

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Ilijana I. Mažibrada

**ANALIZA POKAZATELJA OKSIDATIVNOG
STRESA U ADOLESCENTKINJA SA
SINDROMOM POLICISTIČNIH JAJNIKA
NA RAZLIČITIM TERAPIJSKIM REŽIMIMA
ORALNE HORMONSKE KONTRACPCIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Ilijana I. Mažibrada

**ANALYSIS OF THE INDICATORS OF THE
OXIDATIVE STRESS IN ADOLESCENT
GIRLS WITH POLYCYSTIC OVARY
SYNDROME ON DIFFERENT ORAL
HORMONAL CONTRACEPTION THERAPY
REGIMENTS**

DOCTORIAL DISSERTATION

Belgrade, 2018

MENTOR:

Prof. dr Đuro Macut, vanredni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu

KOMENTOR:

Prof. dr Ana Savić Radojević, vanredni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Svetlana Vujović, redovni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Marija Plješa Ercegovac, vanredni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Artur Bjelica, vanredni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane: _____

**You don't always get what you wish for,
but you always get what you work for.**

**Mojim ćerkama,
Mariji i Jeleni**

REZIME

Uvod: Sindrom policističnih jajnika (PCOS) je složeni poremećaj prisutan u 6-10% žena reproduktivnog perioda, a karakteriziran je hiperandrogenizmom, hiperinsulinemijom, oštećenom funkcijom hipotalamo-hipofizno-ovarijumske osovine i disfunkcijom hormonske aktivnosti masnog tkiva. Pretpostavlja se da različiti endokrini i metabolički poremećaji mogu dodatno uticati na pojavu oksidativnog stresa kod žena sa PCOS a posebno hiperandrogenizam, koji se smatra glavnim pokretačem povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Kod adolescentkinja sa PCOS, oralna hormonska kontraceptivna (OHK) pilula može efikasno poboljšati biohemijske i kliničke parametre. Cilj ovog rada bio je određivanje parametara oksidativnog stresa i aktivnost ključnih enzima antioksidantne zaštite kod adolescentkinja sa PCOS, koje su bile normalno uhranjene i bez poremećaja tolerancije glukoze, pre i posle primene oralne hormonske kontraceptivne pilule. Pored toga, ispitali smo markere inflamacije, hs-CRP i fibrinogen kao i njihovu vezu sa antropometrijskim i parametrima lipidnog statusa.

Materijal i metode: Studijom je praćeno 35 adolescentkinja sa PCOS i 17 zdravih kontrola, odgovarajuće starosti i indeksa telesne mase. Izvršena su antropometrijska merenja, biohemijska i hormonska ispitivanja. Parametri oksidativnog stresa, koncentracije nitrotirozina i proteinskih tiol grupa kao i aktivnosti glutathion-peroksidaze i superoksid dismutaze, određivane su našte i tokom oralnog testa opterećenja glukozom (OGTT). Genetski polimorfizmi glavnih citosolnih glutathion S-transferaza (GST) određeni su PCR-om. Insulinska rezistencija procenjivana je primenom homeostatskog indeksa rezistencije na insulin (HOMA-IR), homeostatskog indeksa funkcije β ćelija (HOMA- β), insulinogenog indeksa (IGI), "Matsuda" indeksa sezivnosti na insulin [$ISI_{(Matsuda)}$] i AUC glukoze.

Rezultati: U uslovima našte, nije pronađena značajna razlika u koncentraciji parametara oksidativnog stresa između adolescentkinja sa PCOS i zdravih kontrola. Akutna hiperglikemija tokom OGTT izazvala je značajne promene u koncentraciji parametara oksidativnog oštećenja proteina kod ispitanica sa PCOS. Posebno su promene koncentracije nitrotirozina bile povezane sa testosteronom, DHEAS, androstenedionom, FAI i LH, dok je promena proteinskih tiol grupa bila povezana sa DHEAS ($p < 0,05$). Pronađena je značajna

inverzna povezanost između LH i ISI ($r=-0,359$; $p=0,034$), kao i AUC glukoze i proteinskih tiol grupa. Adolescentkinje sa PCOS, nosioci *GSTM1-nultog* genotipa imale su znatno niži nivo testosterona u odnosu na one sa *GSTM1-aktivnim* genotipom ($p<0,05$). Adolescentkinje sa PCOS su, u odnosu na zdrave kontrole, imale značajno više vrednosti hs-CRP i fibrinogena. U grupi adolescentkinja sa PCOS otkrivena je značajna pozitivna povezanost između hs-CRP i ITM, obima struka, obima kuka, LDL, LDL/HDL kao i negativna povezanost sa HDL. U istoj grupi adolescentkinja fibrinogen je bio pozitivno povezan sa ITM, obimom struka, LDL i LDL/HDL. ROC analizom otkrivena je granična vrednost za hs-CRP od 0,35 mg/L, kao i granična vrednost za fibrinogen od 2,8 g/L. U grupi adolescentkinja sa PCOS, obim struka, obim kuka, ITM i LDL bili su značajno viši kod devojaka sa hs-CRP iznad 0,35 mg/L u odnosu na ispitanice koje su imale hs-CRP niži od 0,35 mg/L. Adolescentkinje sa PCOS i fibrinogenom iznad 2,8 g/L imale su značajno viši ITM, ukupni holesterol, LDL kao i LDL/HDL u odnosu na devojke sa PCOS čije su vrednosti fibrinogena bile niže od 2,8 g/L.

Zaključak: Na osnovu povišenih vrednosti parametara oksidativnog oštećenja proteina, uz nepromenjenu aktivnost ključnih antioksidantnih enzima tokom OGTT, može se zaključiti da kod adolescentkinja sa PCOS postoje suptilne promene redoks balansa. Pored toga, značajna povezanost koja je dobijena između parametara oksidativnog stresa sa testosteronom, DHEAS i androstenedionom, upućuje na pretpostavku da je povećana produkcija slobodnih radikala verovatno posledica hiperandrogenemije. Primena OHK pilule značajno poboljšava kliničke i biohemijske karakteristike adolescentkinja sa PCOS. Pokazana je povezanost markera inflamacije, hs-CRP i fibrinogena, sa antropometrijskim i biohemijskim karakteristikama adolescentkinja sa PCOS. Markeri inflamacije mogu biti korisni u praćenju normalno uhranjenih adolescentkinja sa PCOS u nastojanju da se pravovremeno spreče nepovoljne promene u telesnoj masi i lipidnom statusu.

Ključne reči: Sindrom policističnih jajnika; oksidativni stres; C-reaktivni protein; fibrinogen; inflamacija

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Endokrinologija

SUMMARY

Objectives: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex disorder present in 6-10% of the reproductive age women and characterized by hyperandrogenism, hyperinsulinemia, impaired function of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and dysfunction of adipose tissue hormonal activity. It has been supposed that different endocrine and metabolic disorders can further affect the occurrence of oxidative stress in women with PCOS, with special emphasis on hyperandrogenism which is considered the main progenitor of increased production of reactive oxygen species (ROS). In an adolescent with PCOS, oral contraceptive therapy can effectively improve biochemical and clinical parameters. The aim of this study was to determine oxidative stress by-products and activity of key antioxidant enzymes in adolescent girls with PCOS, which were non-obese and normoinsulinemic, before and after oral contraceptive therapy. In addition, we evaluated inflammatory markers, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and fibrinogen as well as their relationship with anthropometric and lipid parameters.

Methods: The study comprised a total of 35 adolescent girls with PCOS and 17 healthy controls, appropriate age and body mass index. The anthropometric measurements, biochemical and hormonal testing were performed. Oxidative stress parameters, nitrotyrosine and thiol groups' concentrations as well as glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities were determined under fasting conditions and during oral glucose tolerance test (OGTT). Glutathione S-transferases (GSTs) polymorphisms were determined by PCR. Insulin resistance was assessed by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), homeostasis model assessment of β -cell function (HOMA- β), insulinogenic index (IGI), insulin sensitivity index-Matsuda [ISI_{Matsuda}] and blood glucose area under the curve (AUC_{glucose}).

Results: Under fasting conditions, no significant difference of oxidative stress parameters was found between adolescent patients with PCOS and healthy controls. However, acute hyperglycemia during OGTT induced significant alteration in parameters of oxidative protein damage in PCOS patients. Specifically, alteration in nitrotyrosine concentrations correlated with testosterone, DHEAS, androstenediones, FAI and LH, while change in thiol

groups was correlated with DHEAS ($p < 0.05$). A significant inverse association was found between LH and ISI ($r = -0.359$; $p = 0.034$), as well as AUC glucose and thiol groups. Adolescent girls with PCOS, carriers of *GSTM1-null* genotype had significantly lower testosterone levels than those with *GSTM1-active* genotype ($p < 0.05$). PCOS adolescent girls had significantly higher levels of hs-CRP and fibrinogen compared to healthy controls. Among PCOS patients, significant positive correlations were found between hs-CRP and BMI, waist circumference (WC), hip circumference (HC), LDL, LDL/HDL ratio, and negative correlation with HDL. In the same group of adolescents, fibrinogen was positively correlated with BMI, WC, LDL and LDL/HDL ratio. The ROC analysis revealed 0.35 mg/L as cut-off value for hs-CRP, as well as 2.8 g/L as cut-off value for fibrinogen. In the group of PCOS patients, WC, HC, BMI and LDL were significantly higher in patients whose hs-CRP was above 0.35 mg/L in comparison with the ones who had hs-CRP below 0.35 mg/L. PCOS adolescent patients who had fibrinogen above 2.8 g/L had significantly higher BMI, total cholesterol, LDL and LDL/HDL ratio in comparison with PCOS patients whose fibrinogen was below the level of 2.8 g/L.

Conclusion: Based on elevated values of parameters of oxidative protein damage, with unchanged activity of key antioxidant enzymes during OGTT, it can be concluded that there are subtle changes of redox balance in adolescent girls with PCOS. In addition, the significant associations between oxidative stress parameters and testosterone, DHEAS and androstenedione suggests that increased free radicals production is probably a consequence of hyperandrogenemia. The use of COCs significantly improves the clinical and biochemical characteristics of the adolescent with PCOS. We have shown an association of proinflammatory indices hs-CRP and fibrinogen with anthropometric and biochemical characteristics of adolescent girls with PCOS. The inflammatory markers might be useful in monitoring normal weight adolescent girls with PCOS in an effort to prevent adverse changes in body mass and lipid profile in a timely manner.

Key words: Polycystic ovary syndrome; Oxidative stress, C-reactive protein; Fibrinogen; Inflammation

Scientific Field: Medicine

Narrow Scientific Field: Endocrinology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. KARAKTERISTIKE SINDROMA POLICISTIČNIH JAJNIKA.....	1
1.1.1. Etiologija sindroma policističnih jajnika (PCOS)	1
1.1.2. Dijagnostički kriterijumi za PCOS	3
1.1.3. Patofiziologija PCOS	4
1.1.3.1. Hiperandrogenizam.....	5
1.1.3.2. Poremećaj folikulogeneze	6
1.1.3.3. Hiperinsulinemija i insulinska rezistencija	7
1.1.3.4. Neuroendokrini poremećaj.....	9
1.1.3.5. Uloga genetskih faktora	11
1.1.3.6. Uloga hronične inflamacije	12
1.1.3.7. Uloga oksidativnog stresa	13
1.1.3.7.1. Antioksidantna zaštita	14
1.1.3.7.2. Oksidativni stres kod pacijentkinja sa PCOS	16
1.1.4. Značaj glutation S-transferaza u PCOS	18
1.1.4.1. Glutation S-transferaze, podela i nomenklatura	18
1.1.4.2. Polimorfizam glutation S-transferaza	19
1.2. KARAKTERISTIKE SINDROMA POLICISTIČNIH JAJNIKA U ADOLESCENCIJI	22
1.2.1. Specifičnosti PCOS u adolescentnom uzrastu.....	23
1.2.2. Dijagnostički kriterijumi za PCOS u adolescentnom uzrastu	24
1.3. TERAPIJSKI PRISTUP U PCOS	25
1.3.1. Nefarmakološke mere	26
1.3.2. Farmakološka terapija.....	27
1.3.2.1. Primena insulinskih senzitajzera	27
1.3.2.2. Primena kombinovanih hormonskih kontraceptiva.....	28
1.3.2.3. Primena antiandrogena.....	29
1.3.3. Kombinovani terapijski režimi	30

1.3.4.	Dejstvo kombinovane hormonske kontracepcije na oksidativni stres	31
1.3.5.	Uticaj hormonske kontracepcije na oksidativni stres kod adolescentkinja sa PCOS	32
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	34
3.	MATERIJAL I METODE	35
3.1.	ISPITANICE	35
3.1.1.	Demografski podaci	36
3.1.2.	Antropometrijski podaci	36
3.1.3.	Podaci o kliničkim karakteristikama	37
3.2.	ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA	37
3.3.	ODREĐIVANJE HORMONA	39
3.4.	ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA	39
3.4.1.	Određivanje koncentracije proteinskih tiol grupa u plazmi	39
3.4.2.	Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze u plazmi	40
3.4.3.	Metoda za određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi	41
3.4.4.	Metoda za određivanje koncentracije nitrotirozina	43
3.5.	ODREĐIVANJE POLIMORFIZMA GST	43
3.5.1.	Priprema uzorka za analizu - izolacija DNK	43
3.5.2.	Određivanje polimorfizma GSTA1	45
3.5.3.	Određivanje polimorfizma GSTM1 i GSTT1	46
3.5.4.	Određivanje GSTP1 Ile105Val polimorfizma	47
3.6.	ULTRAZVUČNI PREGLED MALE KARLICE	47
3.7.	IZVEDENE VREDNOSTI/PARAMETRI	48
3.8.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	49
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	50
4.1.	KLINIČKE, BIOHEMIJSKE, HORMONSKE I ULTRAZVUČNE KARAKTERISTIKE ISPITANICA	50
4.1.1.	Kliničke karakteristike zdravih i adolescentkinja sa PCOS	52
4.1.2.	Biohemijske karakteristike zdravih i adolescentkinja sa PCOS	53
4.1.3.	Hormonski status zdravih i adolescentkinja sa PCOS	54

4.1.4.	Ultrazvučne karakteristike zdravih i adolescentkinja sa PCOS.....	55
4.1.5.	Povezanost biomarkera inflamacije sa antropometrijskim, biohemijskim i hormonskim parametrima zdravih adolescentkinja i adolescentkinja sa PCOS	55
4.2.	BIOHEMIJSKE I HORMONSKE PROMENE TOKOM OGTT	60
4.3.	PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA.....	62
4.4.	GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION S-TRANSFERAZA	65
4.5.	KLINIČKE, BIOHEMIJSKE, HORMONSKE I ULTRAZVUČNE KARAKTERISTIKE ISPITANICA POSLE SPROVEDENE ŠESTOMESEČNE TERAPIJE	68
4.6.	PROMENE TOKOM OGTT POSLE PRIMENJENE TERAPIJE U GRUPI ADOLESCENTKINJA SA PCOS	72
4.7.	PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA KOD ADOLESCENTKINJA SA PCOS POSLE PRIMENJENE TERAPIJE.....	75
5.	DISKUSIJA.....	80
6.	ZAKLJUČCI.....	90
7.	LITERATURA.....	92

1. UVOD

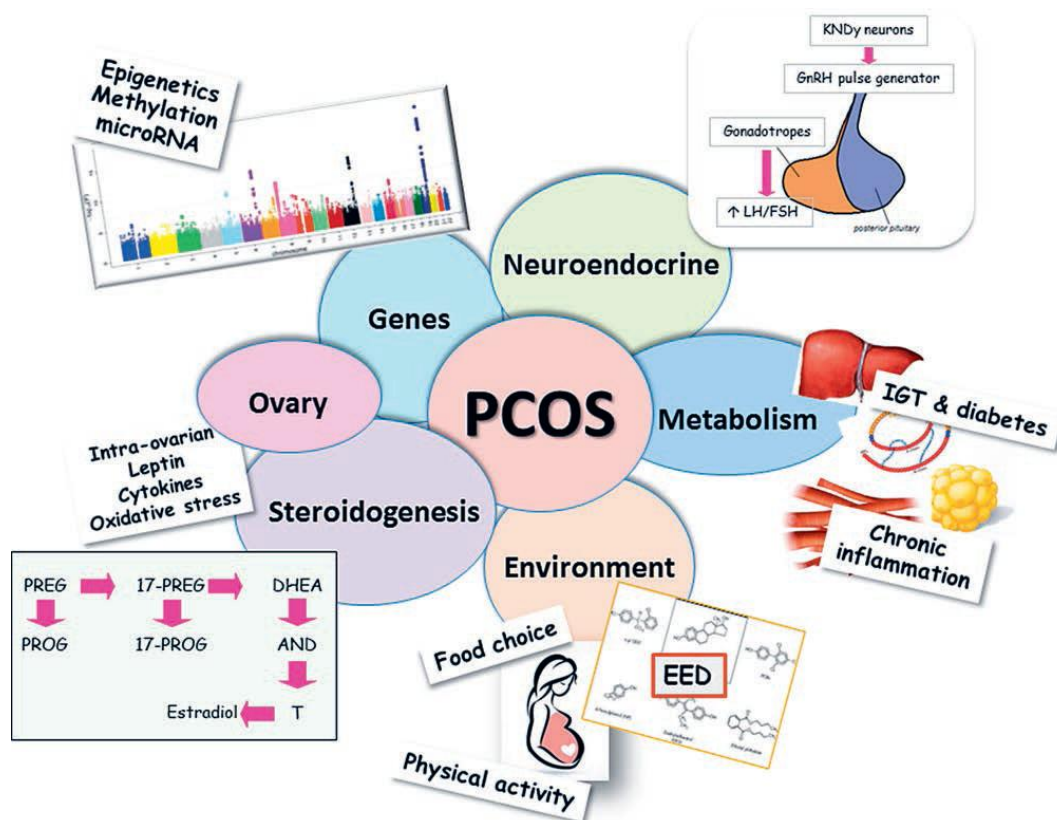
1.1. KARAKTERISTIKE SINDROMA POLICISTIČNIH JAJNIKA

Sindrom policističnih jajnika (*eng. Polycystic Ovary Syndrome, PCOS*) predstavlja najčešći endokrini poremećaj koji se prema različitim izvorima javlja kod oko 5-10% (Franks, 1995), pa čak i do 20% (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004) žena reproduktivnog perioda. PCOS predstavlja kompleksan endokrini poremećaj uzrokovan različitim etiopatofiziološkim mehanizmima, ima heterogenu kliničku sliku i ispoljava se tokom celog reproduktivnog perioda žene. Posledica je disfunkcije jajnika koji imaju policističan izgled, a karakteriše ga hiperandrogenizam, hiperinsulinemija, oštećena funkcija hipotalamo-hipofizno-ovarijumske osovine kao i disfunkcija hormonalne aktivnosti masnog tkiva (Catteau-Jonard i Dewailly, 2013). Važnost PCOS ne ogleda se samo u značajnoj učestalosti već i različitoj kliničkoj slici koja utiče na reproduktivno zdravlje žene (poremećaj menstrualnog ciklusa, infertilitet, hiperandrogenizam i hirzutizam), metabolički status (insulinska rezistencija, poremećaj tolerancije glukoze, tip 2 diabetes mellitus, povećan kardiovaskularni rizik) i izaziva značajne psihološke promene (pojačana anksioznost, depresija i lošiji kvalitet života), što sve ovaj sindrom čini vodećim zdravstvenim rizikom u reproduktivnom periodu žene (Alexander i sar., 2009).

1.1.1. Etiologija sindroma policističnih jajnika (PCOS)

Nema jasnog stava oko uzroka nastanka PCOS, a brojne hipoteze uključuju uticaj genetskih faktora i okoline (Slika 1). Sa druge strane, na etiološki uticaj okoline ukazuju zapažanja da niska porođajna težina kao i izloženost fetusa delovanju androgena mogu

dovesti do razvoja PCOS fenotipa (Conway i sar., 2014). Danas je jasno ukazano na povezanost niske porođajne težine sa insulinskom rezistencijom i gojaznošću koja nastaje u odraslom dobu (Conway i sar., 2014).



Slika 1. Potencijalni faktori uključeni u patofiziologiju PCOS (slika preuzeta iz rada Ibáñez i sar., 2018)

Klinički simptomi PCOS mogu nastati zbog genetski predodređene hipersekrecije androgena iz jajnika koji se javljaju u pubertetu ili značajno pre puberteta. Takođe, tipične kliničke i biohemijske karakteristike PCOS mogu se ispoljiti i kao posledica izloženosti androgenima pre nastupanja puberteta (Conway i sar., 2014). Hiperandrogenizam u fetalnom periodu favorizuje sekreciju luteinizirajućeg hormona (LH) i vodi razvoju abdominalne gojaznosti, što za posledicu ima razvoj insulinske rezistencije. Poremećena negativna povratna sprega regulacije LH zajedno sa kompenzatornom hiperinsulinemijom,

nastala zbog insulinske rezistencije, mogu uzrokovati anovulaciju (Conway i sar., 2014). Intrauterini faktori koji utiču na porođajnu težinu kao i moguće promene u intrauterinom okruženju mogu takođe igrati značajnu ulogu (Conway i sar., 2014). Retrospektivne analize su pokazale da devojčice rođene sa niskom porođajnom težinom tokom života mogu razviti prevremenu pubarhu, ranu menarhu i PCOS (Conway i sar., 2014). Ukazano je na češću udruženost zastoja u intrauterinom rastu sa nastankom prevremene pubarhe i funkcionalnog ovarijalnog hiperandrogenizma, hiperinsulinemije i poremećaja tolerancije na glukozu u odraslom dobu (Conway i sar., 2014). Pokazano je da prevremena adrenaarha može voditi nastanku jednog od četiri opisana fenotipa PCOS (Conway i sar., 2014).

