ผลการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีต่อการทำงานของเอนโดทีเลียม ในหนูที่ถูกทำให้เป็นเบาหวานด้วย เสตรปโตโซโตซิน

นางสาว อัมพร จาริยะพงศ์สกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาสรีรวิทยา สหสาขาวิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-0520-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18 ธ.ค. 2545
I19978868

ANTIOXIDANT EFFECT OF VITAMIN C ON ENDOTHELIAL FUNCTION IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

Miss Amporn Jariyapongskul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Physiology
Inter-Department of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2000

ISBN 974-13-0520-6

Thesis Title	ANTIOXIDANT EFFECT OF VITAMIN C ON ENDOTHELIAL FUNCTION IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS
By	Miss. Amporn Jariyapongskul
Field of Study	Physiology
Thesis Advisor	Associate Professor . Suthiluk Patumraj, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Hideyuki Niimi, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Doctor's Degree

.....Dean of Graduate School

(Professor . Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor . Prasong Siriviriyakul, M.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor . Suthiluk Patumraj, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Hideyuki Niimi, Ph.D.)

.....Member

(Laddawal Phivthongngam, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor. Sompongse Suwanwalaikorn, M.D.)

อัมพร จาริยะพงศ์สกุล : ผลการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีต่อการทำงานของเอ็นโดทีเลียมในหนูที่ถูกทำให้เป็นเบาหวาน
ด้วยเสตรปโตโซโตซิน (Antioxidant Effect of Vitamin C on Endothelial Function in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : Dr . Hideyuki Niimi, 145 หน้า.
ISBN 974-13-0520-6.

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการให้วิตามินซี ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติเสริมในระยะยาว ต่อการป้องกันความผิดปกติในการทำงานของเอ็นโดทีเลียมของหลอดเลือดเล็กในสมองในสภาวะเบาหวาน โมเดลของสัตว์ทดลองที่ใช้ทำการศึกษาคือหนูที่ถูกทำให้เป็นเบาหวาน โดยวิธีฉีดสารเสตรปโตโซโตซินเพียงครั้งเดียวเข้าทางหลอดเลือดดำในขนาดความเข้มข้น 55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

หนูวิสตาร์เพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม ได้ถูกแบ่งแบบสุ่มเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มควบคุม (CON) และกลุ่มเบาหวาน (STZ) ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มยังถูกแบ่งต่อเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มที่ไม่ได้รับวิตามินซีและกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี การให้วิตามินซีโดยให้สัตว์ทดลองดื่มน้ำ ซึ่งผสมวิตามินซีในขนาดความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร อย่างอิสระ

เทคนิคทาง อินทราไวทัล ฟลูออเรสเซ้นท์ ไมโครสโคปี้ จะถูกนำมาใช้เมื่อครบ 12, 24 และ 36 สัปดาห์หลังจากได้รับการฉีดสารเสตรปโตโซโตซิน โดยการเปิดกระโหลกศีรษะและวิธีโคลส คราเนี่ยว วินโด เพื่อศึกษาการไหลเวียนของหลอดเลือดเล็กในสมอง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะเก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อสมองบริเวณที่ศึกษาหลอดเลือดข้างต้น เพื่อทดสอบสารเคมีในเลือดและถ่ายภาพเนื้อเยื่อสมองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่าหลังจากหนูทดลองได้รับการฉีดเสตรปโตโซโตซินแล้ว 12, 24 และ 36 สัปดาห์ จะเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง, โคเลสเตอรอลในเลือดสูงและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และสูงสุดที่ 36 สัปดาห์ ขณะเดียวกันพบว่าระดับวิตามินซีในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มเบาหวาน เป็นที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ได้รับวิตามินซีจะต่ำกว่าระดับน้ำตาลของหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม 36 สัปดาห์หลังฉีดเสตรปโตโซโตซิน (ระดับน้ำตาลในเลือด : หนูเบาหวาน = 398.12±17.12 มิลลิกรัม/เดซิลิตร, หนูเบาหวานที่ได้รับวิตามินซี = 317.28±29.59 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ; $p < 0.05$) นอกจากนั้นที่ 36 สัปดาห์ระดับโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาของหนูเบาหวานที่ได้รับวิตามินซีมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูเบาหวาน (ระดับโคเลสเตอรอล : หนูเบาหวาน = 157.83±25.21 มิลลิกรัม/เดซิลิตร, : หนูเบาหวานที่ได้รับวิตามินซี = 71.33±4.72 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ; ไตรกลีเซอไรด์ : หนูเบาหวาน = 154.17±37.09 ,:หนูเบาหวานที่ได้รับวิตามินซี = 53.56±8.13 มิลลิกรัม/เดซิลิตร)

นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยความดันเลือดแดงของหนูเบาหวานมีค่าสูงขึ้นในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา ขณะที่อัตราการไหลของเลือดในหลอดเลือดเล็กของสมองมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูเบาหวานกลุ่ม 36 สัปดาห์ วิตามินซีมีผลในการลดความผิดปกติดังกล่าว ทั้งค่าเฉลี่ยความดันเลือดแดงและอัตราการไหลของเลือด (อัตราการไหลของเลือด : หนูเบาหวาน 36 สัปดาห์ = 0.40±0.04 นาโนลิตร/วินาที, : หนูเบาหวานได้รับวิตามินซี 36 สัปดาห์ = 1.92±0.09 นาโนลิตร/วินาที) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อทดสอบผลต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีโดยตรงต่อการทำงานของเอ็นโดทีเลียม, จำนวนการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวจะถูกนับและทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือดสมองขนาดเล็กต่อสารอะเซทิลโคลีน, อะดีโนซีน-5-ไดฟอสเฟต และไนโตรกลีเซอรีน ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าในกลุ่มหนูเบาหวาน 36 สัปดาห์ เม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนผนังเอ็นโดทีเลียมเซลล์ของหลอดเลือดดำโพสแคปปิลารี่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูเบาหวานทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษาเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (หนูเบาหวาน 36 สัปดาห์ = 4.63±0.33 เซลล์/100 ไมโครเมตร,หนูควบคุมที่ 36 สัปดาห์ = 0.62±0.16 เซลล์/100 ไมโครเมตร) และวิตามินซีสามารถลดการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวในหนูเบาหวานทั้ง 3 ช่วงอายุ นอกจากนี้การศึกษาการตอบสนองของหลอดเลือดเล็กสมอง (20-30 ไมโครเมตร) พบว่าการขยายตัวของหลอดเลือดต่ออะเซทิลโคลีนและอะดีโนซีน-5 ไดร์ฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารที่ขึ้นต่อเอ็นโดทีเลียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูเบาหวานทั้ง 3 ช่วงอายุ เทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ($p<0.01$) การให้วิตามินซีเสริมสามารถป้องกันความบกพร่องในการขยายตัวของหลอดเลือดสมองต่ออะเซทิลโคลีนและอะดีโนซีน-5 ไดฟอสเฟตได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อไนโตรกลีเซอรีน ซึ่งเป็นสารที่ไม่ขึ้นต่อเอ็นโดทีเลียม ไม่พบความแตกต่างในการขยายตัวของหลอดเลือดระหว่างหนูควบคุมและหนูเบาหวานทั้งกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับวิตามินซี ยิ่งไปกว่านั้นการให้วิตามินซีเสริมสามารถป้องกันการหนาตัวของเนื้อเยื่อเบสเมนต์เมมเบรนของหลอดเลือดเล็กและหลอดเลือดแคปปิลารี่ของสมองในหนูเบาหวานได้เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ($p<0.01$)

การศึกษาครั้งนี้สรุปว่า การได้รับวิตามินซีซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน สามารถป้องกันการเสียหน้าที่ของเอ็นโดทีเลียมของหลอดเลือดเล็กในสมองของหนูเบาหวานได้ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขนาดเล็กของหลอดเลือด ดังนั้นวิตามินซีอาจมีความสำคัญสำหรับใช้รักษาเพื่อป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดสมองที่เกิดจากเบาหวานได้ในอนาคตอันใกล้นี้

หลักสูตร สหสาขาวิชาสรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต อัมพร จาริยะพงศ์สกุล
สาขาวิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุทธิลักษณ์ ปทุมราช
ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

3972478930 :MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS / ENDOTHELIAL FUNCTION / VITAMIN C / INTRAVITAL FLUORESCENCE MICROSCOPIC STUDY / CEREBRAL MICROCIRCULATION / ANTIOXIDANT

AMPORN JARIYAPONGSKUL : ANTIOXIDANT EFFECT OF VITAMIN C ON ENDOTHELIAL FUNCTION IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF.SUTHILUK PATUMRAJ, Ph.D., DR. HIDEYUKI NIIMI, Ph.D. 145 pp. ISBN 974-13-0520-6.

