

Depo kanlarına ilave edilen yüksek doz vitamin C'nin eritrosit parametreleri üzerine etkisi*

Fatih Gültekin¹, Mehmet Akdoğan¹, Bahattin Tunç², İbrahim Kılınç¹, Recep Sütçü¹

*: "The Chinese Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2000, Hong Kong, China" da poster olarak sunulmuştur

¹: Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta

²: Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, Isparta

Özet

Tüm kan komponentleri kanın depolanmasından etkilenirler. Oksidan – antioksidan denge de aynı zamanda etkilenir. Bu çalışmada, kanların depolanması süresince eritrosit parametrelerinde oluşan değişiklikler ve depo kanlarına eklenen yüksek doz vitamin C'nin koruyucu etkileri araştırıldı.

Bu amaçla, beşi kontrol ve beşi çalışma olmak üzere on donörden tam kan alındı. Çalışma grubundaki kan torbalarına yüksek doz vitamin C (10 mmol/L) eklendi. Kan torbalardan Red Blood Cells (RBC) ve Mean Corpuscular Volume (MCV) sayımları yapıldı. Plazmada oksidan – antioksidan dengeyi değerlendirmek için lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS), ve Antioksidan Potansiyel (AOP) çalışıldı. Eritrosit hemolizini değerlendirmek için plazma K⁺ düzeyi ve Laktat Dehidrojenaz (LDH) aktivitesi çalışıldı. Ölçümler depolanmanın 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, ve 35. günlerinde yapıldı.

Depolanma süresine bağlı olarak her iki grupta TBARS, K⁺ ve LDH artarken AOP azaldı. Çalışma grubunda kontrol grubuna göre TBARS daha düşük iken AOP daha yüksekti. K⁺ ve LDH'daki depolanma süresine bağlı artma çalışma grubunda kontrol grubuna göre daha düşüktü. RBC zamana bağlı olarak her iki grupta da azalırken, çalışma grubunda kontrol grubuna göre azalma daha azdı. Kontrol grubunda MCV' de zamana bağlı bir artış varken çalışma grubunda anlamlı bir artış olmadı.

Sonuç olarak, depo kanlarına yüksek konsantrasyonda vitamin C ilave edilmesinin, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını azaltarak eritrositlerin yaşam kabiliyetini ve süresini artırabileceği kanısına vardık.

Anahtar Kelimeler: Eritrosit, RBC, MCV, TBARS

The effect of high dose of vitamin C added to stored blood on erythrocyte parameters

Abstract

All blood components are affected by storage of blood. Oxidant - antioxidant balance is also affected. In this study the changes of erythrocyte parameters occurred during the storage and protective effect of high dose of vitamin C added to stored blood were investigated.

For this purpose, the whole bloods were taken from ten donor (five donor control group and five donor study group). High dose of vitamin C (10 mmol/L) was added to the blood bags of study group, and Red Blood Cells (RBC) and Mean Corpuscular Volume (MCV) were determined from stored blood. Plasma Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS), an indicator of lipid peroxidation, and Antioxidant Defense Potential (AOP) were studied to evaluate oxidant - antioxidant balance. Plasma K⁺ level and Lactate Dehydrogenase (LDH) activity were studied to determine erythrocyte hemolysis. Measurements were done at the day 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, and 35 of the storage.

Depending on time, while TBARS, K⁺ and LDH increasing AOP decreased in both control and study groups. TBARS was lower in study group than control group whereas AOP was higher in study group than control group. The increase in K⁺ and LDH depending on storage time was lesser in study group than control group. Although RBC decreased in both groups, the decrease in study group was lesser than control group. MCV increased in control group depending on time though there was no significant change in study group.

Consequently, it can be suggested that high dose of vitamin C given to the stored blood can improve the viability and longevity of red cells by reducing cell damage caused by free radicals.