1.1.2. Dijagnostički kriterijumi za PCOS

Kompleksnu kliničku sliku koju karakteriše trijada amenoreje, gojaznosti i hirzutizma, prvi su opisali Štejn i Leventhal (*Stein, Leventhal*) 1935. godine. Od tada inicijalnog opisa udruženosti gojaznosti, hirzutizma, akni i amenoreje sa obostrano uvećanim jajnicima sve do danas se pokušavaju definisati najprihvatljiviji dijagnostički kriterijumi za PCOS. Na osnovu preporuke Nacionalnog instituta za zdravlje SAD (*eng. National Institute of Health, NIH*), 1990. godine su dati dijagnostički kriterijumi koji podrazumevaju postojanje anovulacije i hiperandrogenizma potvrđenog biohemijski, klinički (hirzutizam, akne) ili na oba načina (Carmina, 2013). U to vreme nije uzimana u obzir i morfologija jajnika. Na ekspertskom sastanku ESHRE/ASRM (European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine) održanom u Roterdamu 2003. godine u dijagnostički postupak se uvodi i policistična struktura jajnika. Tako je predloženo da su 2 od 3 kriterijuma (hronična anovulacija, hiperandrogenizam i ultrazvučno potvrđen policistični izgled jajnika) neophodna za postavljanje dijagnoze. Međutim, klinička praksa je pokazala da ginekolozima najznačajnije sredstvo za postavljanje dijagnoze predstavlja ultrazvučni (UZ) nalaz, dok su endokrinolozi fokusirani na prisustvo hirzutizma i anovulacija. Zbog toga je Udruženje za višak androgena i PCOS, *AEPCOS* (*eng. Androgen Excess and PCOS Society*) 2006.

godine predložilo kompromis između dva seta dijagnostičkih kriterijuma, ukazujući da je PCOS uglavnom hiperandrogeni poremećaj, a da prisustvo hirzutizma, akni i/ili hiperandrogenemije predstavlja *sine qua non* za dijagnozu PCOS. Drugi potreban kriterijum za dijagnozu po *AEPCOS* preporukama je prisustvo hronične anovulacije ili policistične morfologije jajnika (Azziz i sar., 2009). U Amsterdamu su 2011. godine definisana četiri različita fenotipa PCOS kada su razdvojene kliničke manifestacije koje karakterišu hiperandrogenizam i hronična anovulacija od onih koje karakterišu disfunkcija jajnika i njihova policistična građa (Fauser i sar., 2012). Tada je posebno ukazano na neophodnost procene metaboličkih poremećaja u PCOS (Conway i sar., 2014). Tako se na osnovu mogućih kombinacija dijagnostičkih kriterijuma definišu četiri osnovna fenotipa PCOS:

- **Fenotip A:** hiperandrogenizam, hronična anovulacija i policistična struktura jajnika
- **Fenotip B:** hiperandrogenizam i hronična anovulacija
- **Fenotip C:** hiperandrogenizam i policistična struktura jajnika
- **Fenotip D:** hronična anovulacija i policistična struktura jajnika

Značaj uspostavljanja jasnih dijagnostičkih kriterijuma ogleda se i u činjenici da upravo oni omogućavaju isključivanje poremećaja sa sličnom kliničkom slikom: kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH), androgen-sekretujući tumor, Kušingov sindrom, HAIRAN sindrom (Hiperandrogenizam, Insulinska rezistencija i Akantoza nigrikans) ili jatrogeno izazvan hiperandrogenizam (Azziz i sar., 1999; Waggoner i sar., 1999).

1.1.3. Patofiziologija PCOS

I pored opsežnih i brojnih istraživanja, patofiziologija PCOS je i dalje slabo poznata. Međutim, dosadašnji rezultati ukazuju da abnormalnost jajnika ima najznačajniju i primarnu ulogu (Dewailly i sar., 2014).

1.1.3.1. Hiperandrogenizam

Hiperandrogenizam i oligoovulacija predstavljaju najznačajnije poremećaje u PCOS. Pojačana aktivnost teka ćelija praćena povećanom produkcijom androgena u jajniku je osnovna karakteristika PCOS. Pojava povišene vrednosti LH tokom rane faze razvoja ovog sindroma posledica je povećane frekvencije pulseva kao i povećanja amplituda pulseva gonadotropin-oslobađajućeg hormona (*eng. gonadotropin-releasing hormone, GnRH*). Zbog toga na rastućim folikulima jajnika prerano se pojavljuju LH receptori što dovodi do povećane sinteze androgena u jajniku (Dewailly i sar., 2014). Novija istraživanja ukazuju da navedeni poremećaj sekrecije LH nije primarna pojava već posledica negativne povratne sprege estradiola ili progesterona, ali može predstavljati odgovor hipotalamo-hipofizno-ovarijumske osovine na hiperandrogenemiju u peripubertetskom periodu (Blank i sar., 2007). Povećana produkcija androgena praćena je pojačanom amplitudom GnRH i posledičnim poremećajem sekrecije gonadotropina, produkcijom androgena u jajnicima i poremećajem ovulacije (Baptiste i sar., 2010). Značajna je i uloga hiperinsulinemije koja kao spoljašnji faktor pojačava efekte LH na produkciju steroida u teka ćelijama što rezultira hiperandrogenizmom. U *in vitro* eksperimentima pokazano je da insulin ovo delovanje ostvaruje direktnom stimulacijom sekrecije androgena iz jajnika delovanjem na citohrom P450 C17- α . Hiperinsulinemija sve do insulinske rezistencije ne predstavlja uzročni faktor ali predstavlja drugi, više neophodan nego dovoljan faktor za nastajanje PCOS, posebno u slučajevima ekstremne hiperinsulinemije (Lujan i sar., 2008). Povišene vrednosti androgena prisutne su kod 60-80% žena sa PCOS, i predstavlja ključni poremećaj u sindromu. Povećana produkcija androgena za posledicu ima hirzutizam i hiperandrogenemiju. Hiperandrogenizam predstavljen povišenim vrednostima slobodnog testosterona najčešća je abnormalnost koja igra glavnu ulogu u pokretanju patofiziologije PCOS. Najčešće se susreće povećana ovarijalna sekrecija androgena mada je kod nekih pacijenata prisutna i pojačana adrenalna produkcija androgena. Povišeni androgeni izazivaju supresiju koncentracije globulina koji vezuje polne hormone (*eng. Sex hormone binding globulin, SHBG*) što vodi daljem povećanju vrednosti slobodnog testosterona (Chang i sar., 2007).

1.1.3.2. Poremećaj folikulogeneze

Na polovini intrauterinog života ženskog fetusa, u gonadama je prisutan maksimalan broj folikula (6-7 miliona) koji opada tako da je na rođenju devojčice prisutno 2-3 miliona primordijalnih folikula koji predstavljaju rezervu iz koje će se selektovati folikuli za dalji rast. Nije dovoljno poznata inicijalna faza folikularnog rasta, koja je nezavisna od gonadotropina, a pod uticajem je autokrine, parakrine i sekrecije lokalnih endokrinih faktora (Hsueh i sar., 2015). Optimalna folikulogeneza se odvija u uslovima izbalansiranog delovanja intra i ekstraovarijalnih faktora a bilo koji poremećaj ove ravnoteže vodi poremećenoj folikulogenezi (Artini i sar., 2007).

Kod PCOS je narušen balans između androgena, anti Milerovog hormona (*eng. anti-Mullerian hormone, AMH*) i folikulostimulirajućeg hormona (FSH). U teka ćelijama dolazi do povećane produkcije androgena pod dejstvom LH što uz poremećenu koncentraciju FSH i izraženiju konverziju androgena u estrogene za posledicu ima grešku u selektovanju vodećeg folikula, odnosno vodi anovulaciji. AMH, koga sekretuju ćelije granuloze, ima ključnu ulogu u održavanju ravnoteže jer inhibira prelaz primordijalnih folikula u primarne folikule. Skorija istraživanja su pokazala da glavni faktori uključeni u folikulogenezu kod PCOS, faktori iz folikularne tečnosti, pripadaju grupi faktora rasta, citokina i inhibina (Diamanti-Kandarakis, 2008). Faktori rasta koji se smatraju uključenim u proces sazrevanja folikula su epidermalni faktor rasta, faktor rasta fibroblasta, insulinu sličan faktor rasta (*eng. Insulin-like growth factors, IGFs*), grupa neurotropnih faktora rasta, grupa β transformišućih faktora rasta (*eng. Transforming growth factor- β , TGF- β*) koja obuhvata AMH, aktivin, folistatin i inhibin, vaskularni endotelni faktor rasta (*eng. Vascular endothelial growth factor, VEGF*) i citokine (Qiao i Feng, 2011). Epidermalni faktor rasta reguliše rast, proliferaciju i diferencijaciju ćelija, sprečava sintezu estrogena u ćelijama granuloze što objašnjava prestanak rasta antralnih folikula, a kod žena sa PCOS je u odnosu na žene sa ovulacijama povišen (Artini i sar., 2007). Faktor rasta fibroblasta prisutan je u ćelijama granuloze i teke, utiče na rast i oporavak tkiva a smatra se regulatorom funkcije FSH i povišen je kod žena sa PCOS (Artini i sar., 2007). Tako se

PCOS karakteriše porastom malih folikula čiji je rast zaustavljen i za posledicu ima tipičan izgled policističnog jajnika, pri čemu se folikuli kod PCOS razlikuju od onih u zdravim ženama. Tekućina ćelije žena sa PCOS, u kojima se ispoljava povećana produkcija androgena, pokazuju povećanu ekspresiju CYP17A1 ili aktivnost P450c17. Imunohistohemijska ispitivanja su pokazala da tekućina ćelije ekspresiraju enzime uključene u alternativni put steroidogeneze (Marti i sar., 2017). Ispitivanje DENND1A genetskog lokusa ukazalo je na postojanje nekoliko varijanti od kojih je DENND1A V2 povećana u tekućinama žena sa PCOS. Mnogi enzimi steroidogeneze koji su prisutni u korteksu nadbubrežne žlezde, posebno u zoni retikularis gde se luče dihidroepiandrosteron (DHEA), dihidroepiandrosteron sulfat (DHEAS) i androstenedion, prisutni su i u tekućinama (Ibáñez i sar., 2017).

1.1.3.3. Hiperinsulinemija i insulinska rezistencija

Hiperinsulinemija i insulinska rezistencija (IR) često su prisutne kod žena sa PCOS, a u literaturi je opisana incidenca IR u rasponu od 44% do 70% (Macut i sar., 2017). Hiperinsulinemija i IR su prisutne kod žena sa PCOS nezavisno od stepena gojaznosti, rasporeda masnog tkiva i nivoa cirkulišućih androgena, što kod njih povećava rizik za nastajanje poremećaja tolerancije glukoze i tipa 2 diabetes mellitusa (Dunaif i sar., 1992). Insulin reguliše homeostazu glukoze stimulacijom uzimanja glukoze u ciljnim tkivima, adipocitima, skeletnim i srčanom mišiću, kao i smanjenjem sinteze glukoze u jetri. Insulin smanjuje lipolizu što za posledicu ima snižavanje nivoa slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji, a to dodatno može uticati na smanjenje produkcije glukoze u jetri. IR se definiše kao smanjena sposobnost insulina da posreduje u ovim metaboličkim procesima (na iskorišćavanju glukoze, njenoj produkciji i lipolizi), što za posledicu ima potrebu za povećanom količinom insulina za postizanje ovih metaboličkih efekata. U skladu s tim IR karakterišu povišeni nivoi insulina u krvi, bazalno i tokom odgovora na hiperglikemiju (Diamanti-Kandarakis i Dunaif, 2012).

Patogeneza insulinske rezistencije kod žena sa PCOS obuhvata interakciju genetskih faktora, uticaja okoline tokom intra- i ekstrauterinog života, kao i mogućnost

njihove adaptacije na povećan energetske unos. Poznato je da prenatalna izloženost delovanju androgena ima direktan i trajan efekat na ženski plod, povećanje broja β ćelija. Ovo izaziva izmenjenu funkciju pankreasa koja se ispoljava primarnim hiperinsulinemijским odgovorom na glukozu, što je početak budućih metaboličkih poremećaja (Macut i sar., 2017). Tokom puberteta, kada inače dolazi do prolaznog pada insulinske osetljivosti, dolazi do razvoja insulinske rezistencije i hiperinsulinemije (Amiel i sar., 1986). Navedeni period prolazne hiperinsulinemije i IR doprinosi porastu hormona rasta i IGF-1, što obezbeđuje veću dostupnost amino kiselina potrebnih u ovom periodu rasta (Amiel i sar., 1986), i selektivna je za metabolizam glukoze dok je metabolizam proteina neizmenjen (Ibáñez i sar., 2017).

Kod žena sa PCOS ispoljena je tkivno selektivna insulinska rezistencija. Naime, rezistencija na metaboličku aktivnost insulina primarno je opisana u skeletnim mišićima, masnom tkivu i jetri, dok je osetljivost na uticaj insulina na steroidogenezu ostala neizmenjena, kako u nadbubrežnim žlezdama, tako i u jajnicima, što predstavlja paradoks karakterističan za PCOS (Diamanti-Kandarakis i Dunaif, 2012; Ibáñez i sar., 2017).

Iako su ranije studije preko subkliničke inflamacije povezivale insulinsku rezistenciju sa gojaznošću (Carmina i sar., 2007), novija istraživanja su potvrdila prisustvo insulinske rezistencije i kod normalno uhranjenih žena sa PCOS. Tako su Morciano i saradnici u svom istraživanju pokazali da insulinsku rezistenciju ima 26,3% žena sa PCOS čiji je indeks telesne mase (ITM) manji od 25 kg/m². Takođe je pokazano da etnička pripadnost i navike u ishrani imaju značajnu ulogu u ovom metaboličkom procesu (Morciano i sar., 2014). Brojne *in vivo* i *in vitro* studije su pokazale da insulin i IGF-1 u sadejstvu sa LH mogu povećati produkciju androgena u ćelijama teke. Insulin može dovesti do povećane produkcije androgena direktnom stimulacijom aktivnosti P450c17 i aktivnosti enzima P450scc (eng. *P450 Side-Chain Cleavage, P450scc*). P450scc, kodiran CYP11A1, je mitohondrijalni enzim koji kroz 3 različite enzimske reakcije (20 α -hidroksilaciju, 22-hidroksilaciju i cepanje bočnog lanca holesterola) konvertuje holesterol u pregnenolon. Na taj način je P450scc odgovoran za prvi, neophodni korak sinteze steroida - mineralokortikoida, glukokortikoida i androgena u nadbubrežnim žlezdama i gonadama (Hanukoglu, 1992).

Pored toga, insulin može delovati na smanjenje sinteze SHBG čime direktno dovodi do porasta slobodnih androgena (Daka i sar., 2012).

Molekularni mehanizmi odgovorni za insulinsku rezistenciju kod PCOS uključuju insuficijentnu post-receptornu aktivnost insulina, povećanu koncentraciju slobodnih masnih kiselina, povećanu sekreciju citokina i delovanje povišenog nivoa androgena. Intraabdominalni adipociti pojačano oslobađaju slobodne masne kiseline i citokine, TNF- α (eng. *tumor necrosis factor alfa*, *TNF- α*), interleukin-6 (IL-6), leptin i rezistin. Navedeni adipocitokini preko vene porte dolaze u jetru i utiču na sekreciju, metabolizam i perifernu aktivnost insulina. U odnosu na kliničko ispoljavanje PCOS, klasičan fenotip A koji je često gojazan ima centralni tip gojaznosti, dislipidemiju, IR i metabolički sindrom. Pored toga pokazano je da su žene sa fenotipom A otpornije na insulin i imaju izraženiju hiperandrogenemiju u odnosu na fenotip B. Pokazana je IR i kod „blažeg“ fenotipa D, u odsustvu hiperandrogenizma, kada je bila prisutna gojaznost. Sa druge strane žene sa fenotipom C nisu se u odnosu na zdrave žene sličnog ITM razlikovale u markerima IR (Macut i sar., 2017).

Distribucija masnog tkiva je, pre nego gojaznost ili ITM, povezana sa PCOS. Novije studije su pokazale da za razliku od gojaznih, kod žena sa PCOS insulinska rezistencija nastaje drugačijim mehanizmom, te da je kod žena sa PCOS prisutna pojačana fosforilacija serinskih ostataka insulinskih receptora i IRS-1 signalnog molekula, što dovodi do poremećaja u prenosu insulinskog signala i nastanku insulinske rezistencije, nezavisno od ukupne bezmasne telesne mase.

1.1.3.4. Neuroendokrini poremećaj

Kod žena sa PCOS izmenjena je sekrecija GnRH i gonadotropina usled čega dolazi do porasta cirkulišućeg LH, povećanog odnosa LH i FSH, povećanja frekvencije i/ili amplitude LH pulseva kao i relativnog sniženja FSH. Poremećena sekrecija FSH i LH, iako nije presudna za dijagnozu PCOS, utiče na steroidogenezu u jajnicima, folikularnu dinamiku i ovulaciju. Pored značaja LH kao biomarkera u proceni GnRH pulsa, opisana je i disocijacija između GnRH i LH, koja se kod gojaznih žena sa PCOS prezentuje kao snižena

sekrecija LH. Poremećaj sekrecije gonadotropina u direktnoj je vezi sa izmenjenim profilom pulsatilnosti GnRH, pre svega kao odraz povećane aktivnosti stimulatornog efekta gonadotropina na sekreciju GnRH. Naime, poznato je da je sekrecija GnRH određena povećanjem broja pulseva, više LH nego FSH. Međutim, u genetski predisponiranih osoba, moguć je nastanak izmenjenog GnRH pulsa. Eksperimentalne studije na životinjama i kliničke studije na ženama su pokazale da na sekreciju GnRH mogu uticati insulin i androgeni, koji su inače izmenjeni kod PCOS (Ibáñez i sar., 2017).

Kako je hiperandrogenizam prisutan kod PCOS, ispitivani su i potencijalni mehanizmi kojim poremećena sekrecija androgena utiče na neuroendokrinu regulaciju kod PCOS. Povišene koncentracije androgena ometaju regulatorni efekat polnih hormona na sekreciju GnRH/LH klasičnom povratnom spregom. Poremećena negativna povratna sprega steroida jajnika (estrogena i progesterona) doprinosi hipersekreciji i povišenoj pulzatilnosti LH, koja je karakteristična za PCOS. Sa druge strane, smanjena osetljivost na progesteronsku negativnu povratnu spregu, u vezi sa ranom pojavom hiperandrogenizma, bio je povezivan sa povećanom sekrecijom LH kod PCOS, iako samo kod polovine žena sa PCOS dolazi do poremećaja negativne povratne sprege. Primećeno je da su neuroni koji luče GnRH lišeni većine receptora za polne hormone, koji su odgovorni za negativnu povratnu spregu, dok su prisutni estrogenski receptori- β (Er β), čija je uloga u povratnoj regulaciji GnRH nejasna (Ibáñez i sar., 2017).

Pokazano je da su povišen nivo insulina i IR uključeni u izmenjenu, povećanu, neuroendokrinu sekreciju GnRH/LH. Neophodno je centralno delovanje insulina za pravilno funkcionisanje gonadotropne osovine, a nedostatak signalizacije insulina u mozgu praćen je smanjenim nivoom LH. Moret je kod zdravih žena pokazao da infuzija insulina dovodi do povećanja frekvence LH impulsa, slično sekretornom profilu koji se viđa kod žena sa PCOS (Moret i sar., 2009). Sa druge strane, infuzija insulina kod žena sa PCOS nije izazvala promenu pulzatilnosti LH (Patel i sar., 2003).

1.1.3.5. Uloga genetskih faktora

Studije sprovedene na jedno- i dvojajčanim blizancima pokazale su da nasleđivanje ima relativno mali značaj u nastanku PCOS. Sa druge strane, velike epidemiološke studije su ukazale na značajnost faktora rizika i bioloških procesa koji deluju tokom života: niska porođajna težina i izloženost fetusa androgenima, postnatalni brz porast telesne mase (TM), prevremena adrenarha i rani pubertetski razvoj, TM u odraslom dobu i stil života (Ibáñez i sar., 2017).

Do skoro se nisu sprovodile genske studije, ali je pokazan značaj GWAS (*engl. genome-wide association study, GWA study, GWAS*) koje su donele novi uvid, iako su bile sprovedene na odraslim ženama sa PCOS te se njihov značaj za adolescentkinje sa PCOS tek treba odrediti. Prva GWAS analiza PCOS, koja je sprovedena na kineskoj i kavkaskoj populaciji, pokazala je da se određeni genetski lokusi na 2. i 9. hromosomu često ponavljaju u populaciji kineskih žena sa PCOS (Chen i sar., 2011). GWAS analiza žena sa PCOS kavkaskog porekla nije potvrdila ponavljanje istih lokusa, što bi se moglo objasniti različitom genomskom arhitekturom u različitim populacijama pa možda i u subpopulacijama različitih fenotipova PCOS (Shi i sar., 2012). U brojnim studijama je kao suspektan gen za nastanak PCOS identifikovan LH/horiogonadotropinski receptor (LHCGR) (lokus 2p16.3). Naime, povišene koncentracije LH su često prisutne kod PCOS i udužene su sa poremećenom folikulogenezom i hiperandrogenizmom (Ibáñez i sar., 2017). Pored toga, određene epigenetske promene, kao što je hipometilacija LHCGR je najpre opisana na eksperimentalnom PCOS modelu, a zatim i u ćelijama periferne krvi i granulosa ćelijama žena sa PCOS (Wang i sar., 2014; Zhu i sar., 2010). Naime, hipometilacija LHCGR koja dovodi do povećane osetljivosti LH pulsatilnosti, mogla bi predstavljati molekularni mehanizam u nastanku PCOS. Aromataza, kodirana pomoću CYP19A1, smatra se još jednim potencijalnim genom za razvoj PCOS. Kao što je estrogen potreban za odabir folikula i njihov rast, snižena aromataza pridonosi poremećenoj folikulogenezi kod PCOS (Ibáñez i sar., 2017). Kod kineskinja sa PCOS, pokazano je da hipermetilacija gena za CYP19A1 u tkivu jajnika korelira sa sniženom ekspresijom ovog enzima. Epigenetske

studije celog genoma žena sa PCOS pokazale su poremećaj u metilaciji DNK i ekspresiji gena p53 signalnog puta, kao i ekspresiji proteina važnih za funkciju jajnika (IGFBP2, INSR, SLC2A8, NRIP1) i steroidogenezu (CYP19A1, AMH i njegov receptor AMHR2) (Wang i sar., 2014; Yu i sar., 2015).

