

TİP 2 DİYABETLİ HASTALARDA C VİTAMİNİ UYGULAMASININ ERİTROSİT GLUTATYON VE HbA1C DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ*

Müjgan CENGİZ, Salih CENGİZ

Background and Design.- Diabetes mellitus (DM) has some complications. Oxidative stress plays an important role in the creation of these complications. At the other hand vitamin C plays nonenzymatic antioxidant role in the organisms. The goal of our study was to compare glycosylated haemoglobin (HbA1c) and glutathione (GSH) levels of the 20 type 2 DM patients taking vitamin C with the 20 type 2 DM patients taking placebo. The amount of HbA1c by chromatographic elution and glutathione were measured by using capillary electrophoresis technique at the first day, first month and second month.

Results.- After usage of vitamin C for one month, the values of HbA1c were decreased significantly but GSH levels were still without a significant difference. After usage of vitamin C for two months, the values of HbA1c were decreased significantly and GSH levels were increased significantly. After one and two months usage of placebo, the values of both HbA1c and GSH were still without a significant difference.

Conclusion.- Comparison of the vitamin C taking group with the placebo receiving group showed that these findings and results must be considered as positive effect of the vitamin C to the patients. This is because of the decreasing of the glycosylated haemoglobin and increasing of the glutathione levels. The glutathione levels

are all found as in lower value when compared with non chromatographic method. This is because of the exact molecular prediction and measurement of the species.

Cengiz M, Cengiz S. The effects of vitamin C administration on erythrocyte glutathione and HbA1c levels of type 2 diabetic patients. Cerrahpaşa J Med 2000; 31: 211-215.

Tip 2 diyabet oldukça yaygın bir hastalıktır ve toplumun % 5-10'unda görülür. Hastaların % 80'inden fazlası 40 yaşından sonra bu hastalığa yakalanmaktadır ve şişmanlık bu hastaların çoğunda belirgin bir özelliktir.¹ Bu tip diyabette insülin salgısı normaldir hatta insülin salgısı artabilir. Glukozun organizmaya alınması sonucu artan plazma glukoz düzeylerine insülin cevabında azalma olmaktadır.²⁻⁴ Kan glukoz düzeyi hiperglisemik olarak kalmaktadır. Glikozile hemoglobin (HbA1c) değerleri kandaki ortalama glukoz düzeylerinin bir göstergesidir.

Diyabette proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonu ve serbest radikal üretimi artmaktadır.^{5,6} Diyabetik hastalarda doku hasarının proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonundan dolayı olduğu ileri sürülmektedir. Bu hastalıkta bazı proteinler glukoz ile bağlanır ve anormal fiziksel özellikler gösterirler.⁷⁻⁹

Antioksidan vitaminler insülin salgılanmasının regülasyonunda önemli bir role sahiptir. Doğal bir antioksidan olan GSH ve antioksidan vitaminler diyabetin komplikasyonlarından olan serbest radikal oluşumunu engelleyebilmektedir.¹⁰ C vitamini ve glutatyon, diyabette görülen serbest radikal hasarına karşı hücreleri korumakla görevlidirler. Bunların dışında pek çok koruyucu sistemler de mevcuttur.¹¹

Bazı araştırmacıların yaptığı çalışmalar-

**Anahtar Kelimeler:* Tip II Diyabet, C vitamini, Glikozillenme, Glutatyon; *Key Words:* Type 2 Diabetes, Vitamin C, Glycosylation, Glutathione; *Alındığı Tarih:* 29 Haziran 2000; Doç. Dr. Müjgan Cengiz, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü; Prof. Dr. Salih Cengiz, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp enstitüsü; *Yazışma Adresi (Address):* Dr. M Cengiz, Zuhuratbaba Mah. Akatlar sok. 1/12, 34740, Bakırköy, İstanbul. <http://www.ctf.istanbul.edu.tr/dergi/online/2000v31/s4/004a4.htm>

da diyabette HbA1c düzeylerinin artışının lipid peroksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir.¹² C vitamininin ise diyabette artmış olan glukoz düzeylerini ve ortaya çıkan oksidatif hasarları azaltabileceği belirtilmiştir.¹³

Diyabetik kişilerde eritrosit GSH düzeyleri azaldığı gösterilmiştir.¹⁴ Ayrıca diyabetiklerde GSH peroksidaz aktivitesinin de azaldığı ve eritrosit lipid peroksidasyonunun arttığı saptanmıştır.¹⁵ Diyabetiklerde hepatik GSH düzeyleri de normal veya hafif azalmış olarak bulunmuştur.^{15,16}

