de la glycation du collagène (cross-Links). En plus, la diminution de l'élasticité artérielle est liée aux dépôts d'AGEs ce qui peut contribuer au développement de l'hypertension systémique et à la rigidité artérielle. D'autre part, les lipoprotéines glyquées contribuent à la formation des cellules spumeuses [2-4].

Nos résultats ont montré une corrélation positive du taux des AGEs avec l'HbA1c, cette corrélation a été retrouvée dans l'étude de Turk et al [16,22] qui avaient rapporté que cette corrélation était observée chez les patients ayant un mauvais contrôle (HbA1c $>8\%$ ), ce qui est le cas de nos patients ; cependant cette corrélation est faible chez les patients dont l'HbA1c  $< 8\%$ . Ces auteurs expliquaient que cette discordance pourrait refléter une différence de cinétique de formation de l'HbA1c et des AGEs. Dans l'étude de Kalousova et al [23], cette corrélation était observée seulement chez les diabétiques de type 1, en revanche, Wagner et al n'ont pas trouvé

cette corrélation [24]. Nous suggérons que plus l'HbA1c (équilibre glycémique à moyen terme) est augmentée plus la formation des AGE est accélérée, ce qui reflète que l'intensité de glycation est proportionnelle à la qualité de l'équilibre glycémique ; ainsi, un contrôle strict est indispensable pour réduire les effets délétères des AGEs.

L'analyse des activités érythrocytaires de la SOD, de la GPX, de la GR et de la CAT a montré une élévation statistiquement significative chez les patients diabétiques comparés aux témoins, en accord avec plusieurs travaux [25-28].

L'augmentation des activités des enzymes antioxydantes pourrait être une réponse adaptative au pro-oxydants chez les diabétiques. De plus, cette augmentation peut être due soit à un déséquilibre antioxydant/pro-oxydant, soit à une surexpression des gènes codants pour ces enzymes antioxydantes via des facteurs de transcription redox sensibles [27].

En effet, l'augmentation de l'activité de la SOD est la première réponse adaptative résultant d'une augmentation de la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) [28]. L'augmentation de la GPX pourrait être expliquée par le fait que cette enzyme sélénium dépendante participe au processus qui limite les dégâts de la peroxydation lipidique ; par conséquent, les cellules des sujets diabétiques vont capter le sélénium entraînant l'activation de la GPX dans ces cellules [28]. De même, l'élévation de l'activité de la GR, souvent associée à l'activité de la GPX, pourrait être un mécanisme compensatoire antioxydant par la régénération du glutathion, ce dernier est souvent diminué au cours de diabète [27]. La catalase, qui transforme le  $H_2O_2$  en  $H_2O$ , vient en seconde ligne pour lutter contre la production accrue de  $H_2O_2$  via la SOD.

Bien que la mesure du statut antioxydant total permette d'évaluer l'action cumulative des antioxydants dans l'organisme, nous avons observé une diminution significative du SAT chez les patients diabétiques comparée aux témoins ; ce résultat est en accord avec l'étude de Kusano et al. [29] qui ont trouvé une association entre la diminution du taux de SAT et l'augmentation des dommages vasculaires. De plus, l'étude de Lodovici et al [30] a montré que le SAT était plus diminué chez les patients

diabétiques ayant un mauvais contrôle glycémique.

La diminution du SAT trouvée dans notre étude, malgré des activités antioxydantes enzymatiques élevées, pourrait témoigner que cette défense enzymatique reste insuffisante pour contrebalancer les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Ces données nous mènent à promouvoir le rôle des autres antioxydants enzymatiques tels que les thioredoxines peroxydases et les antioxydants non enzymatiques tels que le glutathion, les flavonoïdes et notamment les vitamines A, C et E [29-30].

Dans la littérature, les résultats concernant la variation de la défense antioxydante chez le diabète sont controversés. Des travaux ont montré une augmentation des activités érythrocytaires de la SOD, de la GPX, de la GR et de la CAT [25-28], d'autres ont rapporté leur diminution [31] alors que d'autres encore n'ont pas trouvé de variations [32-33]. Cette discordance pourrait être expliquée par le fait que les enzymes antioxydantes pourraient subir une glycation ou une dénaturation par les ERO, aboutissant à leur inactivation. En outre, les patients diabétiques sont traités par un ou plusieurs antidiabétiques oraux (ADO) qui posséderaient également des effets antioxydants [34].

## Conclusion

Nous pourrions confirmer à travers notre étude que le mauvais contrôle glycémique observé chez les sujets diabétiques est responsable des modifications métaboliques graves parmi les quelles la dyslipidémie et l'exagération du processus de glycation ; ces deux phénomènes aboutissent au stress oxydant et à un dysfonctionnement endothélial, et ainsi, prédispose les patients à un risque accru de maladies cardiovasculaires. De plus, l'élévation des activités des enzymes antioxydantes, contrastée par un SAT diminué chez nos patients, serait en faveur d'une réponse compensatoire contre le stress oxydant qui reste encore insuffisante. Une prise en charge thérapeutique antioxydante précoce est donc indispensable pour prévenir les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène.