1.1.3.6. Uloga hronične inflamacije

Žene sa PCOS karakteriše niz metaboličkih abnormalnosti koje se smatraju važnim faktorima u nastanku ateroskleroze. Dislipidemija, tip 2 diabetes mellitus i gojaznost predstavljaju česte metaboličke komponente odraslih žena sa PCOS, dovode se u vezu sa kardiovaskularnim poremećajima (Macut i sar., 2015b; Macut i sar., 2013). U potrazi za surogatnim markerima aterogeneze u žena sa PCOS, korišćena je procena odnosa debljine intime i medije karotidnih arterija pomoću ultrazvuka. Pokazano je da su žene sa PCOS starije od 45 godina imale značajno veći odnos debljine intime i medije u odnosu na kontrolnu grupu (Talbot i sar., 2000). I meta-analize upućuju na to da žene sa PCOS imaju veći rizik za nastajanje rane ateroskleroze (Meyeri sar., 2012). Iako visoke vrednosti lipoproteina niske gustine (LDL) ostaju najvažniji faktor rizika u procesu aterogeneze, različiti faktori inflamacije kao što je faktor stimulacije kolonije makrofaga (*eng. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF*), transformirajući faktor rasta- β (*eng. transforming growth factor- β , TGF- β*), IL-6 i C-reaktivni proteini (CRP) su uključeni u proces aterogeneze i doprinose nestabilnosti plaka, trombozi i komplikacijama ateroskleroze (Galkina i Ley, 2009). C-reaktivni protein i fibrinogen su reaktanti akutne faze inflamacije i značajni markeri subkliničke faze ateroskleroze. Proizvode ih hepatociti tokom stimulacije proinflamatornim citokinima, kao što su IL-6 i TNF α , dok CRP, takođe, direktno nastaje u masnom tkivu. Novija istraživanja ispituju protrombotičku ulogu CRP-a, koja je uključena u aterosklerotički proces, kao i ulogu CRP-a koji može aktivirati i sistem komplemenata, te je sve veći broj dokaza koji podržavaju pretpostavku da CRP nije samo marker već i medijator procesa inflamacije (Duleba i Dokras, 2012). Fibrinogen je pozitivni reaktant akutne faze. I fibrinogen je poznat faktor rizika za nastanak ateroskleroze, a njegove povišene vrednosti vode ka povećanoj incidenci kardiovaskularnih događaja (Galkina i

Ley, 2009). Fibrinogen svoj proaterogeni efekat postiže na različite načine: povećanjem viskoziteta plazme, povećanjem agregabilnosti trombocita i stimulacijom proliferacije glatke muskulature (Odegaard i sar., 2016). Međutim, iako fibrinogen pojačava agregaciju trombocita preko receptora trombocita, što je ključna reakcija za formiranje tromba, potencijalni nepovoljni učinak fibrinogena kod žena sa PCOS ostaje i dalje kontroverzan (Mannerås-Holm i sar., 2011). S druge strane, visoke vrednosti CRP se smatraju uključenim u dugoročne kardiovaskularne komplikacije koje mogu nastati kod žena sa PCOS (Repaci i sar., 2011).

1.1.3.7. Uloga oksidativnog stresa

Atomi ili molekuli koji u spoljašnjoj orbitali sadrže jedan nesporen elektron nazivaju se slobodni radikali. Zbog nesparenog elektrona su visoko reaktivni i započinju lančane reakcije tokom kojih preuzimaju elektron iz susednih molekula. U brojne, normalne, biološke procese uključeni su slobodni radikali - deo su odbrambenog sistema fagocita, regulatorni su molekuli (azotni oksid, *eng. Nitric oxide, NO*), deluju kao unutarćelijski sekundarni glasnici i uključeni su u mehanizam delovanja nekih enzima (Mimić-Oka i sar., 1999). Neprestano se u svakoj ćeliji organizma dešava kontrolisano stvaranje kiseoničnih slobodnih radikala (KSR) ili reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng. Reactive oxygen species, ROS*). Međutim kada dođe do nekontrolisanog stvaranja slobodnih radikala u ćeliji započinje oštećenje brojnih bioloških makromolekula, proteina, DNK, ugljenih hidrata i visoko nezasićenih masti (Pincemail i sar., 2007). Kako su ćelije naročito osetljive na oksidativno oštećenje makromolekula, detoksikacija reaktivnih kiseoničnih slobodnih radikala je preduslov života u aerobnim uslovima.

Oksidativni stres predstavlja neravnotežu između oksidanasa i antioksidanasa u korist oksidanasa, što dovodi do prekida redoks signalizacije i do/ili do molekularnih oštećenja. Različita stanja mogu dovesti do povećane produkcije slobodnih kiseoničnih radikala, kao što je jonizujuće zračenje, metabolizam lekova i toksičnih jedinjenja i izloženost duvanskom dimu. S druge strane, povećanu produkciju slobodnih radikala izazivaju i endogeni faktori, kao što su povećana aktivnost fagocita izazvana oštećenjem

tkiva, oštećenje mitohondrijskog respiratornog lanca, aktivacija metabolizma arahidonske kiseline, delokalizacija metala sa promenljivom valencom i oslobađanje hem proteina, smanjenje zaštitnog kapaciteta ćelije usled redukcije antioksidantnih enzima i neenzimskih antioksidanasa (Mimić-Oka i sar., 1999).

1.1.3.7.1. Antioksidantna zaštita

Glavni zaštitni sistem odbrane od kiseoničnih slobodnih radikala čini kaskada antioksidantnih enzima: superoksid dizmutaza (SOD), glutation peroksidaza, katalaza i druge hem-protein peroksidaze. Kaskada antioksidantnih enzima predstavlja prvu liniju odbrane i učestvuje u eliminaciji primarnih proizvoda parcijalne redukcije molekuskog kiseonika (Valko i sar., 2006). Dobar antioksidans specifično uklanja slobodne radikale, deluje s drugim antioksidansima unutar antioksidantnog sistema, helira redoks-senzitivne metale, ima povoljan učinak na ekspresiju gena, ima fiziološki relevantnu koncentraciju u tkivima i biološkim tečnostima, lako se apsorbuje, te deluje i u vodenim i/ili membranskim domenama (Valko i sar., 2006).

Superoksid dizmutaze predstavljaju familiju metaloenzima koji katališu reakciju prevođenja superoksid anjona u vodonik peroksid i molekulski kiseonik. Identifikovane su tri različite izoforme SOD: bakar-cink superoksid dizmutaza (Cu/Zn-SOD) lokalizovana u citosolu, jedru i mitohondrijalnoj membrani; mangan superoksid dizmutaza (Mn-SOD) lokalizovana u mitohondrijalnom matriksu i ekstracelularna superoksid dizmutaza (EC-SOD) lokalizovana ekstracelularno, u plazmi i na ćelijskim membranama. Cu/Zn-SOD i EC-SOD čine 85-90% ukupne tkivne aktivnosti SOD. Sve tri forme SOD imaju istu funkciju, ali se jasno razlikuju po svojoj proteinskoj strukturi, kofaktorima, genskoj distribuciji i ćelijskoj lokalizaciji. U mirovanju, u svim ćelijama, najveći deo formiranog superoksidnog anjona neutrališe SOD u mitohondrijama, a samo mali deo SOD u citosolu. S obzirom da superoksid dizmutaza redukuje superoksid anjon u vodonik peroksid, koji može biti preveden u toksični hidroksil radikal, neophodno je da superoksid dizmutaza, sa jedne strane i glutation peroksidaza ili katalaza sa druge strane, deluju sinhronizovano.

Glutation peroksidaze (GPX, GSH-Px peroksidaze) predstavljaju familiju enzima koji katališu redukciju hidroperoksida u odgovarajući alkohol, koristeći redukovani glutation kao specifični donator vodonika. Do sada je identifikovano pet izoenzima glutation peroksidaza (Baskol i sar., 2012), od kojih su najzastupljenije ćelijska (citosolna ili klasična GSH-Px 1) i ekstracelularna (GSH-Px 3) prisutna u plazmi (Arthur i Beckett, 1994). GSH-Px 1 je tetramerni protein sa četiri identične podjedinice molekulske mase od 19-24,8 kDa (Zachara, 1992). I ekstracelularna GSH-Px ima tetramernu strukturu sa četiri identične podjedinice molekulske mase 21,5-23 kDa, a detaljnija ispitivanja su pokazala da se strukturno razlikuje od enzima u eritrocitima i drugim ćelijama (Zachara, 1992). Mills je 1957. godine prvi opisao aktivnost ćelijske GSH-Px i dokazao da štiti eritrocite od oksidacije hemoglobina i hemolize (Mills, 1957).

U odbrani od štetnog dejstva slobodnih kiseoničnih radikala zajedno sa enzimskim antioksidantnim sistemom učestvuju i ne-enzimski antioksidansi. Ne-enzimski antioksidantni sistem uključuje liposolubilne i hidrosolubilne antioksidanse. Ne-enzimske antioksidanse čine tiolni antioksidansi (glutation, tioredoksin i lipoična kiselina), albumin, bilirubin, transferin, ceruloplazmin, α -keto kiseline (piruvat i α -keto glutarat), polni hormoni (estradiol, estron i estriol), melatonin, urati i dipeptidi koji sadrže histidin (karnozin, homokarnozin i anserin). Bilirubin je krajnji proizvod metabolizma hemoproteina. Ima snažan antioksidantni potencijal protiv peroksid radikala i štiti ćelije od toksičnih nivoa H_2O_2 . Mokraćna kiselina je slaba organska kiselina, koja pri fiziološkoj vrednosti pH, krvotokom cirkuliše u jonizovanom obliku, kao mononatrijum-urat. Sintezu mokraćne kiseline katališe široko rasprostranjeni enzim ksantin-oksida. Mokraćna kiselina predstavlja potentni hvatač superoksidnog anjona, hidroksil radikala i singlet kiseonika. Ima sposobnost da vezuje gvožđe i na taj način inhibira oksidaciju askorbata zavisnu od gvožđa, prevenirajući pojačanu produkciju slobodnih radikala. Takođe učestvuje u stabilizaciji vitamina C i E, produžavajući na taj način njihovo antioksidantno dejstvo. Posebno se bitnom činjenicom smatra uloga mokraćne kiseline u odstranjivanju peroksinitrita. Peroksinitrit, produkt superoksidnog radikala i azotnog oksida, snažan je oksidans, koji direktno reaguje sa brojnim biomolekulima, dovodeći do oksidativnih oštećenja i smrti ćelije. Iako se istraživači slažu da mokraćna kiselina predstavlja endogeni

antioksidans njen značaj u totalnoj antioksidantnoj zaštiti je mali. Sabuncu je sa saradnicima ukazao da povišena vrednost mokraćne kiseline kod žena sa PCOS povećava rizik za kardiovaskularna oboljenja (Sabuncu i sar., 2001).

Tioli (glutation, prekursori glutaciona) su značajni deo biološkog ne-enzimskog antioksidantnog sistema zaštite. Imaju brojne funkcije u biološkim sistemima - uloga u sintezi proteina, redoks sistemima, imunitetu. Glutation (GSH) je najznačajnije neproteinsko tiol jedinjenje sa brojnim ulogama u metabolizmu ćelije (Anderson i Meister, 1983). Glutation može reagovati sa α -tokoferil radikalom i regenerisati α -tokoferol. Pored toga što je i sam značajan antioksidans, glutacion je i kofaktor seleno-enzima glutacion peroksidaze i glutacion S-transferaze koje učestvuju u procesima konjugacije i detoksikacije ksenobiotika. Pokazano je da α -tokoferol u prisustvu glutaciona pruža zaštitu od autokatalitičke peroksidacije lipida i štiti tiol (-SH) grupe proteina od oksidacije (Sies, 1991). Tiol grupe proteina imaju važnu ulogu u antioksidantnoj zaštiti (Hu, 1994; Michiels i sar., 1994). Ne-enzimski antioksidansi koji se unose hranom su vitamin C, vitamin E, karotenoidi, prirodni flavonoidi, te druga jedinjenja koja sadrže selen (Matés i sar., 1999).

Oksidativni stres je moguće meriti određivanjem intenziteta produkcije slobodnih radikala, određivanjem antioksidantnog kapaciteta ćelija i/ili ekstracelularnih tečnosti ili na osnovu posledica oksidativnog oštećenja različitih bioloških molekula. Antioksidansi koji su prisutni u većoj koncentraciji u plazmi čine totalni antioksidantni status (TAOS) a čine ga mokraćna kiselina, beta-karoten, albumini, tiol grupe, alfa-tokoferol, vitamin C, vitamin E i bilirubin (Garibaldi i sar., 2001). Promene u koncentracijama ovih antioksidanasa mogu biti indikator postojanja oksidativnog stresa *in vivo*.

1.1.3.7.2. Oksidativni stres kod pacijentkinja sa PCOS

Dokazano je da tokom normalnog menstrualnog ciklusa, nekoliko dana pre dostizanja najvišeg nivoa estrogena, dolazi do porasta nivoa hidroperoksida u plazmi. Porast nivoa hidroperoksida se prolongira i tokom progesteronske faze, tako da tokom 2/3 menstrualnog ciklusa žena dolazi do povećane produkcije slobodnih kiseoničnih radikala (Finco i sar., 2012). Sa druge strane, nekoliko studija sprovedenih *in vitro* je pokazalo da

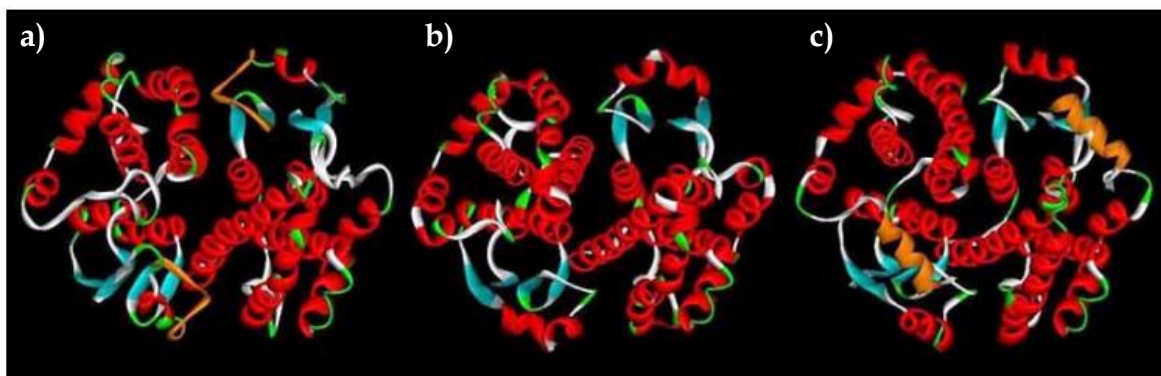
estrogeni posebno estradiol, mogu značajno redukovati oksidativno oštećenje lipida izloženih slobodnim radikalima (Carmina i sar., 2013). Zaključeno je da je ovaj potencijalni antioksidantni efekat estrogena u osnovi njihovog zaštitnog uticaja na kardiovaskularni sistem (Ling i sar., 2006).

Poznato je da kod žena sa PCOS dolazi do povećane produkcije slobodnih radikala što uz pad nivoa antioksidanata u serumu dovodi do stanja oksidativnog stresa (González i sar., 2006). Molekularni mehanizmi koji dovode do nastanka oksidativnog stresa kao i njihova veza sa insulinskom rezistencijom i hiperandrogenizmom kod pacijentkinja sa PCOS još uvek nisu dovoljno jasni. Pretpostavlja se da parametri oksidativnog stresa mogu biti na kompleksan način povezani sa etiopatogenezom, kliničkom slikom i mogućim razvojem nepovoljnih kardiometaboličkih posledica u žena sa PCOS (Macut i sar., 2013). Čini se da hiperandrogenizam predstavlja glavni pokretač povećane proizvodnje ROS. Oksidativni stres, sa druge strane, može podstaknuti ekspresiju steroidogenih enzima jajnika koji su uključeni u proizvodnju androgena i proliferaciju teka ćelija jajnika. Štaviše, oksidativni stres ometa signalizaciju insulina što rezultira kompenzatornom hiperinsulinemijom koja može dodatno stimulisati stalnu steroidogenezu. Sveukupno, može se zaključiti da oksidativni stres, zajedno sa niskim stepenom hronične inflamacije, otpornošću na insulin i/ili hiperinsulinemiju značajno doprinosi hiperandrogenizmu i anovulaciji, kao i kardiovaskularnim poremećajima u žena sa PCOS (Agarwal i sar., 2012; González i sar., 2006).

Za razliku od zdravih žena sa normalnim ovulacijama, kod kojih je hiperglikemija praćena fiziološkom produkcijom slobodnih radikala, neophodnom za insulinom-posredovani unutarćelijski prenos signala, poznato je da kod normalno uhranjenih žena sa PCOS opterećenje glukozom dovodi do povećane produkcije slobodnih radikala i inflamatornog odgovora, no čini se da nisu povezani sa direktnim učinkom hiperinsulinemije. Takođe je poznato da su markeri oksidativnog stresa povezani sa indeksima rezistencije na insulin, ali i sa cirkulišućim testosteronom (Azziz i Adashi, 2016; Savic-Radojevic i sar., 2015). Međutim, još uvek nije istražena potencijalna veza hormonskog statusa i oksidativnog stresa kod normoinsulinemičnih adolescentkinja sa PCOS.

1.1.4. Značaj glutation S-transferaza u PCOS

Superfamiliju enzima koji učestvuju u reakcijama detoksikacije, koje se odvijaju konjugacijom elektrofilnih metabolita endogenog i egzogenog porekla sa glutationom, predstavljaju glutation S-transferaze (GST), Slika 2, (Hayes i Strange, 2000). Zbog konjugacije sa glutationom dolazi do smanjenja toksičnosti elektrofilnih jedinjenja koji postaju manje reaktivni prema nukleofilnim grupama u važnim biološkim makromolekulima, kao što su nukleinske kiseline, proteini i lipidi (Habig i sar., 1974). Upravo zbog toga značajnu ulogu u procesima detoksikacije ali i umanjenja štetnih efekata elektrofilnih jedinjenja određuje odgovarajući izoenzimski profil, odnosno broj i količina raspoloživih izoenzima GST (Vos i Van Bladeren, 1990).

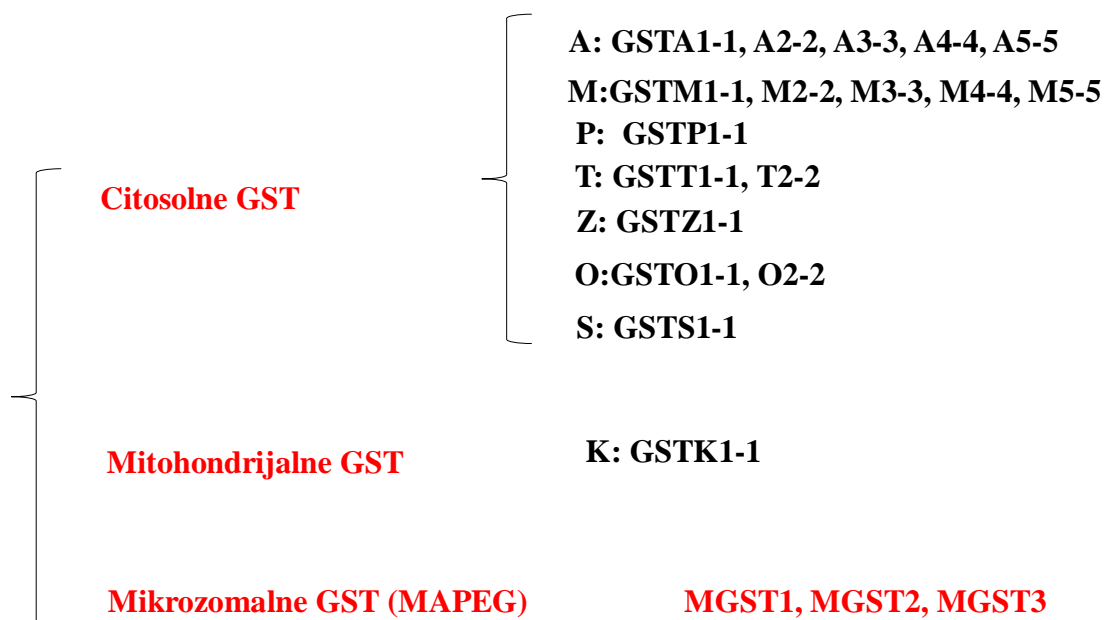


Slika 2. Struktura glutation S-transferaza: a) GSTM1-1; b) GSTP1-1; c) GSTA1-1 (slika preuzeta iz rada Dourado i sar., 2008)

1.1.4.1. Glutation S-transferaze, podela i nomenklatura

Superfamilija glutation S-transferaza je podeljena na tri familije: citosolne, mitohondrijalne i mikrozomalne GST. Na osnovu primarne strukture, citosolna familija GST se deli na nekoliko klasa, koje se obeležavaju slovima grčkog alfabeta (α , μ , π ...) ili velikim latiničnim slovima (A, M, P...), (Hayes i Strange, 2000), Slika 3. Unutar klasa,

izoenzimi se obeležavaju arapskim brojevima, a struktura nativnih dimernih proteina dobija naziv na osnovu subjediničnog sastava (Mannervik i sar., 2005). Do danas identifikovano je sedam grupa gena koji kodiraju sedam klasa citosolnih GST: GST α (geni GSTA 1-5), GST μ (geni GSTM 1-5), GST π (gen GSTP 1), GST θ (geni GSTT 1-2), GST ξ (gen GSTZ 1), GST Ω (geni GSTO 1-2) i GST ζ (gen GSTS 1) klase. Proizvodi ekspresije GST gena su različiti izoenzimi GST koji se međusobno razlikuju na osnovu svojih strukturnih, fiziko-hemijskih i imunoloških osobina. One svoju katalitičku aktivnost ispoljavaju u obliku homo ili heterodimera, koji nastaju kombinovanjem identičnih ili različitih subjedinica koje pripadaju istoj klasi (Ketterer i sar., 1992).