Key Words: Erythrocyte, RBC, MCV, TBARS

Donörlerden alınan tam kanı antikoagüle etmek ve korumak için 1947 yılında asit-sitrat-dekstroz (ACD) solüsyonu kullanılmaya başlanmıştır (1). Daha sonraki yıllarda torba kanlarının depolama süresini ve eritrositlerin yaşam süresini artırmak için çeşitli besleyici formüller gerçekleştirilmiştir (2). Sitrat-fosfat-dekstroz (CPD) ile 21 gün olan depolanma süresi, glukoz eklenmiş sitrat-fosfat-dekstroz-adenin (CPDA-1) ile 35 güne ve mannitol ilavesiyle 42 güne çıkarılmıştır. Kanların depolanma sürelerini artırmaya yönelik katkı maddelerini üretme çalışmaları halen devam etmektedir (3, 4).

Bazı araştırmacılar bu önemli katkı maddelerine ilave olarak depo kanlarındaki eritrositlerin antioksidan özelliklerini ve bunun eritrositlerin yaşam sürelerine etkilerini araştırmaya başladılar. Bu çalışmalarda, depo kanlarında lipit peroksidasyonunun arttığı, glutatyon miktarının düştüğü, glutatyon ve metal bağlayıcı şelatörlerin ilave edilmesiyle lipit peroksidasyonunun azaldığı gösterilmiştir (5-8).

Bilindiği gibi vitamin C (vit C), plazmanın çok önemli antioksidanlarından biridir. Bu çalışmada depo kanlarına antioksidan olarak vitamin C ilave ederek, bunun eritrositlerin antioksidan kapasitelerine ve eritrositlerin yaşam sürelerine etkilerini araştırmak istedik. Depolanma süresince plazmada lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance) oluşumu ve vitamin C'nin buna etkisi takip edildi. Eritrosit hemoliz derecesi plazma potasyum ve LDH düzeyleri ile takip edildi.

Materyal ve Metod

Bu çalışma gönüllü 10 donörden alınan kanlarla Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Hematoloji Laboratuvarları ile Isparta Kızılay Kan Merkezi'nde gerçekleştirildi. Gönüllüler rasgele kontrol grubu (üçü kadın, ikisi erkek) ve çalışma grubu (ikisi kadın üçü erkek) olmak üzere ikiye ayrıldı. Kontrol ve çalışma gruplarının yaş ortalamaları ve standart sapmaları sırasıyla 28 ± 8 ve 31 ± 6 yıl idi. Gönüllü donörler, herhangi bir şikayeti olmayan, son bir hafta içerisinde hiçbir ilaç kullanmamış olan sağlıklı kişilerdi. Tüm donörlerin tam kan sayımları ile serum AST, ALT, LDH, Glukoz, Bilirübin, Üre ve Kreatinin düzeyleri normal sınırlarda idi. Önce gönüllülerden içinde antikoagülan olarak 65 cc CPDA-1 bulunan kan torbalarına (Kansuk, Türkiye) 450 ml kan alındı. Kontrol grubuna bir ilave yapılmazken, çalışma grubundan alınan kanlara 10 mmol/L vit C olacak şekilde

Sodium-L-ascorbate (Sigma, A7631, USA) ilave edildi. Kan torbaları Isparta Kızılay Kan Merkezi'ndeki kan dolaplarında $+4$ °C'de saklandı. 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 ve 35. günlerde kan torbaları yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve ölçümler için kan örnekleri alındı. Alınan örneklerden red blood cell (RBC), mean corpuscular volume (MCV) sayımları yapıldıktan sonra, santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazmada TBARS, antioksidan potansiyel (AOP) ve potasyum düzeyleri ile laktik dehidrojenaz (LDH) aktivitesi çalışıldı. Ayrıca ölçüm yapılan örneklerden kültür yapılarak torbalardaki kanda herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı araştırıldı.

TBARS ölçümü:

TBARS için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanıldı (9). Metodun prensibi MDA-TBA (Tiobarbitürik asit) kompleksinin 532 nm'de verdikleri absorbansın ölçülmesi esasına dayanır.

AOP (Antioksidan Potansiyel) Ölçümü :

Durak ve ark.'nın (10) yöntemine göre AOP belirlendi. Bu yöntemde, reaksiyon ortamı ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerine (O_2^-) bir saat süreyle maruz bırakılır. Reaksiyon ortamındaki TBARS konsantrasyonu, O_2^- radikal oluşmadan önce ve oluşturulduktan sonra ölçülür. İki değer arasındaki fark antioksidan potansiyele ters orantılıdır.

