

DIYABETİKLERDE ERİTROSİT İÇİ SUPEROKSİD DİSMUTAZ, GLUTATYON PEROKSİDAZ İLE PLAZMA E VİTAMİNİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Mehmet GÜRBİLEK*, Dr. Neşe Hayat AKSOY*, Dr. İdris AKKUŞ*, Dr. Sadınaz KALAK*,
Dr. Osman ÇAĞLAYAN*, Dr. Mehmet AKÖZ*, Dr. Elif Menekşe ZEREN*

* S.Ü.T.F. Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Diyabetin komplikasyonları, insülin homeostasisinde ve enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin bir sonucu olarak kabul edilmektedir. Metabolik stres, oksidatif stresin artmasına yol açarak komplikasyonların gelişimini teşvik eden yapısal ve fonksiyonel hasar oluşturmaktadır. Özellikle iyi kontrol edilemeyen diyabette oksidatif aktivitenin artması serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmalarda geliştirilmiş antioksidan savunma sistemleri bulunur.

Bu çalışmada, 35-75 yaşları arasındaki 57 tip II diabetes mellituslu hasta ile 34-66 yaşları arasındaki 33 sağlıklı kişide eritrosit içi Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Süperoksid dismutaz (SOD) ile serum E vitamini düzeyleri tayin edildi.

Diabetes mellitus grubunda GSH-Px 26.7 ± 12.8 U / g Hb, SOD 550 ± 200 U/g Hb, E vitamini ise 472.6 ± 183 µg/dl iken, kontrol grubunda GSH-Px 21.8 ± 6.2 U / g Hb, SOD 649 ± 165 U / g Hb ve E vitamini 422.7 ± 145 µg/dl olarak bulundu.

Her iki gruba ait GSH-Px, SOD ve E vitamini arasındaki fark istatistikî açıdan önemli bulunmadı.

Bu çalışma ile, antioksidanların aktivitesinde hiçbir önemli değişiklik bulunmadığından, diyabetin tedavisinin serbest radikallerin üretimini engelleyebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Diyabet, glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz ve E vitamini.

SUMMARY

Investigation Of Serum Vitamin E Level And Erythrocyte Super Oxidase And Glutathione Peroxidase Activities Of Patients With Type II Diabetes Mellitus

Complications of Diabetes mellitus are believed to be resulted from alterations in insulin homeostasis and energy metabolism. Metabolic stress, by increasing oxidative stress causes functional and structural damage which results in diabetic complications.

The formation of free radicals as a result of an increase in oxidative activity increases in uncontrolled diabetes mellitus. In organisms, antioxidant defense systems are present against harmful effects of free radicals.

In the present study, serum vitamin E and erythrocyte superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities of 33 healthy subjects aged between 34-66 and 57 patients with type II diabetes mellitus under treatment and aged between 35-75 years have been investigated.

Erythrocyte SOD and GSH-Px activities and serum vitamin E level of patients were 550 ± 200 U / g Hb, 26.7 ± 12.8 U / g Hb and 472.6 ± 183 µg / dl whereas these of controls were 649 ± 165 U / gr Hb, 21.8 ± 6.2 U / gr Hb and 422.7 ± 145 µg/dl respectively. The difference between the parameters of the two groups were not significant statistically.

Since no significant alteration was found in the activity of antioxidants, it was concluded that treatment of diabetes mellitus might prevent production of free radicals.

Key words : Diabetes mellitus, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, vitamin E.

GİRİŞ

Serbest radikallerin önemli biyokimyasal ara ürünler olarak kabulünün artmasıyla birlikte, çok sayıda hastalıkla da ilgileri bulunmuştur (1).

Diyabette serbest radikal oluşumunun arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülmüştür (2). Bu gelişmeler, diyabet komplikasyonlarının patogeneğinde serbest radikallere olan ilgiyi artırmıştır.

KontROLSÜZ serbest radikal reaksiyonları hücre yapı ve fonksiyonlarını bozar. Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmalarda geliştirilmiş korumalar, "Antioksidan Savunmalar" olarak bilinmektedir. Glutasyon peroksidaz, Süperoksit dismutaz enzimleri ve E vitamini, hücreleri oksidan ajanlara karşı korurlar.

Bu çalışmadaki amacımız diyabetli hastalarda bu her üç antioksidan ajanın seviyelerini tesbit ederek, hem diyabetiklerde eritrositlerin serbest radikallerden etkilenme derecelerini hem de bu parametrelerin diyabetin teşhis ve tedavisinin takibinde kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymaktır.