Slika 3. Podela i nomenklatura glutathion S-transferaza (slika preuzeta iz rada Wu i sar., 2012)

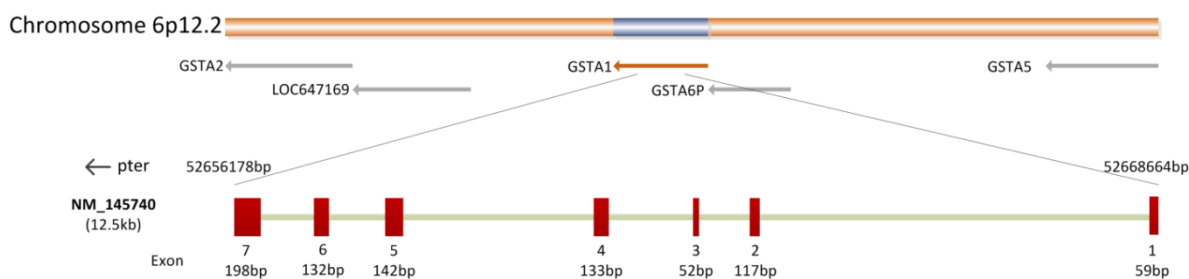
1.1.4.2. Polimorfizam glutathion S-transferaza

Kada između individua jedne vrste postoje razlike u sekvenci DNK sa učestalošću većom od 1% označene su kao polimorfizmi sekvence DNK, a različite forme jednog

lokusa DNK označene su kao aleli. Polimorfizam se ispoljava kao polimorfizmi nukleotidne sekvence (tačkasti i inserciono-delecioni polimorfizmi) ili polimorfizmi dužina sekvenci. Tačkasti polimorfizmi ili polimorfizmi jednog nukleotida (*eng. single nucleotide polymorphisms, SNPs*) su vezani za varijabilnost tipa bazne zamene. Još 1997. godine je dokazano da SNP-ovi predstavljaju 90% svih polimorfizama (Collins i sar., 1997). U ljudskom genomu ima oko 1,5 miliona SNP-a, od kojih 50.000 do 100.000 može promeniti funkciju ili ekspresiju gena (Sachidanandam i sar., 2001).

Genetski polimorfizam je opisan u većini citosolnih GST gena: α (GSTA1 i GSTA2), μ (GSTM1, GSTM3 i GSTM4), π (GSTP1), θ (GSTT1), ξ (GSTZ1), Ω (GSTO1) (Pemble i sar., 1994; Xu i sar., 1998).

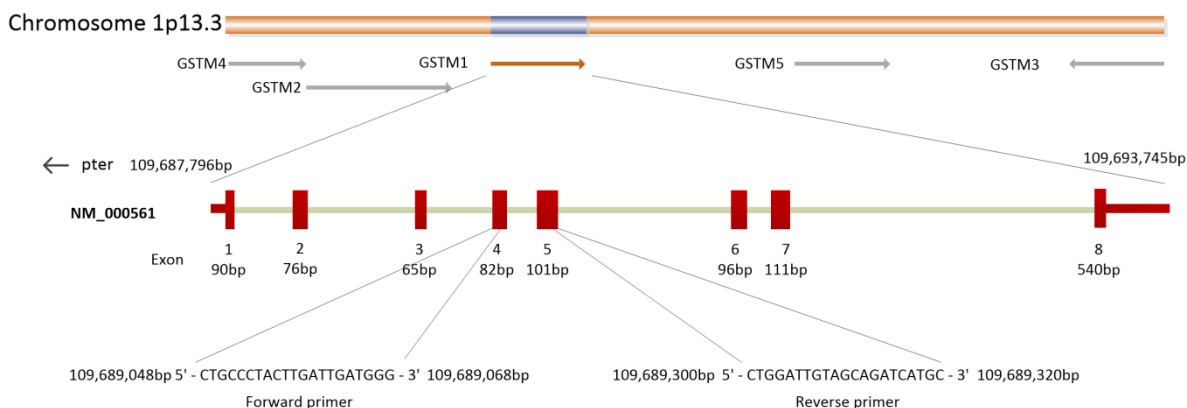
Pet različitih gena, koji su smešteni na šestom hromozomu, kodira GSTA1 klase (GSTA1-A5). Među njima, genetski polimorfizam GSTA1, C-69T, koji obuhvata tri povezane supstitucije baza (SNP) u promotorskom regionu na poziciji 567, 69 i 52 (T, C i G), u kome se na ovim pozicijama nalaze G, T i A, za posledicu ima velike kvantitativne razlike u ekspresiji i aktivnosti enzima (Coles i sar., 2001). Ova polimorfna ekspresija GSTA1 ima najveći klinički značaj, uzimajući u obzir ključnu ulogu GSTA1 u detoksikaciji ksenobiotika (Slika 4).



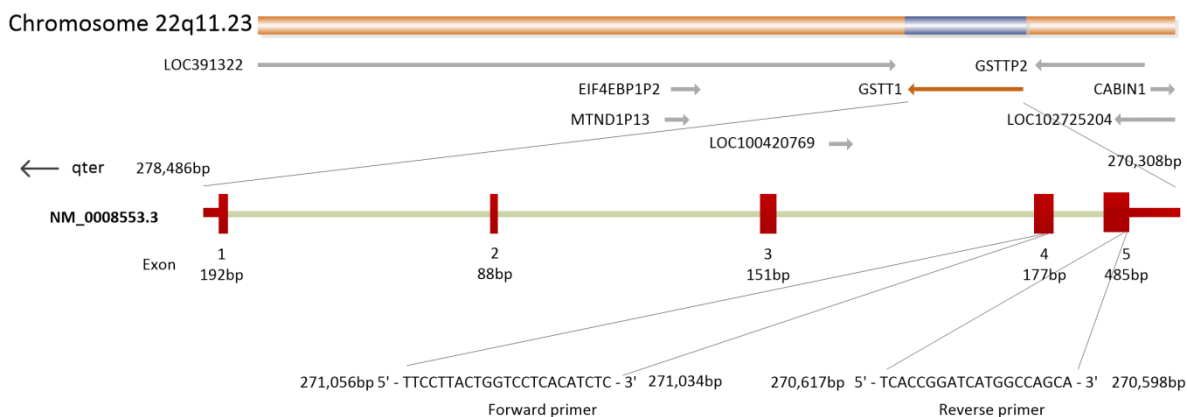
Slika 4. Lokus GSTA1 gena na hromozomu 6 (slika preuzeta iz rada Savić-Radojević i Radić, 2014)

Na prvom hromozomu je lokalizovan genski lokus GSTM1 (Slika 5), a na 22-om hromozomu genski lokus GSTT1 enzima (Slika 6). Poznato je da je GSTM1 uključen u detoksikaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika i aromatičnih amina prisutnih u

duvanskom dimu i različitim izduvnim gasovima (Ketterer i sar., 1992). Kod osoba kojima nedostaje ekspresija GSTM1 (GSTM1*0), nedostaje i adekvatna detoksikacija ovih kancerogena. Polimorfizam pripadnika teta klase, GSTT1 može imati uticaj na pojavu različitih nemalighnih i malignih oboljenja. Slično kao kod GSTM1, najčešće je ispitivan delecioni polimorfizam u kojem zbog delecije gena, nastaje *GSTT1-nulti* genotip. *GSTT1-nulti* genotip prisutan je kod oko 20-30% pripadnika bele i crne rase.

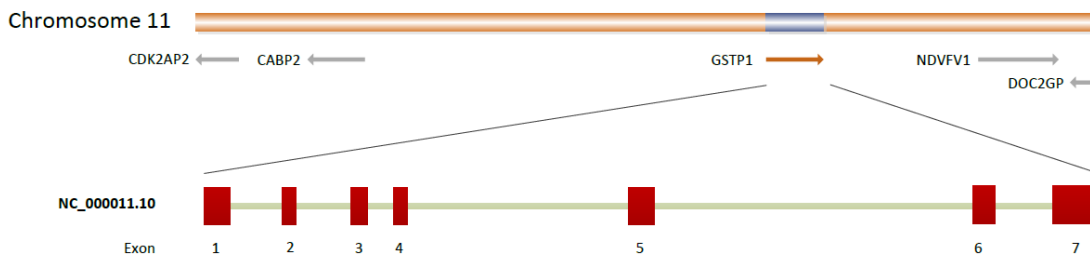


Slika 5. Lokus GSTM1 gena na hromozomu 1 (slika preuzeta iz rada Pejović-Milovančević i sar., 2010)



Slika 6. Lokus GSTT1 gena na hromozomu 22 (slika preuzeta iz rada Pejović-Milovančević i sar., 2016)

Na jedanaestom hromozomu je lokalizovan genski lokus GSTP1 (Slika 7). Opisane su četiri glavne alelske forme GSTP1: *GSTP1**A (105I, 114A), *GSTP1**B (105V, 114A), *GSTP1**C (105V, 114V) i *GSTP1**D (105I, 114V), a do sada su brojne epidemiološke studije pokazale povezanost različitih varijanti GSTP1 alela u nemaligim i malignim bolestima (Sundberg i sar., 1998).



Slika 7. Lokus GSTP1 gena na hromosomu 11 (slika preuzeta iz rada Simić, 2016)

1.2. KARAKTERISTIKE SINDROMA POLICISTIČNIH JAJNIKA U ADOLESCENCIJI

Adolescencija je period odrastanja tokom kog se jedinke menjaju od deteta do odrasle osobe. Adolescenti su mladi ljudi uzrasta 10-19 godina života. U ovom periodu se razvijaju sekundarne polne osobine, kod devojčica nastupaju prva materična krvarenja i uspostavlja se menstrualni ciklus. U normalnom pubertetskom razvoju menarha je praćena različito dugim periodom anovulatornih materičnih krvarenja, a tokom ovog perioda dolazi do sinhronizacije hipotalamo-hipofizno-ovarijalne aktivnosti koje vode ovulaciji i redovnom menstrualnom ciklusu. Tokom ranog puberteta, u određenom broju zdravih devojčica, kao razvojna faza, pojavljuje se prolazni hiperandrogenizam koji kasnije bude praćen ovulatornim ciklusima. Sa druge strane, spontana ovulacija može nastati kod oko 10% žena sa PCOS. Broj ovulacija u adolescentnom uzrastu je nepoznat. Kod adolescentkinja sa PCOS perzistira anovulacija kod većine ali ne kod svih. Naime uočeno

je da devojke sa prevremenom pubarhom, koje su inače u riziku za PCOS, prve tri godine posle menarhe imaju ovulacije sa učestalošću od oko 25%. Kasnije kod ovih devojaka ovulacije bivaju redukovane. Sa druge strane, uočeno je i da neke postmenarhalne devojčice sa neurednim materičnim krvarenjima i povišenim vrednostima androgena tokom sledeće tri godine razviju regularan menstrualni ciklus. Ovi nalazi ukazuju da kod nekih adolescentkinja, sa rizikom za PCOS, normalna ovulacija može postojati ili se može uspostaviti tokom vremena, i upravo one pripadaju grupi adolescentkinja sa PCOS koje ovuliraju (Ibáñez i sar., 2001).

1.2.1. Specifičnosti PCOS u adolescentnom uzrastu

Malo je istraživanja koja su se bavila ispitivanjem učestalosti PCOS u populaciji adolescentkinja. Prevalenca PCOS kod adolescentkinja iz južne Kalifornije iznosila je 1,14% a bila je značajno različita u grupama adolescentkinja različite telesne mase. Naime, u grupi adolescentkinja sa niskom telesnom masom prevalenca PCOS bila je 0,40% slično kao u grupi normalno uhranjenih adolescentkinja u kojoj je iznosila 0,39%. Sa porastom telesne mase povećavala se i prevalenca PCOS koja je u grupi prekomerno uhranjenih bila 1,18%, umereno gojaznih 2,58% a u grupi ekstremno gojaznih iznosila je čak 5,6%. U jednoj iranskoj studiji koja nije grupisala ispitanice prema telesnoj masi, prevalenca PCOS kod devojaka adolescentnog uzrasta procenjena je na 3% (Christensen i sar., 2013; Hashemipour i sar., 2004).

Značaj PCOS u adolescentnom uzrastu ogleda se i u činjenici da stručna javnost smatra da su se kod većine žena sa PCOS klinički simptomi počeli ispoljavati u adolescentnom uzrastu uz kasniji postepeni razvoj potpune kliničke slike (O'Brien i Emans, 2008). Iako se većina komplikacija ispolji u kasnijem uzrastu, klinička manifestacija može nastupiti u vreme gonadarhe, kada započinje sinteza polnih steroida u jajniku kao i stimulacija folikula. Iako nemamo podatke o prevalenci PCOS kod adolescentkinja u našoj sredini, istraživanja sprovedena kod nas pokazala su da adolescentkinje sa PCOS nose rizik za nepovoljan metabolički profil (Macut i sar., 2001) sa posledičnim potencijalom za razvoj

subkliničke kardiovaskularne bolesti tokom života (Macut i sar., 2015a). Upravo zbog ovih činjenica, preporuka je da se dijagnoza postavi do uzrasta od 18 godina kako bi se što pre započelo lečenje i tako umanjili metabolički i kardiovaskularni rizici (Shayya i Chang, 2010).

1.2.2. Dijagnostički kriterijumi za PCOS u adolescentnom uzrastu

Pored brojnih istraživanja koja su sprovedena kod pacijentkinja sa PCOS ipak je ovaj sindrom nedovoljno ispitan, među devojkama adolescentnog uzrasta, pre svega zbog fizioloških karakteristika puberteta koji mogu maskirati kliničku sliku PCOS.

Sa druge strane upravo različita patogeneza, brzina razvijanja kliničke slike i oblici kliničkih manifestacija ovog sindroma značajno utiču na dijagnostičke kriterijume u adolescenciji. Zbog mogućnosti greške u postavljanju dijagnoze PCOS kod adolescentkinja, predloženo je ograničenje dijagnostičkog postupka na devojke sa najvećom verovatnoćom da imaju razvijen poremećaj. Definitivna dijagnoza PCOS tokom adolescencije (Carmina i sar., 2010) trebala bi se postaviti:

1. po isteku najmanje dve godine od nastupanja menarhe
2. kod devojaka koje ispunjavaju sva tri kriterijuma predložena na konsenzusu u Rotterdamu

Veoma je važno da se hiperandrogenizam, kao povišeni nivo androgena u serumu, definiše pomoću osetljivih testova. Kod ispitivanih adolescentkinja kod kojih nije bio pozitivan dijagnostički ishod za postavljanje dijagnoze PCOS potrebno je dalje praćenje i kasnija ponovna evaluacija dijagnostičkog postupka (Carmina i sar., 2010). Nacionalna udruženja pedijatrijskih subspecijalista su 2015. godine postigla međunarodni konsenzus oko dijagnostičkih kriterijuma za PCOS u adolescenciji, koji u stvari predstavlja na drugi način neobjašnjen hronični hiperandrogenizam praćen anovulacijom kod adolescentkinja (Rosenfield i sar., 2015). U Tabeli 1 prikazani su dijagnostički kriterijumi za PCOS u adultnom i adolescentnom uzrastu.

Tabela 1. Dijagnostički kriterijumi za PCOS u adultnom i adolescentnom uzrastu

Dijagnostički kriterijumi za PCOS u adultnom uzrastu	Dijagnostički kriterijumi za PCOS u adolescentnom uzrastu
<p>Fenotip 1 („<i>classic PCOS</i>“)</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Klinički i/ili biohemijski potvrđen hiperandrogenizam b. Potvrđena oligoovulacija c. Ultrazvučno potvrđen policistični izgled jajnika 	<p>Na druge načine neobjašnjiva kombinacija:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Nepravilno materično krvarenje <ul style="list-style-type: none"> a. Neuobičajeno za uzrast ili za ginekološki uzrast b. Prisustvo simptoma tokom 1-2 godine
<p>Fenotip 2</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Klinički i/ili biohemijski potvrđen hiperandrogenizam b. Potvrđena oligoovulacija 	<ul style="list-style-type: none"> 2. Prisustvo hiperandrogenizma <ul style="list-style-type: none"> a. Vrednosti testosterona iznad referentne vrednosti za odrasle b. Umeren ili izražen hirzutizam, klinički pokazatelj hiperandrogenizma c. Umerene ili izražene inflamirane akne vulgares, potrebno je ispitivanje hiperandrogenemije
<p>Fenotip 3 („<i>ovulatory PCOS</i>“)</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Klinički i/ili biohemijski potvrđen hiperandrogenizam b. Ultrazvučno potvrđen policistični izgled jajnika 	
<p>Fenotip 4 („<i>nonhyperandrogenic PCOS</i>“)</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Potvrđena oligoovulacija b. Ultrazvučno potvrđen policistični izgled jajnika 	

*Tabela preuzeta iz rada Rosenfield i sar., 2015

1.3. TERAPIJSKI PRISTUP U PCOS

Terapijski pristup sindromu policističnih jajnika pre svega mora uzeti u obzir heterogenost PCOS fenotipova zbog čega je neophodan individualni pristup lečenju. U skladu sa promenama kliničkih karakteristika sindroma tokom života žene, potrebno je

stalno prilagođavanje terapijskog pristupa. Osnovne postavke u lečenju žena sa PCOS podrazumevaju nefarmakološke mere koje uključuju sprovođenje dijetetskih mera i režima fizičke aktivnosti, farmakološke mere koje uključuju primenu insulinskih senzitajzera, kombinovanih hormonskih kontraceptivnih pilula i antiandrogena. Lečenje devojaka sa PCOS treba da se zasniva na adekvatnoj dijagnozi, da rezultuje ublažavanjem ili nestankom simptoma PCOS i poboljšanjem zdravlja u adultnom uzrastu (Ibáñez i sar., 2017).

1.3.1. Nefarmakološke mere

Promena stila života predstavlja osnovni pristup u lečenju. Smanjenje telesne mase i intenzivnija fizička aktivnost savetuju se kao prvi terapijski izbor kod gojaznih i prekomerno uhranjenih devojaka. Pokazano je da smanjenje TM i povećana fizička aktivnost snižava nivo ukupnog i slobodnog testosterona izraženog kao indeks slobodnih androgena (*eng. Free androgen index, FAI*), povećava koncentraciju SHBG i dovodi do normalizacije menstrualnog ciklusa (Lass i sar., 2011). Primena medikamentne terapije uz promenu stila života može dodatno povoljno uticati na sniženje nivoa androgena i regulaciju menstrualnog ciklusa (Legro i sar., 2013). Pokazano je i da promena stila života kod žena sa PCOS pozitivno utiče na smanjenje kardiovaskularnih rizika: snižava krvni pritisak, poboljšava dislipidemiju i toleranciju glukoze, kao i ranih markera ateroskleroze (debljina zida karotide), (Lass i sar., 2011).

Međutim, i sam gubitak telesne mase bez promena u fizičkoj aktivnosti rezultuje poboljšanjem simptoma PCOS (Lass i sar., 2011). Nema jasnih dokaza da je bilo koji tip dijeta efikasniji kod adolescentkinja sa PCOS. Promena stila života trebala bi da se bazira na kombinaciji restrikcije kalorijskog unosa, poromene ponašanja i vežbanja. Sa povećanjem fizičke aktivnosti dolazi do umerene ili značajne redukcije rizika za nastanak metaboličkog sindroma kod normalno uhranjenih devojaka. Uočeno je da porodična terapija može značajno uticati na promenu stila života adolescentkinja čime se izvodi zaključak da promene u ponašanju roditelja utiču na krajnji ishod lečenja adolescentkinja sa PCOS (Ibáñez i sar., 2017; Reinehr, 2013).

1.3.2. Farmakološka terapija

1.3.2.1. Primena insulinskih senzitivajzera

Insulinski senzitivajzer kao što je metformin, poslednjih godina široko se primenjuje u lečenju PCOS. Metformin hidrohlorid je oralni antihiperглиkemik koji se poslednjih 40 godina u brojnim zemljama koristi za lečenje tip 2 diabetes mellitusa. On poboljšava kontrolu glikemije pre svega smanjujući stvaranje glukoze u jetri, povećava insulinsku osetljivost te samnjuje apsorpciju glukoze u crevima bez uticaja na povećanje sekrecije insulina. Pored toga utiče na kontrolu telesne mase i poboljšava lipidni status. Sprovedene meta analize su pokazale da primena metformina kao monoterapije ili u kombinaciji sa promenom stila života, ima pozitivan efekat na ITM i karakteristike menstrualnog ciklusa (Naderpoor i sar., 2015). Neke opservacione i randomizovane studije pokazale su kratkotrajne terapijske efekte metformina kod prekomerno uhranjenih i gojaznih adolescentkinja sa PCOS (Ibáñez i sar., 2017). Sa druge strane, primena metformina u dozi od 850 mg/dan kod normalno uhranjenih adolescentkinja sa PCOS pokazala je poboljšanje u učestalosti ovulacija i sniženju serumskog nivoa testosterona (Ibáñez i sar., 2017).

Nedavna meta analiza je pokazala efekat metformina na hirzutizam, nivo triglicerida i HDL holesterola koji je bio sličan efektu primenjene oralne hormonske kontraceptivne (OHK) pilule (Al-Zubeidi i Klein, 2015). Pored toga, kod adolescentkinja koje su koristile metformin došlo je do značajnijeg poboljšanja ITM, dok je značajnije delovanje na menstrualni ciklus i akne bilo u grupi koja je koristila OHK pilule (Al-Zubeidi i Klein, 2015).

1.3.2.2. Primena kombinovanih hormonskih kontraceptiva

Kombinovana oralna hormonska kontraceptivna (OHK) pilula je najčešće korišćen oblik savremene kontracepcije sa visokom efikasnošću u uslovima idealne upotrebe. OHK pilula može biti monofazna sa istom dozom etinilestradiola i progestagena u svakoj piluli ili se doze pojedinačnih komponenti mogu razlikovati kao u slučaju trofaznih pilula. OHK pilule se u odnosu na dozu etinilestradiola koju sadrže dele na niskodozne i visokodozne. Međutim, pored kontraceptivnog efekta, OHK pilule koriste se za lečenje neurednih materičnih krvarenja, dismenoreje, hirsutizma, akni i endometrioze. Zbog toga se OHK pilula često koristi u tretmanu simptoma PCOS. U lečenju hiperandrogenizma, OHK pilula ostvaruje terapijski efekat na više načina (Bozdag i Yildiz, 2013):

- supresijom sinteze androgena u jajnicima inhibicijom sekrecije LH za više od 70%;
- indukcijom sinteze SHBG u jetri, već posle 3-4 nedelje upotrebe, što za posledicu ima snižene vrednosti slobodnog testosterona za oko 50%;
- blago sniženje sekrecije androgena iz nadbubrežnih žlezda;
- direktnim antiandrogenim delovanjem progestagenske komponente OHK pilule, na primer ciproteron acetata.

