

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU
KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, održanoj 12.04.2018. godine imenovana je Komisija u sastavu:

1. Dr Svetlana Ignjatović - redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor rada
2. Dr Jelena Kotur-Stevuljević - redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
3. Dr Đuro Macut - vanredni profesor - Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet
4. Dr Jelena Vekić - docent, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

za ocenu i odbranu završne doktorske disertacije koja je prijavljena pod naslovom „**Uticaj redoks disbalansa i inflamacije na aktivnost enzima paraoksonaze 1 i njegovu distribuciju na lipoproteinima visoke gustine u sindromu policističnih jajnika – efekat na kardiovaskularni rizik**“, kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara, specijaliste medicinske biohemije Ive Perović Blagojević.

Nakon pregledane doktorske disertacije podnosimo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija kandidata Ive Perović Blagojević pod naslovom „**Uticaj redoks disbalansa i inflamacije na aktivnost enzima paraoksonaze 1 i njegovu distribuciju na lipoproteinima visoke gustine u sindromu policističnih jajnika – efekat na kardiovaskularni rizik**“ napisana je na 153 strane, sadrži 45 slika, 35 tabela i 250 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske disertacije je izložen u sledećim poglavljima: Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijali i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura.

Uvod je podeljen u pet većih celina. U okviru prve celine prikazan je istorijat otkrića i proučavanja sindroma policističnih jajnika (PCOS). Druga celina posvećena je kompleksnoj etiopatogenezi PCOS. U okviru ove celine govori se o uticaju genetskih i/ili stečenih etioloških faktora na razvoj ovog sindroma poput gojaznosti, hiperandrogenemije, insulinske rezistencije (IR). U trećoj celini opisane su četiri različite definicije PCOS koje se podjednako koriste i danas kao kriterijumi za postavljanje dijagnoze ovog sindroma. U četvrtoj celini jasno i precizno opisane su karakteristike PCOS i detaljno su prikazane kliničke, biohemijske i morfološke

karakteristike. Peta celina posvećena je faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB) u PCOS. Posebno su naznačeni aspekti koji zahtevaju dalja istraživanja kako bi se rasvetlili mehanizmi koji povezuju PCOS sa rizikom za KVB. U skladu sa postojanjem kardiovaskularnog rizika u PCOS opisan je uticaj i doprinos gojaznosti (abdominalne gojaznosti), IR koja je jedan od glavnih patofizioloških mehanizama u sindromu i doprinosi razvoju drugih kardiometaboličkih poremećaja (poremećena tolerancija glukoze, dijabetes melitus tip 2, oksidativni stres (OS), endotelna disfunkcija, hronična inflamacija, aterogena dislipidemija i drugi). Važan deo u petoj celini posvećen je OS i hroničnoj niskostepenoj inflamaciji, odnosno LDL i HDL subfrakcijama kao faktorima rizika za KVB u PCOS. U tom delu jasno su opisani mehanizmi koji promovišu razvoj OS kao i koncept formiranja povratnih sprega između hronične niskostepene inflamacije i OS u sindromu što dalje može doprineti aktivnom formiranju aterosklerotskog plaka. Posebna pažnja posvećena je opisu LDL i HDL lipoproteinskih subfrakcija, odnosno distribuciji enzima paraoksonaza 1 (PON1) na HDL subfrakcijama i njihovom doprinosu proceni rizika za razvoj KVB u PCOS. Opisane su do sada poznate značajne izmene lipidnog profila u PCOS koje se odnose na kvalitativne promene LDL i HDL čestica (promene dijametra, proteinskog i lipidnog sastava). U okviru ove celine bilo je reči o prethodnim studijama koje su ispitivale distribuciju LDL subfrakcija koja je ukazala na postojanje neklasičnog aterogenog lipidnog profila, odnosno na prisustvo aterogenih malih, gustih LDL čestica koje su povezane sa ranim razvojem KVB. Takođe, opisana je veza između promena u raspodeli HDL subfrakcija, odnosno aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama i značaju koji bi ovakva analiza imala za žene sa PCOS. Antioksidativnu/anti-inflamatornu ulogu HDL čestice ostvaruju zahvaljujući prisustvu enzima PON1 u njihovoj strukturi. U skladu sa tim, antiaterogena aktivnost PON1 na HDL česticama ograničava razvoj aterosklerotskih lezija i na taj način može smanjiti rizik za razvoj KVB u PCOS. Na kraju pete celine predstavljena je nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD) i njena povezanost sa abdominalnom gojaznošću i IR, a samim tim i sa kardiovaskularnim rizikom čime je zaokružen ovaj sveobuhvatni prikaz kardiometaboličkog rizika, kome su izložene pacijentkinje sa PCOS.

U poglavlju **Ciljevi istraživanja** precizno i sažeto navedeni su ciljevi doktorske disertacije. Cilj ove disertacije bio je da se primenom skora rizika za KVB (KVRS) za osobe mlađe od 40 godina (1) proceni rizik za razvoj KVB u PCOS i da se ispita udruženi uticaj različitih pojedinačnih faktora rizika koji su prisutni u ovom sindromu na nivo kardiovaskularnog rizika, odnosno pojavu KVB kasnije tokom života. S obzirom na to da je primenjeni McMahan skor obuhvatio samo tradicionalne faktore rizika za razvoj KVB kao što su starost, hipertenzija, dijabetes, niska koncentracija HDL-holesterola, visok non-HDL-holesterol, gojaznost i pušenje, postavljeni su i dodatni ciljevi koji bi omogućili razmatranje i procenu netradicionalnih, novih faktora rizika kao što su vrsta dislipidemije, to jest analiza distribucije LDL lipoproteinskih subfrakcija, zatim stepena inflamacije, redoks statusa, određivanje cirkulišuće aktivnosti enzima PON1 u PCOS. Kao poseban entitet ove doktorske disertacije predstavljen je zbirni skor značajnog tradicionalnog faktora rizika dislipidemije i novih: inflamacije i oksidativnog stresa (DOI skor). Jedan od ciljeva ove disertacije je bilo ispitivanje sposobnosti ovog novog skora da razlikuje žene sa PCOS u odnosu na zdrave žene. Takođe, posebno je analiziran uticaj redoks statusa i inflamacije na aktivnost enzima PON1 i njegovu distribuciju na HDL subfrakcijama u sindromu i njihov doprinos proceni rizika za razvoj KVB.

U poglavlju **Materijali i metode** precizno su navedeni korišćeni materijali i detaljno opisana metodologija primenjena u istraživanju. Istraživanje je dizajnirano i sprovedeno kroz dve studije u kojima je učestvovalo ukupno 168 žena sa PCOS i 96 zdravih žena (kontrolna grupa) uz poštovanje principa datih u najnovijem amandmanu Helsinške deklaracije (Edinburgh, 2000).