Çalışmamızda, tip 2 diyabetli hastalarda C vitamininin HbA1c ve GSH düzeylerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Araştırmamızda, DETAE Diyabet Polikliniği'nde takip edilen 20'şer kişiden oluşan iki grup diyabetik olgu kullanıldı. Bu gruplardan birine (birinci grup) C vitamini diğerine (ikinci grup) plasebo verildi. Hastaların bazı kriterleri taşımasına dikkat edildi. Bu kriterler: hastanın tip II Diyabetli olması, aşırı obez olmaması (Vücut kütle indeksi, BMI: 20-30), diyabet süresinin 10 yıldan az olması, tek tip oral antidiyabetik [gliklazid etkin maddeli Diamicon (Servier İlaç) veya Betanorm (Ali Raif İlaç)] kullanması, açlık kan şekerlerinin 130 mg/dL nin üzerinde olmaması, yaşlarının 40-60 arasında olmasıdır.

Birinci gruba günlük 1000 mg C vitamini eşdeğer kalsiyum askorbat (Bilim İlaç) vermeye başlamadan önce kan alındı ve bu, 0. gün olarak belirlendi. Daha sonra 30. ve 60. günlerde kan alındı. İkinci gruba plasebo verildi ve aynı şekilde kan alındı.

Glikozillenmiş hemoglobin tayininde Helena Glyco Hb Quik Column kromatografi kiti kullanıldı. Bu kit Hb A1c in miktar tayini için mikrokromatografik yöntem kullanmak üzere hazırlanmıştır. Burada kullanılan kromatografi türü katyon değiştirici kromatografidir.¹⁷ 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. HbA reçineye tutunmuş halde kalır. Spektrofotometrede 415 nm de HbA1c düzeyi okunur. Total Hb düzeyi de ölçülür. HbA1c 'nin total Hb'ye oranı % olarak hesaplanır.

GSH düzeyinin belirlenmesi için kapiller elektroforez yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 9ml. 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 çözüldü. Üzerine 1 mol/L perklorik asit ilave edilip proteinleri çöktürüldü. Supernatant pastör pipeti ile alınıp pH'sı 8,5'e ayarlandı. Daha sonra filitreden geçirilerek kapiller elektroforeze uygulandı.¹⁸

Kapiller elektroforezde çalışma koşulları:

Örneklerin elektroforeze uygulanması için gerekli enjeksiyon süresi: 4 sn, enjeksiyon türü hidrodinamik, kapillerin uzunluğu 44 cm, kapillerin çapı 75 (m, voltajı 12.000 volt, sıcaklığı 30(C, deney süresi (runtime) 13 dakika, kullanılan tampon miseller tampon (30 mM borat, 30 mM SDS %1,5 asetonitril) idi. Sonuçlar GSH standardı ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Çalışmamızda birinci grup ile ikinci grubun 0-30. gün, 0-60. gün % HbA1c düzeyleri ile mg/dL cinsinden GSH düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesinde eşleştirilmiş dizilerde Student- t testi uygulandı.

BULGULAR

Bulgularımıza göre birinci grupta C vitamini kullanmaya başlamadan önceki duruma göre 30. gün ve 60. gün sonundaki HbA1c düzeylerinde ileri düzeyde anlamlı bir azalma saptanmıştır (p<0,001). İkinci gruba plasebo verildikten sonraki 30. gün ve 60. gün sonunda ölçülen HbA1c değerleri kullanıma başlamadan önceki (0. gün) değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05). Toplu sonuçlar Tablo I'de gösterilmiştir.

Birinci grupta 30. gün sonunda ölçülen GSH değerleri, 0. gün değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış-

Tablo I. C Vitamini ve Plasebo Kullanan Tip 2 Diyabetli Hastaların HbA1c ve GSH Düzeyleri (Ortalama \pm SD)

		C vitamini alan grup	Plasebo (kontrol) grubu
		n=20	n=20
HbA _{1c} (%)	0. gün	11.92 \pm 1.04	10.27 \pm 1.84
	30.gün	10.16 \pm 0.89 a**	11.18 \pm 1.34
	60. gün	9.43 \pm 0.52 b**	10.31 \pm 1.62
GSH (mg/dL)	0. gün	17.68 \pm 8.24	19.50 \pm 10.61
	30.gün	18.89 \pm 9.23	18.84 \pm 11.43
	60.gün	22.60 \pm 11.83 c*	19.07 \pm 13.79

a: C vitamini alan grubun 0. gün ile 30. gün arasında HbA_{1c} nin istatistiki farkları; **b:** C vitamini alan grubun 0. gün ile 60. gün arasında HbA_{1c} nin istatistiki farkları; **c:** C vitamini alan grubun 0. gün ile 60. gün arasında GSH' un istatistiki farkları; *: p<0.05; **: p<0.001.

tır (p>0,05). Aynı ölçüm 60. gün sonunda yapıldığında anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0,05). İkinci grup GSH düzeyleri incelendiğinde, 30. ve 60. gün sonunda 0. güne göre anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,05).