MATERYAL VE METOD

Çalışma, Haziran-Eylül 1994 tarihleri arasında, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye kliniğine müracaat edip DM teşhisi konmuş 57 diyabetli ve 33 sağlıklı kişi üzerinde yapıldı.

Diyabet grubu; önceden tip II diabetes mellitus tanısı konmuş, yaş ortalaması 53.25 olan (35-75 yıl) 31 kadın ve yaş ortalaması 53.46 olan (36-70 yıl) 26 erkek hastadan oluşmaktadır. Bu hastaların bir kısmı insülin, bir kısmı oral diyabetik, bir kısmı ise sadece diyet ile tedavi edilmekteydi.

Kontrol grubu; yaş ortalaması 48.25 olan (34-66 yıl) 16 kadın ve yaş ortalaması 45 olan (35-66 yıl) 17 erkekten oluşmaktadır. Kontrol grubuna alınan olguların, hiçbirinde organik ve ruhsal bozukluk olmayıp ilaç, sigara, alkol kullanmayan ve biyokimya rutin tahlilleri normal olan sağlıklı kişilerdi. Bu kişilerin önceden ayrıntılı anamnezleri alınıp boyları ve ağırlıkları ölçüldü.

Numunenin Alınması Ve Hazırlanması :

Çalışmada hasta ve kontrol grubuna alınan kişilerin 10-14 saat açlıktan sonra uygun şartlar sağlanıp 20 ml venöz açlık kanları alındı. Bu kanın 10 ml si içinde 2 mg / ml EDTA bulunan tüpe aktarılıp alt üst edildi, eritrosit paketi elde etmek için kullanıldı. Kalan 10 ml kanın 2 ml' si sitrath tüplere tam kan analizi için ayrıldı. Kanın 5 ml' si rutin biyokimya tetkikleri, kalan 3 ml' si ise E vitamini tayini için kullanıldı. Pıhtılaşmadan sonra 3000 devir / dak' da 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlardan E vitamini kolorimetrik metodla aynı gün çalışıldı.

Eritrosit Paketinin Hazırlanması :

Enjektör içindeki 10 ml EDTA'lı kan üzerine 5 ml Dekstran-70 solüsyonu eklendi. Alt üst edildikten sonra enjektör dik pozisyonda 60 dakika bekletildi.

Enjektörün ucu eğilerek, 60 dakika sonunda oluşan üstteki faz atıldı. Altta kalan faz başka bir cam tüpe aktarıldı. 3500 devir / dakika' da +4 °C 'de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan supernatan dikkatlice ayrılıp atıldı. Altta kalan kısım kadar soğuk serum fizyolojik eklenip alt üst edildikten sonra 3000 devir / dak' da +4 °C 'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı. Bu işlem toplam üç kez yapıldı. Alttaki eritrosit paketinden 100 µl kadar alınıp hematoloji laboratuvarında tam kan analizi yapıldı. Geriye kalan kısım iki parça halinde derin dondurucuda saklandı. Eritrosit paketinden; SOD enzim aktivitesi ve GSH-Px enzim aktivitesi ticari kit kullanılarak otoanalizörde ölçüldü.

Bulgular, "Student-t testi" kullanılarak değerlendirildi.

BULGULAR

Diabetes mellitus'lu ve kontrol grubundaki kişilerin eritrosit içi SOD, GSH-Px, serum E vitamini çalışıldı. Kontrol grubunu oluşturan vakaların serum glukoz, trigliserit, total kolesterol, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol tayinleri yapıldı.

Çalışılan her bir parametrenin kontrol ve diyabet gruplarındaki sonuçları Tablo 1 de gösterildi :

Tablo1. Kontrol ve Hasta Gruplarında Araştırma Parametrelerinin Aritmetik Ortalaması ve İstatistik Yorumu:

Parametreler	Kontrol		Diabetes Mellitus		t	P
	X ± SD	n	X ± SD	n		
Glukoz (mg /dl)	98.2 ± 9.8	33	224.2 ± 72.4	57	9.83	P<0.001
SOD (U/g Hb)	649.1 ± 165	33	550 ± 200	23	-1.97	P>0.05
GSH-Px (U/g Hb)	21.8 ± 6.2	30	26.7 ± 12.8	49	1.90	P>0.05
E vitamini (µg/ dl)	422.7 ± 145	33	472.6 ± 183	42	1.26	P>0.05

TARTIŞMA

Diyabetin komplikasyonlarının, insülin homeostazisindeki ve enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin bir sonucu olarak geliştiği kabul edilmektedir. Metabolik stres, oksidatif stresin artmasına yol açarak diyabet komplikasyonlarının gelişimini kolaylaştıran yapısal ve fonksiyonel hasarı oluşturmaktadır (3).

