

Polikistik Over Sendromlu Hastalarda, Metformin Tedavisinin Malondialdehid Düzeyi ile Paraoksonaz 1 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Effects of metformin therapy on malondialdehyde level and paraoxonase 1 activity in patients with polycystic ovary syndrome

Derya Koçer, MD.

Department of Biochemistry
Erciyes University, Medical Faculty
ayder78@yahoo.com

Sabahattin Muhtaroğlu, PhD.

Department of Biochemistry
Erciyes University, Medical Faculty
muhtars@erciyes.edu.tr

Fahri Bayram, MD.

Department of Endocrinology
Erciyes University, Medical Faculty
fbayram@kaynet.net

Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı, metformin tedavisinin, polikistik over sendromlu hastalarda kardiyovasküler hastalık riskini artıran oksidatif stres üzerine etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya, 15 polikistik over sendromlu hasta ve 17 sağlıklı birey dahil edildi. Hasta grubuna altı ay süreyle, 2x850 mg/gün metformin tedavisi verildi. Çalışma gruplarından elde edilen serum örneklerinde serum androjen ve malondialdehid seviyeleri ve paraoksonaz 1 aktivitesi ölçüldü.

Bulgular: Polikistik over sendromlu hastalarda kontrol grubuna göre, paraoksonaz 1 aktivitesi anlamlı şekilde düşük; serum androjen ve malondialdehid seviyeleri ise anlamlı şekilde yüksek bulundu. Metformin tedavisinden sonra, paraoksonaz 1 aktivitesinde anlamlı artış; serbest testosteron, dihidroepiandrostenedion sülfat ve malondialdehid seviyesinde ise anlamlı azalma görüldü ($p < 0.05$).

Sonuç: Polikistik over sendromlu hastalarda artmış reaktif oksijen türlerinin, paraoksonaz 1 aktivitesini azaltabileceği, malondialdehid düzeylerini ise yükseltebileceği tespit edildi. Bu hastalara uygulanan metformin tedavisinin, lipid peroksidasyonunu azaltıp, serum paraoksonaz 1 aktivitesini yükselterek, kardiyovasküler riski artıran oksidatif stresi önleyebileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: **Malondialdehid; Metformin; Polikistik over sendromu; PON1 protein, insan.**

Abstract

Purpose: The aim of this study was to assess the effects of metformin on oxidative stress that may increase the risk of cardiovascular disease in patients with polycystic ovary syndrome.

Materials and methods: Fifteen patients with polycystic ovary syndrome and 17 healthy subjects were included in this study. Patients were treated with 2x850 mg/day metformin for six months. Serum androgen and malondialdehyde levels and paraoxonase 1 activity levels were measured in serum obtained from study groups.

Results: Significantly decreased paraoxonase 1 activities, but increased free testosterone, dihydroepiandrosterone sulfate and Malondialdehyde levels were found in patients with polycystic ovary syndrome compared to those of controls. Paraoxonase 1 activities increased and Malondialdehyde levels decreased significantly after metformin therapy ($p < 0.05$).

Conclusions: Increased reactive oxygen species levels in patients with polycystic ovary syndrome might result in decreasing antioxidant paraoxonase 1 activity and increasing Malondialdehyde levels. Metformin therapy may inhibit the risk of cardiovascular diseases by decreasing lipid peroxidation and increasing paraoxonase 1 activity.

Key Words: **Malondialdehyde; Metformin; PON1 protein, human; Polycystic ovary syndrome.**

Submitted : November 06, 2007
Revised : December 08, 2007
Accepted : February 11, 2008

Corresponding Author:

Department of Biochemistry
Erciyes University, Medical Faculty
Kayseri, Turkey

Telephone : +90 -505 7912861
E-mail : ayder78@yahoo.com

Giriş

Polikistik over sendromu (PKOS), reproduktif çağıdaki kadınların % 5-10'unu etkileyen, yaygın, heterojen bir endokrinolojik hastalıktır. Bu sendrom, hiperandrojenizm, infertilite, hirsutizm, kronik anovulasyon ve insülin direnci ile karakterizedir (1). PKOS'un etyopatogenezinde özellikle üzerinde durulan mekanizma insülin direncidir. İnsülin direnci ve hiperinsülinemi; PKOS' lu kadınlarda uzun dönemde riskler oluşturan, hipertansiyon, endotel disfonksiyonu ve dislipidemi gibi bozukluklara da yol açabilir. Endotel disfonksiyonu ve dislipidemi, kardiyovasküler hastalıklar açısından önemli risk faktörleri sayılmaktadır (2).