TARTIŞMA

Diabetes mellitus toplumda sık görülen bir hastalıktır. Nonenzimatik glikozilasyon, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu gibi çeşitli komplikasyonları nedeniyle diyabet en sık araştırılan hastalıklardandır.

Çalışmamızda tip 2 diyabetli hastalarda, antioksidan olarak verilen C vitamini nin nonenzimatik glikozillenme ve GSH'a etkileri incelenmiştir. C vitamini kullanan hastalarda, kullanmaya başlamadan önceki duruma 30. gün ve 60. gün sonunda HbA_{1c} düzeyinde ileri düzeyde bir azalma belirlenmiştir (p<0,001). Plasebo kullanan hasta grubunda ise 30. gün ve 60. gün sonunda HbA_{1c} değerlerinde anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05).

Bu durum C vitamininin diyabetik hastalar üzerine yararlı bir etkisi olduğunu göstermektedir.¹³ Diyabetik sıçanlar üze-

rinde yapılan bir çalışmada askorbatın artmış kan glukoz düzeylerini azalttığı ve diğer bir çalışmada ise diyabette oksidatif strese de ileri derecede bir düzelme sağladığı saptanmıştır.^{11,13} Çalışmamız, hayvan deneylerinden elde edilmiş sonuçlar ile uyum içindedir. Ayrıca Kaneto ve ark. bulguları, pankreas beta hücrelerinin glukoz toksisitesine karşı korunmasında C vitamininin çok değerli bir antioksidan olduğu yönündedir. Ayrıca histolojik analizlerde antioksidan verilen diyabetik farelerin beta hücrelerinin verilmeyenlere göre daha büyük oldukları, buna neden olarak da antioksidanların beta hücrelerinin çoğalmasına etki etmeden apoptozisi önlediği belirtilmiştir. Bunun sonucu olarak kronik hiperglisemide apoptozisin uyarılmasının antioksidan kullanılarak engellenebileceği hipotezi ileri sürülmektedir.¹⁹ Çalışmamızın bulguları bu hipotezle birlikte uzun süreli C vitamini desteğinin protein veya hemoglobin glikozilasyonunu önlediği iddialarını destekler içeriktedir.

C vitamini alan hastalarda GSH düzeyleri, 0-30. gün arasında kıyaslandığında anlamlı bir artış bulunamamış, 0-60. gün arasında anlamlı bir artış bulunmuştur. Plasebo kullanan hastalarda 30. gün ile

60. gün kıyaslandığında GSH düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tablo I'de görüldüğü gibi C vitamini alan ve C vitamini yerine plasebo verilen hastaların HbA1c değerleri ile GSH düzeyleri arasında 30. gün anlamlı bir fark bulunamamıştır. 60 gün C vitamini verilen hastaların ortalama HbA1c değerleri C vitamini yerine plasebo verilen hastalarla karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur, fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$), 60. gün C vitamini verilen hastaların GSH değerleri, plasebo alan hastalardan anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$).

Çalışmamızda GSH düzeyleri tayininde kapiller elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Bu deneyler sonucu çalışmamızda hem hasta ve hem de kontrol gruplarında belirlenen GSH düzeyleri diğer çalışmalara göre daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeni hidroliz olabilir veya bu yöntemde tayin yapılırken dedektör tarafından belirlenen sülfidril grupları sadece glutatyona aittir. Elman yönteminde diğer proteinlerden gelen sülfidril grupları da glutatyona ait olarak değerlendirilmektedir.

Bazı çalışmalarda diyabetik hastalarda glutasyonun normalden düşük olduğu ama tedavi edilen diyabetlilerde bu düzeyin normal seviyeye geldiği belirlenmiştir.² Çalışmamızda diyabetli hastalara C vitamini verildikten 30. gün sonra HbA1c düzeylerinde azalma, GSH düzeylerinde bir artma görülmüştür. 60. günde bu durum daha da düzelmektedir.

Sonuçlarımızdan C vitamini verilmesinin glutasyonun artmasını sağlayarak antioksidan etkiyi arttırdığı ve nonenzimatik glikozillenmeyi azalttığı ve bu nedenle C vitaminin koruyucu etkisi olduğu kanaatine varılmıştır.