Özellikle iyi kontrol edilemeyen diyabette, oksidatif aktivitenin artması serbest radikal oluşumunu ve proteinlerin glikozillenmesini artırır (4). Plazma ve membran proteinleri uzun süre yüksek konsantrasyonda glukoz ile karşı karşıya kalırsa, glukoz hızla proteinlerin amino gruplarına non enzimatik bir yolla bağlanır. Yeni oluşan glikozilasyon ürünleri kan glukoz konsantrasyonu ile orantılı olarak bir dengeye ulaşır ve biraz daha stabil olan erken glikozilasyon ürünleri oluşur. Bunun tipik örneği glikozillenmiş hemoglobindir. Glikozillenmiş proteinler, otooksidasyona uğrayabilir ve bu sırada serbest radikaller üretilir. Sonuçta proteinlerin çapraz bağlanması ve degradasyonu ile diyabette moleküler düzeyde hasarlar oluşur (3).

Plazmada üretilen ve eritrosit hücre membranını geçebilen hidrojen peroksid ve süperoksid iyonları eritrositlerde toplanır. Bu açıdan eritrositler önemli bir havuzdur. Eritrositlerde biriken süperoksid radikallerinin dismutasyonunu sağlayan Cu - Zn SOD, hidrojen peroksid detoksifikasyonunu sağlayan GSH-Px, CAT ve vitamin A, C ve E gibi çeşitli antioksidan savunma sistemleri bulunur. Bu savunma sistemleri sayesinde toksik hidroksil radikallerinin oluşması engellenir (5).

Glutasyon, serbest radikaller ve ksenobiyotikler tarafından oluşturulabilen hasara karşı hücreyi korumada, proteinlerin tiol gruplarının korunmasında, amino asid transportu, DNA ve protein sentezi gibi biyolojik reaksiyonlarda geniş bir öneme sahiptir. Glutasyon peroksidaz indirgenmiş glutasyonun yükseltgenmesi sırasında hidrojen peroksidi de içeren peroksidlerin yıkımını katalize eden hücrelerin diğer bir antioksidan savunma sistemini oluşturur.

GSH-Px aktivitesi, diyabetli hastaların eritrositlerinde çalışılmış ve çeşitli araştırmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir.

Uzel ve arkadaşları (6), diyabetik hastalarda eritrosit GSH-Px aktivitesinde azalma olduğunu bildirmişler ve bu azalmayı, eritrosit ve plazmada lipid peroksidasyonunun artması sonucu glutatyona bağlı savunma sistemlerindeki baskılanma ile birlikte olduğunu ileri sürmüşlerdir. Glutasyon metabolizmasıyla ilgili çalışmalarda, diyabetik hastaların hepatik glutasyon seviyesinin azaldığını, bu azalmayı ise glutasyonun parçalanmasında bir artma yada sentezinde bir azalma şeklinde açıklamışlardır. Bazı araştırmacılar, diyabette Hegsoz Monofosfat şanti aktivitesinin değişmesi sonucu NADPH⁺ üretiminin de etkilenebileceğini bildirmişlerdir (7,8).

Matsubara ve arkadaşları (9) ise insüline bağlı diabetes mellitus hastalarının eritrosit GSH-Px aktivitesinde önemli bir artma olduğunu bildirmişler ve glutasyon redoks sisteminin diyabet yada diyabetin tedavisiyle stimüle edebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Yukarıdaki çalışmaların tersine, Strange ve arkadaşları (5), Walter ve arkadaşları (4) eritrosit

GSH-Px aktivitesinde diyabet ile normal kişiler arasında önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızın sonuçları bu çalışmalar ile uyumludur. Çalışmamızda, GSH-Px aktivitesinde biraz yükselme görülmesine rağmen bu, istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Bu yükseklik hasta grubumuzun diyabetli olma sürelerine yada tedavide olmalarına bağlı olabilir.

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit iyonlarının dismutasyonunu sağlayarak hidrojen peroksit oluşturur ve potansiyel zararlı etkilere karşı hücre savunma reaksiyonu olarak rol oynar. Diyabette artmış oksidatif stres nedeniyle serbest oksijen radikallerinin üretiminde artma olduğu çeşitli çalışmalarda ileri sürülmüştür (4). Oksijen radikallerindeki bu artış nedeniyle, diyabetli hastaların özellikle eritrosit SOD aktivitesi üzerine çalışmalar yoğunlaşmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Loven ve arkadaşları (8) diyabetik ratların eritrosit SOD aktivitesinin önemli olarak azalmadığını ama kontrol grubundan daha düşük aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Selvam ve arkadaşları da (10) eritrosit SOD aktivitesinin diyabette önemli olarak azaldığını bildirmişlerdir. Crouch ve arkadaşlarının (11) yaptığı *in vitro* bir çalışmada, insan eritrosit SOD aktivitesinin streptozotosin uygulanmasından 10 dakika sonra, maksimum % 40 inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan Sakurai ve arkadaşları (12) yüksek glukoz konsantrasyonunda Cu Zn SOD'nin enzimatik aktivite kaybının olduğunu göstermişlerdir. Strange ve arkadaşları (5) Cu Zn SOD enzim miktarının diyabetli hasta eritrositlerinde değişmediğini bildirmişlerdir.

