

Araştırma Makalesi
Adıyaman Hastanelerine Başvuran KOAH'lı Hastalarda Antioksidan Sistem Enzim Aktivitelerinin
İncelenmesi

Research Article
Antioxidant Enzyme Activities in Patients with COPD Admitted to Hospitals in Adıyaman

Devrim TAŞKIN¹, Muhittin ÖNDERCI², Serap YALIN³, Füsun FAKIOĞLU¹, Ülkü ÇÖMELEKOĞLU⁴, Sedat YILMAZ², Abdullah ARPACI²

¹Adıyaman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Adıyaman

²Adıyaman Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adıyaman

³Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

⁴Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Amaç: Adıyaman'da yaşayan kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan hastalarda antioksidan sistem enzimlerinden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), paraoksonaz 1 (PON 1) enzim aktivitelerinin lipid peroksidasyonu ürünlerinden malondialdehid (MDA) düzeyleri incelendi. Bölgedeki ilk çalışma oldu.

Yöntem: Adıyaman Eğitim ve Araştırma hastanelerine başvuran olgulardan alınan kan örneklerinde lipid peroksidasyonunu belirlemek için malondialdehid (MDA) düzeylerine, antioksidan düzeylerini belirlemek için ise katalaz, paraoksonaz 1 (PON1) ve süperoksitdismutaz (SOD) aktivitelerine bakıldı. EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve analiz yapılabilmek için -20°C'de saklandı. SOD, MDA PON1 ve CAT değerleri bakımından kontrol, KOAH grupları arasındaki istatistiksel farklılıkların test edilmesinde ANOVA ve alt grup karşılaştırmalarında LSD çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Tanıtıcı istatistik olarak ortalama ± standart sapma değerleri verildi ve değişkenler için Error bar grafikleri çizildi.

Bulgular: Elde edilen bulgulara göre MDA düzeyleri kontrol grubunda 6,88 ± 2,14nmol/L iken, KOAH'lı hastalarda 12,88 ± 6,01 nmol/L olarak bulundu. Plazma katalaz seviyeleri kontrol grubunda 48,23 ± 18,86 U/L iken, KOAH'lı hastalarda 17,09 ± 8,82 U/L olarak tespit edildi. Plazma PON aktivite kontrol grubunda 45,89 ± 16,46 U/L iken, KOAH'lı hastalarda 28,52 ± 14,85U/L olarak saptandı. Plazma SOD aktiviteleri kontrol grubunda 60,36 ± 20,29U/L iken, KOAH'lı hastalarda 33,44 ± 12,32U/L olarak ölçüldü. KOAH olgularının verileri, kontrol grubunun verileri ile karşılaştırıldığında plazma MDA konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışın (p<0.01), plazma katalaz, PON1 ve SOD aktivitelerinde ise grupta anlamlı bir azalmanın olduğu (p<0.01) saptandı.

Sonuç: Çalışmamızda görüldüğü gibi; KOAH'lı hastalarda; genel olarak Antioksidan sistem defans sisteminde yetmezlik durumu oluşmuştur. Bu durum hastalarda Oksidatif Stres'in gelişmesine ve KOAH komplikasyonlarına neden olacaktır. Sonuçlarımız Literatür ile uyumludur.

Anahtar Sözcükler: KOAH, oksidatif stres, süperoksit dismutaz, katalaz, paraoksonaz 1, malondialdehid

Abstract

Aim: Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and paraoxonase 1 (PON1) and as an indicator of lipid peroxidation, the level of malondialdehyde (MDA) in patients with COPD in Adıyaman were investigated. This is the first report of mentioned parameters in Adıyaman.

Method: Samples of patients admitted to Adıyaman Training-Research Hospital were used to evaluate antioxidant status, activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and paraoxonase were determined. To detect lipid peroxidation as an oxidative stress marker, MDA levels were measured. Blood samples were collected in tubes with EDTA, centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm and plasma samples were kept at -20°C until analysis. Statistical Analyses; SOD, MDA PON and catalase values of study group and control group were compared with using one-way analysis of variance ANOVA. LSD multiple comparison test were used to compare differences within subgroups. Data were presented as mean ± standard deviation and error bars for variables were drawn.