Prva studija je sprovedena u cilju procene rizika za razvoj KVB u PCOS primenom KVRS kao i ispitivanja kombinovanog uticaja različitih faktora rizika koji postoje u ovom sindromu na nivo kardiovaskularnog rizika i pojavu KVB kasnije u toku života. U prvoj studiji, učestvovalo je 100 ispitanica (54 žene sa PCOS i 46 zdravih žena).

Druga studija je sprovedena u cilju ispitivanja uticaja redoks statusa i inflamacije na aktivnost enzima PON1 i njegovu distribuciju na HDL subfrakcijama u sindromu i njihov doprinos proceni rizika za razvoj KVB. U drugoj studiji učestvovale su 164 ispitanice (114 žena sa PCOS i 50 zdravih žena).

Krv je uzorkovana venepunkcijom iz prednje kubitalne vene u jutarnjim časovima, posle dvanaestočasovnog noćnog gladovanja, tokom folikularne faze menstrualnog ciklusa (2. ili 3. dana menstrualnog ciklusa) ženama sa PCOS i ženama iz kontrolne grupe (KG) ili nasumično u slučaju teške oligomenoreje ili amenoreje ženama sa PCOS.

Ispitanicama su određivani sledeći antropometrijski parametri: telesna težina, telesna visina, indeks telesne mase (ITM), obim struka, obim kuka, odnos struk/kuk, obim nadlaktice i meren je arterijski krvni pritisak. Biohemijski parametri (parametri inflamacije, lipidnog statusa, funkcije jetre i glukoza) određivani su primenom rutinskih metoda na automatskim biohemijskim analizatorima. Koncentracija LDL-holesterola je određena računskim putem, preko Friedewald-ove formule, non-HDL-holesterol je izračunat kao razlika ukupnog holesterola i HDL-holesterola, a aterogeni indeks je izračunat kao odnos TG/HDL-holesterola. Hormoni su određivani hemiluminescentnim imunoesejom (CLIA) na imunohemijskom analizatoru. KVRS je izračunat kao zbir pojedinačnih skor vrednosti koje se dodeljuju za svaki faktor rizika (ITM, niske koncentracije HDL-holesterola, visoke koncentracije non-HDL-holesterola, pušenje, visok krvni pritisak i glikemija našte, kao i godine starosti ispitanica). Indeks centralne gojaznosti (ICO) kao i NAFLD indeksi (APRI, HIS i LAP) su izračunati upotrebom odgovarajućih formula. Parametri oksidativnog stresa (AOPP, TOS) i antioksidativne zaštite (koncentracija ukupnih SH-grupa, aktivnosti enzima SOD i PON1) određivani su na automatskom biohemijskom analizatoru optimizacijom originalnih metoda. MDA i PAB su određeni spektrofotometrijskim metodama koje su modifikovane i validirane u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju, Farmaceutskog fakulteta. Karakteristike svih metoda detaljno su opisane u ovom poglavlju disertacije. Određivani su skorovi dislipidemije, OS i inflamacije korišćenjem populacionih vrednosti dobijenih iz zdrave populacije u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju, Farmaceutskog fakulteta, za svaki od parametara koji predstavljaju ove glavne metaboličke karakteristike PCOS. Izračunat je DOI skor kao zbir ovih pojedinačnih skorova. Na kraju, ispitivane su LDL i HDL subfrakcije primenom optimizovane metode vertikalne elektroforeze na nedenaturišućem gradijentu (3–31%) poliakrilamidnog gela. Enzimaska aktivnost PON1 na HDL subfrakcijama određivana je originalnom metodom uz optimizaciju.

Poređenje normalno distribuiranih kontinuiranih promenljivih izvršeno je primenom Student-ovog t-testa ili jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa Tukey-Snedecor-ovim *post hoc* testom. Primenom Kruskal-Wallis testa sa Mann-Whitney testom kao *post hoc* analizom poređene su promenljive koje ne prate normalnu raspodelu. Analizom kovarijanse (ANCOVA)

ispitivane su razlike između grupa nakon korekcije za godine starosti. Za proveru postojanja značajnih korelacionih odnosa između različitih parametara korišćena je Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza. Višestruka linearna regresiona analiza (MLR) upotrebljena je u cilju testiranja istovremenog uticaja dve ili više nezavisno promenljivih na jednu zavisno promenljivu. U cilju ispitivanja dijagnostičke tačnosti pojedinačnih parametara i izabranog modela da predvide veći kardiovaskularni rizik u PCOS, kao i diskriminativnih sposobnosti da razdvoje žene sa PCOS od zdravih žena korišćena je ROC analiza. Na osnovu vrednosti površine ispod ROC krive (AUC) klasifikovana je diskriminativna sposobnost parametra (dijagnostička tačnost). Svi testovi su smatrani statistički značajnim ukoliko je verovatnoća $P \leq 0,05$.

B. Opis dobijenih rezultata

U poglavlju **Rezultati** predstavljen je pregled rezultata dobijenih nakon sprovedenog istraživanja. Poglavlje je podeljeno u dve celine, shodno dizajnu istraživanja. Rezultati su prikazani grafički i tabelarno. U prvoj celini date su antropometrijske, biohemijske i hormonske karakteristike svih ispitanica koje su bile podeljene prema ITM na podgrupe, odnosno vrednosti KQRS. Pokazano je da su vrednosti KQRS statistički značajno veće kod gojaznih PCOS žena ($ITM \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$) u odnosu na normalno uhranjene ispitanice ($ITM \leq 24,9 \text{ kg/m}^2$) obe podgrupe (PCOS i KG). Rezultati ispitivanja uticaja parametara koji ne ulaze u proračun KQRS kao i hormona na nivo rizika za KVB su potvrdili da hormonski status žena sa PCOS utiče na kardiovaskularni rizik i da najviši rizik za KVB u kasnijem životu potiče od gojaznosti. U posebnom delu prve celine prikazana je procena dodatnog kardiovaskularnog rizika koji potiče od prisustva NAFLD u ovom sindromu kroz vrednosti nekoliko NAFLD indeksa i ICO. Svi NAFLD indeksi pokazali su značajnu pozitivnu korelaciju sa KQRS kao i ICO što je verifikovalo uticaj abdominalne gojaznosti na povećanje rizika. Utvrđeno je da je LAP indeks, u odnosu na ITM, pouzdaniji parametar za procenu većeg rizika za KVB u PCOS i da model sastavljen od NAFLD indeksa i ICO ima odlične diskriminativne sposobnosti da izdvoji žene sa PCOS koje imaju visok kardiovaskularni rizik.