Artmış oksidatif stresin PKOS'lu kadınlarda kardiyovasküler hastalık riskini arttırabileceği bildirilmiştir (3). Oksidatif stresin, doku hasarına yol açma mekanizmalarından biri de lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunu yansıtan malondialdehid (MDA), hücrenin yapı ve fonksiyonlarını bozabilir. MDA, biyokimyasal olarak tayinin kolay ve doğru olarak yapılabilmesinden dolayı, vücutta lipid peroksidasyon düzeyinin tespitine yönelik çalışmalarda en çok tercih edilen parametre olmuştur (4, 5). Çalışmamızda, MDA ölçümü, olası intefransları önlemek için, spektrofotometrik olarak değil, spesifik/sensitif bir yöntem olan "Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)" ile yapılmıştır.

Paraoksonaz 1 (PON1), okside lipoproteinler üzerindeki lipid peroksidleri hidroliz edip, yüksek dansiteli lipoproteini (HDL) ve düşük dansiteli lipoproteini (LDL) oksidatif stresin etkilerinden koruyan ve HDL'nin antioksidan özelliklerinden kısmen sorumlu olan bir enzimdir (6).

Günümüzde, standart bir tedavi şeması olmayan PKOS'ta pek çok ilaç denenmektedir. Oral bir antidiyabetik ilaç olan metformin, PKOS'taki birçok bozuklukta olumlu etkilerinden dolayı tercih edilmektedir (7, 8). Çalışmamızda; insülin direncine etkili olduğu bilinen metforminin, PKOS'lu hastalarda oksidatif stres üzerine etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışma Grupları. Bu çalışma için Temmuz 2004 - Temmuz 2006 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Polikliniği'ne hirsutizm sebebiyle başvuran ve hirsutizm sebebi PKOS olan hastalar seçildi. Hirsutizm ile birlikte oligo/amenoreesi olan ve ultrasonografi ile multipl

subkapsüler follikülleri saptanan hastalar PKOS tanısı aldı. Yaş dağılımı 18-40 yıl arasında değişen toplam 15 hasta çalışmaya alındı. Hastalara 6 ay süreyle, 2x850 mg/gün olacak şekilde, metformin (Glukofen, Sandoz) tedavisi verildi. Tedaviye başlanmadan önce ve 6 aylık tedavi süresinin sonunda hastalardan kan örnekleri alındı. Elde edilen serum örnekleri alikotlar halinde, -80 °C'de çalışma gününe kadar dondurularak saklandı. Hasta grubunun serum androjen düzeyleri [serbest testosteron (sT), dehidroepiandrostenedion sülfat (DHEAS) ve androstenedion (A)], tedaviden önce ve sonra, menstrüel siklusun folliküler fazında (adetin 3-7. günleri arasında), Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Ünitesi Laboratuvarı'nda ölçüldü. Rutin biyokimya sonuçları ve bazal hormon düzeyleri normal sınırlar içinde bulunan, sistemik hastalığı olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan, sigara içmeyen 17 sağlıklı kadın, kontrol grubu olarak seçildi. Kontrol grubundan menstrüel siklusun folliküler fazında alınan kan örneklerinde, hasta grubu ile aynı parametreler çalışıldı.

Serum MDA düzeylerinin ölçümü. İmmundiagnostik marka kit ile HPLC cihazında yapıldı. MDA'nın derivatizasyon reaktifi ile floresan ürünlere dönüşümünü takiben, reaksiyon solusyonu eklenerek ortamın pH'sı optimum değerlere getirildi. MDA'nın oluşturduğu floresans, izokratik HPLC sisteminde, spektrofotometrik detektörle 553 nm (emiyon) ve 515 nm (eksitasyon)'de ölçüldü. Serum örneklerinde MDA düzeyleri µmol/L olarak verildi.

Serum PON 1 aktivitesinin ölçümü. Eckerson ve arkadaşlarının (9) metodu kullanılarak yapıldı. Paraoksonun, PON 1 tarafından hidrolizi ile oluşan sarı renkli para-nitrofenol'ün neden olduğu absorpsiyon artışının, 412 nm'de kinetik olarak izlenmesi ile enzim aktivitesi ölçüldü. Serum örneklerinde bazal PON aktivitesi, Ü/L olarak verildi.

İstatistiksel Analiz. Tüm istatistiki karşılaştırmalar, SPSS for Windows 13.0 paket bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubundan elde edilen biyolojik materyalde çalışılan değişkenlerin karşılaştırılmasında Student-t testi kullanıldı. Hasta grubunun tedavi öncesi MDA, PON1 ve sT değerleri arasındaki korelasyonların belirlenmesinde Pearson's korelasyon analizi kullanıldı.