Kod adolescentkinja sa PCOS, korisnica OHK pilule, delovanjem estrogene komponente pilule dolazi do porasta SHBG i pada LH što dovodi do sniženja FAI. Sa druge strane progestagenska komponenta pilule sprečava proliferaciju endometrijuma i reguliše materično krvarenje. OHK pilula efikasno redukuje hirsutizam i akne kod žena sa PCOS, a 60%-100% poboljšanje se očekuje posle šestomesečne primene. Međutim, postoji samo nekoliko studija koje porede efikasnost i uticaj različitih OHK pilula na metaboličke parametre kod adolescentkinja. Smatra se da vrsta progestagena kao i doza estradiola mogu uticati na potencijalne komplikacije kod korisnica. Smatra se da mogući efekti na metabolizam ugljenih hidrata i lipida kod korisnica OHK pilula nisu dovoljno izražene da bi predstavljale značajan dugoročni rizik po zdravlje. Naime, insulinska rezistencija je prisutna kod najvećeg broja pacijentkinja sa PCOS kod kojih je u odnosu na opštu

populaciju povećana incidenca poremećaja tolerancije glukoze i tip 2 diabetes mellitusa, čak i u odnosu na žene sa istim ITM (Moran i sar., 2010). Rezultati meta analize koja je uključila 35 studija, sprovedenih kod pacijentkinja sa PCOS a korisnica OHK pilule sa različitim progestagenskim komponentama, ukazuju da primena OHK pilule nije uticala na promenu glikemije naše, bazalnog insulina kao ni njihovog međusobnog odnosa, a primena OHK pilule nije uticala ni na homeostatski indeks rezistencije na insulin (HOMA-IR) kod žena sa PCOS (Halperin i sar., 2011).

Nema dokaza koji govore o smanjenom riziku za nastanak trudnoće kod seksualno aktivnih adolescentkinja sa PCOS u odnosu na odrasle žene sa PCOS. Uz činjenicu da ovulacije mogu nastati spontano ovisno o efektima hroničnog poremećaja ciklusa, kontraceptivna odluka je značajna za seksualno aktivne adolescentkinje sa PCOS. Iregularna materična krvarenja kao i menoragije u adolescentnom periodu teško se mogu regulisati bez primene hormonske terapije. Antiandrogeni efekti kao i uspešna regulacija menstrualnog ciklusa čine OHK pilule odličnim kontraceptivnim izborom adolescentkinja sa PCOS. Primena progestagenske kontracepcije praćena je porastom TM i mogućim gubitkom koštane mase kod adolescentkinja. Progestagenska kontraceptivna pilula ne dovodi do porasta SHBG, dok intrauterini uložak sa progestinom može biti alternativni kontraceptivni izbor jer izaziva minimalne sistemske efekte i ima visoku kontraceptivnu efikasnost (Francis i Gold, 2017).

1.3.2.3. Primena antiandrogena

U terapiji PCOS primenjuju se dve grupe antiandrogena: blokatori androgenih receptora (spironolakton, flutamid i ciproteron acetat) i inhibitor 5-alfa reduktaze (finasterid) koji sprečava konverziju testosterona u dihidrotestosteron (DHT). Zbog svoje dostupnosti i bezbednosti najširu primenu ima spironolakton. Spironolakton je potentni antagonist androgenih i mineralokortikoidnih receptora, a koristi se kod pacijentkinja sa PCOS koje imaju izražen hirzutizam. Nedavne studije su pokazale da spironolakton poboljšava funkciju endotela i da ima pozitivne efekte na profil lipoproteina i metabolizam

glukoze (Harmanci i sar., 2013). Spironolakton se smatra lekom sa teratogenim efektom te se savetuje istovremena upotreba OHK pilule što rezultuje efikasnom kontracepcijom i dobrom kontrolom ciklusa. Pored toga kombinacija spironolaktona sa hormonskom progestagenskom pilulom koja ima antiandrogeno delovanje rezultuje snažnim snižavanjem nivoa androgena. Ova se kombinacija naročito predlaže ženama sa PCOS koje ne planiraju trudnoću. Spironolakton se u terapiju uvodi sa početnom dozom od 25 mg/dan koja se postepeno može povećavati do 200 mg/dan. Početak njegove primene može biti praćen prolaznom pojavom tačkastog vaginalnog krvarenja ili poremećajem menstrualnog ciklusa, napetošću grudi ili slabošću (Ibáñez i sar., 2017).

Pokazana je klinička efikasnost flutamida u dozi od 1 mg/kg TM/dan i to pre svega na hirzutizam. Međutim, upotreba flutamida je ograničena pošto nije dostupan u nekim zemljama, dok se u drugim obazrivo koristi jer je, kod primene visokih doza (>250 mg/dan), opisana njegova hepatotoksičnost (Fauser i sar., 2012). Anti androgeni značajno smanjuju hirzutizam u odnosu na placebo i normalizuju menstrualni ciklus i endokrino-metaboličke varijable bolje nego monoterapija metforminom (Ibáñez i sar., 2017). Seksualno aktivne adolescentkinje mogu koristiti anti-androgene samo kada koriste i adekvatnu metodu savremene kontracepcije, kako bi se izbegla inkompletna virilizacija muškog ploda u slučaju neplanirane trudnoće. U literaturi nisu dostupni rezultati poređenja efekata antiandrogene terapije kod adolescentkinja.

1.3.3. Kombinovani terapijski režimi

Kombinovani tretman kod adolescentkinja sa PCOS ima za cilj popravljjanje različitih simptoma i sinergističko delovanje koje vodi značajnijem poboljšanju uz minimalan rizik. Promena stila života je osnovna terapija za većinu adolescentkinja sa PCOS, posebno kod prekomerno uhranjenih i gojaznih. Kod većine adolescentkinja koje sprovode opšte mere dodata OHK pilula dovodi do redukcije simptoma PCOS i normalizacije menstrualnog ciklusa. Primena kombinacije insulinskih senzitivajzera i antiandrogena praćena je sporijom redukcijom simptoma PCOS, a kombinacija koja bi u

budućnosti mogla predstavljati novi terapijski pristup podrezumeva primenu metformina (850 mg/dan), spironolaktona (50 mg/dan) i pioglitazona (7,5 mg/dan). Navedena kombinacija u odnosu na primenu samo OHK pilule normalizuje faktore kardiovaskularnog rizika i telesni sastav, rezultuje nižim nivoom cirkulišućih androgena i većim brojem ovulacija (Ibáñez i sar., 2017).

1.3.4. Dejstvo kombinovane hormonske kontracepcije na oksidativni stres

Istraživanje oksidativnog stresa duže vreme zaokuplja pažnju istraživača. Međutim, stanje oksidativnog stresa i efekti primenjenih terapija na njegov nastanak i modifikaciju nisu razjašnjeni kod pacijentkinja sa PCOS (Yilmaz i sar., 2005). Metabolički procesi tokom kojih nastaju reaktivne kiseonične vrste kao i aktivnost antioksidanata predstavljaju rezultat složenog odnosa genetske predisponiranosti i delovanja faktora iz okoline (Barp i sar., 2002).

Uticaj OHK pilule na antioksidantnu zaštitu privukao je veliku pažnju brojnih istraživača koji su evidentirali porast aktivnosti GPX kod višegodišnjih korisnica OHK pilule (Capel i sar., 1981; Jendryczko i sar., 1993). Novija istraživanja su potvrdila da primena OHK izaziva značajan porast aktivnosti GPX i smanjenje aktivnosti SOD u eritrocitima (Fallah i sar., 2011). Mehanizam kojim OHK utiču na aktivnost antioksidantnih enzima još uvek nije potpuno jasan. Ukazano je da etinil estradiol stimuliše aktivnost GPX, što može biti posledica uticaja steroida na koštanu srž, na maturaciju eritroblasta i stimulacije sinteze novih molekula GPX (Fallah i sar., 2011). Čini se da se male doze steroida iz OHK pilula konvertuju u perokside, što može biti dovoljno da indukuje sintezu novih molekula GPX. Sa druge strane, čini se da je promena aktivnosti SOD značajno manja kod korisnica OHK. Upravo ovi dokazi ukazuju da je mogući oksidativni stres nastao posredstvom OHK pilula odgovoran za indukciju zaštitnih mehanizama kroz povećanje enzimske aktivnosti GPX. Smatra se da ovaj značajni porast aktivnosti GPX kod korisnica OHK igra ključnu ulogu u zaštiti eritrocita i hemoglobina od oksidativnog oštećenja. Ipak u naučnim krugovima još uvek ne postoji konsenzus u vezi aktivnosti SOD

i GPX, u vezi s promena kao ni oko obima promena kod korisnica OHK pilule. Iako su podaci o aktivnosti eritrocitne SOD i GPX kod korisnica OHK pilula oskudni i konfliktni, naglašena je uloga GPX kao primarnog mehanizma degradacije niskih nivoa H_2O_2 i hidroperoksida nezasićenih masnih kiselina. Iz navednog je izveden zaključak da enzim GPX ima značajnu ulogu u zaštiti membranskih lipida od oksidativnog oštećenja (Sidhu i sar., 2004). Fallah objašnjava pojačanu aktivnost GPX kod korisnica OHK kao protektivnu reakciju eritrocita na povišene vrednosti ovih hormona u krvi. Naime, primena OHK može dovesti do nastajanja oksidanata i slobodnih radikala koji posledično mogu stimulisati brojne GPX da ih neutrališu, što na kraju rezultuje nastajanjem vode. Međutim, ovim istraživanjem otkrivene različite vrednosti GPX, mogu se objasniti različitom dostupnošću glutationa (Fallah i sar., 2011).

1.3.5. Uticaj hormonske kontracepcije na oksidativni stres kod adolescentkinja sa PCOS

Izbor terapijskog pristupa za adolescentkinje sa PCOS pre svega zavisi od prisutnih simptoma. Oralne hormonske kontraceptivne pilule mogu korigovati endokrini disbalans kod ovih pacijentkinja i tako ublažiti i kliničke i biohemijske parametre hiperandrogenizma. Zbog toga je kod pacijentkinja sa hiperandrogenizmom i poremećajem menstrualnog ciklusa i uobičajena primena OHK pilule (O'Brien i Emans, 2008). Imajući u vidu uzrast pacijentkinja koje postaju seksualno aktivne, OHK pilule će ujedno obezbediti i efikasnu kontracepciju. Poznato je da kod žena sa urednim menstrualnim ciklusom, zbog delovanja estradiola tokom poslednje 2/3 menstrualnog ciklusa dolazi do povećane produkcije ROS, dok se kod korisnica OHK pilule sa visokom dozom (50 μ g) etinil estradiola ovo stanje povećane ROS produkcije uspostavlja već u ranoj folikularnoj fazi, odnosno od momenta započinjanja terapije (Finco i sar., 2011). Ovakvo, OHK pilulom izazvano, jače „reaktivno“ stanje prolongirano je do nastupanja menstrualnog krvarenja tokom perioda u kom se ne uzima pilula. Finco je eksperimentom sprovedenim sa korisnicama niskodoznih OHK pilula potvrdio prethodne rezultate (Pemble i sar., 1994; Xu i sar., 1998) koji su dokazali

povećanu produkciju ROS kod ovih žena (Finco i sar., 2012). Postoji više hipoteza o terapijom indukovanom oksidativnom stresu: pretpostavlja se da bi snižene vrednosti LH i FSH ili smanjena sekrecija relaksina, kojeg luči žuto telo u jajniku (Bani, 2008), kao i enzimi jetre koji metabolišu hormone iz OHK pilule bili faktori indukcije povećane produkcije ROS (Borek-Dohalska i sar., 2015). Naime, pokazano je da u toku reakcija konjugacije progestagena i estrogena u jetri dolazi do smanjene raspoloživosti glutaciona, jednog od ključnih ćelijskih antioksidanasa (Finco i sar., 2012).

Kod primene niskodozne OHK pilule (30 µg etinil estradiola) nivoi oksidativnog stresa bili su niži kako tokom uzimanja pilule, tako i tokom pauze između uzimanja dva pakovanja (Finco i sar., 2012). Nedavno je pokazano da primena OHK može uticati i na aktivnost glavnih antioksidantnih enzima, GPX i SOD. Naime, uočena je pojačana aktivnost GPX kod zdravih žena koje su duže od 6 meseci koristile kontraceptivnu pilulu (Fallah i sar., 2011). Sa druge strane, kod navedenih žena uočena je smanjena aktivnost SOD koja se čini manje osetljiva na hormonske promene koje nastaju kod korisnica OHK pilule (Fallah i sar., 2011).

Uzimajući u obzir da je jedno od obeležja savremenog društva smanjena plodnost žena, čemu značajno doprinosi i PCOS, važno je rano prepoznavanje i adekvatno lečenje pacijentkinja sa ovim sindromom. Lečenje treba započeti već u adolescentnom uzrastu kako bi se očuvalo, ali i unapredilo njihovo reproduktivno ali i opšte zdravlje. Do sada se u našoj zemlji nijedna studija nije bavila navedenom problematikom u adolescentnom uzrastu.

Bolje sagledavanje dugoročnih efekata primenjene terapije kao i efikasnija prevencija hroničnih metaboličkih sekvela kod pacijentkinja sa PCOS značajno bi doprineli boljem razumevanju patofiziologije ovog sindroma u adolescentnom uzrastu.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su bili da se:

1. Odrede biokemijski pokazatelji oksidativnog stresa i aktivnosti enzima antioksidantne zaštite kod zdravih adolescentkinja i adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika;
2. Izvrši uporedna analiza efekata šestomesečne primene različitih terapijskih protokola na hormonski status, kliničke i biokemijske karakteristike adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika;
3. Izvrši uporedna analiza efekata šestomesečne primene različitih terapijskih protokola na pokazatelje oksidativnog stresa kod adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika;
4. Odredi polimorfizam glutation S-transferaza A1, M1, T1 i P1 kod zdravih adolescentkinja i adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. ISPITANICE

Ispitivanje je sprovedeno tokom 2015. i 2016. godine u Službi za dečiju i adolescentnu ginekologiju Republičkog centra za planiranje porodice, Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. U studiju je bilo uključeno trideset i pet adolescentkinja, uzrasta do devetnaest godina, koje su ispunjavale roterdamske dijagnostičke kriterijume za PCOS (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group, 2004). Kod svih su prethodno isključeni drugi endokrinološki poremećaji kao što su hiperprolaktinemija, poremećaji funkcije štitaste žlezde, kongenitalna adrenalna hiperplazija, prevremena insuficijencija jajnika, Kušingov sindrom, akromegalija i androgen sekretujućii tumori. Pored toga, kod svih ispitanica isključeno je postojanje drugih hroničnih bolesti, korišćenje kortikosteroida, bilo kada tokom života, i hormonske kontracepcije u poslednja 3 meseca. Studijom su obuhvaćene ispitanice kod kojih je menarha nastupila najmanje dve godine pre uključivanja u studiju. Sve učesnice ovog istraživanja su bile na režimu normalne ishrane i unosa tečnosti, i bez suplementacije vitaminima. U istraživanje su bile uključene adolescentkinje koje ne puše i ne konzumiraju alkohol. Ispitanice su bile podeljene u dve grupe, a prema primenjenom terapijskom režimu OHK:

„PRVAGRUPA“ - lečena OHK pilulom sa 30 µg etinilestradiola i 3 mg drospirenona

„DRUGA GRUPA“ - lečena OHK pilulom sa 20 µg etinilestradiola i 3 mg drospirenona

Kontrolna grupa bila je sastavljena od sedamnaest zdravih adolescentkinja, koje odgovaraju ispitanicama prema uzrastu i indeksu telesne mase.

Sve adolescentkinje uključene u ovu studiju detaljno su informisane, a svojim ili potpisom svog staratelja su dale pisanu saglasnost za učestvovanje u istraživanju. Studija je izvedena u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (revidirana verzija iz 1983. godine) i odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu.

U skladu sa postavljenim ciljevima rada, istraživanje je sprovedeno po tipu kohortne studije koja je bazirana na longitudinalnom praćenju adolescentkinja kod kojih je dijagnostikovano PCOS.

Podaci o adolescentkinjama uključenim u istraživanje prikupljeni su uz pomoć upitnika kao i kliničkim, laboratorijskim i ultrazvučnim pregledom. Upitnikom su prikupljeni podaci iz lične i porodične anamneze, demografske, antropometrijske i kliničke karakteristike.

3.1.1. Demografski podaci

Demografski podaci ispitivanih adolescentkinja su se odnosili na: karakteristike trudnoće i vreme porođaja majke u odnosu na termin porođaja, telesnu masu na rođenju, telesnu dužinu na rođenju, Apgar skor (AS) na rođenju (Apgar, 1953), kao i uzrast u trenutku ispitivanja.

3.1.2. Antropometrijski podaci

Antropometrijski podaci o ispitanicama su obuhvatali telesnu visinu (TV), telesnu masu (TM), obim struka (OS) i obim kuka (OK), koji su određivani prema važećim preporukama Svetske zdravstvene organizacije (SZO). Telesna visina je merena visinometrom (stadiometrom) u stojećem položaju, sa preciznošću merenja od 1 mm. Telesna masa je merena redovno baždarenom mehaničkom vagom sa preciznošću merenja od 100 grama. Obim struka je meren plastifikovanom platnenom centimetarskom trakom u stojećem položaju, na kraju normalnog ekspirijuma, na sredini rastojanja između najviše

tačke grebena bedrene kosti i donje ivice rebarnog luka, sa preciznošću od 1 mm. Obim kuka je meren plastifikovanom platnenom centimetarskom trakom u stojećem položaju, sa preciznošću od 1 mm.

3.1.3. Podaci o kliničkim karakteristikama

Kliničke karakteristike su obuhvatile određivanje stadijuma razvoja sekundarnih polnih osobina (porast dojki, pubične i aksilarne maljavosti) po standardima Tannera i saradnika, stepen hirzutizma izražen po F-G skor sistemu (*eng. Ferriman–Gallwey score*) (Hatch i sar, 1981), prisustvo akni na licu i leđima, prisustvo akantozne nigrikans, sistolni (SKP) i dijastolni krvni pritisak (DKP), meren živinim manometrom metodom auskultacione sfigmomanometrije sa preciznošću od 1 mmHg.

3.2. ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH PARAMETARA

Priprema plazme

Za određivanje različitih biohemijskih parametra, hormona, kao i parametara oksidativnog stresa venepunkcijom je uzimana periferna krv u epruvete sa Na citratom. Krv je uzimana u jutranjim časovima (najkasnije do 9:00) na prazan stomak, posle najmanje 12 sati gladovanja. Plazma je odvojena centrifugiranjem na 3000 obr/min u trajanju od 15 minuta, na temperaturi od +4°C. Zbog nestabilnosti tiol grupa uzeta krv je odmah centrifugirana, a dobijena plazma alikvotirana i zamrznuta na -80°C, i tako čuvana do trenutka ispitivanja.

Određivanje biohemijskih parametara

Rezultati biohemijskih parametara dobijeni su korišćenjem originalnih Roche reagenasa na automatskom analizatoru Hitachi 6000 Cobas c501[®] (Roche).

Vrednost glikemije u serumu određena je enzimskom referentnom metodom sa heksokinazom i izražena u mmol/L. Iz uzorka venske krvi meren je nivo glikemije našte (G 0'), a zatim tokom testa oralnog opterećenja glukozom (OGTT) u 30-om, 60-om, 90-om i 120-om minutu (G 30'; G 60'; G 90'; G 120').

Koncentracija uree (mmol/L) merena je kinetičkim testom sa ureazom i glutamat dehidrogenazom, koncentracija kreatinina (μ mmol/L) kinetičkom *Jaffe* metodom bez deproteinizacije (Toto, 1995). Indirektnom potencijometrijom, primenom jon-selektivnih elektroda, određene su koncentracije elektrolita: Na, K, Cl, a dobijene vrednosti izražene u mmol/L, dok je za merenje koncentracije kalcijuma i magnezijuma korišten fotometrijski test (mmol/L). Serumski nivo gvožđa (μ mol/L) određivan je metodom sa ferozinom. Koncentracija ukupnog bilirubina određena je, pre i na kraju OGTT, diazo metodom. Dobijene vrednosti izražene su u μ mol/L.

Aktivnosti aminotransferaza u serumu - AST (aspartat amino transferaze) i ALT (alanin amino transferaze) meren je u skladu sa preporukama IFCC (Međunarodna federacija za kliničku hemiju i laboratorijsku medicinu), enzimskim metodom pod dejstvom MDH i LDH. Dobijene vrednosti izražene su u IJ/L sa preciznošću od 1 IJ/L. Koncentracija mokraćne kiseline određena je, pre i na kraju OGTT, enzimskim kolorimetrijskim testom pod dejstvom urikaze, izražena je u μ mol/L (Kageyama, 1971).

Koncentracija ukupnih proteina određivana je, pre i na kraju OGTT, kolorimetrijski test metodom krajnje tačke, biuretskom reakcijom. Koncentracija albumina određivana je, pre i na kraju OGTT, fotometrijski test metodom krajnje tačke, reakcija sa BCG-brom krezol zelenim. Dobijene vrednosti su izražene u g/L (Dumas i sar., 1997).

Koncentracija holesterola u serumu određena je kolorimetrijskim metodom, a koncentracija HDL holesterola merena je homogenim enzimskim kolorimetrijskim testom. Koncentracija LDL holesterola u serumu izračunata je uz pomoć Friedwald-ove formule (za trigliceride manje od 2,2 mmol/L): $LDL \text{ (mmol/L)} = \text{holesterol} - (\text{Tg} : 2,2 + HDL)$ (Friedewald i sar., 1972). Koncentracija triglicerida u serumu određena je enzimskim kolorimetrijskim testom. Dobijene vrednosti izražene su u mmol/L.

Koncentracija hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) merena je kalorimetrijskim metodom posle afinitetne hromatografije u uzorku venske krvi uzete sa antikoagulansom (Na citrat).

Dobijena vrednost izražena je procentom. Nivo hs-CRP određivan je imunoturbidimetrijskim testom a dobijene vrednosti izražene su u mg/L. Koncentracija fibrinogena u plazmi određivana je modifikovanim metodom po Clauss-u (Clauss, 1957) iz uзорka venske krvi uzete sa antikoagulansom (Na citrat), izražena je u g/L.

3.3. ODREĐIVANJE HORMONA

Nivoi hormona (FSH, LH, prolaktin, estradiol, progesteron, testosteron, TSH, fT4, 17 OHP i insulin - našte (I 0'), a zatim tokom testa oralnog opterećenja glukozom (OGTT) u 30-om, 60-om, 90-om i 120-om minutu (I 30'; I 60'; I 90'; I 120') su određeni na imunoheмиjskom analizatoru Cobas e411[®] (Roche). Detekciona metoda na kojoj je zasnovan merni princip ovog analizatora je elektrohemiluminiscencija (ECL). Dobijene vrednosti izražene su: FSH u IJ/L, LH u IJ/L, prolaktin u mIJ/L, estradiol u pmol/L, progesteron u nmol/L, testosteron u nmol/L, kortizol u nmol/L i 17 OHP u nmol/L sa preciznošću od jedne decimale, a TSH u mIJ/L, fT4 u pmol/L i insulin u mIJ/L sa preciznošću od dve decimale. Serumski nivo androstenediona, DHEAS i SHBG mereni su radioimunoesej ispitivanjem (R-GM-100, DHEAS-CT i SHBG-RIACT). Dobijene vrednosti izražene su: androstenedion u ng/ml, DHEAS u μ mol/L i SHBG u nmol/L. Osetljivost, specifičnost, inter-analiza i koeficijenti varijacije unutar testa bili su unutar propisanih granica prema protokolu proizvođača.