ÖZET

Antioksidan vitaminler insulin salgılanmasının regülasyonunda önemli bir role sahiptir. Doğal bir antioksidan olan GSH ve antioksidan vitaminler diyabetin komplikasyonlarından olan serbest radikal oluşumunu engelleyebilmektedir.

Diyabetes mellitus glukoz homeostazisinin bozulması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Tip 2 Diyabetin komplikasyonlarından birisi HbA1c yüzdesinin artmasıdır. Diğer bir komplikasyon ise serbest radikal oluşumunun artmasıdır. GSH ve C vitamini diyabetle artan oksidatif hasara karşı hücreleri koruyabilmektedirler.

Çalışmamızda tip 2 diyabetli hastalarda C vitaminin HbA1c ve GSH düzeyleri üzerine olan etkisinin incelenmesi amaçlandı. Yaşları 40-60 arasında olan 20 tip 2 diyabetli C vitamini alan, aynı sayıda ve yaşta olan ve tip 2 diyabetli plasebo kullanan kontrol grubu karşılaştırıldı. HbA1c tayini Helena HbA1c kiti ile, GSH düzeyleri kapiller elektroforez yöntemi ile yapıldı.

C vitamini kullanan Diyabetik hastalarda C vitamini kullanmadan önceki duruma göre 30. gün ve 60. gün sonunda HbA1c düzeylerinde anlamlı bir azalma ve GSH düzeylerinde anlamlı bir artma bulunmuştur. Plasebo verilen hastalarda her iki parametrede de anlamlı bir fark görülmemiştir.

Sonuç olarak C vitamini verilmesinin antioksidan etkiyi arttırdığı ve nonenzimatik glikozillenmeyi azalttığı, bu nedenle de koruyucu etkisinin olduğu kanatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Pigeolet E, Remacle J. Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. Free Radical Biol Med. 1991; 11: 191-195.
2. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsu-

- zawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in Diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*. 1999; 48: 2398-2406.
3. Skkodowska M, Gromadzinska J, Wasowicz W. Lipid peroxide concentration, selenium level and glutathione peroxidase activity in blood of type 2 (Noninsulin-dependent) diabetic elderly people. *J Clin Biochem Nutr* 1989; 7: 35-41.
 4. Wolf SP. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* 1993; 49: 642-652.
 5. Özden İ, Deniz G, Tasalı E, Ulusaraç A, Altuğ T, Büyükdevrim S. The effect of vitamin E on glycosylated hemoglobin levels in diabetic rats. A preliminary report. *Diabetes Res* 1989; 12: 123-124
 6. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radical Biol Med* 1991; 10: 339-352.
 7. Counts DF, Shaw WN. Effect of carbohydrate structure and concentration on the non-enzymatic glycosylation and subsequent crosslinking of collagen. *Diabetes Res* 1991; 16: 37-40.
 8. Guillausseau PJ, Charles MA, Godard V, Timsit J, Chanson P, Paolaggi F, Peynet J, Eschwege F, Rousselet F, Lubetzki I. Comparison of fructos -amine with glycated hemoglobin as an index of glycemic control in diabetic patients. *Diabetes Res* 1990; 13: 127-131.
 9. Sensi M, Buruno MR, Valente L, Ciocchia GP, Chianelli M, Pozzilli P. Retinol binding protein A short half life determinant of protein nonenzymatic glycation in diabetes *Diabetes Res* 1990; 13: 195-198.
 10. Waczulikova I, Krahulec B, Sikurova L, Carsky J, Orszaghova Z, Durackova Z. Effect of vitamin C and E on nonenzymatic glycation and physico- chemical properties of isolated erythrocyte membranes in diabetic patients. *Bratisl Lek Listy* 2000; 101: 152-156.
 11. Nazıroğlu M, Dilsiz N, Çay 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: 223-232.
 12. Jain SK, Mevie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989; 38: 1539-1542.
 13. Younf IS, Torney JJ, 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.
 14. Maarques D, Cazana L, Puyol RM. In vitro response of erythrocytes to a tocopherol exposure *J Vit Nutr Res* 1986; 56: 311-314.
 15. Uzel N, Sivas A, Uysal M, Öz H. Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus *Horm Metabol Res* 1987; 19: 89-90.
 16. Mc Lennan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, Turtle JR. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 344-348.
 17. Trivelli LA, Ranney HM, Lai HT. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus *N Engl J Med* 1971; 284: 353-357.
 18. Jellum E, Thorsrud AK, Time E. Capillary electrophoresis for diagnosis and studies of human disease, particularly metabolic disorders. *J Chrom* 1991; 559: 455-465.
 19. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 1999; 48: 2398-2406.