



TİP II DİABETES MELLİTUSLU HASTALARDA C VİTAMİNİ İLE E VİTAMİNİNİN GLUTATYON VE HbA1c DÜZEYLERİNE ETKİLERİ

Salih CENGİZ¹ ve Müjgan CENGİZ²

THE EFFECTS OF VITAMIN C AND VITAMINE E ON GLUTATHIONE AND HbA1c LEVELS IN PATIENTS WITH TYPE II DIABETES MELLITUS

Summary: Vitamins E and C are known to play an antioxidant role in the organisms. Oxidative stress plays an important role in the creation of the complications of Diabetes Mellitus (DM). The aim of our study was to compare glycosylated haemoglobine (HbA1c) and glutathione (GSH) levels in 20 patients with type II DM who were given take 1000 mg of ascorbate and 400 IU of alpha-tocopherol daily at different periods with the same type II DM patients who take placebo. The amount of the glycosylated Hb and blood glutathione were measured at the first day just before taking vitamins, first month and second month by using glyco-quick and capillary electrophoresis respectively. The values of HbA1c were decreased and GSH levels increased significantly after vitamin treatment for the first and second months. The values of both HbA1c and GSH levels after one and two months usage of placebo, were still without a significant difference ($p>0.05$). Comparison of the Vitamin taking group ($n=20$) with the placebo receiving group ($n=20$) showed that the glycosylated haemoglobine formation was decreased ($p<0.001$) and the glutathione levels were increased ($p<0.001$). These findings and results must be considered as additional support of the Vitamins C and E to the diabetic patients in decreasing the complications of diabetes mellitus.

Key Words: Diabetes Mellitus, vitamin C, vitamine E, HbA1c, Glutathione

Özet: Glutasyon ile birlikte E ve C vitaminleri diyabetle artan oksidatif hasara karşı hücreleri korumaktadırlar. Oksidatif stres, Diabetes Mellitus hastalığının komplikasyonlarının oluşumunda çok önemli bir rol oynar. Çalışmamızda günlük 1000 mg askorbat ve 400 IU alpha-tokoferol alan 20 adet tip II diyabetli hastanın glikozile hemoglobin ve glutasyon düzeyleriyle plasebo verilen 20 adet tip II diyabetli hastanın glikozile hemoglobin ve glutasyon düzeylerinin karşılaştırılarak incelenmesi amaçlandı. Vitamin almadan hemen önce, verildikten 1 ay sonra ve verildikten 2 ay sonraki kan glikozile hemoglobin düzeyleri hızlı iyon değiştirme kromatografisiyle (glyco -quick) ve glutasyon düzeyleri kapiller elektroforez yöntemiyle ölçüldü. E vitamini ile birlikte C vitamini kullanan diyabetik hastalarda ($n=20$) vitaminleri kullanmadan önceki duruma göre 1. ve 2. ay sonunda glikozile hemoglobin düzeylerinde anlamlı bir azalma ($p<0.001$) ve glutasyon düzeylerinde anlamlı bir artma bulunmuştur ($p<0.001$). Plasebo verilen hastalarda ($n=20$) her iki parametrede de anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Sonuçta bu vitaminlerin verilmesinin glutasyon düzeyinde bir yükselmeyi sağlayarak antioksidan etkiyi arttırdığı ve nonenzimatik glikozillenmeyi azalttığı ve bu nedenle vitaminlerin koruyucu etkisinin olduğu fikri desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes Mellitus, C vitamini, E vitamini, HbA1c, Glutasyon

GİRİŞ

Diyabet Glukoz homeostazisinin bozulmasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır. Tip II diyabette dokuların insüline olan duyarlılığı azalır, kan Glukoz düzeyleri yüksek kalır (1). Antioksidan vitaminler insulin salgısında düzelmeyi sağlayabilmektedirler (2). Doğal

bir antioksidan olan glutasyon ve antioksidan vitaminler diyabetin komplikasyonlarından olan serbest radikal oluşumunu engelleyebilmektedir.

Glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) düzeylerinin yükselmesi diyabette görülen komplikasyonların en önemlilerindedir. Proteinlerin nonenzimatik

¹ İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü

glukasyonları proteinlerin belli amino gruplarını Glukoz ile schiff bazı oluşturup daha sonra daha kararlı ketoamin şekline dönüşmeleriyle meydana gelir (3). Bu nedenle anormal fiziksel özellik gösterirler (1,4, 5) Diyabetik hastaların eritrositlerinde artan HbA1c oksijene karşı aşırı ilgi göstermektedir.Çünkü diyabetik hastaların hemoglobinlerindeki 2,3 difosfogliserat bağlayan bölge glikozillenir ve (+) yük azalır ve böylece hemoglobinin 2,3 DPG ile bağlanması etkilenir.Böylece doku hipoksisi ortaya çıkar ve doku harabiyeti meydana gelir (3,6).Bunun sonucu olarak insanın lensinde katarakt oluşabilir,diyabetik nefropati ve benzeri mikroanjyopatiler de oluşabilir (7).

Diyabetik hastalarda lipid peroksidasyonunun arttığı ve eritrosit zarlarında poliansatüre peroksitlenebilir lipidlerin azaldığı belirlenmiştir (5). E vitamininin aynı zamanda lipid peroksidasyonu sonucu artan MDA düzeylerini ve trigliserid düzeylerini azalttığı belirlenmiştir (8).

Hücrelerde oluşan serbest radikallerin hücreye olan zararlarının engellenmesi enzimatik olarak başlıca süperoksit dismutaz enziminin yardımıyla olmaktadır (9). Ayrıca bu radikallere karşı E ve C vitaminleri gibi diğer antioksidanlar da etkilidir. Doğal antioksidanlardan olan glutatyonun, Glukoz hemostazisinde ve serbest radikallerin önlenmesinde önemli etkilerinin olduğu bildirilmektedir (2).

Bazı araştırmacıların yaptığı çalışmalarda diyabette glikozillenmiş Hemoglobin düzeylerinin artışının lipid peroksidasyonunu arttırdığı (10), antioksidan vitaminlerin, diyabette artmış olan Glukoz düzeylerini ve diyabetle ortaya çıkan oksidatif hasarları azaltabileceği belirlenmiştir (11). Diyabetik kişilerde eritrosit glutatyon düzeyleri azalmaktadır (12). Ayrıca diyabetiklerde glutatyon peroxidaz aktivitesinin de azaldığı ve eritrosit lipid peroxidasyonunun arttığı (13), hepatic glutatyon düzeylerinin de normal veya hafif azaldığı saptanmıştır (13 ,14).

Çalışmamızda tip II diyabetli hastalarda E ve C vitaminlerinin verilmesi ile HbA1c ve glutatyon düzeylerine etkilerinin, plasebo verilmiş hastaların

HbA1c ve glutatyon düzeyleri ile karşılaştırılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler: sodyum klorür,perklorik asit, di sodyum tetraborat, sodyum dodesil sülfat Merck Darmstadt Almanya firmasından sağlandı. Standart GSH sigma-USA firmasından, HbA1c tayini için iyon değiştirici kolon kiti ise Glyco-quick Column adı ile Helena-USA den temin edildi.

Çalışmaya alınan hastalar, yaşları 50±8 olan, tip II diyabetli olan, aşırı obez ve diğer komplikasyonları olmayan (Vucut ağırlık indeksi: 25±5), diyabet süresi 10±2 yıl olan düzenli ve tek tip oral antidiyabetik [gliklazid etkin maddeli diamicon (servier ilaç) veya betanorm (Ali Raif ilaç)] kullanan, açlık kan şekerleri 130 mg/dL nin üzerinde olmayan kişilerden seçildi. Hastalar vitamin almaya başlamadan 10 ar ml kanları alındı ve bu 0.ncı gün olarak belirlendi daha sonra. günlük 1000 mg askorbat ile birlikte 400 IU alfa tokoferol verilen grubun 1. ve 2. aylarda HbA1c ve glutatyon tayini için 10 ar ml kanları alındı.. Aynı yaş grubundan oluşan kontrol grubundan önce kan alındı, sonra plasebo verildi. Bu hastalardan da plasebodan hemen önce, birinci ve ikinci aylarda HbA1c ve glutatyon tayini için 10 ar ml kanları alındı.

Glikozillenmiş hemoglobin tayininde "Helena Glyco Hb Quik Column" kiti kullanıldı. Bu kit hemoglobin A_{1c} in miktar tayini için mikrokromatografik yöntem kullanmak üzere hazırlanmıştır. Burada kullanılan kromatografi türü iyon değiştirici kromatografidir (15). Kolondaki negatif yüklü reçine, pozitif yüklü hemoglobin molekülüne ilgi gösterir. Seçici iyonik güç ve pH ta HbA1c, HbA dan daha az pozitif yüke sahiptir. Bu nedenle (-) yüklü reçineye HbA'dan daha zayıf olarak bağlanır. Böylece HbA1c kolondan daha erken ayrılır. UV-Vis Spektrofotometrede 415 nm de HbA1c düzeyi ile Total Hb düzeyi ölçülür. HbA1c' nin total Hb'ye oranı % olarak hesaplanır.