To examine the efficacy of long-term supplemented vitamin C, a natural antioxidant, on the prevention of endothelial dysfunction in diabetic cerebral microcirculation, the animal model of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (a single intravenous injection of STZ; 55 mg/kg bw) was used.

Male Wistar Furth rats weighing 200-250 g were divided randomly into two major groups of diabetes (STZ) and non-diabetes(CON). In each group, two subgroups were further randomly divided as followings: CON with supplemented and CON without supplemented by vitamin C, and STZ with supplemented and STZ without supplemented by vitamin C. The treatment of vitamin C was performed by allowing the animals freely assessed to drinking water added 1g/L of vitamin C.

The intravital fluorescent microscopy technique was performed at 12, 24 and 36 weeks (wks) after the injection of STZ by using a craniotomy and a closed cranial window technique for cerebral microcirculatory visualization. At the end of each experiment, blood sample and cerebral tissues from the same fluorescent studied area were taken for metabolic and transmission electron microscopic studies, respectively.

The experimental results showed that at 12, 24, and 36 wks after the STZ injection, hyperglycemia, hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia were significantly developed and markedly severe at 36 weeks. Simultaneously, the decreased plasma vitamin C level was also demonstrated significantly in STZ-rats. Interestingly, the present study demonstrated that the level of blood glucose (BG) in STZ-Vit C rats was significantly less than the value of STZ-rats, however, the significant difference was only monitored at 36 wks after STZ injection (BG ; STZ-rats = 398.12 ± 17.12 mg/dl, BG ; STZ-Vit C rats = 317.28 ± 29.58 mg/dl; $p<0.05$). Moreover, at 36 wks, the results of plasma cholesterol (Chol) and triglyceride (TG) levels in STZ-Vit C rats were significantly different than those values of STZ-rats (Chol ; STZ-rats = 157.83 ± 25.21 mg/dl; cholesterol (Chol) level of STZ-Vit C rats = 71.33 ± 4.72 mg/dl, triglyceride (TG) level of STZ-rats = 154.17 ± 37.09 mg/dl; triglyceride level of STZ-Vit C rats = 53.56 ± 8.13 mg/dl).

Besides, the results also showed that mean arterial pressure (MAP) was elevated for all three monitored time point whereas the mean value of cerebral arteriolar flow rate was significantly reduced in 36 wks STZ- rats. Vitamin C has the benefit effects to reduce these abnormalities of both MAP and the arteriolar flow rate (arteriolar flow rate : 36 wks STZ-rats = 0.40 ± 0.04 nl/sec, 36 wks STZ-Vit C rats = 1.92 ± 0.09 nl/sec). Especially, to examine the antioxidant effect of vitamin C directly on endothelial function, the number of leukocytes adhesion were counted. And the cerebral arteriolar responses to acetylcholine (Ach), adenosine-5' diphosphate (ADP) and nitroglycerine (NTG) were respectively examined. The results demonstrated that there were the significantly increased leukocytes adhesion on the endothelial cells of postcapillary venules in STZ-rats for all three monitored time point as compared to the CON-rats (36 wks STZ-rats = 4.63 ± 0.33 cells/100μm; 36 wks CON-rats = 0.62 ± 0.16 cells/100μm). Interestingly, the leukocytes adhesion were almost entirely prevented by vitamin C supplementation for all three monitored time points. Moreover, for all three monitored time points, the responses of cerebral arterioles (20-30 μm) demonstrated that the endothelium-dependent vasodilation to Ach and ADP were significantly decreased in STZ-rats as compared to the CON-rats ($p<0.01$). The supplementation of vitamin C could significantly prevent these impairment of endothelium-dependent vasodilation to Ach and ADP. However, the responses of endothelium-independent vasodilation to NTG were evaluated, no significant differences were found between control and diabetic rats both with and without vitamin C supplementation. Moreover, the vitamin C supplementation could also prevent the thickening of basement membrane that were occurred in the cerebral arterioles and capillaries of STZ-rats as compared to those of CON- rats ($p<0.01$).