3.4. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA

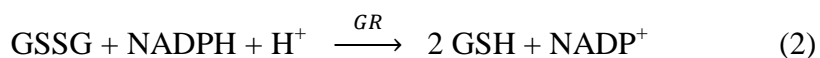
3.4.1. Određivanje koncentracije proteinskih tiol grupa u plazmi

Koncentracija proteinskih tiol grupa u plazmi određivana je spektrofotometrijski, upotrebom *Ellman*-ovog reagensa (DTNB) po metodi *Jocelyn*-a (Ellman i Lysko, 1979). U reakciji proteinskih tiol grupa (P-SH) i DTNB dolazi do redukovanja DTNB [5,5'-ditiobis

(2-nitrobenzoeva kiselina)] i stvaranja žuto obojenog anjona 5-tio 2-nitrobenzoeve kiseline (TNB). Na talasnoj dužini od 412 nm molarni ekstinkcioni koeficijent anjona 5-tio 2-nitrobenzoeve kiseline iznosi $13.6 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Do redukcije Ellman-ovog reagensa i stvaranja TNB dolazi i pod dejstvom svetlosti. Kako bi se pri određivanju proteinskih tiol grupa sprečilo nespecifično redukovanje DTNB pod uticajem svetlosti, i reagensi i analize bili su zaštićeni od izvora svetlosti. Slepa proba analize rađena je za svaki pojedinačni uzorak, čija je apsorbanacija pročitana odmah nakon mešanja na vorteksu i to na talasnoj dužini od 412 nm prema puferu. Koncentracija proteinskih tiol grupa izražena je u $\mu\text{mol/g}$ proteina.

3.4.2. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze u plazmi

Aktivnost glutacion peroksidaze (EC 1.11.1.9) u plazmi je određivana spektrofotometrijski, korišćenjem metode Günzler-a i sar (Günzler i sar., 1974). Metoda se zasniva na reakciji redukcije t-butil hidroperoksida pod uticajem glutacion peroksidaze (GSH-Px) u odgovarajući alkohol. Pri tom se redukovani GSH, inače specifičan donor vodonika, oksiduje u glutacion disulfid (GSSG) (Reakcija 1). U povezanoj reakciji koju katališe glutacion reduktaza u prisustvu NADPH kao kofaktora, GSSG se redukuje u GSH (Reakcija 2).



Meru aktivnosti glutacion peroksidaze predstavlja brzina oksidacije NADPH u NADP^+ , a ona se prati spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm. Molarni apsorpcioni koeficijent za NADPH iznosi $6,22 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, na talasnoj dužini od 340 nm. Brzina oksidacije NADPH data je kao razlika u brzini oksidacije NADPH u prisustvu i odsustvu enzima i računa se prema formuli:

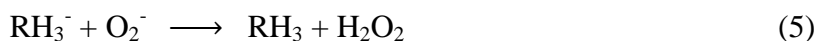
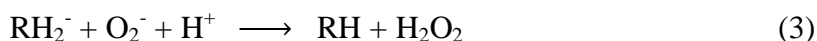
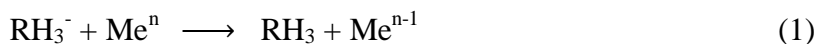
$$\frac{A \text{ uzorka} - A \text{ slepe probe} \times TV \times DF}{\epsilon m M(NADPH) \times SV \times 0,25} = U/L$$

$\epsilon m M(NADPH) = 6,22$ - ekstinkcioni koeficijent ($L \times mM^{-1} \times cm^{-1}$); A uzorka - srednja vrednost apsorpcije uzorka u minuti; A slepe probe - srednja vrednost apsorpcije slepe probe u minuti; TV - ukupna zapremina ($1000 \mu LSV$ - zapremina uzorka ($50 \mu L$)); DF - faktor razblaženja

Aktivnost glutation peroksidaze izražena je u U/L plazme, a jedinica aktivnosti glutation peroksidaze (U) definisana je kao količina enzima koja katališe oksidaciju jednog μ mola NADPH u minuti u navedenim uslovima.

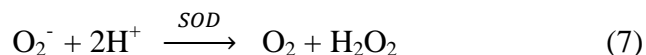
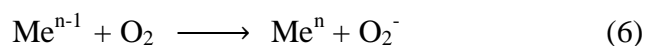
3.4.3. Metoda za određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi

Aktivnost superoksid dizmutaze (EC 1.15.1.1) u plazmi je određivana spektrofotometrijski, po metodi (Misra i Fridovich, 1972). Metoda se bazira na inhibiciji stvaranja adrenohroma u toku spontane oksidacije adrenalina u baznoj sredini. Mehanizam spontane oksidacije adrenalina u kome superoksidni anjon (O_2^-) kao reaktivno jedinjenje izaziva propagaciju lančane reakcije, može se predstaviti na sledeći način (Misra i Fridovich, 1972):



RH_3^- : adrenalin anjon; R : adrenohrom

Jednovalentnom oksidacijom anjona adrenalina, izazvanom metalnim katjonom (Reakcija 1) ili superoksid anjonom (Reakcija 5), započinje lančana reakcija. Redukovani metalni katjon, nastao u toku reakcije 1, može biti oksidovan pomoću molekuskog kiseonika pri čemu nastaje superoksid anjon (Reakcija 6).



Superoksid dizmutaza, uklanjanjem superoksid anjona, prekida autooksidaciju adrenalina a time i stvaranje adrenohroma. Upravo je stepen inhibicije stvaranja adrenohroma srazmeran aktivnosti superoksid dizmutaze. Brzina stvaranja adrenohroma spektrofotometrijski se prati na talasnoj dužini od 480 nm, pri kojoj molarni apsorpcioni koeficijent za adrenohrom iznosi $4,02 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Brzina stvaranja adrenohroma 3 minuta je praćena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 480 nm. Inhibicija spontane oksidacije adrenalina je određena u odnosu na vrednost promene apsorbcije iste reakcione mešavine u koju je umesto plazme dodavan pufer. Jedinica aktivnosti superoksid dizmutaze (U) definisana je kao količina enzima koja za 50% inhibira spontanu oksidaciju adrenalina u minuti u navedenim uslovima. Aktivnost superoksid dizmutaze izražena je u $U \times 10^3/\text{L}$ plazme.

Izračunavanje

Izabrana je ona koncentracija adrenalina koja će u kontroli dati promenu apsorbcije od 0,025 u minuti, te je adrenalin razblaživan sa 20 mmol/L HCl kako bi se postiglo radno razblaženje i $\Delta A/\text{min}$ od 0,025. Promena apsorbcije u minuti od 0,025 je izabrana jer je utvrđeno da SOD tada postiže najviši procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Obzirom na definiciju relativne jedinice aktivnosti enzima SOD, jedinična aktivnost bi dovela do 50%-tnog smanjenja apsorbcije odnosno $\Delta A/\text{min}$ bi u takvom uzorku bila 0,0125.

Aktivnost SOD-e u relativnim jedinicama se izračunava preko sledeće formule:

$$0,0125 : 1U = \left[0,0125 - \left(\frac{\Delta A \text{ analize}}{\text{min}} \right) \right] : X$$

Kako bi se dobila aktivnost SOD-e u 1 mL plazme, dobijena vrednost se množi sa razblaženjem uzorka (Vuk/Vuz), a zatim sa 1000 da bi se dobila aktivnost SOD-e u zapremini od 1 L plazme.

3.4.4. Metoda za određivanje koncentracije nitrotirozina

Koncentracija 3-nitrotirozina u plazmi određivana je kompetitivnom ELISA metodom (*eng. Enzyme-linked immunoabsorbent assay*). Metoda je sprovedena prema uputstvu proizvođača (*OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA Kit, Cell Biolabs, Inc*). Ovom metodom koncentracija 3-nitrotirozina u uzorku se određuje poređenjem njegove apsorbance sa apsorbancom nitriranog BSA, koji se inače koristi za konstruisanje standardne krive. Metoda se izvodi na sledeći način: najpre se na ploču dodaju uzorci plazme ili nitrirani BSA standardi, a zatim se nakon inkubacije dodaje antitelo specifično za nitrotirozin, praćeno HRP obeleženim sekundarnim antitelom. U ispitivanom uzorku, koncentracija nitrotirozina određuje se očitavanjem sa standardne krive, koja se inače konstruiše primenom očitanih apsorbanci nitriranih BSA standarda. Apsorbance se meri na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija nitrotirozina je izražena u nmol/L. Opseg osetljivosti ove metode je od 20 nM do 8.0 μM.

3.5. ODREĐIVANJE POLIMORFIZMA GST

3.5.1. Priprema uzorka za analizu - izolacija DNK

Za izolaciju DNK korišćeni su leukociti pune krvi, koja je uzeta u vakutajnere sa Na citratom i do procedure izolovanja DNK čuvana na -20°C. Za izolaciju DNK korišćen je

DNK kit (*QIAamp DNK mini kit 250*). Najpre se liziraju ćelijske membrane leukocita, u rastvoru deterdženta, a zatim se enzimskom digestijom delovanjem proteinaze K uklanjaju proteini iz kompleksa sa DNK. Tako dobijena slobodna DNK u lizatu prenešena je u mini spin kolone, u kojima se nalazi silikonska-gel membrana za koju se DNK vezuje. Zatim je lizat ispiran serijom pufera koji sadrže soli i etanol, kako bi se odstranili proteini, nukleaze i ostali kontaminanti. Ovako dobijena DNK može se odmah koristiti u reakciji lančanog umnožavanja (*eng. polimerase chain reaction, PCR*) ili se čuvati na -20°C . Izolovana DNK je do izvođenja PCR reakcija čuvana na -20°C . Prisustvo DNK je dokazivano elektroforezom na 1% agarozu uz korišćenje TBE pufera i etidijum bromida. Elektroforeza je trajala 10 min na 100 V, 0,27 A i 50 W. Vizuelizacija DNK je izvođena na UV transluminatoru na 302 nm.

Princip metode

Delecioni polimorfizam GSTM1 i GSTT1 klasa je određivan PCR reakcijom, a SNP GSTA1 klasa analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata, PCR-RFLP (*eng. restriction fragment length polymorphism - RFLP*). PCR je metoda kojom se eksponencijalno umnožava DNK sekvenca, tako da na kraju dobijemo mnogostruko umnožene kopije istog fragmenta, a zasniva se na imitaciji procesa DNK replikacije. Metoda se izodi tako što se smeša genomske DNK, unutar koje se nalazi i gen koji se želi umnožiti pomeša sa parom prejmara (R i F), Taq DNK polimerazom i Master-mixom [dezoksinukleotid trifosfati (dNTP), odgovarajući puffer, joni magnezijuma i sterilna voda].

Prajmeri (oligonukleotidi) koji se koriste u reakciji amplifikacije, komplementarni su krajevima sekvence koja se umnožava. Sinteza DNK odvija se istovremeno na oba raspletana polinukleotidna lanca. Svaki ciklus se sastoji iz denaturacije DNK na 95°C , vezivanja prajmera sa svojim templatom na 42°C - 65°C i elongacije na 72°C . Ovaj proces katalizuje enzim termostabilna DNK polimeraza, koja na vezane prajmere dodaje komplementarne dezoksinukleotide. Smeša se podvrgava kratkotrajnim inkubacijama na tačno određenim temperaturama u ciklusima od 25 do 40 puta. Krajevi umnoženog fragmenta određeni su krajevima prajmera a veličinu fragmenta određuje broj baza između delova koje prajmeri prepoznaju.

RFLP metoda se zasniva na tačno određenom isecanju PCR proizvoda pomoću specifičnih enzima, restrikcionih endonukleaza. U restrikcionoj digestiji koriste se specifični enzimi koji predstavljaju produkte bakterija proizvedene u cilju zaštite od strane DNK, najčešće virusne. Endonukleaze prepoznaju tačno određene sekvence DNK dužine od 4 do 8 nukleotida i vršeći hidrolitičko razlaganje DNK stvaraju veliki broj fragmenata poznatih kao restrikcioni fragmenti. Naziv restrikcionih nukleaza čine tri slova dobijena skraćanjem imena mikroorganizama iz koga su izolovani. Ako je restrikciono mesto promenjeno (mutacijom ili varijacijom) enzim ga neće prepoznati te dobijamo duže fragmente ili ako se iz istih razloga, restrikciono mesto javi na neuobičajenom mestu pojaviće se kraći fragmenti.

Po završetku restrikcione digestije dobijeni produkti se analiziraju elektroforezom na agaroznom gelu uz bojenje etidijum bromidom. Razlike u dužini fragmenata DNK nastalih kao rezultat restrikcione digestije nazvane su polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata. Upoređivanjem veličine restrikcionih fragmenata PCR proizvoda ispitivane i kontrolne osobe mogu se prepoznati genetske mutacije ali i odrediti genotip i fenotip ispitanika.

3.5.2. Određivanje polimorfizma GSTA1

Polimorfizam GSTA1 C69T (rs3957357) određivan je po PCR-RFLP metodi Colesa i saradnika (Coles i sar., 2001). Za amplifikaciju DNK fragmenta odgovornog za sintezu GSTA1 korišćeni su prajmeri forward (5'-GCATCSGTCTGCCCTTCA-3') i reverse (5'-AAACGCTGTCACCGTCCT-3'). Restrikciona digestija PCR proizvoda urađena je sa Earl enzimom (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*). Inkubacija PCR proizvoda i Earl enzima odvijala se na 37°C tokom 16 sati (preko noći). Nakon inkubacije, uspešnost restrikcione digestije proveravana je elektroforezom na 1% agaroznom gelu na 125 V, 0,27 A i 50 W. Po završenoj elektroforezi pristupilo se vizuelizaciji restrikcionih proizvoda na UV kameri Chemidoc (*Biorad, Hercules, CA, USA*)

pomoću SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA*). Dobijeni rezultati u smislu prisustva traka ukazuju na genotip i to:

- wild-type CC genotip - traka veličine 481 bp
- CT genotip - trake veličine 481 bp + 385 bp + 96 bp
- TT genotip - trake veličine 385 bp + 96 bp

3.5.3. Određivanje polimorfizma GSTM1 i GSTT1

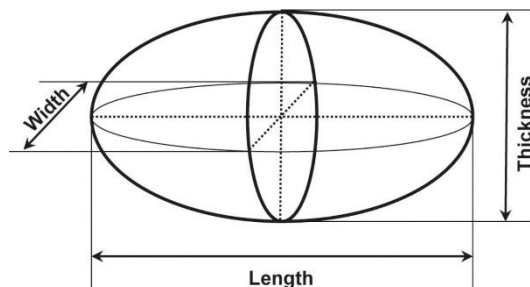
Multipleks polimorfizam GSTM1 i GSTT1 je određivan po metodi Abdel-Rahmana i saradnika (Abdel-Rahman i sar., 1996) za istovremeno analiziranje genotipa GSTM1 i GSTT1. Radilo se na ledu u sterilnim uslovima. Za amplifikaciju DNK fragmenata odgovornog za sintezu GSTM1 korišćeni su prajmeri forvard (5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG - 3') i reverse (5'-TGGATTGTAGCAGATCATGC - 3'). Za amplifikaciju DNK fragmenata odgovornog za sintezu GSTT1 korišćeni su prajmeri forvard (5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC - 3') i reverse (5'-TCACGGGATCAATGGCCAGCAC - 3'). Kontrolni prajmeri koji omogućavaju amplifikaciju egzona 7 CYP1A1 gena (312 bp), takođe su bili uključivani u reakcije kako bi se potvrdilo prisustvo DNK u uzorku, kao i uslovi PCR-a. Uspešnost amplifikacije je proveravana elektroforezom na 2% agaroznom gelu na 125 V, 0,27 A i 50 W, u trajanju oko 21 minut. Vizuelizacija PCR proizvoda je izvođena na UV kameri Chemidoc (*Biorad, Hercules, California, USA*) pomoću SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA*). Prisustvo trake veličine 215 bp ukazivaće na prisustvo gena za GSTM1 (homozigotni i heterozigotni genotipovi), odnosno prisustvo trake veličine 481 bp na prisustvo gena za GSTT1 (homozigotni i heterozigotni genotip). Odsustvo traka ukazivaće na homozigotnu deleciju gena za GSTM1 i GSTT1.

3.5.4. Određivanje GSTP1 Ile105Val polimorfizma

Polimorfizam GSTP1 Ile105Val (rs1695) je određivan uz upotrebu Applied Biosystems TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping eseja (*Life Technologies, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*). Koncentracija DNK je određivana na *GeneQuant* pro (*Biochrom, Cambridge, England*) aparatu. Uzorci DNK, kao i pozitivna i negativna kontrola, su nanošeni na ploču sa 96 bunarčića tako da je nakon uparavanja DNK na 65°C (*Mastercycler gradient thermal cycler, Eppendorf, Hamburg, Germany*) u svakom odgovarajućem bunarčiću bila ista količina DNK. Reakciona mešavina bila je sačinjena od PCR MasterMixa (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*) i fluorescentno obeležene probe i nanošena je uz pomoć *EppMotion* robota (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) dok je PCR amplifikacija i očitavanje fluorescence izvođeno metodom qPCR [*Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany)*].

3.6. ULTRAZVUČNI PREGLED MALE KARLICE

Kod svih ispitanica urađen je ultrazvučni pregled male karlice na početku ispitivanja kao i kontrolni pregled po završetku šestomesečne terapije. Pregled je obavljen na aparatu Voluson-E[®], abdominalnom dopler sondom 4-7 MHz, uz detaljan morfološki opis materice i precizno izmerenom debljinom endometrijuma. Tokom pregleda precizno je urađeno merenje jajnika u tri dimenzije kao i detaljno opisan njihov morfološki izgled. Na osnovu izmerenih dijametara, Slika 8, izračunata je zapremina materice kao i zapremine jajnika uz pomoć formule $V = a \times b \times c \times 0,523$ (Lee i Rausch, 2012).



Slika 8. Šematski prikaz merenja dijametara jajnika (slika preuzeta iz rada Lee i Rausch, 2012)

3.7. IZVEDENE VREDNOSTI/PARAMETRI

Nakon prikupljanja osnovnih podataka pristupljeno je izračunavanju sledećih parametara:

1. Indeks telesne mase (ITM), dobijen deljenjem telesne mase izražene u kilogramima sa kvadratom telesne visine izražene u metrima - $TM(kg)/TV(m^2)$, sa preciznošću od dve decimale
2. Odnos obim struka/obim kuka (OS/OK), dobijen deljenjem obima struka izraženog u centimetrima sa obimom kuka izraženog u centimetrima - $OS(cm)/OK(cm)$, sa preciznošću od dve decimale
3. Slobodni androgen indeks (FAI) je izračunat iz ukupnog testosterona i SHBG, uz pomoć formule $[FAI = \text{Testosteron (nmol/L)} \times 100 / \text{SHBG (nmol/L)}]$, a vrednost > 8 smatrana je povišenom (Yasmin i sar, 2013)
4. Insulinska rezistencija (IR) određena je na osnovu modela homeostaze HOMA-IR
 $HOMA-IR = \text{insulin (mU/L)} \times \text{glukoza (mmol/L)} / 22.5$ (Matthews i sar., 1985)
5. IGI - Insulinogeni indeks u 60-om minutu OGTT, kao pokazatelj odgovora β ćelija na opterećenje glukozom
 $IGI = I_{60'} - I_{0'} (mIU/L) / [G_{60'} - G_{0'} (mmol/L)]$
6. Indeks osjetljivosti na insulin Matsuda

$ISI_{(Matsuda)} = 10000/\sqrt{\text{(srednja vrednost glukoze tokom OGTT (mg/dL) x srednja vrednost insulina tokom OGTT (mU/L) (Matsuda i DeFronzo, 1999)}}$

7. AUC_{glukoze} (Le Floch i sar., 1990)

$$AUC_{\text{glukoze}} = 0,5 \times (0,5 \times G0' + G30' + G60' + G90' + 0,5 \times G120')$$

8. AUC_{insulina} (Le Floch i sar., 1990)

$$AUC_{\text{insulina}} = 0,5 \times (0,5 \times I0' + I30' + I60' + I90' + 0,5 \times I120')$$

3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza urađena je pomoću Statističkog paketa za softver (*SPSS, verzija 17.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois, SAD*). Dobijeni rezultati su obrađeni i analizirani primenom deskriptivne statistike za opis podataka i eksplorativne analize za analizu grupe. Za procenu normalnosti raspodele varijabli korišten je Kolmogorov-Smirnov test. Parametarske kontinuirane varijable prikazane su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) a neparametarske kao srednja vrijednost (minimum - maksimum). Za poređenje podataka među grupama, prema potrebi, korišćeni su parametarski t-test i neparametarski Mann-Whitney-ov test. Korelacija različitih varijabli određivana je pomoću Pearsonovog koeficijenta za parametarske varijable ili Spearmanovog koeficijenta za neparametrijske varijable. Područje ispod krive AUC izračunato je prema trapezoidnoj metodi pomoću programa Microsoft Excel. Kako bi se dodatno analizirala povezanost antropometrijskih i lipidnih parametara s koncentracijama hs-CRP i fibrinogena kod pacijentkinja sa PCOS i kod zdravih adolescentkinja iz kontrolne grupe, izračunate su krive operativnih karakteristika (*eng. receiver operating characteristics, ROC*). Verovatnoća manja od 0,05 se smatrala statistički značajnom, dok je verovatnoća manja od 0,01 bila visoko statistički značajna. Obrađeni podaci i dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Za potrebe ovog istraživanja, u studiju je bilo uključeno trideset i pet adolescentkinja, kojima je na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" dijagnostikovano sindrom policističnih jajnika (PCOS), i sedamnaest zdravih adolescentkinja. Grupa adolescentkinja sa PCOS po uvođenju terapije podeljena je u dve podgrupe. Prvu je činilo 17 ispitanica koje su lečene sa 30 µg etinilestradiola i 3 mg drospirenona (Yasmin[®]), od kojih je 15 završilo ispitivanje. Drugu podgrupu činilo je 18 ispitanica, lečenih sa 20 µg etinilestradiola i 3 mg drospirenona (Yaz[®]), od kojih je 16 završilo ispitivanje.