Potasyum ölçümleri ISE yöntemi ile, LDH aktivitesi ölçümleri ise kinetik UV metodla ticari kit (Olympus Diagnostica GmbH, Ireland) kullanılarak Olympus AU640 (Japan) marka otoanalizöründe yapıldı. Kan sayımları otomatik kan sayım cihazında (Coulter STKS, USA) yapıldı.

İstatistik

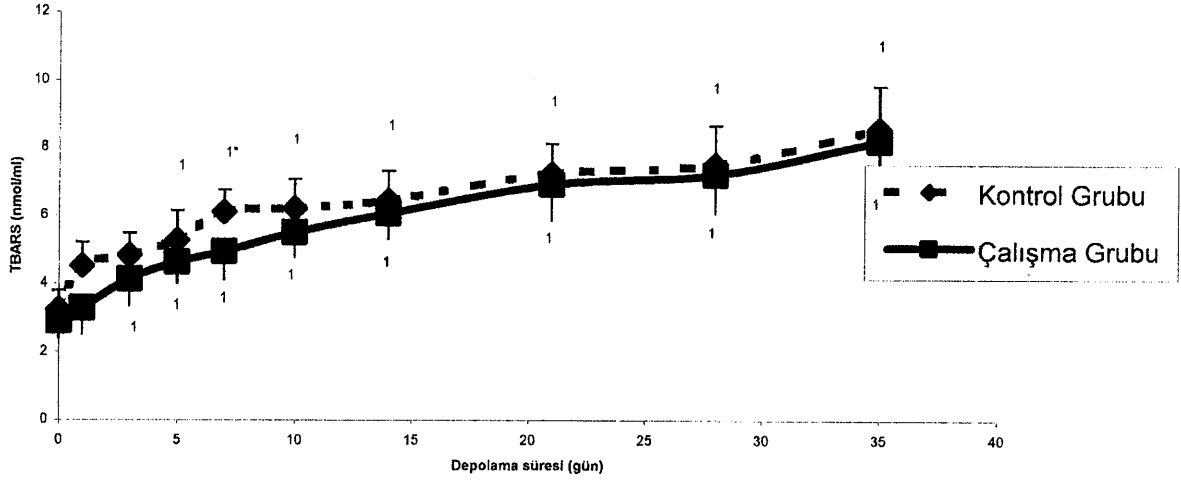
Her grupta depolanma süresince anlamlı bir değişiklik olup olmadığını belirlemek için Friedman testi, anlamlılık varsa hangi günden itibaren anlamlılığın başladığını tespit etmek için de Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı. Aynı günlerdeki kontrol ve çalışma gruplarının karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistikler "SPSS 7.0 for Windows" paket programında yapıldı.

Bulgular

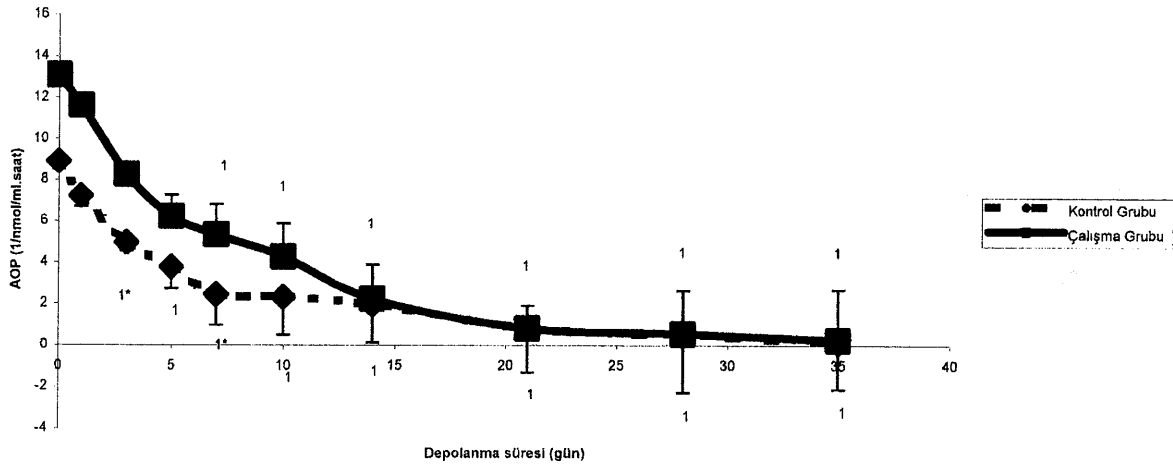
Kontrol ve çalışma gruplarında her parametrenin günlere göre değişimi ortalama \pm standart sapma olarak Şekil 1-6'da gösterilmiştir. TBARS, AOP, K^+ , LDH ve RBC parametrelerindeki zaman içindeki değişimler, kontrol ve çalışma gruplarında anlamlıydı (TBARS, AOP, K^+ ve LDH için $p < 0.001$; RBC için $p < 0.05$, Friedman testi). MCV'nin zaman içindeki değişimi ise kontrol