U drugoj celini prikazane su vrednosti socio-demografskih i biohemijskih parametara, parametara redoks statusa (OS i antioksidativne zaštite). Rezultati ove celine pokazali su da su žene sa PCOS imale samo značajno niže vrednosti koncentracije HDL-holesterola u odnosu na KG (nije bilo značajnih razlika u vrednostima ostalih lipidnih parametara između grupa). Nivoi inflamatornog markera CRP bili su značajno viši u PCOS grupi u odnosu na KG, dok su više vrednosti fibrinogena i brzine sedimentacije eritrocita imale gojazne žene sa PCOS u odnosu na normalno uhranjene žene sa PCOS. Utvrđeno je postojanje redoks disbalansa u PCOS koje je prikazano povišenim nivoima markera OS i proizvodima njihovog delovanja, odnosno sniženim vrednostima parametara antioksidativne zaštite. Procena uticaja i veličine dislipidemije, OS i inflamacije u PCOS u odnosu na KG ostvarena je izračunavanjem pojedinačnih skorova ova tri kardiovaskularna faktora rizika (skor dislipidemije, oksidativno-stresni skor-predstavlja razliku prooksidativnog i antioksidativnog skora (2) i skor inflamacije) i DOI skora kod svih ispitanica. Rezultati su pokazali značajno više vrednosti skorova u PCOS u poređenju sa KG. Na osnovu nivoa statističke značajnosti utvrđeno je da, u ispitivanoj PCOS populaciji, dominira uticaj OS i inflamacije u odnosu na dislipidemiju. Oksidativno-stresni skor i DOI skor su pokazali izuzetnu diskriminativnu sposobnost da razdvoje žene sa PCOS od

zdravih žena, to jest mogli bi predstavljati indekse za predviđanje rizika za KVB u PCOS. Ispitan je i uticaj gojaznosti na vrednosti svih skorova rizika kod žena sa PCOS. U posebnom delu ove celine prikazana je distribucija LDL i HDL subfrakcija i raspodela aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama. Analiza LDL subfrakcija je pokazala da su žene sa PCOS imale značajno manju veličinu LDL čestica u odnosu na KG i da su dijometri LDL čestica bili najmanji kod gojaznih PCOS žena. Usporedna analiza udela LDL frakcija između PCOS i KG pokazala je karakterističnu preraspodelu ka manjim, aterogenijim LDL česticama u PCOS grupi u odnosu na KG što je potvrđeno ponavljanjem analize uzimajući u obzir i ITM ispitanica obe grupe. Daljom analizom je pokazano postojanje značajnih korelacija između veličine LDL čestica i antropometrijskih i biohemijskih parametara u PCOS. Korelaciona analiza sa parametrima OS u PCOS pokazala je negativnu korelaciju između parametara OS i dijametra LDL čestica. Uočena je i značajna korelacija između veličine LDL čestica i NAFLD indeksa, preciznije LAP indeksa i ICO u PCOS. Rezultati ove korelacije ukazali su na vezu između manjih LDL čestica, to jest aterogenog lipidnog profila i abdominalne gojaznosti koja podstiče nastajanje kardiometaboličkih komplikacija i u PCOS i u NAFLD. Zatim je ispitivana korelacija između KQRS i drugih skorova rizika za KVB i veličine i raspodele LDL subfrakcija u sindromu. Sa porastom KQRS, skora dislipidemije, prooksidativnog i oksidativno-stresnog skora uočeno je značajno smanjenje veličine LDL čestica što bi moglo uticati na povećan rizik za KVB kasnije tokom života kod žena sa PCOS. Zapaženo je povećanje udela većih LDL II, a smanjenje udela aterogenih malih, gustih LDL IV subfrakcija sa porastom antioksidativnog skora. Analiza HDL subfrakcija je pokazala da se PCOS i KG nisu razlikovale u pogledu veličine HDL čestica i da je udeo većih HDL 2 subfrakcija bio značajno viši, a manjih HDL 3 subfrakcija značajno niži u PCOS grupi. Kada je uzet u obzir ITM ispitanica iz obe grupe, uočeno je da su gojazne žene sa PCOS imale značajno manje dijemetre HDL čestica. Normalno uhranjene žene sa PCOS imale su najviši udeo HDL 2 subfrakcija u poređenju sa normalno uhranjenim i gojaznim ženama iz KG, dok je udeo HDL 3 subfrakcija bio značajno niži kod žena iz obe PCOS podgrupe u odnosu na gojazne žene iz KG. Korelaciona analiza između veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija i antropometrijskih i biohemijskih parametara u PCOS ukazala je da se gojaznost, a ne sam PCOS nalazi u osnovi promena profila HDL subfrakcija. Povećane vrednosti NAFLD indeksa (LAP i HIS) i ICO bile su u korelaciji sa manjim dijametrima HDL čestica, čime je dodatno verifikovan uticaj abdominalne gojaznosti na kvalitativne promene HDL čestica u PCOS. Povišen OS bio je u korelaciji sa višim udelom manjih HDL 3 subfrakcija. Ispitivana je i korelacija između KQRS i drugih skorova rizika i veličine i udela HDL subfrakcija. Uočeno je značajno smanjenje dijametara HDL čestica, kao i ukupnog udela HDL 2 subfrakcija sa porastom KQRS i skora dislipidemije, to jest porast ukupnog udela HDL 3 subfrakcija sa porastom KQRS, skora dislipidemije i DOI skora.

U okviru ove celine po prvi put analizirana je raspodela PON1 na HDL subfrakcijama u PCOS. Nije pokazana značajna razlika u distribuciji PON1 na HDL subfrakcijama između PCOS i KG. Zatim, značajna razlika u distribuciji PON1 na HDL subfrakcijama nije uočena ni kada je uzet u obzir ITM žena sa PCOS. Rezultati ispitivanja ukupne aktivnosti i distribucije PON1 na HDL subfrakcijama kod žena sa PCOS u zavisnosti od dijametra LDL čestica (LDL dijametar $\leq 25,5$ nm i LDL dijametar $> 25,5$ nm) pokazali su da nije postojala značajna razlika u aktivnosti PON1 u zavisnosti od veličine LDL čestica, ali je ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama bio značajno viši, a ukupan udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama značajno niži

kod žena sa malim LDL česticama. Korelacionom analizom između udela PON1 na HDL subfrakcijama i parametara OS utvrđeno je da je aktivnost PON1 u serumu u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 2 subfrakcijama, odnosno u negativnoj korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 3 subfrakcijama. Dalje, viši nivoi TAS i TOS, a niži nivoi PAB su korelirali sa višim ukupnim udelom PON1 na HDL 3 subfrakcijama, dok je viša koncentracija ukupnih SH-grupa korelirala sa višim ukupnim udelom PON1 na HDL 2 subfrakcijama. Na kraju, ispitivana je korelacija sa različitim skorovima rizika za KVB koji su računati u ovoj doktorskoj disertaciji i uočeno je da je oksidativno-stresni skor u pozitivnoj korelaciji sa udelom PON1 na HDL 3c česticama, odnosno da je antioksidativni skor u negativnoj korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 3 subfrakcijama, a pozitivnoj korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 2 subfrakcijama. Ovi rezultati su pokazali da je redoks disbalans u vezi sa PON1 i njenom distribucijom na HDL subfrakcijama, što je i bila jedna od glavnih pretpostavki ove disertacije.

C. Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa podacima iz literature

U poglavlju **Diskusija** detaljno su analizirani dobijeni rezultati i upoređeni sa podacima iz literature. U doktorskoj disertaciji prvi put su predstavljeni rezultati procene rizika za razvoj KVB kod mladih žena sa PCOS (ispod 40 godina) primenom KQRS koga je definisao McMahan sa sar. (1). Vrednost KQRS ukazuje na verovatnoću za razvoj klinički značajnih aterosklerotskih lezija na koronarnim arterijama. Takođe, prvi put su predstavljeni rezultati povezanosti različitih faktora rizika (redoks statusa, inflamacije, gojaznosti, veličine i raspodele LDL i HDL subfrakcija, aktivnosti PON1 i njene distribucije na HDL subfrakcijama) koji postoje u sindromu i nivoa KQRS, kao i razvoja KVB kasnije u toku života.

U ovoj doktorskoj disertaciji pokazane su više vrednosti markera inflamacije kod gojaznih žena sa PCOS i iz KG. Iako je koncentracija fibrinogena kod svih ispitanica bila u referentnom opsegu, uočen je trend viših vrednosti kod žena sa većim ITM što dokazuje da gojaznost prati niskostepena inflamacija. U studiji Ji i sar. (3) naznačeno je da se, naročito kod mlađih žena sa većim ITM, fibrinogen može koristiti kao dijagnostički marker rane faze PCOS. Dahlgren i sar. (4), međutim, ne ukazuju na razliku u koncentracijama fibrinogena između normalno uhranjenih žena sa PCOS i KG iste starosne dobi. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da nema značajne razlike u vrednostima markera inflamacije između podgrupa sa sličnim ITM. Macut i sar. (5) su pokazali da se aterogena dislipidemija, koju karakterišu hipertrigliceridemija i niske koncentracije HDL-holesterola, najčešće javlja kod gojaznih žena sa PCOS. Ovo istraživanje potvrđuje veću prevalencu dislipidemije kod žena iz ove podgrupe u odnosu na normalno uhranjene žene (90,6% vs. 31,8%). Poređenjem gojaznih žena sa i bez PCOS nije utvrđena razlika u KQRS, što je zahtevalo dalju analizu kako bi se utvrdilo da li PCOS ili gojaznost *per se* utiče na kardiovaskularni rizik. Orio i sar. pokazuju da rizik za KVB u PCOS ne zavisi od gojaznosti (6), dok Elting i sar. ukazuju da gojaznost utiče na višu prevalencu hipertenzije u PCOS (7). Imajući u vidu ove razlike, ispitana je veza pojedinačnih faktora rizika (koji nisu ulazili u proračun KQRS) sa nivoom KQRS, to jest njihov uticaj na povećanje kardiovaskularnog rizika. U grupi žena sa PCOS koje imaju najviši KQRS bilo je najviše gojaznih i žena sa dislipidemijom. Rezultati korelacije između koncentracije estradiola, odnosno FSH i KQRS u PCOS su u skladu sa publikovanim rezultatima drugih studija (8, 9).

Goodarzi i sar. (10) su utvrdili da povišeni nivoi DHEAS smanjuju kardiovaskularni rizik u PCOS. Kod svih žena sa PCOS uočena je negativna korelacija između DHEAS i nivoa KVRŠ što je u skladu sa njihovim zaključcima.

Ispitivanjem povezanosti NAFLD indeksa i nivoa KVRŠ, LAP indeks je izdvojen kao pouzdaniji parametar za procenu većeg rizika za KVB u PCOS. To je u skladu sa objavljenim rezultatima Kahn-a (11) koji je pokazao da je LAP indeks bolji parametar od ITM za identifikaciju rizika za KVB. Rezultat pozitivne korelacije između ICO i KVRŠ potvrdio je vezu između povećanog sadržaja abdominalnog masnog tkiva i većeg rizika za KVB (12). ROC analiza je potvrdila da svi NAFLD indeksi pojedinačno (APRI, HIS i LAP) kao i ICO predstavljaju dobre prediktore za procenu rizika za KVB u PCOS, a model sastavljen od NAFLD indeksa i ICO ima odlične diskriminativne sposobnosti da izdvoji žene sa PCOS koje imaju visok kardiovaskularni rizik.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivana je sposobnost dislipidemije, inflamacije, OS, odnosno aktivnosti PON1 da razdvoji žene sa PCOS koje imaju rizik za razvoj kardiom metaboličkih komplikacija od zdravih žena. Rezultati su pokazali da su žene sa PCOS imale značajno niže vrednosti koncentracije HDL-holesterola u odnosu na KG iako su te vrednosti bile u granicama preporučenih vrednosti prema NCEP ATP III (13). Vrednosti ostalih lipidnih parametara (TG, non-HDL-holesterol, TG/HDL-holesterol, ukupni holesterol i LDL-holesterol) nisu se značajno razlikovale. Holte i sar. (14) u svom istraživanju nisu pokazali postojanje razlike u koncentracijama lipida u cirkulaciji između žena sa PCOS i KG. U literaturi se nalaze različiti podaci o koncentraciji LDL-holesterola u PCOS. Phelan i sar. (15) su pokazali da žene sa PCOS imaju povišene koncentracije LDL-holesterola i da je kvalitet čestica promenjen. U PCOS postoji kontinuirano povećanje aterogenosti LDL čestica kao posledica smanjenja njihove veličine (5). Ove studije su ispitivale gojazne žene sa PCOS. Suprotno, Korejska studija (16) je pokazala da nema povišenih koncentracija LDL-holesterola niti kvalitativnih promena ovih čestica kod normalno uhranjenih žena sa PCOS. Velika meta analiza Wild i sar. (17) potvrdila je postojanje povišenih koncentracija LDL-holesterola u PCOS, ali je ukazala da na te koncentracije utiču različiti faktori (etničko poreklo, način ishrane, ITM, kompleksnost sindroma). Koncentracija inflamatornog markera CRP je bila značajno viša kod žena sa PCOS u odnosu na KG, iako su te vrednosti bile ispod 3,5 mg/L, što govori o postojanju niskostepene inflamacije u sindromu, odnosno rizika za KVB. Ovo potvrđuju Boulman i sar. (18) uz stav da je koncentracija CRP snažan nezavisni prediktor KVB u kasnijem životu. Diamanti-Kandarakis i sar. (19) ukazuju na vezu između povišenih koncentracija CRP i endotelne disfunkcije, koja predstavlja sponu između hronične niskostepene inflamacije i ateroskleroze. Vrednosti parametara OS i proizvoda njihovog delovanja su bile povišene kod žena sa PCOS što je u skladu sa objavljenim rezultatima Murri i sar. (20). Vrednosti parametara antioksidativne zaštite, posebno aktivnosti PON1, su bile snižene kod žena sa PCOS. Dobijeni podaci odgovaraju rezultatima koje su publikovali Baskol i sar. (21).