Bulgular

Hasta (24.06 ± 5.99) ve kontrol (25.70 ± 5.14) grubu arasında, yaş ortalamaları bakımından istatistiki anlamda fark olmadığı görüldü ($p > 0.05$). PKOS'lu hastalarda kontrol grubuna göre, PON1 aktivitesi anlamlı şekilde düşük, serum androjen ve MDA seviyeleri ise anlamlı şekilde yüksek bulundu (Tablo I).

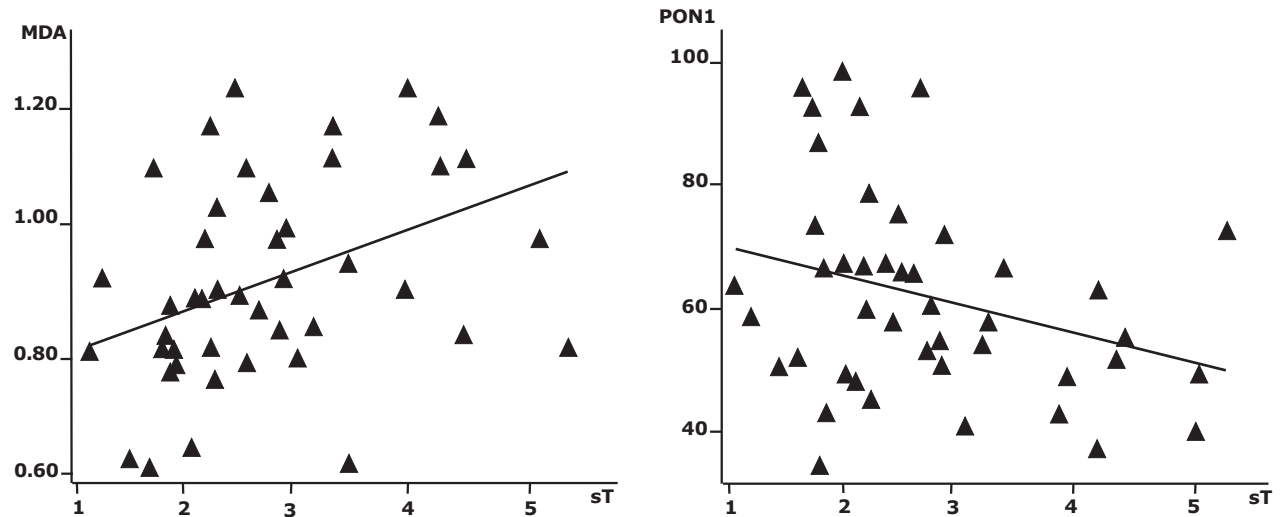
Metformin tedavisinden sonra, PON1 aktivitesinde anlamlı artış; serbest testosteron (sT), dihidroepiandrostenedion sülfat (DHEAS) ve MDA seviyesinde ise anlamlı azalma görüldü ($p < 0.05$, Tablo I).

Tablo I. PKOS grubunun (n:15) tedavi öncesi serum androjen ve MDA düzeyleri ile PON 1 aktivitelerinin (ortalama + standart sapma) kontrol grubu (n:17) ile karşılaştırılması.

Parametreler	PKOS (0. ay)	PKOS (6. ay)	Kontrol	p*	p#
MDA (umol/L)	0,99±0,16	0,77±0,12	0,66±0,08	<0,001	<0,001
PON 1 (U/L)	53,77±13,26	91,12±19,32	100,09±18,01	<0,001	<0,001
sT (pg/mL)	2,81±0,99	2,02±0,50	1,38±0,31	<0,001	<0,01
DHEAS (ng/mL)	2841,80±1045,04	2125,80±881,90	1853,00±438,87	<0,003	<0,001
A (ng/mL)	3,55±0,82	3,16±1,57	2,48±0,71	<0,003	>0,0 5

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. PKOS: Polikistik over sendromu, MDA: malondialdehid, PON 1: Paraoksonaz 1, sT: serbest testosteron, DHEAS: dihidroepiandrostenedion sülfat, A: androstenedion. *: kontrol grubu ile 0ncı ay karşılaştırması, #: 0ncı ve 6ncı ay karşılaştırması.

Çalışma gruplarının 0ncı ay bulgularının korelasyon analizleri MDA ile sT arasında anlamlı pozitif ve PON1 ile sT arasında anlamlı negatif korelasyon olduğunu gösterdi (Şekil 1).



Şekil 1. MDA ve PON1 düzeyi ile sT düzeylerinin korelasyon ilişki doğruları. Doğru denklemleri $MDA = [0,74 + 0,007] \times sT$; $r^2: 0,16$ ve $PON = [75,23 - 4,76] \times sT$; $r^2: 0,09$.