In conclusion, the present study demonstrated that long-term supplementation of vitamin C, a natural antioxidant, could markedly prevent the diabetic induced endothelial dysfunctions including the ultrastructural changes of cerebral microcirculation. Therefore, vitamin C might be possibly important for the therapeutic prevention of diabetic cerebrovascular diseases in the near future.

Department..... Physiology (Inter-department) Student's signature..... Amporn Jariyapongskul

Field of study..... Physiology Advisor's signature.....

Academic year..... 2000 Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest appreciation to my advisors, Associate Professor Dr. Suthiluk Patumraj and Dr. Hideyuki Niimi for their kind suggestion, Thoughtful advice, helpful guidance and constant encouragement through this thesis.

I am indebted to all of the teaching staff of the Inter-Department of Physiology, Graduate school, Chulalongkorn University for giving me the knowledge in Physiology which have enable me to a successful study

I am also very grateful to the members of the thesis committee for their valuable suggestion and correction on my work.

My sincere appreciation is expressed to Professor Piyaratana Tosukhawong, Miss Supang Maneesri, and Miss Penpan Nuanlboonma for their continuous and experienced assistance.

I also wish to express my sincere thanks to all members of Depatment of Vascular Physiology, National Cardiovascular Research Institute ,Osaka Japan for their experienced assistance and the use of their facilities

I would like to thank the committee of the Graduate School, Chulalongkorn University for the research grant to support this study. Moreover, I am extremely grateful to my parents for their love, understanding and encouragement throughout my long period study.

Finally, I would like to special thank Miss Pilaiporn and all of my friends who learn Master's degree of physiology at chulalongkorn University for their help and cheerfulness.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT THAI.....iv

ABSTRACT ENGLISH v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES..... xi

LIST OF ABBREVIATIONS..... xiv

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

II. REVIEW LITERATURE.....5

III. MATERIALS AND METHODS.....45

IV. RESULTS.....58

V. DISCUSSION.....95

VI. CONCLUSION.....114

REFERENCES.....117

APPENDIX.....141

BIOGRAPHY.....145

LIST OF TABLES

TABLE

1. Means±SEM of body weight of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C) 64
2. Means±SEM of blood glucose (mg/dl) of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C) 66
3. Means±SEM of plasma vitamin C (μmol/L) of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....68
4. Means±SEM of plasma cholesterol (mg/dl) of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....70
5. Means±SEM of plasma triglyceride (mg/dl) of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....72
6. Means±SEM of mean arterial pressure (MAP;mmHg) of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....74

7. Means±SEM of arteriolar flow rate (Q; nl/sec) of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....76

8. Means±SEM of number of leukocytes adhesion (cells/100μm) from postcapillary venules of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....78

9. Means±SEM of responses of cerebral arteriole (20-30 μm) to acetylcholine of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....83

10. Means±SEM of responses of cerebral arteriole (20-30 μm) to adenosine-5′ diphosphate of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....85

11. Means±SEM of responses of cerebral arteriole (20-30 μm) to nitroglycerine of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....87

12. Means±SEM of basement membrane thickening from small arteriole (10-20 μm) of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....89

13. Means±SEM of basement membrane thickening from capillary (4-7 μm) of control rats (CON), control rats supplementation with vitamin C (CON-vit C), streptozotocin rats (STZ) and streptozotocin rats supplementation with vitamin C (STZ-vit C).....92