Results: MDA levels in control group were 6,88 ± 2,14nmol/L and 12,88 ± 6,01nmol/L in COPD group. Plasma CAT levels were 48,23 ± 18,86U/L in control group and 17,09 ± 8,82U/L in COPD group. Plasma PON activity was 45,89 ± 16,46U/L in control group and 28,52 ± 14,85U/L in COPD group. Plasma SOD activity was 60,36 ± 20,29U/L in control group and 33,44 ± 12,32U/L in COPD group. Taken together, compared to control group MDA levels were significantly higher (p<0.01) while CAT, PON and SOD activities were significantly lower (p<0.01) in COPD group.

Conclusion: Data obtained from present study indicates that an insufficiency in antioxidant system was seen in COPD patients. This would cause oxidative stress and COPD complications. Results are consistent with literature.

Keywords: COPD, oxidative stress, superoxide dismutase, catalase, paraoxonase 1, malondialdehyde.

Adıyaman Üniv Sağlık Bilim Derg, 2015; 1(1):23-28

Yazışma adresi: Yrd. Doç. Dr. Muhittin ÖNDERCI,
Adıyaman Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adıyaman.
Tel: 0 416 22316 90/1465
Faks: 0 416-2231693
E-posta: monderci@adiyaman.edu.tr

Giriş

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), kronik havayolu zedelenmesi ve ilerleyici hava akımı kısıtlanması ile karakterize tam olarak geri dönüşümlü olmayan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Hastalık, zararlı gaz ve partiküllere özellikle sigara dumanına maruziyete karşı gelişen enflamatuvar bir yanıt olarak ortaya çıkar (1). KOAH, obstrüktif bronşiolit ve anfizem gibi hava yolu zedelenmelerin karışımı ile oluşur (2).

Yirminci yüzyılın sonlarına kadar KOAH erkek hastalığı olarak kabul edilirken 2000 yılında ABD de KOAH'dan ölen kadınların sayısı erkeklere yetişmiştir ve cinsiyet açısından da fark kalmamıştır. Az gelişmiş ve Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde yakıt olarak kullanılan maddelere bağlı oluşan hava kirliliği ve yaşlı nüfusunda giderek artması ile KOAH yükünün daha da artacağı düşünülebilir (3). Dünyada en sık sakat bırakan hastalıklar sıralamasında KOAH, 2002 yılı verilerine göre 11. sırada yer alırken, 2030'da 5. sırada yer alacağı ön görülmektedir. Türkiye'de ise en sık sakat bırakan hastalıklar arasında KOAH 8. sırada yer almaktadır (1).

Çeşitli pnömonilerin nedenleri arasında immün değişiklikler, proteolitik ve oksidatif hasarlar, endotelial disfonksiyon ve steroid resistansı tanımlanmıştır (4-5). KOAH patogeneğinde bu mekanizmalara ilave olarak genetik, diyet ve enfeksiyon heterojenitesi de diğer faktörler olarak sayılır (6-7). Sigara içme KOAH'ın %80-90 oranında predominant nedendir. Buna karşın sigara içenlerin %15-20 sinde KOAH'ın klinik belirtileri görülür.

Oksidatif stres; akciğer kanseri, KOAH, arteriosklerosis gibi bazı hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar ve özellikle KOAH hastalarının ağırlaştığı zamanlarda (kriz dönemlerinde) artar. Bu durum GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) kriterlerinde de tanımlanmıştır. Aktive edilen inflamatuvar hücreler, nötrofiller ve alveolar makrofajlar hastalarda endojen olarak oksidan üretir. Antioksidanların kullanımı oksidatif stresin hasarını minimize eder ya da azaltır (2,9). MDA lipidperoksidasyonunun genel olarak kullanılan önemli bir indikatörüdür (9-11). MDA özellikle kriz dönemlerinde daha fazla yükselir (12).