grubunda anlamlı iken ($p < 0.05$, Friedman testi), testi).
çalışma grubunda anlamlı değildi ($p > 0.05$, Friedman

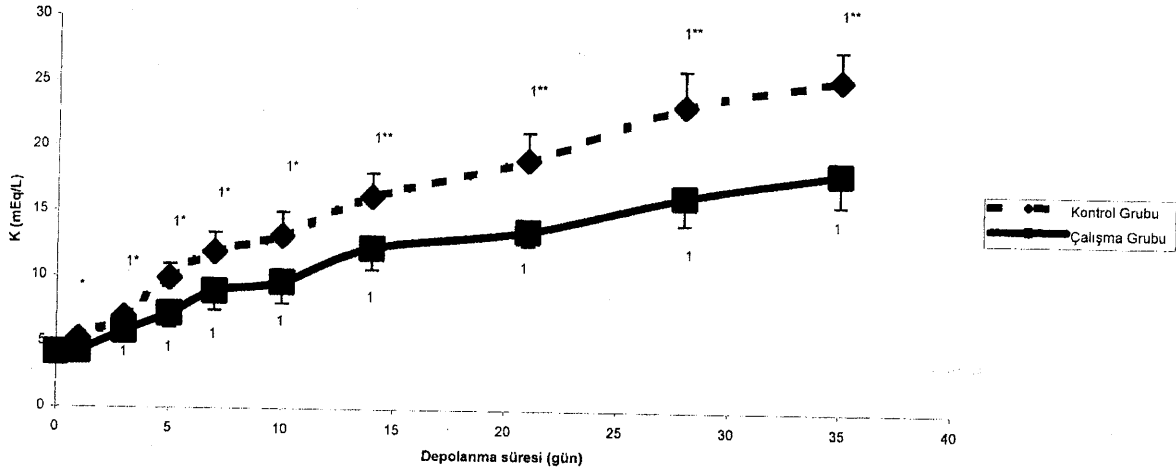
Şekil 1. Depolanma süresince plazma TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) düzeylerindeki değişimler. 1: 0.günle karşılaştırıldığında $p < 0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test; *: Aynı gün farklı gruplar karşılaştırıldığında $p < 0.05$, Mann Whitney U test.



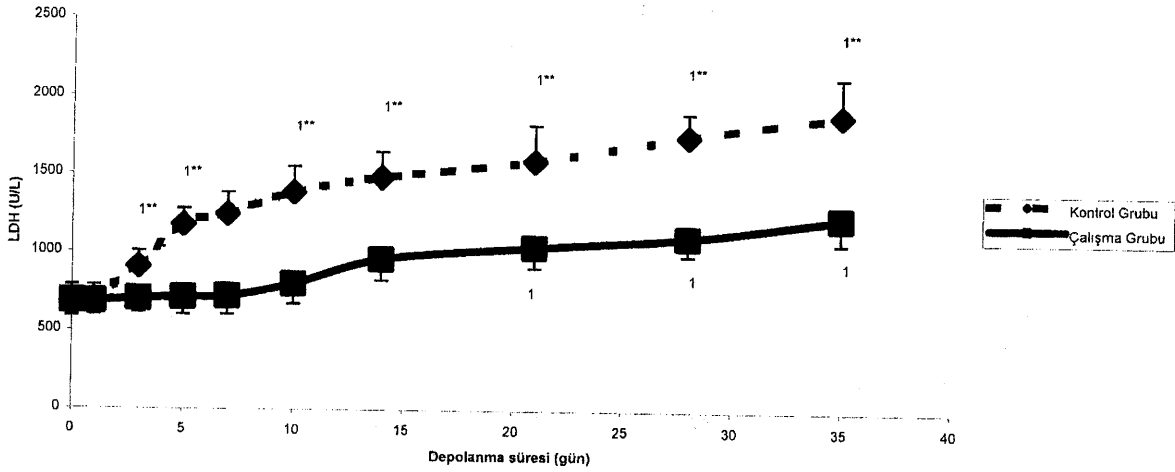
Şekil 2. Depolanma süresince plazma AOP (Antioksidan Potansiyel) düzeylerindeki değişimler. 1: 0.günle karşılaştırıldığında $p < 0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test; *: Aynı gün farklı gruplar karşılaştırıldığında $p < 0.05$, Mann Whitney U test.