Arai ve arkadaşları (13) ise, Cu Zn SOD'nin glikozilasyonunun, enzim aktivitesinin azalmasına yol açtığını bildirmişlerdir. Ancak, diyabetli hastaların eritrositlerinde total SOD aktivitesinin normal kişiler ile aynı olduğunu bulmuşlardır. Bunu diyabetli hastaların eritrositlerindeki glikozillenmiş SOD enziminin yalnızca % 30'u olduğunu ve bunun da total aktivite üzerine büyük etkisinin olmayacağını bildirmişlerdir.

Yukarıdaki çalışmaların aksine, Walter ve arkadaşları ise (4) diyabetli hastaların eritrosit Cu Zn

SOD aktivitesinde, normallere göre önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Arai ve arkadaşlarının (13) sonuçları da bu çalışmayı destekler mahiyettedir.

Bizim çalışmamızın sonuçları, Walter ve arkadaşlarının (4), Arai ve arkadaşlarının (13), Kawamura ve arkadaşlarının (14) sonuçları ile uyumludur. Çalışmamızın sonucunda diyabetli hastaların eritrositlerinde SOD düzeyi biraz düşmesine rağmen bu değer istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

Vitamin E serbest radikallerin oksidasyonuna karşı hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerini korumada ilk savunma hattını oluşturur (15). Plazma a-tokoferol düzeyleri, plazma kolesterolü ve apolipoprotein B içeren lipoproteinler özellikle LDL kolesterol düzeyleri ile pozitif bir korelasyon göstermiştir. Bu nedenle plazma a-tokoferol düzeyleri yükseldiğinde plazma lipid düzeyleri de gözönüne alınmalıdır (16). Vitamin E lipid peroksidlerini bağlar (17). Yüksek oranda E vitamini ile beslenen diyabetli ratların plazma lipid peroksidlerinde bir azalma olduğu gösterilmiştir (18). Eğer lipid peroksidleri artarsa, membran akışkanlığı bozulur (19) ve endotel için sitotoksik olan LDL'nin oksidasyonuna neden olurlar. Okside LDL, endotelin permeabilitesini artırır, vazorelaksasyonunu bozar ve diyabetik komplikasyonlarının gelişmesine aracılık eder (20).

Elde edilen son bilgilere göre vitamin E verilmesi, ratlarda ve diyabetli insanlarda glikohemoglobinin, glikozilasyonunu azaltabilir. Vitamin E verilmesi (900 mg / dl - 4ay) 15 adet tip-2 ve sağlıklı kontrollerde insülin etkisini düzeltmiştir (16,18,21).

Vitamin E eksikliği, diyabetin bir özelliği olmamasına karşın en son kanıtlar, diyabetin serbest radikal aktivitesinin arttığı bir durum olduğunu ve diyabetiklerin E vitamini gibi antioksidanlara daha çok ihtiyaç gösterebileceğini göstermektedir. Birkaç klinik çalışma tip-1 yada tip-2'li diyabetlilerin yüksek plazma ve doku total E vitamini ve - tokoferol düzeyine sahip olabileceklerini göstermiştir (16).

Ceriello ve arkadaşları (22) diyabetli hastaların yüksek miktarları E vitamini tüketmediğini göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada oral a-tokoferol

uygulanmasının diyabetlilerde glikohemoglobin konsantrasyonunu düşürdüğünü bulmuşlardır.

Shoff ve arkadaşları (21) ise aksine diyabetli kişilerde E vitamini alımıyla glikohemoglobin arasında herhangi bir ilişki gözlemediklerini bildirmişlerdir.

Vatassery ve arkadaşları (23) diyabetlilerin plazma total ve a-tokoferol düzeylerinin sağlıklı kişilerden istatistiki olarak önemli derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu artışın temel mekanizmasını açıklayamamışlardır.