4.1. KLINIČKE, BIOHEMIJSKE, HORMONSKE I ULTRAZVUČNE KARAKTERISTIKE ISPITANICA

U ispitivanoj grupi od 52 devojke adolescentnog uzrasta analizirani su anketom dobijeni anamnestički podaci, iz lične i porodične anamneze. Sve ispitanice su rođene u terminu. Vrednosti porođajnih težina ispitanica se nisu statistički značajno razlikovale ($p=0,961$), kao ni Apgar skor ($p=0,285$). Adolescentkinje sa PCOS imale su statistički značajno manju porođajnu dužinu: 51 cm (opseg 47-55) u odnosu na devojke u kontrolnoj grupi: 52 cm (opseg 48-57) - ($p=0,036$). Sve ispitanice su imale uredan psihomotorni razvoj. Niti jedna ispitanica ne puši cigarete i nema naviku konzumiranja alkohola.

Petnaest ispitanica sa PCOS u porodici imaju obolele od tip 2 diabetes mellitusa (48,4%), kao i jedanaest ispitanica iz kontrolne grupe (64,7%). Iako dva ili više bliskih srodnika obolelih od tip 2 diabetes mellitusa ima 7 ispitanica sa PCOS i samo 2 ispitanice

iz kontrolne grupe, među grupama nije otkrivena statistički značajna razlika u pojavi tip 2 diabetes mellitusa u porodici ($p=0,470$).

Uzrast nastupanja menarhe kod ispitanica se kretao od 9,5 do 14 godina, a među grupama nije otkrivena statistički značajna razlika ($p=0,221$). Sve ispitanice su postigle peti stadijum razvoja po Tanneru. Kod svih ispitanica kontrolne grupe dužina menstrualnog ciklusa se kretala od 21 do 35 dana, dok je kod adolescentkinja sa PCOS bila statistički značajno duža ($p<0,001$), (Tabela 2).

Tabela 2. Karakteristike menstrualnog ciklusa ispitanica

Menstrualni ciklus	PCOS		KONTROLA		p
	N	%	N	%	
21-35 dana	0	0	17	100	<0,001
36-60 dana	4	11,4	0	0	
2-4 meseca	13	37,2	0	0	
4-6 meseci	9	25,7	0	0	
6-12 meseci	9	25,7	0	0	
Σ	35	100	17	100	

Statističkom analizom među ispitanicama nije otkrivena značajna razlika u dužini ($p=0,204$), a ni u količini materičnog krvarenja ($p=0,567$), dok su devojke iz kontrolne grupe znatno češće imale bolna materična krvarenja ($p<0,001$). U grupi ispitanica sa PCOS tri su bile seksualno aktivne (9,7%), dok su devojke iz kontrolne grupe značajno češće stupile u seksualne odnose ($p=0,031$), šest devojaka (35,3%). Među ispitanicama ne postoji statistički značajna razlika u uzrastu prvog seksualnog odnosa ($p=0,126$), koji se u PCOS grupi ostvario u uzrastu od $17,2\pm 0,40$ godine, a u kontrolnoj grupi sa $16,4\pm 0,76$ godine. Sve seksualno aktivne devojke ostvarile su polni odnos sa samo jednim partnerom.

4.1.1. Kliničke karakteristike zdravih i adolescentkinja sa PCOS

Kliničke karakteristike ispitivanih adolescentkinja prikazane su u Tabeli 3.

Tabela 3. Kliničke karakteristike ispitanica

	PCOS (n=31)	Kontrole (n=17)	p
Uzrast, godine	16,37 ± 0,94	16,71 ± 1,11	0,251
ITM, kg/m²	22,52 ± 2,45	22,53 ± 2,69	0,982
Obim struka, cm	75,88 ± 6,42	75,23 ± 5,59	0,723
Obim kuka, cm	95,36 ± 5,61	94,80 ± 6,90	0,754
Obim struka/obim kuka	0,80 ± 0,05	0,79 ± 0,04	0,932
Akne lica, n	27 (87,1%)	4 (23,5%)	<0,001
Akne leđa, n	23 (47,9%)	0 (0%)	<0,001
Akantoza nigrikans, n	3 (9,7%)	0 (0%)	0,218
Ferriman-Gallwey skor	13,00 (9-20)	2 (1-5)	<0,001
SKP, mmHg	105 (90-130)	110 (100-120)	0,269
DKP, mmHg	65 (60-80)	70 (60-80)	0,340

Uzrast ispitanica, ITM, obim struka, obim kuka, odnos obima struka i obima kuka, prisustvo akantoze nigrikans, vrednost SKP i DKP nisu se značajno razlikovale među grupama ispitanica ($p > 0,05$). Sa druge strane akne lica i akne leđa značajno češće su bile prisutne kod pacijentkinja sa PCOS ($p < 0,001$), kao što je i F-G skor u grupi ispitanica sa PCOS bio statistički značajno viši ($< 0,001$).

4.1.2. Biohemijske karakteristike zdravih i adolescentkinja sa PCOS

Rezultati biohemijskih analiza prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Biohemijske karakteristike ispitanica

	PCOS (n=35)	Kontrole (n=17)	p
Urea, mmol/L	3,83 ± 0,89	4,03 ± 1,09	0,489
Kreatinin, µmol/L	78,46 ± 9,22	77,35 ± 8,62	0,681
Kalijum, mmol/L	4,1 (3,7-4,8)	40 (3,7-4,6)	0,992
Natrijum, mmol/L	140 (137-142)	140 (138-142)	0,896
AST, IJ/L	15 (11-30)	16 (10-26)	0,937
ALT, IJ/L	11 (5-36)	14 (8-18)	0,652
Glikemija, mmol/L	4,47 ± 0,89	4,79 ± 0,36	0,164
HbA1c, %	4,93 ± 0,27	4,95 ± 0,24	0,811
Holesterol, mmol/L	3,92 ± 0,80	3,64 ± 0,50	0,204
TC/HDL	3,13 ± 0,79	2,86 ± 0,54	0,211
HDL, mmol/L	1,29 ± 0,25	1,30 ± 0,18	0,927
HDL/trigliceridi	0,58 ± 0,23	0,55 ± 0,22	0,634
LDL, mmol/L	2,30 ± 0,73	2,03 ± 0,46	0,167
LDL/HDL	1,90 ± 0,70	1,49 ± 0,34	0,011
Trigliceridi, mmol/L	0,72 ± 0,22	0,69 ± 0,20	0,619
Fibrinogen, g/L	3,31 ± 0,71	2,47 ± 0,45	<0,001
hs-CRP, mg/L	0,60 (0,20-4,80)	0,20 (0,10-0,70)	0,001

Prosečne izmerene vrednosti uree, kreatinina, kalijuma, natrijuma, AST, ALT i HbA1c kod ispitanica sa PCOS nisu se statistički značajno razlikovale od izmerenih vrednosti u kontrolnoj grupi ($p > 0,05$). Vrednosti glikemije naše, ukupnog holesterola,

odnos TC/HDL, HDL, odnos HDL/trigliceridi, LDL i triglicerida nisu se statistički značajno razlikovali među ispitivanim grupama ($p > 0,05$). Vrednosti odnosa LDL/HDL, fibrinogena i hs-CRP bile su statistički značajno više u grupi adolescentkinja sa PCOS ($p = 0,011$; $p < 0,001$ i $p = 0,001$; redom) u odnosu na kontrolnu grupu.

4.1.3. Hormonski status zdravih i adolescentkinja sa PCOS

Vrednosti dobijene analizom hormonskog statusa prikazane su u Tabeli 5.

Tabela 5. Hormonski status adolescentkinja sa PCOS i zdravih kontrola

	PCOS (n=35)	Kontrole (n=17)	p
FSH, U/L	5,10 ± 1,38	5,56 ± 1,31	0,255
LH, U/L	13,59 ± 4,34	4,97 ± 2,28	<0,001
Prolaktin, mU/L	318,19 ± 90,61	365,86 ± 96,95	0,096
Estradiol, pmol/L	119,16 ± 55,41	109 ± 62,73	0,565
Bazalni insulin, mU/L	9,35 ± 4,11	9,34 ± 5,11	0,993
Progesteron, nmol/L	2,52 ± 1,28	32,29 ± 9,86	<0,001
Testosteron, nmol/L	2,06 ± 0,48	0,72 ± 0,28	<0,001
FAI	12,43 ± 7,86	2,64 ± 1,57	<0,001
17 OHP, nmol/L	4,87 ± 2,14	5,17 ± 1,88	0,632
Androstenedion, ng/mL	1,92 ± 0,34	1,71 ± 0,43	0,068
DHEAS, nmol/L	6,84 ± 2,64	4,69 ± 1,95	0,004
SHBG, nmol/L	21,56 ± 10,14	33,60 ± 14,40	<0,001

Vrednosti FSH, prolaktina, estradiola, bazalnog insulina, 17 OHP i androstenediona nisu se među grupama razlikovali ($p > 0,05$) dok su se LH, progesteron, testosteron, FAI, DHEAS i SHBG visoko statistički značajno razlikovali među ispitivanim grupama ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,007$ i $p < 0,001$; redom).

4.1.4. Ultrazvučne karakteristike zdravih i adolescentkinja sa PCOS

U ispitivanoj grupi od 52 devojke adolescentnog uzrasta urađen je ultrazvučni pregled male karlice transabdominalnom sondom, a 6 meseci kasnije pregled je bio ponovljen kod 31 ispitanice sa PCOS-om, posle primene ordinirane terapije. Karakteristike ultrazvučnog nalaza prikazane su u Tabeli 6.

Među ispitanicama dobijena je statistički značajna razlika u debljini endometrijuma koji je bio deblji u kontrolnoj grupi ($p=0,002$), kao i statistički značajno veća zapremina jajnika i češće prisustvo zadebljane strome jajnika u grupi adolescentkinja sa PCOS ($p<0,001$; $p<0,001$).

Tabela 6. Karakteristike ultrazvučnog nalaza male karlice ispitanica

	PCOS (n=35)	Kontrole (n=17)	p
Zapremina materice, ml	3,83 ± 0,89	4,03 ± 1,09	0,489
Debljina endometrijuma, mm	4,16 ± 2,74	6,94 ± 2,83	0,002
Zapremina jajnika, ml	15,89 (10,44-25,12)	6,21 (3,40-8,46)	<0,001
Odjek strome, prisutan	81%	0%	<0,001

4.1.5. Povezanost biomarkera inflamacije sa antropometrijskim, biohemijskim i hormonskim parametrima zdravih adolescentkinja i adolescentkinja sa PCOS

Korelacije između hs-CRP i fibrinogena s antropometrijskim i lipidnim parametrima među pacijentkinjama sa PCOS i kontrolama prikazane su u Tabeli 7. Kod pacijentkinja sa PCOS utvrđene su značajne pozitivne korelacije između hs-CRP i ITM ($r=0,672$; $p<0,001$), OS ($r=0,543$; $p<0,001$), OK ($r=0,623$; $p<0,001$) i odnosom LDL/HDL ($r=0,377$; $p=0,044$), dok je hs-CRP negativno korelirao sa HDL ($r=-0,376$; $p=0,044$).

Fibrinogen je pozitivno korelirao sa ITM ($r=0,486$; $p=0,006$), OS ($r=0,432$; $p=0,015$), LDL ($r=0,395$; $p=0,037$) i odnosom LDL/HDL ($r=0,380$; $p=0,046$).

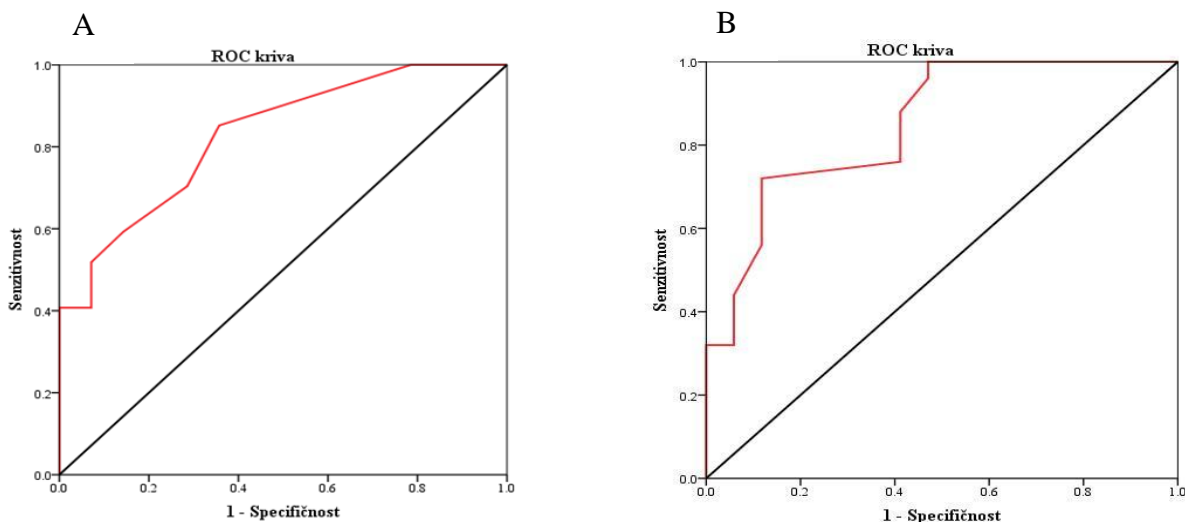
Sa druge strane u kontrolnoj grupi, hs-CRP pozitivno je korelirao sa OS ($r=0,624$; $p=0,007$) dok je fibrinogen pozitivno korelirao s graničnom statističkom značajnošću sa ITM ($r=0,478$; $p=0,052$).

Tabela 7. Povezanost hs-CRP i fibrinogena sa antropometrijskim i lipidnim parametrima

	hs-CRP		Fibrinogen	
	rho	p	r/rho	p
ITM, kg/m² ^a	0,672	<0,001	0,486	0,006
OS, cm	0,543	0,002	0,432	0,015
OK, cm	0,623	<0,001	0,297	0,105
OS/OK	0,285	0,120	0,323	0,076
Holesterol, mmol/L	0,228	0,217	0,346	0,066
TC/HDL	0,288	0,117	0,237	0,199
HDL, mmol/L	-0,376	0,044	-0,108	0,563
HDL/trigliceridi	0,257	0,162	0,233	0,208
LDL, mmol/L	0,383	0,037	0,395	0,037
LDL/HDL	0,377	0,044	0,380	0,046
Trigliceridi, mmol/L	0,294	0,195	0,054	0,775

^aPearson-ov koeficijent korelacije (r) korišćen je za ITM, Spearman-ov (rho) za sve ostale varijable

ROC analizom hs-CRP dobijena je granična vrednost od 0,35 mg/L sa senzitivnošću od 70,4% i specifičnošću od 71,45% ($p=0,001$) dok je za fibrinogen granična vrednost iznosila 2,8 g/L sa senzitivnošću 72% i specifičnošću 88,2% ($p<0,001$), (Grafikon 1).



Grafikon 1. ROC kriva za hs-CRP (A) i fibrinogen (B)

*A Prag specifičnosti 71,45% i senzitivnosti 70,4% ($p=0,001$) za hs-CRP;

*B Prag specifičnosti 88,2% i senzitivnosti 72% ($p<0,001$) za fibrinogen

Antropometrijski i lipidni parametri adolescentkinja sa PCOS i kontrola poređeni su između podgrupa definisanih na osnovu graničnih vrednosti hs-CRP i fibrinogena, dobijenih ROC analizom.

U obe ispitivane grupe, i adolescentkinja sa PCOS i kontrola, vrednosti OS i OK bile su značajno veće u podgrupama sa hs-CRP iznad 0,35 mg/L u odnosu na ispitanice čije su vrednosti hs-CRP bile niže od 0,35 mg/L ($p<0,05$).

Adolescentkinje sa PCOS i hs-CRP iznad 0,35 mg/L imale su veće ITM i LDL u odnosu na adolescentkinje sa PCOS i hs-CRP nižim od 0,35 mg/L ($p<0,001$), (Tabela 8).

U odnosu na fibrinogen, vrednosti ITM i odnosa LDL/HDL, kao i koncentracije ukupnog holesterola i LDL bile su značajno više u pacijentkinja sa PCOS i fibrinogenom višim od 2,8 g/L ($p=0,025$; $p=0,037$; $p=0,012$; $p=0,048$; redom), (Tabela 9).

Tabela 8. Antropometrijski i lipidni parametri u odnosu na hs-CRP *cut-off* od 0,35 mg/L

		PCOS	p		Kontrole	p
ITM, kg/m²	>	24,33 (19,00-26,29)	0,024	>	23,52 (20,36-26,26)	0,143
	<	20,71 (18,73-24,11)		<	21,10 (17,59-26,29)	
OS, cm	>	79,50 ± 4,75	0,002	>	79,64 ± 2,27	0,001
	<	72,83 ± 5,83		<	72,15 ± 5,15	
OK, cm	>	98,10 ± 5,34	0,007	>	98,71 ± 6,99	0,046
	<	93,04 ± 3,44		<	92,05 ± 5,64	
OS/OK	>	0,81 ± 0,04	0,080	>	0,81 ± 0,47	0,288
	<	0,78 ± 0,05		<	0,78 ± 0,36	
Holesterol, mmol/L	>	3,91 ± 0,63	0,107	>	3,71 ± 0,57	0,653
	<	3,55 ± 0,46		<	3,59 ± 0,47	
TC/HDL	>	3,25 ± 0,72	0,328	>	2,95 ± 0,53	0,569
	<	2,95 ± 0,90		<	2,79 ± 0,57	
HDL, mmol/L	>	1,24 ± 0,21	0,117	>	1,27 ± 0,18	0,653
	<	1,38 ± 0,26		<	1,31 ± 0,19	
HDL/TG	>	0,59 ± 0,18	0,776	>	0,62 ± 0,23	0,325
	<	0,57 ± 0,31		<	0,51 ± 0,21	
LDL, mmol/L	>	2,41 ± 0,62	<0,001	>	2,09 ± 0,50	0,660
	<	1,91 ± 0,40		<	1,98 ± 0,45	
LDL/HDL	>	1,98 ± 0,65	0,439	>	1,54 ± 0,33	0,618
	<	1,77 ± 0,80		<	1,45 ± 0,36	
Trigliceridi, mmol/L	>	0,73 ± 0,16	0,899	>	0,76 ± 0,20	0,194
	<	0,71 ± 0,30		<	0,64 ± 0,18	

Tabela 9. Antropometrijski i lipidni parametri u odnosu na fibrinogen *cut-off* od 2,8 g/L

		PCOS	P		Kontrole	p
ITM, kg/m²	>	24,14 (20,08-26,29)	0,025	>	25,01 (24,51-25,51)	0,180
	<	21,34 (18,73-25,56)		<	22,18 (17,59-26,29)	
OS, cm	>	78,64 ± 5,08	0,063	>	80,00 ± 2,83	0,210
	<	74,54 ± 6,72		<	74,60 ± 5,62	
OK, cm	>	97,47 ± 3,81	0,099	>	99,50 ± 0,00	0,320
	<	94,31 ± 6,52		<	94,17 ± 7,13	
OS/OK	>	0,81 ± 0,04	0,323	>	0,80 ± 0,03	0,837
	<	0,79 ± 0,05		<	0,79 ± 0,04	
Holesterol, mmol/L	>	3,99 ± 0,59	0,012	>	3,91 ± 0,78	0,429
	<	3,43 ± 0,43		<	3,60 ± 0,52	
TC/HDL	>	3,24 ± 0,70	0,399	>	3,41 ± 0,73	0,127
	<	2,99 ± 0,91		<	2,78 ± 4,98	
HDL, mmol/L	>	1,27 ± 0,28	0,684	>	1,17 ± 0,23	0,315
	<	1,31 ± 0,22		<	1,31 ± 0,18	
HDL/TG	>	0,62 ± 0,22	0,292	>	0,85 ± 0,33	0,033
	<	0,53 ± 0,24		<	0,51 ± 0,18	
LDL, mmol/L	>	2,45 ± 0,50	0,048	>	2,30 ± 0,22	0,382
	<	2,00 ± 0,64		<	1,99 ± 0,47	
LDL/HDL	>	2,01 ± 0,61	0,037	>	1,62 ± 0,22	0,706
	<	1,51 ± 0,56		<	1,48 ± 0,35	
Trigliceridi, mmol/L	>	0,75 ± 0,18	0,341	>	0,96 ± 0,19	0,028
	<	0,68 ± 0,27		<	0,65 ± 0,17	

4.2. BIOHEMIJSKE I HORMONSKE PROMENE TOKOM OGTT

Tokom standardnog OGTT merene su vrednosti glukoze i insulina u 0, 30, 60, 90 i 120-om minutu, dok su vrednosti ukupnih proteina, albumina, bilirubina i mokraćne kiseline, kao i parametri antioksidantne zaštite određivani u nultom i stodvadesetom minutu testa. U Tabeli 10 prikazane su vrednosti glukoze i insulina izmerenih tokom OGTT kod pacijentkinja sa PCOS i u kontrolnoj grupi, koje se nisu statistički značajno razlikovale ($p > 0,05$).

Tabela 10. Vrednosti glukoze i insulina tokom OGTT

	PCOS (n=35)	Kontrole (n=17)	p
Glukoza: 0' (mmol/L)	4,47 ± 0,89	4,79 ± 0,36	0,164
Glukoza: 30' (mmol/L)	7,25 ± 1,14	7,20 ± 0,87	0,870
Glukoza: 60' (mmol/L)	7,12 ± 1,52	6,58 ± 1,06	0,198
Glukoza: 90' (mmol/L)	6,44 ± 1,40	5,66 ± 1,07	0,050
Glukoza: 120' (mmol/L)	5,61 ± 1,16	5,50 ± 0,72	0,672
Insulin: 0' (mU/L)	9,35 ± 4,11	9,34 ± 5,11	0,993
Insulin: 30' (mU/L)	85,73 ± 38,50	79,96 ± 42,06	0,625
Insulin: 60' (mU/L)	98,22 ± 48,56	78,88 ± 45,38	0,175
Insulin: 90' (mU/L)	91,61 ± 51,21	66,14 ± 33,40	0,068
Insulin: 120' (mU/L)	73,46 ± 43,69	61,53 ± 35,51	0,333

Prosečne vrednosti ukupnih proteina i albumina izmerene kod ispitanica sa PCOS i u kontrolnoj grupi na početku i na kraju OGTT nisu se statistički značajno razlikovale ($p > 0,05$), dok su vrednosti bilirubina izmerene i na početku i na kraju OGTT bile statistički značajno više u grupi ispitanica sa PCOS ($p = 0,049$ i $p = 0,044$; redom), (Tabela 11).