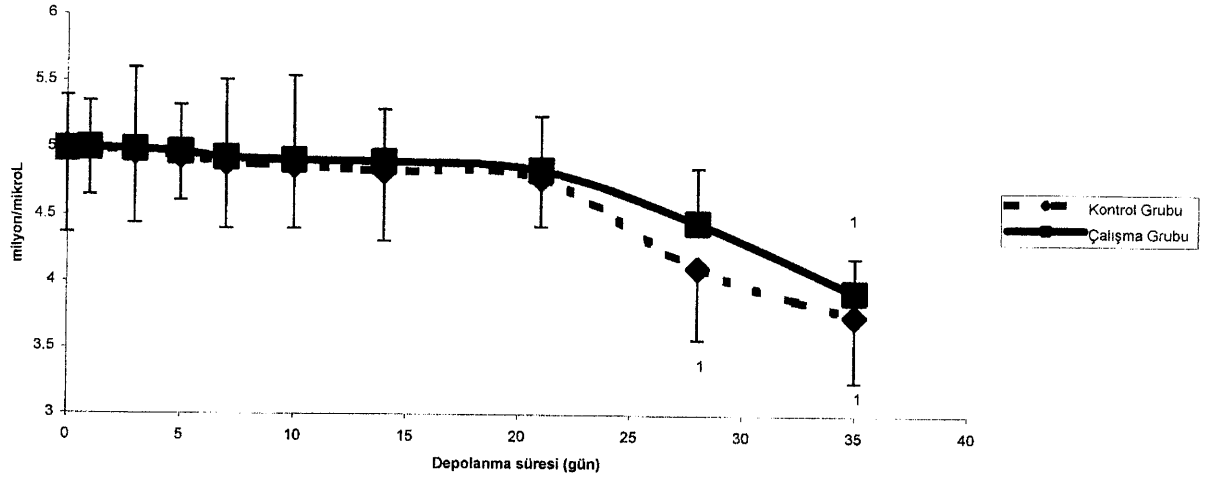
Şekil 3. Depolanma süresince plazma K⁺ (Potasyum) düzeylerindeki değişimler.1: 0.günle karşılaştırıldığında p<0.05, Wilcoxon Signed Ranks test; *: Aynı gün farklı gruplar karşılaştırıldığında p<0.05, **: p<0.01, Mann Whitney U test.