Bu çalışmada Adıyaman Devlet hastanelerine başvuran KOAH'lı hastalarda antioksidan enzimler SOD, CAT ve PON1 enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonunun indikatörü olarak MDA düzeyleri ölçüldü.

Gereç ve Yöntemler

Çalışmaya Adıyaman Devlet Hastanesi Dahiliye Polikliniği'ne müracaat eden KOAH tanısı konulan 100 hasta ve KOAH tanısı konmamış, aile öyküsünde KOAH'lı hasta bulunmayan 100 sağlıklı birey dahil edildi. Çalışma, Adıyaman Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı. Hem hasta hem de kontrol grubu çalışmaya alınmadan önce çalışma konusunda bilgilendirildi.

Olgulardan alınan kan örneklerinde lipid peroksidasyonunu belirlemek için MDA düzeylerine, antioksidan düzeylerini belirlemek için ise CAT, PON1 ve SOD aktivitelerine bakıldı. EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri 10 dakika 3000rpm'de santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve analiz yapılabilmek için -20°C'de saklandı.

MDA Ölçümü

Lipid peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın tiobarbitirik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbansının 532nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü hesaplandı (13).

Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivitesi tayini Aebi tarafından tarif edilen yöntemle yapıldı. Yöntemin esası, H₂O₂ substratın katalaz ile enzimatik yıkılmasının 240nm de izlenmesidir (14).

PON1 Enzim Aktivitesi Tayini

PON1 aktivite tayini Eckerson ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle yapıldı. Aktivite ölçümünde 2mM CaCl₂ ve 4mM paraokson ihtiva eden 100mM Tris-HCl, pH8.0 tamponu kullanılarak paraokson'un enzimatik hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenol'ün 412nm'deki oluşumu ölçülerek PON aktivitesi tayin edildi (15).

SOD Enzim Aktivitesi Tayini

Deneyin prensibi; Oksidatif yolla enerji üretimi sırasında oluşan endojen ve eksojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantinoksidazın açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin nitrobluetetrazolium (NBT) ile 560nm'de absorblanan rengin ölçülmesine dayanır (16).

İstatistiksel Analiz

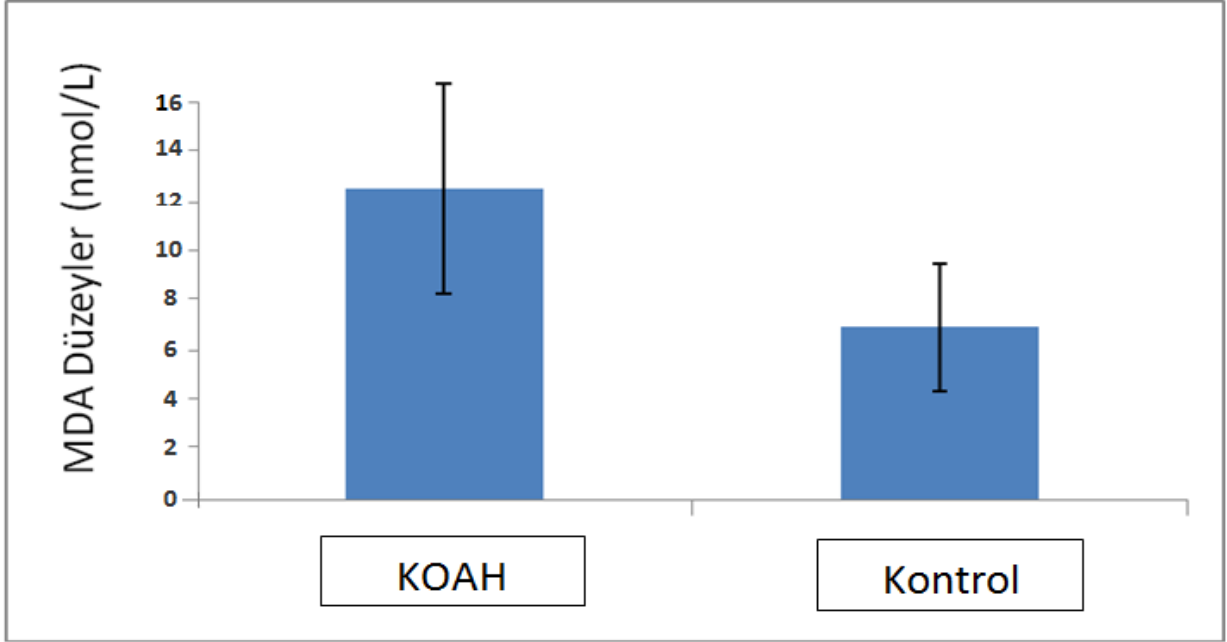
SOD, CAT, PON1 ve MDA değerleri bakımından kontrol grubu ile KOAH grupları arasındaki istatistiksel farklılıkların test edilmesinde ANOVA ve alt grup karşılaştırmalarında LSD çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Tanıtıcı istatistik olarak ortalama ± standart sapma değerleri verildi ve değişkenler için Error bar grafikleri çizildi. Genotip ve allelerin görülme sıklığının gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki kare ve Fisher testi kullanıldı. Analizler istatistiksel analizler MedCalc v. 12.3.0 paket programıyla değerlendirildi.