Glutatyon düzeyinin belirlenmesi kapiller elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildi; Kapiller



elektroforeze uygulamak amacıyla 9 cc. EDTA'lı kan örneği alınıp plazması uzaklaştırıldı., Eritrosit paketi serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı ve supernatant atıldı., Eritrositler -70°C'de deney gününe kadar saklandı., Çalışma yapılacağı zaman örnekler çözülüp lizat hazırlandı., Üzerine 1 mol/L perklorik asit ilave edilip proteinleri çöktürüldü., Supernatant alınıp pH'sı 8.5'e ayarlandı. Daha sonra filitreden geçirilerek kapiller elektroforeze uygulandı (16).

Kapiller elektroforezde çalışma koşulları:

0.45 mikronluk filtreden geçirilen örnekler, 4 sn müddetle hidrodinamik olarak 44 cm uzunluğunda ve 75 µm çapındaki kapillere injekte edildi, çalışma voltajı 12.000 volta ayarlandı. 30°C sabit sıcaklıkta, 13 dakika müddetle elektroforez işlemi yürütüldü. Tampon olarak Jellum E. tarafından tarif edilen miseller tampon kullanıldı(16). Sonuçlar, derişimi bilinen GSH standart piklerinin alanının örnek piklerinin alanları ile karşılaştırılması ile mg/dL olarak hesaplandı.

Bu araştırmada C ve E vitaminleri kullanan hasta grubu ile bu vitaminlerin yerine plasebo kullanan kontrol grubunun 0-1. ay, 0-2. aylarda HbA1c düzeyleri ile glutasyon düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesinde Student-t Testi uygulandı.

BULGULAR

İstatistiksel testlerin sonuçlarına göre C ve E vitaminleri kullanan hastalarda vitamin almaya başlamadan önceki duruma göre 1. ay ve 2. ay sonundaki HbA1c düzeylerinde ileri düzeyde anlamlı bir azalma saptanmıştır (p<0.001). Hasta grubuna 2 ay süreyle plasebo verildikten sonraki 1. ve 2. ay sonunda ölçülen HbA1c değerleri kullanıma başlamadan önceki değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülemedi (p>0.05). Sonuçlar Tablo I de gösterilmiştir.

C ve E vitamini kullanan diyabetli hasta grubunda gerek 1. ayın sonunda ölçülen GSH değerleri gerekse 2. ayın

sonunda ölçülen GSH değerleri ilk ölçüme göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur (p>0.001). Vitamin yerine plasebo alan hasta grubunda 1. ve 2. ayın sonunda ölçülen glutasyon düzeyleri ise ilk ölçümlere göre anlamlı bir fark bulunamadı (p>0.05) Yukarıda açıklanan değerler de Tablo I de görülmektedir

TARTIŞMA

Glikolize hemoglobin glukoz ile hemoglobin arasındaki sabit bir ortalamayı gösterir. 4-8 haftalık kan glukoz düzeyinin dolaylı ölçülmesini sağlar (17). Diyabetik hastaların eritrositlerinin yaşam süresi azdır, aşırı agregasyon görülür (18). DM komplikasyonlarının oluşmasında oksidatif stresin rolü vardır. Diyabetik hastalarda lipid peroksidasyonu ve doku hasarı da artar.

İnsüline bağımlı olmayan (NIDDM) veya tip II diyabet sık görülen bir hastalıktır. Glukozun organizmaya alınması sonucu plazma Glukoz düzeyleri hiper glisemik olarak kalır. Glukoz düzeyinin artmasına karşı insülin cevabı azalır. Glukoz düzeylerinin yüksek kalması HbA1c düzeylerinin yükselmesine neden olur. Diyabetli

Tablo 1. E ve C vitamini alan ve plasebo kullanan Tip II diyabetli hastaların HbA1c ve glutasyon düzeyleri