### Remerciements

Nous tenons à remercier le personnel du laboratoire de Biochimie et d'endocrinologie de CHU F. Hached de Sousse pour leurs coopérations et aides très précieuses.

### Références

1. Johnson EL. Glycemic variability in type 2 diabetes mellitus : oxidative stress and macrovascular complications. *Adv Exp Med Biol* 2012; 771:139-54.
2. Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol*. 2008; 45:1-16.
3. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 2004; 63:582-592.
4. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM : Glycation, inflammation and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res* 2003; 93:1159-1169.
5. Bansal S, Siddarth M, Chawla D, Benerjee BD, Madhu SV, Tripathi AK. Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils in vitro. *Mol Cell Biochem* 2012; 361 (1-2):289-96.
6. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin T.D, Mazur M et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease: *Int J Biochem* 2007; 39: 44-84.
7. Munch G, Kies R, Wessel A; Determination of advanced glycation end product in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35; 669-677.
8. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196:143-152.
9. Friedewald WT, Levy RI & Fredrickson DS : Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative centrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499 - 502.
10. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006; 29 (Suppl 1): S43-8.
11. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1998; 21 (Suppl 1): S 23-32.
12. Mooradian AD. Dyslipidaemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2009; 5(3):150-9.
13. Schwartz EA, Reaven PD. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1821(5):858-66.
14. Krentz AJ. Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2003; 5 (Suppl 1):S19-27.
15. Campos C. Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae. *Postgrad Med* 2012; 124(6):90-7
16. Bansal S, Chawla D, Siddarth M, Banerjee BD, Madhu SV, Tripathi AK. A study on serum advanced glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2 diabetic patients with vascular complications. *Clin Biochem* 2013 ; 46 : 109-114
17. Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, Ronnema T, Torjesen PA, Hanssen KF, et al. Increased serum levels of advanced glycation end products predict total cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes : a population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia* 2007; 50:1409-17.
18. Koyama Y, Takaishi Y, Arimoto T, Niizehki T, Shishido T, Takahashi H et al. High serum level of pentosidine, an advanced glycation end product (AGE), is a risk factor of patients with heart failure. *J Cardiac Failure* 2007;13; 199-205.
19. Nin JW, Jorsal A, Ferreira I, Schalkwijk CG, Prins MH, Parving HH et al. Higher plasma levels of advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011 ; 34:442-447
20. Gillery P. Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré. *Ann Biol Clin* 2006; 64 (4): 309-14.
21. Goh SY, Cooper ME. Clinical review : The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 4:1143-1152.
22. Turk Z, Mesic R, Benco B : Comparison of advanced glycation endproducts on haemoglobin (Hb-AGE) and haemoglobin A1c for the assessment of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1998; 277:159-170.

23. Kalousová M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51(6):597-604.
24. Wagner Z, Wittman I, Mazak I, Schinzel R, Heidland A, Kientsch-engel R, Nagy J : Nε-(carboxymethyl) lysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function. *Am J Kidney Dis* 2001; 38:785-791.
25. Priya V, Surapaneni M. Erythrocyte lipid peroxidation peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamine, antioxydant enzymes and serum homocysteine levels in patients with coronary artery disease. *J Clin and Diag Res* 2008; 2:1180-1185.
26. Choudhuri S, Dutta D, Chowdhury IH, Mitra B, Sen A, Mandal LK, Mukhopadhyay S, Bhattacharya B. Association of hyperglycemia mediated increased advanced glycation and erythrocyte antioxidant enzyme activity in different stages of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013; 100(3):376-84.
27. Srivastan R, Sujata D, Gadde R, Krishna M. Antioxydants and lipid peroxidation status in diabetic patients with and without complications . *Arch Iranian Med* 2009; 12:121-127.
28. Likidilid A, Patchanans N, Peerapatdit T, Sriratana-sathavorn C. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Erythrocytes of Type 2 Diabetic Patients. *J Med Assoc Thai* 2010; 93 (6): 682-93
29. Kusano C, Bucalen F. Total Antioxidant Capacity : a biomarker in biomedical and nutritional studies. *J Cell Mol Biol* 2008; 7:1-15.
30. Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat Res.* 2008; 638 (1-2):98-102.
31. Kumawat M, Sharma TK, Singh I, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, Shankar V. Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Nephropathy. *N Am J Med Sci* 2013; 5(3):213-9.
32. Peuchant E, Delmas-Beauvieux MC, Couchouron A, Dubourg L, Thomas MJ, Perromat A, et al. Short-term insulin therapy and normoglycemia. Effects on erythrocyte lipid peroxidation in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997; 20:202-7.
33. Kajanachumpol S, Komindr S, Mahaisiriyodom A. Plasma lipid peroxide and antioxidant levels in diabetic patients. *J. Med Assoc Thai* 1997; 80:372-7.
34. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 93(1):56-62.