Bulgular

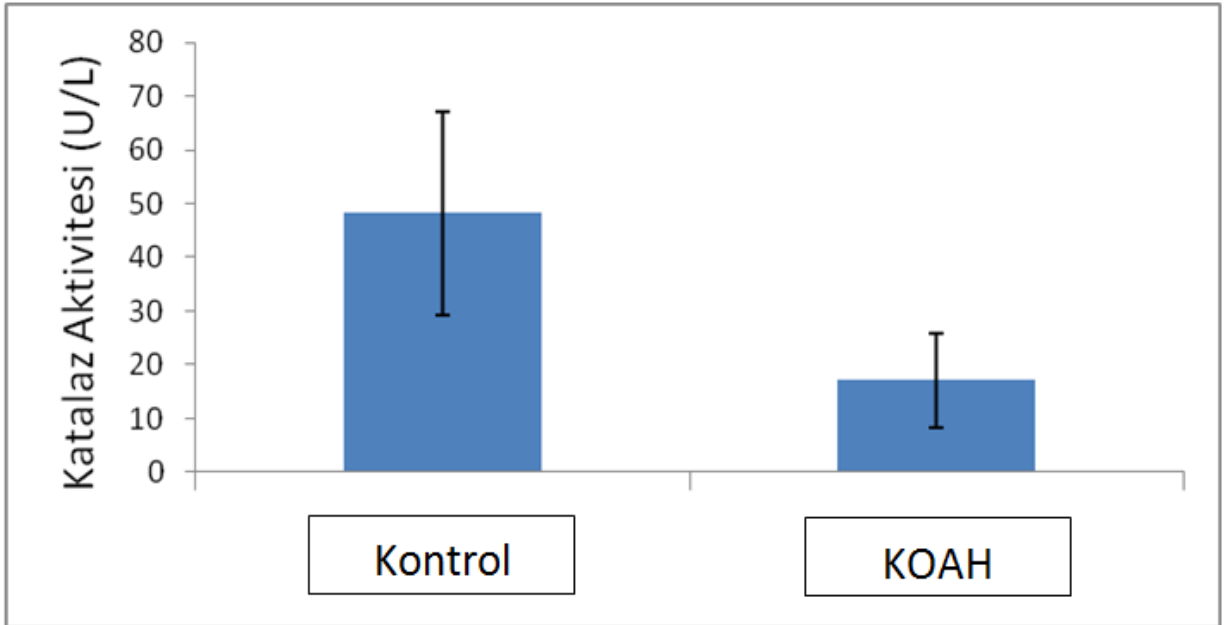
Tüm gruplara ait plazma MDA düzeyleri ile katalaz, PON1 ve SOD enzim aktivitelerinin sonuçları Şekil 1-4'te gösterildi.