Pošto je PCOS multifaktorsko oboljenje, a dislipidemija, OS i inflamacija predstavljaju ključne kardiom metaboličke poremećaje u sindromu, procena njihove sposobnosti da doprinesu povećanju kardiovaskularnog rizika izvedena je računanjem standardizovanih skorova za svaki od navedenih faktora rizika, kao i zbirnog skora skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora i skora inflamacije – DOI skora. Vrednosti svih pojedinačnih skorova, kao i DOI skora, bile su značajno više kod žena sa PCOS u odnosu na KG. Najveći porast je utvrđen za oksidativno-

stresni skor, čime se redoks disbalans izdvojio kao dominantni patofiziološki poremećaj u ispitivanoj PCOS grupi. Ovaj inovativni pristup procene zbirnog rizika kod pacijentkinja sa PCOS po prvi put je primenjen u ovom istraživanju, pa zato nema literaturnih podataka sa kojima bi rezultati mogli da se porede. Rezultati procene dijagnostičke tačnosti skorova u identifikaciji žena sa PCOS pokazali su da oksidativno-stresni skor i DOI skor imaju izuzetnu diskriminativnu sposobnost da razdvoje žene sa PCOS od zdravih žena, odnosno mogu predstavljati dobre indikatore za predviđanje kardiovaskularnog rizika u PCOS. Pozitivna korelacija između abdominalne gojaznosti, IR i OS u PCOS (22), kao i činjenica da OS podstiče hroničnu inflamaciju i disfunkciju masnog tkiva (23) ukazuje na povezanost dislipidemije, OS i inflamacije u sindromu.

Pokazano je da žene sa PCOS imaju značajno manje dijametre LDL čestica u odnosu na KG i da postoji karakteristična preraspodela LDL subfrakcija ka manjim, aterogenijim LDL česticama u PCOS. Berneis i sar. (24) su takođe pokazali da su manji dijametri LDL čestica posledica izraženog smanjenja udela velikih LDL subfrakcija i istovremenog povećanja udela malih LDL subfrakcija u PCOS što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Rezultati dobijeni uzimanjem u obzir ITM svih ispitanica potvrdili su prethodne rezultate, pri čemu su najmanju veličinu LDL čestica imale gojazne PCOS žene. Raspodela udela LDL subfrakcija u obe PCOS grupe je pokazala preraspodelu ka manjim, aterogenijim LDL česticama u odnosu na obe podgrupe KG. Dakle, PCOS i ITM povezani su sa smanjenjem veličine, odnosno distribucijom ka aterogenijim LDL česticama što je u saglasnosti sa studijom Phelan i sar. (15) koja je pokazala da su gojazne žene sa PCOS sklonije aterogenoj dislipidemiji, to jest aterogenom LDL B fenotipu („aterogenom lipoproteinskom fenotipu“) koji doprinosi povećanom riziku za KVB. Ovaj izmenjeni lipidni profil odlikuju kvalitativne promene LDL-a (povećane vrednosti aterogenih malih gustih LDL čestica), povećane koncentracije TG i snižene koncentracije HDL-holesterola i prisutan je u PCOS (25).

James i sar. (26) su ukazali da je odnos struk/kuk (marker abdominalne gojaznosti) nezavisno udružen sa povećanjem malih, gustih LDL čestica, a Doi i sar. (27) opisuju karakteristične lipoproteinske poremećaje udružene sa PCOS i IR (hipertrigliceridemija, snižena koncentracija HDL-holesterola i manji dijametri LDL čestica) što su rezultati ovog istraživanja potvrdili. Dalje, povišen OS je u korelaciji sa manjim dijametrima LDL čestica, odnosno povećanim udelom malih, gustih LDL čestica koje su u uslovima izraženog OS podložnije oksidativnoj modifikaciji i transformaciji u oksidovane LDL čestice (OxLDL). Ovi rezultati su u skladu sa objavljenim rezultatima Macuta i sar. (28) koji su pokazali da izraženi OS dovodi do povećanja koncentracije OxLDL kod žena sa PCOS, što je pouzdani prediktor koronarne arterijske bolesti (KAB), kao i sa objavljenim rezultatima Vekić i sar. (29) gde je istaknuto da osobe sa većim udelom malih LDL čestica pokazuju povišen OS. Povišene vrednosti LAP indeksa (predstavlja marker abdominalne gojaznosti i sadržaja cirkulišućih lipoproteina), kao i ICO su korelirale sa manjim dijametrima LDL čestica u ispitivanoj PCOS grupi. Koliko je poznato, u ovoj doktorskoj disertaciji prvi put se ispituju kvalitativne promene LDL čestica u NAFLD kod žena sa PCOS, a dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima velike MESA studije (30). U pomenutoj studiji je potvrđeno postojanje aterogenog lipidnog profila u NAFLD, koji je, između ostalog, okarakterisan, manjom veličinom LDL čestica, to jest povećanim udelima malih, gustih LDL čestica. Veza kvalitativnih promena LDL čestica i KVRŠ, odnosno drugih skorova rizika za KVB prvi put je ispitivana u ovoj doktorskoj

disertaciji. Rezultati su pokazali da se sa porastom KQRS značajno smanjuje veličina LDL čestica. Premda je KQRS definisan za procenu rizika za KVB kod mlađih osoba, Vekić i sar. (31) su dobili slične rezultate. U njihovoj studiji je korišćen Framingamski skor rizika i više vrednosti Framingamskog skora rizika bile su u korelaciji sa manjim dijametrima LDL čestica. Rezultati korelacija sa drugim skorovima rizika (dislipidemije, OS) ukazuju da u PCOS postoji izražena sklonost ka razvoju aterogenog lipidnog fenotipa ili LDL B fenotipa koji doprinosi povećanom riziku za KVB. Negativna korelacija antioksidativnog skora i raspodele LDL subfrakcija je potvrdila da antioksidansi imaju zaštitnu ulogu u PCOS, to jest teže da uspore aterogene lipidne promene.