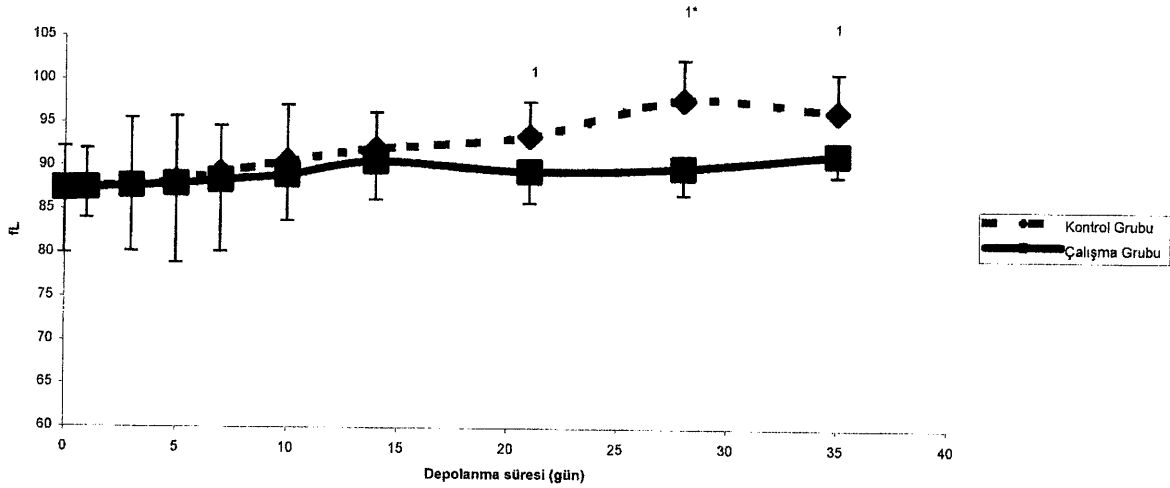
Şekil 4. Depolanma süresince plazma LDH (Laktik dehidrogenaz) aktiviteleri.1: 0.günle karşılaştırıldığında p<0.05, Wilcoxon Signed Ranks test; *: Aynı gün farklı gruplar karşılaştırıldığında p<0.05, **: p<0.01, Mann Whitney U test.



Şekil 5. Depolanma süresince RBC (Red Blood Cell) sayımları.1: 0.günle karşılaştırıldığında $p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test; *: Aynı gün farklı gruplar karşılaştırıldığında $p<0.05$, Mann Whitney U test.



Şekil 6. Depolanma süresince MCV (Mean Corpuscular Volume) değerleri.1: 0.günle karşılaştırıldığında $p<0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test; *: Aynı gün farklı gruplar karşılaştırıldığında $p<0.05$, Mann Whitney U test.



Çalışılan parametrelerde başlangıca göre (0.gün) anlamlı değişiklikler; TBARS için kontrol grubunda 5.

günde, çalışma grubunda 3. günde, AOP için kontrol grubunda 3. günde, çalışma grubunda 7. günde, K⁺ için kontrol ve çalışma gruplarında 3. günde, LDH için kontrol grubunda 3. günde, çalışma grubunda 21. günde, RBC için kontrol grubunda 28. günde, çalışma grubunda 38. günde ve MCV için kontrol grubunda 21. günde başladı ($p < 0.05$, Wilcoxon Signed Ranks test).

Aynı günlerde kontrol ve çalışma gruplarının karşılaştırılmasında TBARS 7. günde, AOP 3. ve 7. günlerde, K+1-35. günlerde, LDH 3-35. günlerde, MCV 28. günde anlamlı olarak farklıydı ($p < 0.05$, Mann Whitney U test).

Tartışma

Membranları poliansatüre yağ asitlerinden zengin olan eritrositler, sürekli olarak yüksel konsantrasyonda oksijenle karşılaştıklarından ve güçlü geçiş metallerine sahip olduklarından sürekli olarak intrasellüler ve ekstrasellüler serbest radikallere maruz kalırlar (11,12). Eritrosit içerisinde sürekli olarak oksihemoglobinin methemoglobine dönüşmesi devamlı olarak süperoksit anyonlarının oluşmasıyla sonuçlanır (13). Eritrositin dışında granülositler, makrofajlar ve metabolik olarak aktif hücreler hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu üretirler (14-18). Bu ürünler ekstrasellüler alana diffüze olabilirler ve muhtemelen eritrositlerle etkileşirler (18-20).

Vitamin C, hücreleri oksidatif hasara karşı korumada anahtar bir role sahiptir. Frei ve ark. (21) aköz peroksil radikallerince indüklenen peroksidatif hasardan lipidleri tamamen koruyabilen en önemli endojen antioksidanın plazma askorbatı olduğunu göstermişlerdir. Daha önceki çalışmalarda, vitamin C'nin aktive edilmiş polimorfonükleer lökositlerden salınan oksidanlara karşı oldukça etkili olduğu ve lipid-soluble peroksil radikallerine karşı antioksidan sistemin ilk savunma hattını oluşturduğu gösterilmiştir (22).