Elde edilen bulgulara göre MDA düzeyleri kontrol grubunda $6,88 \pm 2,14$ nmol/L iken, KOAH'lı hastalarda $12,88 \pm 6,01$ nmol/L olarak bulundu.

Taşkın ve ark.

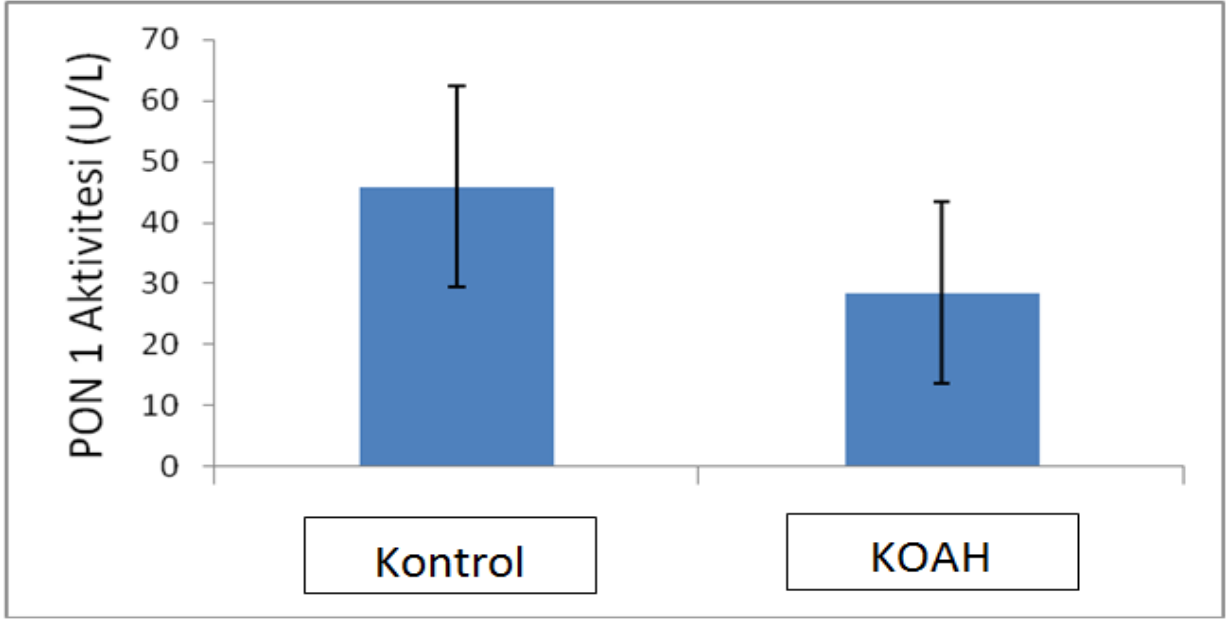


Şekil 1. Kontrol ve KOAH gruplarının MDA düzeyleri
Plazma katalaz seviyeleri kontrol grubunda $48,23 \pm 18,86$ U/L iken, KOAH'lı hastalarda $17,09 \pm 8,82$ U/L olarak tespit edildi.