U doktorskoj disertaciji analizirana je i distribucija HDL lipoproteinskih subfrakcija u PCOS što može pružiti dodatni uvid u postojanje individualnog rizika za KVB kod žena sa ovim sindromom (32). Rezultati analize veličine HDL čestica i raspodele HDL subfrakcija u PCOS i KG nisu pokazali razlike u dijametrima HDL čestica između ispitivanih grupa, ali je udeo većih HDL 2 subfrakcija bio značajno viši, a udeo manjih HDL 3 subfrakcija značajno niži kod žena sa PCOS u odnosu na KG. S obzirom da je do sada publikovano nekoliko studija sa rezultatima istraživanja HDL subfrakcija u PCOS, još uvek nema dovoljno relevantnih podataka sa kojima bi se ovi rezultati mogli uporediti. Rezultati ispitivanja HDL čestica unutar PCOS grupe su pokazali da gojazne žene imaju značajno manje dijemetre HDL čestica, kao i viši udeo malih HDL 3b subfrakcija u odnosu na normalno uhranjene žene sa PCOS. Ovi rezultati su u skladu sa publikovanim rezultatima Kim i sar. (33) koji su pokazali da je smanjenje veličine HDL čestica povezano sa višim rizikom za KVB kod gojaznih PCOS žena što je dovelo do pretpostavke da na promene profila HDL subfrakcija u PCOS utiče zapravo gojaznost.

Analiza korelacija između veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija i antropometrijskih i biohemijskih parametara u PCOS potvrdila je da upravo gojaznost ima efekat na profil HDL subfrakcija, odnosno da gojazne žene sa izraženom abdominalnom gojaznošću imaju manje HDL čestice. Pozitivna korelacija između koncentracije HDL-holesterola i veličine HDL čestica, kao i udela HDL 2 subfrakcija je u skladu sa rezultatima studije Watanabe i sar. (34) koja je pokazala da je povećan kardiovaskularni rizik povezan sa smanjenim udelom HDL 2 subfrakcija. Uticaj gojaznosti na HDL profil potvrdila je i veza između povećanih vrednosti LAP i HIS indeksa, kao i ICO i smanjenja veličine HDL čestica. Ovi rezultati potvrđuju rezultate već pomenute MESA studije (30) koja nesumnjivo pokazuje da se sa napredovanjem NAFLD progresivno smanjuje dijametar HDL čestica. Povišen OS u PCOS (viša koncentracija prooksidansa MDA) je u korelaciji sa povišenim udelom HDL 3 subfrakcija što ukazuje na to da su manje HDL čestice podložnije oksidaciji i da imaju manji antioksidativni potencijal. Publikovani rezultati Vekić i sar. (29) takođe su potvrdili da osobe sa većim udelom malih HDL 3 subfrakcija imaju povišen OS izražen povećanim koncentracijama MDA. Povišene vrednosti KQRS povezane su sa manjim dijametrima HDL čestica, odnosno sa preraspodelom ka manjim HDL subfrakcijama. Iako se u ovom istraživanju KQRS prvi put koristi kod žena sa PCOS, dobijeni rezultati su bili u skladu sa objavljenim rezultatima studije Tian i sar. koja je ispitivala raspodelu HDL subfrakcija i njihov uticaj na kardiovaskularni rizik (35). Slične rezultate je pokazao i skor dislipidemije. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je dislipidemija, možda, najvažniji faktor koji utiče na profil HDL subfrakcija u PCOS. Pozitivna korelacija između DOI skora i udela HDL 3

subfrakcija pokazuje da bi povišene vrednosti DOI skora mogle da ukažu na prisustvo manjih HDL čestica, a to predstavlja još jedan značaj izračunavanja ovog skora u PCOS.

U ovoj doktorskoj disertaciji prvi put je ispitivana raspodela PON1 na HDL subfrakcijama kod žena sa PCOS. Nisu utvrđene značajne razlike u distribuciji PON1 na HDL subfrakcijama između PCOS i KG. Gojaznost nije imala uticaja na raspodelu što je potvrdilo i poređenje ukupne zastupljenosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama između PCOS podgrupa. Pošto PON1 štiti LDL čestice od oksidacije, a manje LDL čestice lakše podležu oksidativnoj modifikaciji u poređenju sa većim LDL česticama, analizirana je aktivnost PON1, odnosno ukupan udeo PON1 na HDL subfrakcijama u zavisnosti od veličine LDL čestica kod žena sa PCOS. Rezultati su pokazali da je aktivnost PON1 na HDL 3 subfrakcijama bila značajno niža kod žena sa malim, gustim LDL česticama u odnosu na žene sa većim LDL česticama. Ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama je bio značajno viši, a na HDL 3 subfrakcijama značajno niži kod žena sa malim LDL česticama u odnosu na žene sa LDL česticama većeg dijametra. Dobijeni rezultati ukazuju da HDL 3 čestice imaju smanjen antioksidativni potencijal u PCOS u uslovima povećanog kardiovaskularnog rizika (36). Povećana aktivnost PON1 je u korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 2 subfrakcijama, odnosno negativnoj korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 3 subfrakcijama. Dobijeni podaci su u skladu sa prikazanim rezultatima ovog istraživanja da su ispitivane žene sa PCOS imale više relativne udele HDL 2 subfrakcija, odnosno manje relativne udele HDL 3 subfrakcija. Gugliucci (37) je utvrdio da se PON1 brzo premešta između HDL subfrakcija tokom njihovog sazrevanja, to jest prelazi sa manjih HDL 3 na veće HDL 2 čestice što je praćeno povećanjem aktivnosti PON1. Više koncentracije ukupnih SH-grupa su u korelaciji sa udelom PON1 na HDL 2 subfrakcijama. Povišeni OS može dovesti do inhibicije aktivnosti PON1 na HDL 3 subfrakcijama. Rozenberg i Aviram (38) su pokazali da OS dovodi do smanjenja aktivnosti PON1 kroz promene redoks statusa slobodnih SH-grupa, posebno SH-grupe aminokiseline cistein koja se nalazi u aktivnom centru enzima. Pozitivna korelacija antioksidativnog skora i udela PON1 na HDL 2 subfrakcijama, odnosno negativna korelacija sa udelom PON1 na HDL 3 subfrakcijama potvrdila je da antioksidativna zaštita povećava ateroprotektivni kapacitet HDL čestica putem povećanja aktivnosti PON1 koje je udruženo sa premeštanjem PON1 na veće HDL 2 čestice. Povećanje oksidativno-stresnog skora je povezano sa povećanim udelom PON1 na HDL 3 subfrakcijama što je u skladu sa rezultatima studija koje su pokazale da OS može da spreči sazrevanje HDL čestica, te da PON1 ostane na HDL 3 subfrakciji. Gugliucci i sar. (39) su se bavili ispitivanjem aktivnosti i distribucije PON1 na HDL česticama kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom (HBI) koji, slično ženama sa PCOS, imaju povišen rizik za KVB. Njihovi rezultati su pokazali da je aktivnosti PON1 snižena kod ovih pacijenata, ali da posle hemodijalize dolazi do povećanja aktivnosti PON1 koje je udruženo sa premeštanjem PON1 između HDL subfrakcija, tj. transferom PON1 na veće HDL 2 subfrakcije koje su ključna antioksidativna HDL subfrakcija. Redoks disbalans utiče na aktivnost PON1 i njenu distribuciju na HDL subfrakcijama u PCOS.