Tartışma

PKOS sadece reproduktif endokrinolojik bir hastalık değil, aynı zamanda diyabet, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi, uzun dönemde riskler oluşturabilecek durumlarla da ilişkili, metabolik bir bozukluktur (10). Metforminin, pankreasın hücrelerinin insülin üretimine etki etmeden, periferik dokulardaki insülin hassasiyetini artırdığı bilinmektedir (8, 11).

Oksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması şeklinde tanımlanan oksidatif stres, KVH gelişimine sebep olan önemli bir risk faktörüdür (12). PKOS'ta yapımı artan ROS'un doku hasarına neden olduğu bilinmektedir (4). Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresin, doku hasarına yol açma mekanizmalarından biridir ve doymamış yağ asitlerinin serbest radikallere ve oksijene bağımlı hasarı olarak bilinir (12). Çalışmamızda, plazma lipid peroksidasyon düzeyinin tayini için, hücrelerde çok zararlı etkileri olan ve biyokimyasal olarak tayini kolay ve doğru olarak yapılabilen MDA seviyeleri ölçülmüştür (4). MDA ölçümü, olası interferansları önlemek için, spektrofotometrik olarak değil, spesifik/sensitif bir yöntem olan "Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)" ile yapılmıştır.

Sabuncu ve arkadaşları (12) kontrol grubuna göre, PKOS'lu kadınlarda MDA seviyelerinin daha yüksek olduğunu gösterdiler. Literatürde PKOS'lu hastalarda lipid peroksidasyonun arttığını gösteren çalışmaların (12, 14) aksine, anlamlı bir artış olmadığını bulan çalışmalara da vardır (15). Sunulan çalışma PKOS'lu hastalarda, sağlıklı kontrole göre MDA seviyeleri yüksek bulundu. Bu bulgu, PKOS'lu hastalarda kardiyovasküler komplikasyonların gelişmesinden önce, oksidatif stresin arttığı şeklinde yorumlanabilir.

PKOS'ta görülen hiperandrojeneminin, oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkileri netlik kazanmamıştır (12, 14). Literatürde, MDA konsantrasyonunun, erkeklerde, kadınlardan daha yüksek olduğu bildirilmektedir (16). Bununla birlikte, PKOS hastalarında, lipid peroksidasyonunun serum androjen seviyeleri ile ilişkisini değerlendiren çalışmalar, birbiriyle uyumlu olmayan sonuçlar vermektedir (12, 14). Sunulan çalışmada, MDA ve sT seviyeleri arasında pozitif yönde korelasyon tespit edildi. MDA ve sT arasında saptanan korelasyon, Yılmaz ve arkadaşlarının çalışması ile paralellik göstermektedir (14). Bu bulgulara dayanarak, PKOS'lu hastalarda görülen hiperandrojenemi, bu hastalarda oksidatif stresin artışına yol açan bir faktör olarak düşünülebilir.

Metforminin oksidatif stres üzerine etkilerini araştıran çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bonnefont ve arkadaşları (17), metforminin oksidatif stresi azalttığını, Pavloviç ve arkadaşları (18) ise oksidatif stresi artırdığını göstermiştir. Yılmaz ve arkadaşları (14) ise metformin tedavisi ile PKOS'lu hastaların MDA düzeylerinde anlamlı değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada, metformin tedavisi ile, MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana gelmiştir. Metformin, ROS oluşumunu direkt olarak inhibe edebileceği gibi, intraselüler NADPH oksidaz aktivitesini düzenleyerek, indirekt yoldan da O₂⁻ radikalinin oluşumunu azaltabilir (17). ROS oluşumunun önlenmesi ile, ateroskleroza neden olan lipid oksidasyonunun ve dolayısıyla MDA düzeylerinin azaldığı düşünülebilir. Buna göre, sunulan çalışmada, metforminin ROS oluşumunu önleyerek, ateroskleroza neden olan lipid oksidasyonunu ve dolayısıyla MDA düzeylerini azalttığı söylenebilir. Ayrıca metforminin, tekal hücreler üzerine direkt etki ederek androjen üretimini inhibe ettiği de bildirilmektedir (19). Buna göre, metforminin oksidatif stresi azaltıcı etki mekanizması, serum androjen düzeylerini azaltması olabilir. Buna göre, metformin ROS oluşumunu önlemesinin yanında, serum androjen düzeylerini düşürerek de oksidatif stresi azaltıyor olabilir.