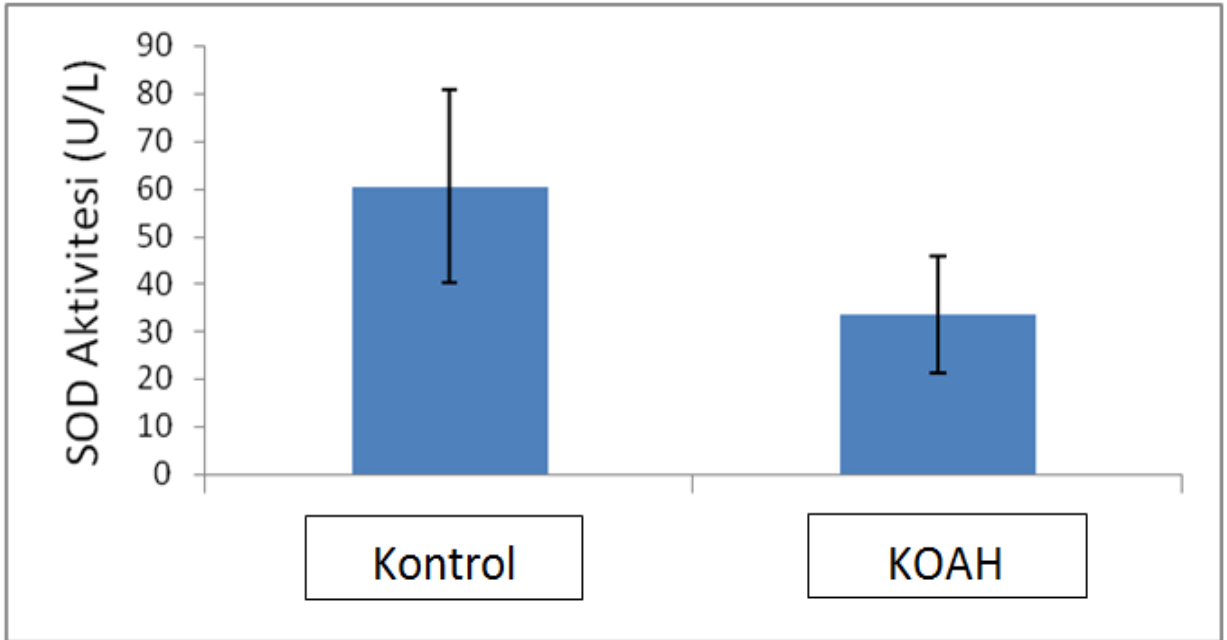
Şekil 2. Kontrol ve KOAH gruplarının katalaz aktiviteleri
Plazma PON1 aktiviteleri kontrol grubunda $45,89 \pm 16,46$ U/L iken, KOAH'lı hastalarda $28,52 \pm 14,85$ U/L olarak saptandı.

Taşkın ve ark.



Şekil 3. Kontrol ve KOAH gruplarının PON 1 aktiviteleri

Plazma SOD aktiviteleri kontrol grubunda $60,36 \pm 20,29$ U/L iken, KOAH'lı hastalarda $33,44 \pm 12,32$ U/L olarak tespit edildi.



Şekil 4. Kontrol ve KOAH gruplarının SOD aktiviteleri

KOAH olgularının verileri, kontrol grubunun verileri ile karşılaştırıldığında, plazma MDA konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışın ($p < 0.01$), plazma katalaz, PON1 ve SOD aktivitelerinde ise anlamlı bir azalmanın olduğu ($p < 0.01$) saptandı.

Tartışma

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2004 yılında bildirilen tüm yaşlarda en fazla ölüme neden olan hastalıklar arasında %5,1 oranı ile 4. Sırada bildirmiştir. ABD de son 30-40 yılda ölüme neden olan hastalıklardan yalnızca KOAH'ın sıklığı artmıştır. Akciğerler sürekli olarak oksidan maddelerin etkisi altındadırlar. Bunlar endojen kaynaklı fagositler ya da diğer hücrelerinden eksojen kaynaklı hava kirliliği ya da sigara kaynaklıdır. Buna ek olarak hücre içi oksidanlar mitokondrial elektron transportundan ve birçok hücrede sinyal yollarında üretilir. Akciğer hücreleri iyi tanımlanmış oksidan ya da antioksidan sistemlerle bu oksidatif değişikliklere karşı kendini korur. Oksidan/antioksidan denge aşırı oksidan ve/veya antioksidan azalması sonucu bozulur ve oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres sadece akciğerlerde zedelenme değil aynı zamanda akciğer inflamasyonu yapan moleküler mekanizmaları da aktive eder (17-18).