14.Procedure for enzymatic-assisted plasma ascorbic acid ..... 142 determination

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

1. Process of pathophysiological changes of IDDM 7
2. Production and mechanism of action of nitric oxide (NO) release by endothelial cells 12
3. The relation between the metabolism of glucose by the polyol pathway with nitric oxide (NO).....18
4. Plot of effect of superoxide dismutase (SOD) and SQ29548 on the inhibitory action of prostaglandin H_2 (PGH_2) on acetylcholine induced relaxation 22
5. Sequential multistep model of leukocyte/endothelial adhesion.....25
6. Pathway for the formation of reactive oxygen species.....31
7. Cholesterol metabolism and vitamin C defficiency.....34
8. Metabolism pathway of vitamin C 35
9. Ascorbic acid reduction of S-nitrosothiols.....44
10. Method for measurment of arteriolar diameter.....50
11. Method for calculation the % change of arteriolar diameter.....50
12. Schematic of a setup for intravital microscopy of the cerebro microvasculature in the rat..... 57
13. Effect of vitamin C supplementation on the body weight..... 65
14. Effect of vitamin C supplementation on blood glucose.....67
15. Effect of vitamin C supplementation on plasma vitamin C.....69
16. Effect of vitamin C supplementation on plasma cholesterol.....71
17. Effect of vitamin C supplementation on plasma triglyceride.....73

18.Effect of vitamin C supplementation on
mean arterial pressure.....75
19.Effect of vitamin C supplementation on arteriolar flow rate.....77
20.Effect of vitamin C supplementation on leukocyte adhesion.....79
21.Intravital microscopic demonstration of leukocyte adhesion
in the postcapillary venule of rats 12 wks in control and
STZ rats with and without vitamin C supplementation.....80
22.Intravital microscopic demonstration of leukocyte adhesion
in the postcapillary venule of rats 24 wks in control and
STZ rats with and without vitamin C supplementation.....81
23.Intravital microscopic demonstration of leukocyte adhesion
in the postcapillary venule of rats 36 wks in control and
STZ rats with and without vitamin C supplementation.....82
24.Effect of vitamin C supplementation on responses
of cerebral arterioles (20-30 μm) to acetylcholine.....84
25.Effect of vitamin C supplementation on responses
of cerebral arterioles (20-30 μm) to adenosine-5′-diphosphate.....86
26.Effect of vitamin C supplementation on responses
of cerebral arterioles (20-30 μm) to nitroglycerine.....88
27.Effect of vitamin C supplementation on basement
membrane thickening of small arteriole (10-20 μm).....90
28.TEM photomicrograph of cerebral small arterioles
(10-20 μm) from 36 wks of control and STZ-rats with
and without vitamin C supplementation.....91

29.Effect of vitamin C supplementation on basement membrane thickening of capillary (4-7 μm).....93
30.TEM photomicrograph of cerebral capillary (4-7 μm) from 36 wks of control and STZ-rats with and without vitamin C supplementation.....94
31.Scheme illustration the major mechanism for vitamin C uptake and recycling.....97
32.Proposed mechanism of vitamin C on endothelial function in diabetes mellitus.....113

LIST OF ABBREVIATIONS

AGEs	=	Advanced Glycosylation end products
AM	=	Adhesion molecules
ARIs	=	Aldose reductase inhibitor
cGMP	=	cyclic 3′, 5′ guanosine-monophosphate
DHA	=	Dehydroascorbic acid
EDRF	=	Endothelium-derived relaxing factor
GSH	=	Reduced glutathione
H_2O_2	=	Hydrogen peroxide
HDL	=	High density lipoprotein
ICAM-1	=	Intercellular adhesion molecules 1
IDDM	=	Insulin dependent diabetes mellitus
LDL	=	Low density lipoprotein
LPL	=	lipoprotein lipase
NADPH	=	Nicotinic – adenine dinucleotide phosphate
$NF\text{-}_kB$	=	Nuclear factor kappa B
NIDDM	=	Non- insulin dependent diabetes mellitus
NO	=	Nitric oxide
NOS	=	Nitric oxide synthase
$O_2^{\cdot}$	=	Superoxide anion
$OH^{\cdot}$	=	Hydroxyl radical
$OONO^{\cdot}$	=	Peroxynitrite
PGH_2	=	Prostaglandin H_2
PGI_2	=	Prostacyclin
$ROO^{\cdot}$	=	Peroxyl radical

SOD	=	Superoxide dismutase
TXA_2	=	Thromboxan A_2
VCAM-1	=	Vascular adhesion molecules 1
VLDL	=	Very low density lipoprotein
VSM	=	Vascular smooth muscle