Genetik olarak PON1 eksikliği olan farelerde oksidatif stresin arttığı, HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruyamadığı ve sonuçta ateroskleroz geliştiği gözlenmiştir (20). Ayrıca artmış oksidatif stres altında bulunan aterosklerotik hastalarda da PON1 aktivitesinin düşük olduğu bildirilmektedir (6). Bu çalışmalar, PON1 aktivitesinin aterosklerotik olaylarla yakından ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu görüşü destekler şekilde, ateroskleroz ve KVH riskinin yüksek olduğu PKOS hastalarında da PON1 aktivitesi düşük bulunmuştur (15). Sunulan çalışmada da, literatürle uyumlu olarak, PKOS'lu hastalarda PON1 aktivitesi düşük bulundu.

Karaciğer PON1 mRNA ekspresyonunun, bazı genetik ve çevresel faktörlerden etkilendiği bildirilmiştir. Özellikle, androjenler ve proinflatuar mediatörler, karaciğer PON1 mRNA ekspresyonunu azaltırlar. Bin Ali ve ark.'nın (21) çalışmasında, erkek farelerde PON1 aktivitesi düşük bulunmuş, kastrasyon sonrası hepatik PON1 mRNA ekspresyonunda %170 oranında artma gözlenmiştir. Bu görüşü destekler biçimde, Dursun ve ark. (18). PKOS'lu kadınlarda PON1 aktivitesi ile tT arasında negatif korelasyon tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada da, PON1 aktivitesi ile sT arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Hiperandrojenizm ve proinflatuar mediatörlerle ilişkili

olduğu bilinen PKOS'ta PON1 aktivitesinin düşüklüğü bu mekanizma ile açıklanabilir. Oksidatif stres insülinin etkisini bozabileceğinden, azalmış PON1 aktivitesi, insülin direncinin oluşumuna katkıda bulunabilir. Sunulan çalışmada, metformin tedavisi ile PON1 aktivitesinde istatistiki olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Metforminin serum androjen düzeylerini azaltarak PON1 aktivitesini artırdığı düşünülebilir.

Çalışmamızın bulguları, literatür bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde, PKOS'ta yüksek KVH riskinden sorumlu mekanizmalardan birisinin de oksidatif stres olabileceği düşünülebilir. Bu hastalara uygulanan metformin tedavisinin, PON1 aktivitesini artırıp, MDA düzeylerini düşürerek, KVH gelişimine neden olan oksidatif stresi azalttığı görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışma, PKOS'lu kadınlarda uzun dönemde gelişebilecek komplikasyonların önlenmesinde, metforminin etkili ve güvenilir olduğunu göstermiştir.

Kaynaklar

1. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine* 1995; 333:853-861.
2. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 1-17.
3. Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Serteser M. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril* 2003; 80:123-127.
4. Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive Oxygen Species-Induced Oxidative Stress in the Development of Insulin Resistance and Hyperandrogenism in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 336-340.
5. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998; 39:1529-1542.
6. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parro SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998;101:1581-90.
7. Haas DA, Carr BR, Attia GR. Effects of metformin on body mass index, menstrual cyclicality, and ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2003; 79:469-481.
8. Unluhizarci K, Kelestimur F, Bayram F, Sahin Y, Tutus A. The effects of metformin on insulin resistance and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 51: 231-236.
9. Eckerson HW, Romson J, WYTE C, La Du BN. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts *Am J Hum Genet* 1983;35:214-227.
10. Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, et al. Early impairment of endothelial structure and function in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4588-4593.
11. Banaszewska B, Duleba AJ, Spaczynski RZ, Pawelczyk L. Lipids in polycystic ovary syndrome: role of hyperinsulinemia and effects of metformin *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1266-1272.
12. Sabuncu T, Vural H, Harma M, Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease *Clin Biochem* 2001; 34: 407-413.
13. Sevanian A, Ursini F. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 306-311
14. Yilmaz M, Biri A, Karakoc A, et al. The effects of rosiglitazone and metformin on insulin resistance and serum androgen levels in obese and lean patients with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 1003-1008.
15. Dursun P, Demirtas E, Bayrak A, Yarali H. Decreased serum paraoxonase 1 (PON1) activity: an additional risk factor for atherosclerotic heart disease in patients with PCOS? *Hum Reprod* 2006;21:104-108.
16. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 43: 1209-1214.
17. Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, et al. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism* 2003;52:586-589.
18. Pavlovic D, Kocic R, Kocic G, et al. Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidant defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2000; 2:251-256.
19. Attia GR, Rainey WE, Carr BR. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil Steril* 2001;76:517-524.
20. Shih DM, Gu L, Xia YR, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394:284-2887.
21. bin Ali A, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK. Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:824-829.