Çalışmamızda KOAH'lı hastalarda MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Bu bulgu KOAH da oksidan etki ile lipidperoksidasyonu olduğunu belirgin olarak göstermektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, Ağaçdiken ve ark. (19) Kocaeli, Işık ve ark. (20) Diyarbakır, Tuğ ve ark'ları (21) Elazığ'da KOAH hastalarında MDA düzeylerini kontrollere göre anlamlı yüksek bulmuşlardır.

Önemli antioksidan rolü olan PON1 enziminin aktivitesinin LDL lipid peroksidasyonunun oluştuğu durumlarda anlamlı derecede düşmektedir. Bir çalışmada da sigara içmenin PON enzimatik aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir (22). Paraoksonaz (PON1) enzimi yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde (HDL) bulunan, kalsiyuma bağımlı bir ester hidrolazdır ve karaciğerde sentezlenmektedir. Organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme özelliği vardır. İnsanlarda PON1 ayrıca böbrekler, beyin, kalp, ince bağırsak ve akciğerde de bulunmaktadır (23-28). Bizim çalışmamızda KOAH grubunda PON1 enzim aktivitesinde anlamlı düzeyde ($p<0.01$) düşüş bulundu.

Plazma CAT ve SOD düzeylerinde de istatistiksel olarak anlamlı düşüş bulundu ($p<0.01$). Hem MDA düzeylerindeki artış hem de PON, SOD, Katalaz antioksidan enzim düzeylerinde düşüşler çalışmaya alınan KOAH hastalarında total oksidan/antioksidan dengesinin oksidanlar lehine bozulduğunu göstermektedir. Akciğerler oksijenle teması en çok olan organ olduğu için KOAH hastaları dış kaynaklı oksidatif strese en çok maruz kalan hastaların başında geldiği söylenebilir. Sonuçlarımız literatürdeki bilgiler ile uyumludur. Oksidatif stresin akciğer kanseri, diabet gibi kronik hastalıklarda da geliştiği bilinmektedir. KOAH da bu hastalıklardan biridir ve morbidite-mortalite oranlarında hızla yükselmektedir (17, 29-31).

Sonuç olarak, sigara içme oranının yüksek olduğu, çiftçilikle uğraşan kentimizde akciğer iritanlarına çokça

maruz kalınmaktadır. Ayrıca kış aylarında yoğun kullanılan biomas (kömür, odun) yakıtlar yoğun hava kirliliğine neden olmaktadır. Adıyaman'da bu sonuçlara bakılarak KOAH hastalığının artacağı söylenebilir. Çalışmamızın kısıtlılığı aktivitelere bakılan enzimlerin genetik polimorfizmlerinin incelemesinin de yapılması daha uygun olabilirdi, ileriki çalışmalarda planlanmasında yarar olacağı kanısındayız.

Teşekkür

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Biriminin TIPFBAP 2010/0001 nolu projesi ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Kocabaş A, Yıldırım N, Gürgün A, Saryal S, Köktürk N, Yarkin T, Kıyan E, Kunt Uzaslan E, Sevinç C, Çöplü L, Saymer A, Günen H, Karakurt S, Ergün P, Erdinç M, Şen E, Umut S, Yılmaz V, Çımrın AH, Demir T. KOAH Epidemiyolojisi, Yükü ve Ulusal Kontrol Programı. Editörler: Sema Umut, Sevgi Bartu Saryal. Türk Toraks Derneği Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Tanı Ve Tedavi Uzlaş Raporu. Ankara. Görsel Dizayn Ofset Matbaacılık Tic. Ltd. Şti. 2010. Sayfa: 7-12.
2. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease *Eur Respir J* 2003; 21:347-60.
3. Günen H, Hacıevliyagil S, Yetkin O, Gülbaş G, Mutlu LC, Pehlivan E. Prevalence of COPD: first epidemiologica lstudy of a large region in Turkey. *Eur J Intern Med* 2008; 19: 499-504.
4. Uzun K. Oxidative stress in smokers and COPD. *T Klin J Med Sci* 1999; 19(2): 123-129.
5. Man SF, Connett JE, Anthonisen NR, Wise RA, Tashkin DP, Sin DD. C-reactive protein and mortality in mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2006; 61: 849-53.
6. Yin P, Jiang CQ, Cheng KK, Lam TH, Lam KH, Miller MR, Zhang WS, Thomas GN, Adab P. Passive Smoking Exposure and risk of COPD among adults in China. The Guangzhou Biobank Cohort Study. *Lancet* 2007; 370: 751-757.
7. Tzortzaki EG, Stafakas NM. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* 2006; 38: 84-99.
8. Buist AS. Introduction. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5:796-9.
9. World Health Organization. Global Burden Disease. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf. Erişim tarihi: 05.05.2015.
10. Global Initiative for Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. GOLD 2009. www.goldcopd.org. Erişim tarihi: 05.05.2015.