	E ve C vitamini verilen hasta grubu	Plosebo verilen hasta grubu
	n=20	n=20
% Glikozillenmiş Hb düzeyleri	0. gün 11.67 ± 1.16	10.48 ± 1.66
ortalama. ± Sd.	1. ay 9.84 ± 0.62 (p<0.001)	11.33 ± 1.43 (p>0.05)
	2. ay 9.05 ± 0.49 (p<0.001)	10.83 ± 1.25 (p>0.05)
Glutasyon düzeyleri (mg/dL)	0. gün 17.09 ± 7.57	18.2 ± 9.68
ortalama. ± Sd.	1. ay 20.63 ± 7.32 (p<0.001)	18.84 ± 10.34 (p>0.05)
	2. ay 21.96 ± 8.97 (p<0.001)	19.32 ± 11.28 (p>0.05)

hastalarda lipid peroksidasyon ve doku hasarı da artar.

Çalışmamızda tip II diyabetli hastalarda antioksidan olarak hastalara verilen C ve E vitaminlerinin nonenzimatik glukozillenme ve glutatyona etkileri incelenmiştir. Her gün C ve E vitaminleri kullanan hastalarda vitamin almaya başlamadan önceki duruma göre 1. ay ve 2. ay sonundaki HbA1c düzeylerinde ileri düzeyde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Buna karşılık hasta grubuna 2 ay süreyle plasebo verildikten sonraki 1. ve 2. ay sonunda ölçülen HbA1c değerleri kullanıma başlamadan önceki değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülememiştir.

C ve E vitamini kullanan diyabetli hasta grubunda gerek 1. ayın sonunda ölçülen GSH değerleri gerekse 2. ayın sonunda ölçülen GSH değerleri ilk ölçüme göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir artış bulunmuştur. Vitamin yerine plasebo alan hasta grubunda 1. ve 2. ayın sonunda ölçülen glutasyon düzeylerinde ise ilk ölçümlere göre anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Diyabetik sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada askorbatın artmış kan Glukoz düzeylerini azalttığı (11) ve diğer bir çalışmada ise diyabette oksidatif strese de ileri derecede bir düzelmeye sağladığı saptanmıştır (19).

E vitamini terapisinin retina kan akımını normalize ettiği ve böbrek fonksiyonlarında düzelttiği saptanmıştır. Ancak aynı çalışmada HbA1c düzeylerinin etkilenmediği bildirilmektedir(20). Türk diabetik çocuklarında eritrosit vitamin E değerlerinin kontrollara göre büyük farklılıklar gösterdiği ve Vitamin desteğinin bu değerler göz önünde tutularak yapılması gerektiğinde bildirilmektedir (21). E ve C vitaminlerinin birlikte verildiği durumu araştıran çalışmamız, bu hayvan deneylerinden elde edilmiş sonuçlar ile uyum içindedir. Diğer taraftan bu sonucun, benzer hastalar üzerinde yapılan diğer çalışmaların vitamin desteğinin gerekli olduğunu savunan sonuçları desteklemekte olduğu da görülmüştür (22).

Glutasyon düzeylerinin tayininde kapiller elektroforez yöntemi kullandığımızdan deneylerimizin sonuçları hem hasta, hem de kontrol gruplarında belirlenen glutasyon düzeyleri diğer çalışmalara göre daha düşük olarak bulunmuştur. Bunun nedeni bu yöntemde tayin yapılırken dedektör tarafından belirlenen sülfidril grupları sadece glutatyona aittir. Elman yönteminde ise diğer proteinlerden gelen sülfidril grupları da glutatyona ait olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle Elman yönteminin bulduğu değerlerin CE ile bulunan değerlerden yüksek olması doğal sayılmalıdır.

Bu bulgulardan yola çıkılarak antioksidan vitaminlerin bu özellikleri ile, proteinlerin belli amino gruplarının Glukoz ile schiff bazı oluşturmaları veya daha sonra bunu takip eden ardışık tepkimeler sonucu daha kararlı ketoamin şekline dönüşmelerinin önüne geçilmesi ile, diyabetin en önemli moleküler ürünlerden biri olan HbA1c nin nonenzimatik oluşumunun engellendiği söylenebilir. Glutasyon düzeylerinin artması ise diyabetle ortaya çıkan oksidatif hasarların azalmasını en önemli delillerden biridir.