Çalışmamızda E vitamini düzeyleri diyabetli grupta yükselme göstermesine rağmen istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Çalışmamıza aldığımız diyabetli hastaların diyetle veya oral ilaçlarla tedavi ediliyor olması yada diğer çalışmalardaki hasta grubu ile bizim çalışmamızdaki hasta grubunun yaşlarının farklı olmasından ileri gelebilir. Ayrıca vitamin E seviyesi popülasyonun diyet alışkanlığı ile de yakından ilişkili olabilir.

Bu bulgulardan, tedavi altındaki diabetik hastalarda eritrosit içi antioksidan enzim aktivitesinin diabette önemli oranda etkilenmediği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Cheesman, K H and Slater, T F Introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 1993 49(3):481-493.
2. Langenstroer, P and Pieper, G M Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. Am J Physiol 1992 263: 257-265.
3. Baynes, J W Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 1991 40:405-412.
4. Walter, R M, Hare, J U, Olin, K L, Oster, M H and Keen, C L Copper, zinc, manganese and complications of diabetes mellitus. Diabetes Care 1991, 14:1050-1056.
5. Strange, R C, Jones, P, Bicknell, J and Scarpello, J Expression of Cu Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocyte from diabetic and non diabetic subjects. Clin. Chim. Acta, 1992 207:261-263.
6. Uzel, N, Sivas, A, Uysal, M and Öz, H Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. Horm. Metabol. Res. 1987 19:89-90.
7. Loven, D P and Oberley, L W Free radicals, insulin action and diabetes. Disease States 1985 3: 151-190.
8. Loven, D P, Schedl, H, Wilson, H, Daabeas, T T, Stegink, L D, Diekus, M and Oberley, L Effect of insulin and oral glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. Diabetes 1986 35: 503-507.
9. Matsubara, L S, Ferreira, A L A, Tomero, M T T and Machado, P E A Influence of diabetes mellitus on the glutathione redox system of human red blood cells. Braz. J. Med. Biol. Res. 1992 25: 331-335.
10. Selvam, R and Anuradha, C V Lipid peroxidation and anti-oxidative enzyme changes in erythrocytes in diabetes mellitus. Ind. J. Biochem. Biophys. 1988 25: 268-272.
11. Crouch, R K, Gandy, S E, Kimsey, G, Galbraith, R A, Galbraith G M P and Buse, M G The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. Diabetes 1981 30: 235-241.
12. Sakurai, T, Matsuyama, M and Tsuchiya, S Glycation of erythrocyte superoxide dismutase reduces its activity. Chem. Pharm. Bull. 1987 35:302-307.
13. Arai, K, Iizuka, S, Tada, Y, Oikawa, K, and Taniguchi, N Increase in the glycosylated form of erythrocyte Cu Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glycosylation with the enzyme activity. Biochim. Biophys. Acta 1987 924: 292-296.
14. Kawamura, N, Ookawara, T, Suzuki, K, Konishi, K, Mino, M and Taniguchi, N Increased glycated Cu Zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin dependent diabetes mellitus. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1992 74(6): 1352-1354.
15. Packer, L and Landvik, S (1990) Vitamin E in biological systems, Antioxidant In Therapy And Preventive Medicine 1990 262: 93-103.
16. Mooradian, A D, Failla, M, Hoogwerf, B, Marvniuk, M and Rosett, J W Selected vitamins and minerals in diabetes. Diabetes Care 1994 17(5):464-470.
17. Wartanowicz, M, Kresowska, B P, Zimlanski, S and Okolska, G The effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on the serum lipid peroxide level in elderly people. Ann. Nutr. Metab. 1984 28: 186-191.
18. Prichard, K A, Patell, S T, Karpen, C W, Newman, H A I and Panganamala, R V Triglyceride lowering effect of dietary vitamin E in streptozotocin-induced rats. Diabetes 1986 35:278-281.

19. Duthie, G G , Arthur, J R and James, P T Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status, Am. J. Clin. Nutr. 1991 53: 1061-1063.
20. Packer, L The role of antioxidative treatment in diabetes mellitus, Diabetologia 1993 36:1212-1213.
21. Shoff, S M , Perlman, J A , Cruickshanks, K J , Klein, R and Klein B E K Glycosylated hemoglobin concentrations and vitamin E, vitamin C and b- carotene intake in diabetic and non diabetic older adults, Am. J. Clin. Nutr. 1993 58: 412-416.
22. Ceriello, A , Giugliano, D , Quatro, A , Donzella, C , Lefebvre, P J Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes, Diabetes Care. 1991 14:68-72.
23. Vatassery, G T , Morley, J E and Kuskowski, M A Vitamin E in plasma and platelets of human diabetic patients and control subjects, Am. J. Clin. Nutr. 1983 37: 641-644.