Citirana literatura

1. McMahan CA, Gidding SS, Fayad ZA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC Jr. Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. *Arch Intern Med* 2005;165:883-890.
2. Veglia F, Cighetti G, De Franceschi M, Zingaro L, Boccotti L, Tremoli E, et al. Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index. *Biomarkers* 2006;11:562-573.
3. Ji X, Zhang B, Ying CM. Fibrinogen to be a laboratory screening biomarker for polycystic ovary syndrome (PCOS) patients: a Meta-analysis. *J Reprod Contracept* 2015;26:91-101.
4. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, et al. Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1994;61:455-460.
5. Macut D, Bjekić-Macut J, Savić-Radojević A. Dyslipidemia and oxidative stress in PCOS. *Front Horm Res*, 2013;40:51-63.
6. Orio F Jr, Palomba S, Spinelli L, Cascella T, Tauchmanová L, Zullo F, et al. The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin End Met* 2003;89:3696-3701.
7. Elting MW, Korsen TJ, Bezemer PD, Schoemaker J. Prevalence of diabetes mellitus, hypertension and cardiac complaints in a follow-up study of a Dutch PCOS population. *Hum Reprod* 2001;16:556-560.
8. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New Engl J Med* 1999;340:1801-1811.
9. Chu MC, Rath KM, Huie J, Taylor HS. Elevated basal FSH in normal cycling women is associated with unfavourable lipid levels and increased cardiovascular risk. *Hum Repr* 2003;18:1570-1573.
10. Goodarzi M, Carmina E, Azziz R. DHEA, DHEAS and PCOS. *J Ster Bioch* 2015;145:213-225.
11. Kahn HS. The “lipid accumulation product“ performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. *BMC Cardiovasc Disord* 2005;5:26-36.
12. Carmina E, Bucchieri S, Esposito A, Del Puente A, Mansueto P, Orio F, et al. Abdominal fat quantity and distribution in women with polycystic ovary syndrome and extent of its relation to insulin resistance. *JCEM* 2007;92:2500-2505.
13. National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert

- panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-3421.
14. Holte J, Bergh T, Berne C, Lithell H. Serum lipoprotein lipid profile in women with polycystic ovary syndrome: relation to anthropometric, endocrine and metabolic variables. *Clin Endocrinol* 1994;41:463–471.
 15. Phelan N, O'Connor A, Kyaw-Tun T, Correia N, Boran G, Roche HM, Gibney J. Lipoprotein subclass patterns in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) compared with equally insulin-resistant women without PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3933-3939.
 16. Kim JJ, Chae SJ, Choi YM, Hwang KR, Song SH, Yoon SH, et al. Atherogenic changes in low-density lipoprotein particle profiles were not observed in non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2013;28:1354–1360.
 17. Wild RA, Rizzo M, Clifton S, Carmina E. Lipid levels in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2011;95:1073–1079.
 18. Boulman N, Levy Y, Leiba R, Shachar S. Increased C-reactive protein levels in the polycystic ovary syndrome: a marker of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2160–2165.
 19. Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Alexandraki K, et al. Indices of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin. *Hum Reprod* 2006;21:1426-1431.
 20. Murri M, Luque-Ramirez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Hum Repr Update* 2013;19:268-288.
 21. Baskol G, Aygen E, Erdem F, Caniklioglu A, Narin F, Sahin Y, Kaya T. Assessment of paraoxonase 1, xanthine oxidase and glutathione peroxidase activities, nitric oxide and thiol levels in women with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstetricia Gynecol Scandinavica* 2012;91:326–330.
 22. Chen L, Xu WM, Zhang D. Association of abdominal obesity, insulin resistance, and oxidative stress in adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2014;102:1167–1174.
 23. Marseglia L, D Angelo G, Manti S, Aversa S, Arrigo T, Reiter RJ, Gitto E. Oxidative stress in obesity: a critical component in human disease. *Int J Mol Sci* 2015;16:378–400.
 24. Berneis K, Rizzo M, Lazzarini V, Fruzzetti F, Carmina E. Atherogenic lipoprotein phenotype and low-density lipoproteins size and subclasses in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin End Met* 2007;92:186-189.
 25. Rizzo M, Berneis K. Lipid triad or atherogenic lipoprotein phenotype: a role in cardiovascular prevention? *J Atheroscler Thromb* 2005;12:237-239.
 26. James RW, Brulhart-Meynet MC, Lehmann T, Golay A. Lipoprotein distribution and composition in obesity: their association with central adiposity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:1115–1120.

27. Doi SA, Abbas JM, Parkinson L, Chakraborty J, Akanji AO. LDL species heterogeneity in the atherogenic dyslipidemia of polycystic ovary syndrome. *Am J Clin Pathol* 2008;129:802–810.
28. Macut D, Damjanovic S, Panidis D, et al. Oxidised low-density lipoprotein concentration - early marker of an altered lipid metabolism in young women with PCOS. *Eur J Endocrinol* 2006;155:131-136.
29. Vekic J, Kotur-Stevuljević J, Jelić-Ivanović Z, Spasić S, Spasojević-Kalimanovska V, Topić A, Zeljković A, Stefanović A, Žunić G. Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Investig* 2007;37:715-723.
30. DeFilippis AP, Blaha MJ, Martin SS, Reed RM, Jones SR, Nasir K, Blumenthal RS, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and serum lipoproteins: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2013;227:429–436.
31. Vekic J, Topic A, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle-aged Serbian population. *Clin Biochem* 2007;40:310-316.
32. Hu W, Chen L, Mao S, Qiao J. A case-control study on reduced HDL2b in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2016;32:848-851.
33. Kim JY, Tfayli H, Michaliszyn SF, Lee S, Arslanian S. Distinguishing characteristics of metabolically healthy versus metabolically unhealthy obese adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2016;105:1603-1611.
34. Watanabe H, Soderlund S, Soro-Paavonen A, Hiukka A, Leinonen E, Alagona C, Salonen R, et al. Decreased high-density lipoprotein (HDL) particle size, prebeta-, and large HDL subspecies concentration in Finnish low-HDL families: relationship with intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:897-902.
35. Tian L, Li C, Liu Y, Chen Y, Fu M. The value and distribution of high-density lipoprotein subclass in patients with acute coronary syndrome. *PLoS One* 2014;9:1-8.
36. Gugliucci A, Menini T. Paraonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta* 2015;439:5-13.
37. Gugliucci A. Activation of paraonase 1 is associated with HDL remodeling ex vivo. *Clin Chim Acta* 2014;429:38–45.
38. Rozenberg O, Aviram M. S-Glutathionylation regulates HDL-associated paraonase 1 (PON1) activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:492-498.
39. Gugliucci A, Kinugasa E, Ogata H, Caccavello R, Kimura S. Activation of paraonase 1 after hemodialysis is associated with HDL remodeling and its increase in the HDL2 fraction and VLDL. *Clin Chim Acta* 2014;430:9-14.