Taşkun ve ark.

11. M Siedlinski, CC vanDiemen, DS Postman JM, Vonkand HM. Boezen. Superoxide dismutases, lung function and bronchial responsiveness in a general population. *Eur Respir J* 2009; 33: 986–992.
12. Mac Neeand Rahman I. Oxidants and antioksidants as thrapeuatic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit Care Med* 1999; 160: 58S-65S.
13. Yagi K. Simple procedure for specific enzyme of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 1998; 108:107–110.
14. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
15. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 1126-38.
16. Sun Y, Oberley LW, YingL. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
17. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 33–50.
18. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 1998; 53: 601–612.
19. Agacdiken A, Basyigit I, Ozden M, Yildiz F, Ural D, Maral H, Boyaci H, Ilgazli A, Komsuoglu B. Theeffects of antioxidants on exercise-induced lipid peroxidation in patients with COPD. *Respirology* 2004; 9(1): 38-42.
20. Isik B, Ceylan A, Isik R. Oxidative Stress in Smokers and Non-smokers. *Inhal Toxicol* 2007; 19(9): 767–769.
21. Tug T, Karatas F, Terzi SM. Antioxidant vitamins (A, C and E) and malondialdehyde levels in acute exacerbation and stable periods of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Invest Med* 2004; 27(3): 123-8.
22. Nishio E, Watanabe Y. 1997. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236(2): 289-93.
23. Antikainen M, Murtomäki S, Syväne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, Frick MH, Ehnholm C. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996; 98(5): 883-5.
24. Juretić D, Tadijanović M, Rekić B, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Barić M. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohortstudy. *Croat Med J* 2001; 42: 146-50.
25. Li WF, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifostoxicity in mice. *Toxicol Lett* 1995; 76:219-26.
26. La Du BN, Adkins S, Kuo CL, Lipsig D. Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interact* 1993; 87(1-): 25-34.
27. La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med* 1996; 2: 1186.
28. Taşkıran P, Cam SF, Sekuri C, Tüzün N, Alioğlu E, Altıntaş N, Berdeli A. The relationship between paraoxonase gene Leu-Met (55) and Gln-Arg (192) polymorphisms and coronary artery disease. *Turk Kardiyol Dem Ars* 2009; 37;(7): 473-478.
29. Mak JC, Ho SP, Yu WC, Choo KL, Chu CM, Yew WW, Lam WK, Chan-Yeung M. Polymorphisms and functional activity in superoxide dismutase and catalase genes in smokers with COPD. *Eur Respir J* 2007; 30(4): 684–690.
30. Ilieva V, Nikolava G, Gadjeva V. Lipid peroxidation and catalase activities in patients with choronic obstructive pulmanary diseases: A comparative study with other pulmonary diseases. *Trakia J of Sciences* 2014; No: 2, pp:177-181.
31. Kohei KAKU. Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Its Treatment Policy. *JMAJ* 2010; 53(1): 41–46.