Sonuç olarak C ve E vitaminlerinin, diyabetik hastalar üzerine yararlı ve koruyucu bir etkisi olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Guillausseau PJ, Charles MA, Godard V, Timsit J, Chanson P, Paolaggi F, Peynet J, Eschwege F, Rousselet F and Lubetzki I : Comparison of fructos-amine with glycated hemoglobin as an index of glycemic control in diabetic patients. *Diabetes Res.* 1990; 13:127-131
2. Barbagallo M, Dominguez LJ, Tagliamonte MR, Resnick LM, Paolisso G. Effects of vitamin E and glutathione on glucose metabolism: role of magnesium. *Hypertension* 1999; 194: 1002-6.
3. Browlee M., Cerami A., and Vlassara H. Advanced glycolysation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *The new Eng J of med.* 1988; 318: 1315-21
4. Counts DF, and Shaw WN. Effect of carbohydrate structure and concentration on the non-enzymatic glycosylation and subsequent crosslinking of collagen. *Diabetes Res.* 1991; 16:37-40



5. Parthiban A., Vijayalingam S., Shanmugasundaram KR., Mohan R. Oxidative stress and development of diabetic complications. Antioxidants and lipid peroxidations in erythrocytes and cell membranes. *Cell Biol Int* 1995;19(12):987-93
6. Candan G., Şahin G., Sipahioğlu F., Hatemi H., Yiğit G., Terzioğlu M: Tip I diyabetlilerde glukozillenmiş hemoglobin ve 2,3 difosfo gliserat arasındaki ilişkinin oksihemoglobinin dissosiyasyonu üzerine etkisi. *Diyabet Yıllığı*, 1988;5:425-33
7. Cengiz, S. Çakıner, T. Cengiz, M. Özkök, E. Gökhan N. Invitro Effects of Calcium and glucose on calf Lens. *T.J.Med. Sci.* 1993; 18: 41-46
8. Jain SK, Krueger KS, McVie R, Jaramillo JJ, Palmer M, Smith T. Relationship of blood thromboxane B2(txB2) with lipid peroxides and effect of vitamin E and placebo supplementation on TxB2 and lipid peroxide levels in type 1 diabetic patients . *Diabetes care* 1998 21(9):1511-6.
9. Cengiz M, Yüksel A, Seven M.The effects of carbamazepin and valproic acid on the erythrocyte glutathione , glutathione peroxidase. Superoxide dismutase and serum lipid peroxidation in epileptic children.*Pharmacol. res.* 2000; 41(4):423-425.
10. Jain SK , Mevie R, Duett J and Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989; 38:1539-1542.
11. Younf IS,Torney JJ, and Trimble ER. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the oxidative stress in the streptozotocin diabetic rats . *Free Radical Biol Med.* 1992;13: 41-46.
12. Maarques D, Cazana L, Puyol RM. In vitro respons of erythrocytes to a tocopherol exposure J. *Vit.Nutr.Res.* 1986;56:311-314.
13. 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
14. Mc Lennan SV, Heffernan S ,Wright L,Rae C,Fisher E ,Yue DK and Turtle JR. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 344-348.
15. Trivelli LA ,Ranney HM, and Lai HT. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus *N Engl J Med* 1971; 284:353-357.
16. Jellum E,Thorsrud AK and Time E. Capillary electrophoresis for diagnosis and studies of human disease, particularly metabolic disorders. *J Chrom* 1991;559: 455-465.
17. Sensi M, Bruno MR, Valente et.al. Retinol Binding Protein: A short half life determinant of protein nonenzymatic glycation in diabetes. *Diabetes res.*1990; 13:195-8
18. Ceriello A,Bortolotti N,Motz E et.al.Meal-generated oxidative stress in type II diabetic patients. *Diabetes Care.* 1998; 21(9): 1529-33
19. Naziroglu M, Dilsiz N, Cay M. Protective role of intraperitoneally administered vitamins C and E and selenium on the levels of lipid peroxidation in the lens of rats made diabetic with streptozotocin. *Biol Trace Elem Res* 1999; 70(3):223-32.
20. Bursel SE, Clermont AC, Aiello LP, Aiello LM, Schlossman DK, et al. High dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type I diabetes. *Diabetes care* 1999 22(8): 1245-51.
21. Cinaz P, Hasanoglu A, Bideci A, Biberoglu G. Plasma and erythrocyte vitamin E levels in children with insulin dependent diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1999; 12(2): 193-6.
22. Tutuncu NB, Bayraktar M, Varli K. Reversal of defective nerve conduction with vitamin E supplementation in type II diabetes: a preliminary study. *Diabetes Care* 1998;21(11):1915-8.