D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

Radovi koji čine deo doktorske disertacije sa SCI liste

1. **Perović Blagojević I**, Eror T, Pelivanović J, Jelić S, Kotur-Stevuljević J, Ignjatović S. Women with Polycystic Ovary Syndrome and Risk for Cardiovascular Disease. *J Med Biochem* 2017;36:259-269 (M23)
2. **Perović Blagojević I**, Ignjatović S, Macut Đ, Kotur-Stevuljević J, Božić-Antić I, Vekić J, Bjekić-Macut J, Kastratović-Kotlica B, Andrić Z, Ilić D. Evaluation of a Summary Score for Dyslipidemia, Oxidative Stress and Inflammation (The DOI Score) in Women with Polycystic Ovary Syndrome and Its Relationship with Obesity. *J Med Biochem* 2018;37: (in press) (M23)

Saopštenja sa međunarodnih skupova

Perovic-Blagojevic I, Markovic M, Jelic S, Eror T, Ajdzemovic V, Milosevic V, Majkic-Singh N. Does ferritin and leptin level in young women with polycystic ovary syndrome depend on the nutritional status? EuroMedLab Milano 2013, May 19-23, *Bio Clin* 2013; 37:T055 (M34)

Perović Blagojević I, Eror T, Kotur-Stevuljević J, Jelić S, Pelivanović J, Jovanović N, Ignjatović S. Relationship between cardiovascular risk and non-alcoholic fatty acid liver disease in PCOS women, 2nd International Symposium on Advances in PCOS and Women's Health Belgrade 2016, April 14-16, Poster presentation

Perović Blagojević I, Eror T, Kotur-Stevuljević J, Jelić S, Pelivanović J, Ignjatović S. Is NAFLD a good predictor of cardiovascular risk in women with PCOS? EuroMedLab Athens 2017, Jun 11-15, *Clin Chem Lab Med* 2017; 55:T142 (M34)

E. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Podaci prezentovani u ovoj doktorskoj disertaciji pružaju originalan doprinos boljem razumevanju kombinovanog uticaja različitih pojedinačnih faktora rizika koji su prisutni u PCOS na nivo kardiovaskularnog rizika, odnosno rizik za pojavu KVB kasnije tokom života. Pored toga, rezultati ovog istraživanja doprinose jasnijem shvatanju kompleksne veze između OS, inflamacije i dislipidemije, odnosno njihovom uticaju na aktivnost PON1 i njenu distribuciju na HDL subfrakcijama te njihove povezanosti sa rizikom za razvoj KVB.

Pokazano je da je najviši rizik za KVB kod žena u PCOS (visoke vrednosti KQRS) povezan sa gojaznošću. NAFLD koegzistira u PCOS i dodatno povećava kardiovaskularni rizik u ovom sindromu, što abdominalnu gojaznost izdvaja kao specifični faktor rizika za KVB u PCOS. Dodatno, ovo istraživanje je ukazalo na značaj NAFLD za razvoj proaterogenog lipidnog profila u PCOS.

Dislipidemija, povećan OS, odnosno aktivnost PON1 i hronična inflamacija su ključni kardiometabolički faktori rizika u PCOS. Originalnost ove disertacije leži u pokušaju sagledavanja interakcije OS, dislipidemije i inflamacije i procene njihove sposobnosti da

doprinesu povećanju kardiovaskularnog rizika u PCOS, što je izvedeno izračunavanjem skorova dislipidemije i inflamacije, oksidativno-stresnog skora i DOI skora. Rezultati primenjene ROC analize za procenu dijagnostičke tačnosti skorova u identifikaciji žena sa PCOS pokazali su da oksidativno-stresni skor i DOI skor imaju izuzetnu diskriminativnu sposobnost da razdvoje žene sa PCOS od zdravih žena, odnosno mogu predstavljati dobre indikatore za predviđanje kardiovaskularnog rizika u PCOS. Prisustvo gojaznosti utiče na vrednosti parametara OS, inflamacije i dislipidemije. Sveukupno, povećanje telesne težine bi moglo biti zajednički faktor odgovoran za nastanak i produbljivanje ovih kardiometaboličkih faktora rizika u PCOS.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji predstavljaju naučni doprinos u rasvetljavanju tipa i intenziteta dislipidemije u PCOS. Nalaz malih, gustih LDL čestica kod žena sa PCOS, te dalje povećanje njihovog udela u gojaznosti, može imati značaja za definisanje adekvatnih preventivnih mera i sagledavanje potencijalnih terapijskih mogućnosti. Poseban doprinos ove disertacije ogleda se u činjenici da je u ispitivanoj populaciji pacijentkinja sa PCOS analizirana i distribucija HDL subfrakcija, imajući u vidu da su dostupni podaci o profilu HDL subfrakcija u PCOS ograničeni. Redoks disbalans prisutan u PCOS snižava aktivnost PON1 i time doprinosi smanjenju antioksidativne funkcije HDL čestica. U skladu sa prethodnim, antioksidansi (najpre iz hrane) bi mogli da uspore aterogenu lipidnu peroksidaciju u PCOS.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji doprinose shvatanju kinetike i funkcije PON1, posebno kako se prenosi tokom sazrevanja i remodelovanja HDL čestica gde ostvaruje zaštitnu ulogu što je od izuzetne važnosti za proces ateroskleroze. Rezultati, takođe, predstavljaju naučni doprinos aktuelnoj polemici oko uloge pojedinačnih HDL subfrakcija u samom razvoju ateroskleroze kao i rasvetljavanju uloge dislipidemije, OS i inflamacije u nastanku disfunkcionalnih HDL čestica, te njihovim efektima na rizik za razvoj KVB.

Posebnu aplikativnu vrednost rezultata ove doktorske disertacije čini primena KQRS skora i DOI skora, kao potencijalnih algoritama koji se mogu primeniti za procenu rizika za razvoj KVB u PCOS.

F. Mišljenje i predlog komisije

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je kandidat u svom istraživanju opravdao postavljene ciljeve istraživanja i zato predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivnu ocenu doktorske disertacije pod naslovom „**Uticaj redoks disbalansa i inflamacije na aktivnost enzima paraoksonaze 1 i njegovu distribuciju na lipoproteinima visoke gustine u sindromu policističnih jajnika – efekat na kardiovaskularni rizik**“ i omogući kandidatu da pristupi javnoj odbrani iste.

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Svetlana Ignjatović, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr Đuro Macut, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Dr Jelena Vekić, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Beograd,

08.06.2018. godine