Vitamin C'nin inkübasyon ortamına eklenmesiyle, eritrositlerde hidrojen peroksidin indüklediği MDA oluşumunun doza bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir (23). Kan donörlerinin 2 hafta boyunca oral olarak vitamin E ve C aldıktan sonra kan vermeleri halinde, eritrosit membran bütünlüğünün arttığı gösterilmiştir (24). Benzer şekilde donörlerin 30 günden daha fazla oral olarak beta karoten, vitamin C ve vitamin E almaları sonucunda eritrosit membranlarının radikal toplayıcı aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (25).

Bizim çalışmamızda da zamana bağlı olarak lipid peroksidasyonu her iki grupta da anlamlı olarak artmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çalışma grubunda genel olarak lipid peroksidasyonu daha düşük bulunmuştur. TBARS'ın tersine, AOP vitamin C ilavesi ile anlamlı olarak artmıştır. Ayrıca vitamin C ilavesi, RBC'de kontrol grubuna göre daha az azalmaya neden olmuştur. Bunun yanında, kontrol grubunda görülen MCV'deki zamana bağlı artış çalışma grubunda görülmemiştir.

Her ne kadar vitamin C önemli bir antioksidan ise de, aynı zamanda bir prooksidandır. Antioksidan ve prooksidan olmasını belirleyen faktör askorbat ve ortamdaki geçiş metallerinin konsantrasyonudur (26, 27). Frei ve ark (21) plazmada 5 mM askorbat olduğunda prooksidan etkinin tamamen ortadan kalktığını göstermişlerdir. Samokyozyun ve Aust (28) Fe³⁺.ADP içeren lipozom lipidlerinin peroksidasyonunun 0-30 mikromol/L konsantrasyonunda vitamin C ilave edilmesiyle arttığını, daha fazla konsantrasyonlarda ise azaldığını göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda yüksek konsantrasyonda vitamin C (10 mM) ilave ettiğimiz için, antioksidan etki gözledik. Bunun nedeni plazma geçiş metal iyonlarının, plazma proteinlerine sıkıca bağlı olmaları ve serbest radikal reaksiyonlarına katılmak için uygun olmamaları olabilir. Vitamin C, direk antioksidan özelliği yanında, membranların çok önemli bir antioksidanı olan vitamin E'nin rejenerasyonu sağlayarak indirek antioksidan etki de gösterir (29). Böylece bir yandan plazmada güçlü antioksidan etki gösterirken, diğer yandan da membranları vitamin E vasıtasıyla korumaktadır. Ortama askorbat veya dehidroaskorbat eklenmesi anaerobik glikolizin son ürünü olan laktatın artışıyla sonuçlanır (30). Dolayısıyla askorbat antioksidan özelliğinin yanında eritrositler için bir enerji kaynağıdır.

Bu çalışmada, plazma potasyum düzeyleri ve LDH aktivitesi vitamin C ilave edilen çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Dolayısıyla depo kanlarına vitamin C eklenmesi hemolizi anlamlı olarak azaltmaktadır.

Sonuç olarak, depo kanlarına yüksek konsantrasyonda vitamin C ilave edilmesinin, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını azaltarak eritrositlerin yaşam kabiliyetini ve süresini arttırabileceği kanısına vardık.

Yazışma adresi:

Dr. Fatih Gültekin

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

Isparta

E-mail: drfatih2000@hotmail.com

Kaynaklar

- 1-Gibson JG, Evans RD, Aub JC, Sack T, Peacock WC. The post-transfusion survival of preserved human erythrocytes stored as whole blood, or in resuspension, after removal of plasma, by means of two isotopes of radioactive iron. *J Clin Invest* 1947; 26: 715-738.
- 2-Ross JF, Finch CA, Peacock WE, Sammons MC. The in vitro preservation and post-transfusion survival of stored blood. *J Clin Invest* 1947; 26: 687-703.
- 3-Brecher ME, Zylstra-Holling VW, Pineda AA. Rejuvenation of erythrocytes preserved with AS-1 and AS-3. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 767-769.
- 4-Valeri CR, Valeri DA, Gray A, Melaragno A, Dennis RC, Emerson CP. Viability and function of red blood cell concentrations stored at 4°C for 35 days in CPDA-1, CPDA-2, or CPDA-3. *Transfusion* 1982; 22: 210-216.
- 5-Aslan R, Sekeroglu MR, Tarakcioglu M, Koylu H. Investigation of malondialdehyde formation and antioxidant enzyme activity in stored blood. *Haematologia* 1997; 28: 233-237.
- 6-Knight JA, Voorhees RP, Martin L, Anstall H. The effect of metal chelators on lipid peroxidation in irradiated erythrocytes. *Ann Clin Lab Sci* 1992; 22: 417-422.
- 7-Lachant NA, Noble NA, Myrhe BA, Tanaka KR. Antioxidant metabolism during blood storage and its relationship to posttransfusion red cell survival. *Am J Hematol* 1984; 17: 237-249.
- 8-Lee DM. Malondialdehyde formation in stored plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 1663-1672.
- 9-Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421-431.
- 10-Durak I, Karabacak HI, Buyukkocak S, Cimen MYB, Kacmaz M, Omeroglu E, Ozturk HS. Impaired antioxidant defence system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporine. *Nephron* 1998; 78: 207-211.
- 11-Chiu D, Lubin B, Shohet SB. Peroxidative reactions in red cell biology. In Pryor W: *Free Radicals in Biology* (vol 5). San Diego, Academic, 1982, 115-160.
- 12-Chiu DTY, Claster S. Measurement of red cell membrane oxidation and the generation of oxidative intermediates, in Shohet SB, Mohandes N: *Red Cell Membrane*. Livingston, Saunders, 1988, 203-236.
- 13-Carrel RW, Winterbourn CC, Rachmilewitz EA. Activated oxygen and hemolysis. *Br J Haematol* 1975; 30: 259-264.
- 14-Biaber B, Curnett JT, Kipnes RS. Biologic defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *J Lab Clin Med* 1977; 85: 235-244.
- 15-Jain SK, Shohet SB. A novel phospholipid in irreversibly sickled cells: Evidence for in vivo peroxidative membrane damage in sickle cell disease. *Blood* 1984; 63: 363-367.
- 16-Salin ML, McCord JM. Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1975; 56: 1319-1323.
- 17-Weiss SJ, Young J, LoBuglio AF, Slivka A, Nimeh NF. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1981; 68: 714-21.
- 18-Weiss SJ. The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. *J Biol Chem* 1980; 255: 9912-9917.
- 19-Claster S, Chiu DTY, Quintanilha A. Neutrophils mediated lipid peroxidation in human red cells. *Blood* 1984; 64: 1079-1084.
- 20-Claster S, Quintanilha A, Schott MA. Neutrophil-induced K⁺ leak in human red cells: A potential mechanism for infection-mediated hemolysis. *J Lab Clin Med* 1987; 109: 201-210.
- 21-Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6377-6381.
- 22-Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9748-9752.
- 23-Stocks J, Dormandy TL. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol*, 1971; 20: 95-111.
- 24-Knight JA, Blaylock RC, Searles DA. The effect of vitamins C and E on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Ann Clin Lab Sci* 1993; 23: 51-56.
- 25-Regnault C, Postaire ER, Rousset GJ, Bejot M, Hazebroucq GF. Influence of beta carotene, vitamin E, and vitamin C on endogenous antioxidant defenses in erythrocytes. *Ann Pharmacother* 1993; 27: 1349-50.
- 26-Stadtman E. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1125S-1128S.
- 27-Samakyozyn VM, Aust SD. Role of iron in lipid peroxidation. In: Hayaishi O, Niki E, Kondo M, Yoshikawa T, Medical, biochemical and chemical aspects of free radicals. Amsterdam, Elsevier, 1988; 41-8.
- 28-Vincent TE, Mendiratta S, May JM. Inhibition of aldose reductase in human erythrocytes by vitamin C. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 43: 1-8.

- 29-Jialal I, Vega GI, Grundy SM. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990; 82: 185-191.
- 30-Banhegyi G, Braun L, Csala M, Puskas F, Mandl J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Rad Biol Med* 1997; 23:793-803.