Tabela 11. Serumske koncentracije proteina, albumina i bilirubina tokom OGTT

	PCOS (n=35)	Kontrole (n=17)	p
Proteini: OGTT 0' (g/L)	70,49 ± 3,66	68,65 ± 4,29	0,114
Proteini: OGTT 120' (g/L)	69,03 ± 3,18	67,06 ± 3,17	0,041
Albumini: OGTT 0' (g/L)	46,14 ± 2,32	45,88 ± 2,64	0,718
Albumini: OGTT 120' (g/L)	46,0 (37-50)	45,0 (40-50)	0,836
Bilirubin: OGTT 0' (µmol/L)	10,20 (3,4-20,8)	7,2 (2,9-17,10)	0,049
Bilirubin: OGTT 120' (µmol/L)	8,2 (3,2-19,2)	5,6 (3,7-15,2)	0,044

Izmerene vrednosti pokazatelja insulinske osetljivosti i insulinske rezistencije, kao i AUC glukoze i AUC insulina izmerenih tokom OGTT kod pacijentkinja sa PCOS i u kontrolnoj grupi nisu se statistički značajno razlikovali ($p > 0,05$), (Tabela 12).

Tabela 12. Vrednosti pokazatelja insulinske osetljivosti i insulinske rezistencije

	PCOS (n=35)	Kontrole (n=17)	p
HOMA-IR	1,93 ± 0,96	1,98 ± 1,02	0,825
HOMA-β	188,73 ± 129,50	250,12 ± 417,34	0,427
IGI	41,32 ± 62,24	15,02 ± 103,11	2,258
ISI (Matsuda)	4,93 ± 2,35	5,27 ± 2,55	0,636
AUC glukoze	12,98 ± 1,93	12,27 ± 1,65	0,196
AUC insulina	157,80 ± 66,38	131,62 ± 51,61	0,160

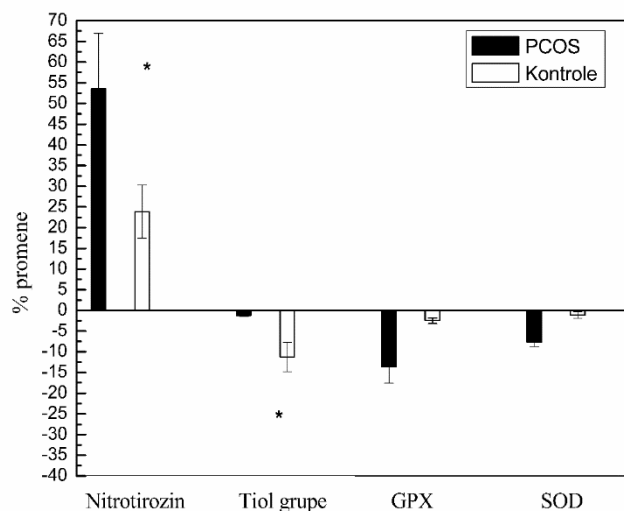
4.3. PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA

Izmerene vrednosti parametara oksidativnog statusa (tiol grupe, nitrotirozin-indirektni marker peroksinitritne produkcije i mokraćne kiseline), kao i aktivnost antioksidantnih enzima GPX i SOD, kod pacijentkinja sa PCOS i u kontrolnoj grupi prikazani su u Tabeli 13. Nije zabeležena značajna razlika u aktivnosti antioksidanata GPX i SOD, niti u koncentraciji nitrotirozina i tiol grupa, kao markera oksidativnog oštećenja proteina između ispitivanih grupa ($p>0,05$).

Tabela 13. Parametri oksidativnog stresa i aktivnosti antioksidantnih enzima kod adolescentkinja sa PCOS i zdravih kontrola

	PCOS (n=35)	Kontrole (n=17)	p
Tiol grupe ($\mu\text{mol/L}$)	10,25 \pm 3,83	10,21 \pm 2,21	0,967
Nitrotirozin (nmol/L)	84,31 \pm 43,02	63,79 \pm 33,46	0,215
Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/L}$)	253,70 \pm 41,21	258,40 \pm 20,51	0,600
GPX (U/L)	494,00 \pm 140,36	505,76 \pm 100,90	0,759
SOD (U/L)	106,96 \pm 24,22	104,27 \pm 19,44	0,711

Akutna hiperglikemija tokom OGTT indukovala je promenu oba parametra oksidativnog oštećenja proteina i aktivnosti GPX enzima kod pacijentkinja sa PCOS i u kontrolnoj grupi. Kako je prikazano na Grafikonu 2, kao odgovor na oralni test opterećenja glukozom, procenat promene oba parametra oksidativnog oštećenja proteina značajno je promenjen kod adolescentkinja sa PCOS u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0,05$). Naime, procenat promene nitrotirozina bio je znatno veći, dok je promena sadržaja tiolnih grupa, kao žrtveni protein antioksidant, bio znatno niži u adolescentkinja sa PCOS. Međutim, promena aktivnosti SOD i GPX nije dostigla statističku značajnost među ispitivanim grupama ($p>0,05$).



Grafikon 2. Procenat promene koncentracije nitrotirozina, tiol grupa i aktivnosti GPX i SOD tokom OGTT kod adolescentkinja sa PCOS i zdravih kontrola

* Statistički značajna razlika ($p < 0,05$)

U Tabeli 14 prikazani su rezultati korelacije markera oksidativnog stresa, odnosno procenta njihovih promena do kojih je došlo poređenjem vrednosti na početku i na kraju OGTT, i hormona kod pacijentkinja sa PCOS. Statistički značajna korelacija uočena je za LH, testosteron, FAI, androstenedion i DHEAS sa nitrotirozinom ($p=0,036$; $p=0,020$; $p=0,020$; $p=0,006$ i $p=0,028$; redom) kao i DHEAS i AUC glukoze sa tiol grupama ($p=0,014$ i $p=0,043$; redom). AUC insulina korelirao je pozitivno sa GPX, dok je LH statistički značajno korelirao sa SOD ($p < 0,001$).

U Tabeli 15 prikazani su rezultati dobijeni korelacijom pokazatelja insulinske rezistencije (HOMA-IR, HOMA- β , IGI i $ISI_{(Matsuda)}$) i hormona u grupi devojaka sa PCOS. Pronađena je značajna inverzna korelacija za ISI i LH ($r=-0,359$; $p=0,034$).

Tabela 14. Povezanost procenta promena markera oksidativnog stresa i hormonskog statusa adolescentkinja sa PCOS

Procentat promene								
	Nitrotirozin		Tiol groupe		GPX		SOD	
	r	p	r	p	r	p	r	p
FSH	-0,069	0,759	0,080	0,659	-0,207	0,232	0,072	0,762
LH	0,496	0,036	0,068	0,697	-0,180	0,300	0,731	<0,001
T*	0,493	0,020	-0,024	0,890	-0,020	0,908	0,016	0,947
SHBG	-0,365	0,095	0,172	0,338	0,065	0,711	0,067	0,752
FAI	0,491	0,020	0,020	0,913	0,085	0,626	0,078	0,743
A**	0,568	0,006	-0,041	0,819	-0,304	0,076	-0,029	0,902
DHEAS	0,469	0,028	-0,425	0,014	-0,318	0,062	0,123	0,604
AUC_{glukoze}	0,083	0,713	-0,344	0,043	-0,100	0,566	-0,063	0,764
AUC_{insulina}	0,285	0,198	0,110	0,531	-0,338	0,047	0,373	0,106

* Testosteron; ** Androstenedion

Tabela 15. Povezanost pokazatelja insulinske rezistencije i hormonskog statusa adolescentkinja sa PCOS

	Testosteron		FSH		LH		DHEAS		SHBG	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
HOMA-IR	0,122	0,485	0,157	0,368	0,012	0,947	-0,072	0,680	-0,167	0,336
HOMA-β	0,032	0,855	0,201	0,247	0,137	0,434	-0,054	0,757	0,051	0,772
IGI	0,132	0,450	0,150	0,389	0,118	0,501	-0,077	0,662	-0,276	0,109
ISI_(Matsuda)	-0,173	0,321	-0,176	0,311	-0,359	0,034	-0,095	0,588	0,197	0,256

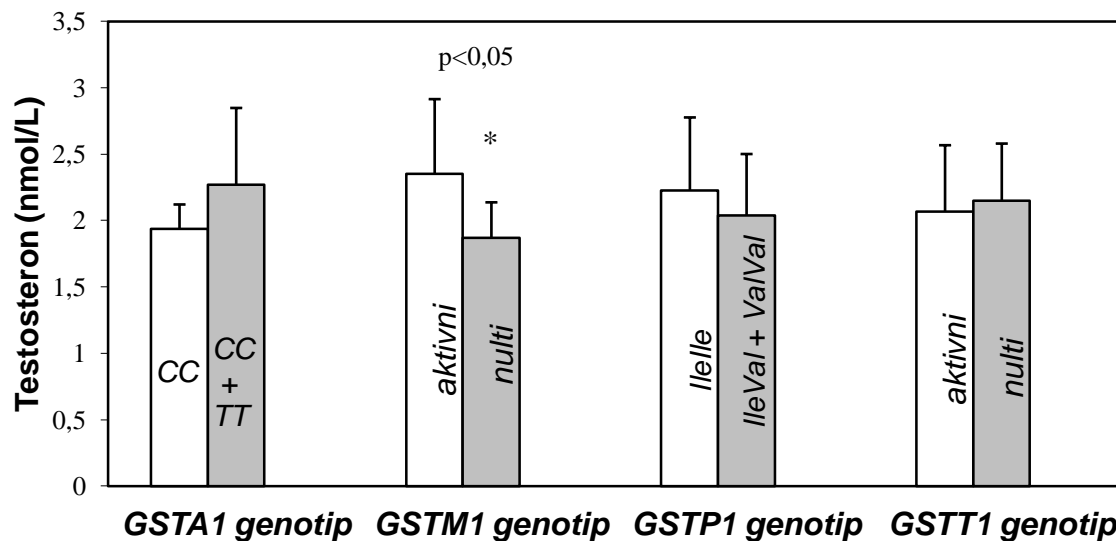
4.4. GENETSKI POLIMORFIZAM GLUTATION S-TRANSFERAZA

Distribucija četiri zajednička GST polimorfizma (GSTA1, GSTM1, GSTP1 i GSTT1) u adolescentkinja sa PCOS i u kontrolnoj grupi prikazana je u Tabeli 16. Kao što je prikazano, razlika u učestalosti različitih GST genotipova između ispitivanih grupa nije bila statistički značajna ($p > 0,05$). Tačnije, delecijски polimorfizmi GSTM1 i GSTT1 posledično dovode do potpune odsutnosti specifične enzimske aktivnosti u *GSTM1-nultoj* ili *GSTT1-nultoj* podjedinci, dok nosioci *GSTM1-aktivnog* ili *GSTT1-aktivnog* genotipa imaju potpuno aktivan enzim. Polimorfizmi jednog nukleotida GSTA1 i GSTP1 mogu rezultirati nižom ekspresijom enzima u slučaju GSTA1-varijante ili promenjenom enzimskom aktivnošću u GSTP1-varijantnim nositeljima genotipa.

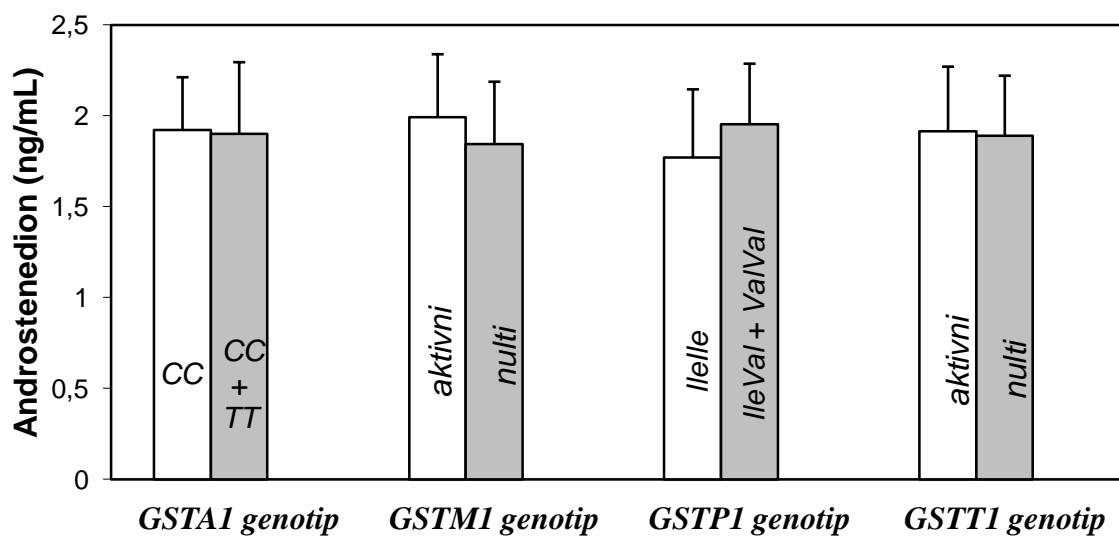
Tabela 16. Distribucija GST polimorfizma (GSTA1, GSTM1, GSTP1 i GSTT1) u adolescentkinja sa PCOS i u kontrolnoj grupi

Varijable	PCOS (n, %)	Kontrole (n, %)	p
<i>GSTA1</i>			
<i>CC (aktivni)</i>	15 (44,1)	3 (17,6)	0,062
<i>CT+TT (snižene aktivnosti)</i>	19 (55,9)	14 (82,4)	
<i>GSTM1</i>			
<i>aktivni</i>	15 (44,1)	10 (58,8)	0,322
<i>nulti</i>	19 (55,9)	7 (41,2)	
<i>GSTP1</i>			
<i>IleIle (referentni)</i>	8 (23,5)	1 (6,2)	0,138
<i>IleVal+ValVal (varijantni)</i>	26 (76,5)	15 (93,8)	
<i>GSTT1</i>			
<i>aktivni</i>	28 (82,4)	11 (64,7)	0,161
<i>nulti</i>	6 (17,6)	6 (35,3)	

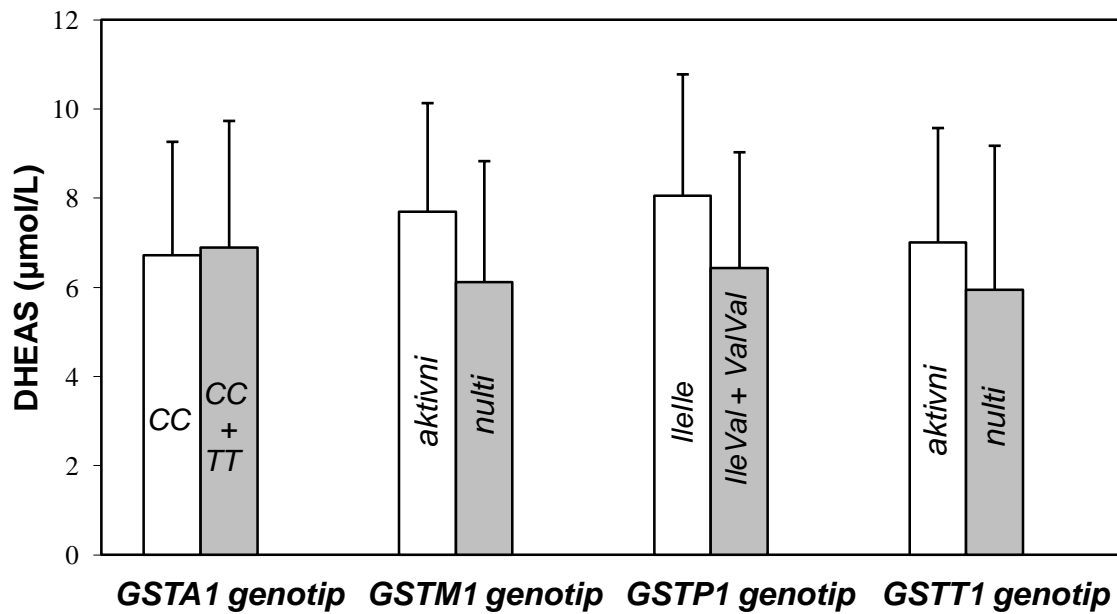
Dobijeni rezultati hormonskih analiza kod devojaka sa PCOS (testosteron, androstenedion, DHEAS, progesteron) stratifikovani su prema GST genotipu i prikazani su na grafikonima 3A-3D. Adolescentkinje sa PCOS-om, nositeljci *GSTM1-nultog* genotipa, pokazale su značajno niže koncentracije testosterona u odnosu na one sa *GSTM1-aktivnim* genotipom ($p<0,05$), (Grafikon 3A).



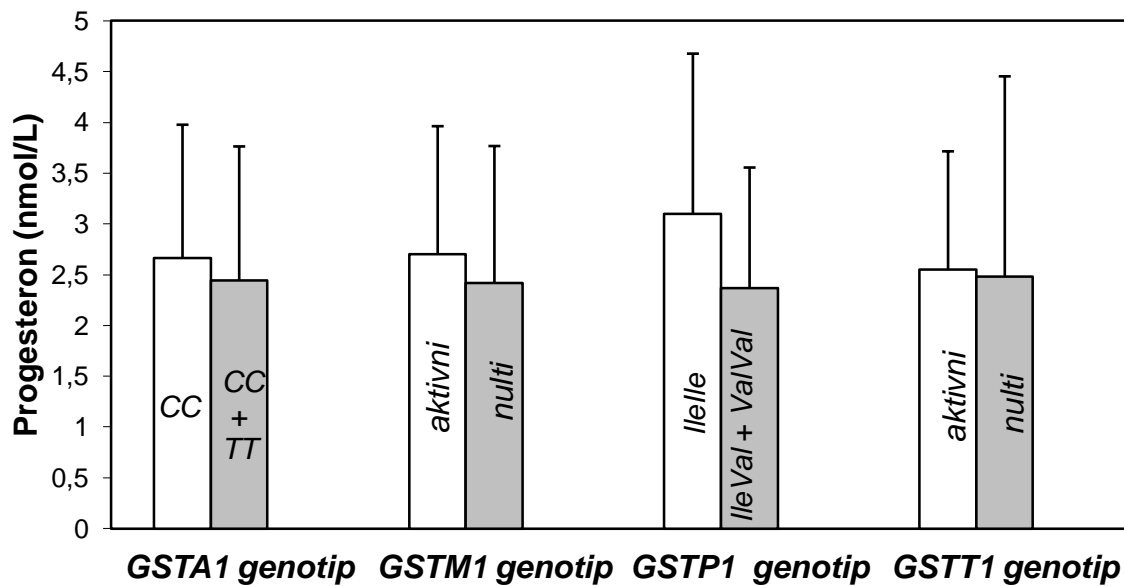
Grafikon 3A. Koncentracije testosterona stratifikovane prema GST genotipu pacijentkinja sa PCOS



Grafikon 3B. Koncentracije androstenediona stratifikovane prema GST genotipu pacijentkinja sa PCOS



Grafikon 3C. Koncentracije DHEAS stratifikovane prema GST genotipu pacijentkinja sa PCOS



Grafikon 3D. Koncentracije progesterona stratifikovane prema GST genotipu pacijentkinja sa PCOS

4.5. KLINIČKE, BIOHEMIJSKE, HORMONSKE I ULTRAZVUČNE KARAKTERISTIKE ISPITANICA POSLE SPROVEDENE ŠESTOMESEČNE TERAPIJE

Pacijentkinje sa PCOS su šest meseci primenjivale određenu OHK pilulu i kod svih njih je došlo do regulacije menstrualnog ciklusa čija je dužina iznosila 28 dana i kod obe grupe bila statistički značajno različita u odnosu na početak lečenja ($p=0,001$). Kliničke karakteristike adolescentkinja sa PCOS, pre i posle terapije, prikazane su u Tabeli 17.

Tabela 17. Kliničke karakteristike adolescentkinja sa PCOS stratifikovanih prema primenjenoj OHK

	PRVA GRUPA ^a			DRUGA GRUPA ^b		
	Pre Th	Posle Th	p	Pre Th	Posle Th	p
TM, kg	65,88±7,63	67,05±8,05	0,128	60,83±6,27	60,73±5,62	0,892
ITM, kg/m²	23,77±1,89	24,19±1,89	0,133	20,09±2,36	22,05±2,16	0,896
OS, cm	79,10±5,73	78,83±7,35	0,795	74,87±5,82	73,18±5,53	0,040
OK, cm	98,06±5,51	99,46±6,06	0,220	94,34±4,41	95,56±4,16	0,261
OS/OK	0,80±0,05	0,79±0,03	0,166	0,79±0,41	0,76±0,04	0,001
Akne lica, n	13	0	<0,001	14	0	<0,001
Akne leđa, n	12	0	<0,001	11	0	0,001
F-G skor	12 (9-19)	9 (5-15)	0,001	13,87±3,09	10,56±3,09	<0,001
SKP, mmHg	107,3 (100-130)	100,0 (90-120)	0,167	106,56 (90-125)	105,62 (90-120)	0,596
DKP, mmHg	67,0 (60-80)	60,0 (50-70)	0,031	66,25 (60-75)	67,18 (60-80)	0,748

^a **PRVAGRUPA** - lečena OHK pilulom sa 30 µg etinilestradiola i 3 mg drospirenona

^b **DRUGA GRUPA** - lečena OHK pilulom sa 20 µg etinilestradiola i 3 mg drospirenona

Telesna masa pacijentkinja prve grupe, njihov ITM, OS, OK, OS/OK kao i sistolni krvni pritisak nisu se posle sprovedene terapije statistički značajno razlikovali od vrednosti dobijenih pre započinjanja terapije ($p > 0,05$). Kod pacijentkinja druge grupe posle sprovedene terapije nije registrovana promena TM, ITM, OK, sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska ($p > 0,05$), ali je izmeren statistički značajno manji OS ($p = 0,040$) i OS/OK ($p = 0,001$). U obe grupe ispitanica registrovana je statistički značajno manja pojava akni na licu i na leđima, kao i statistički značajno manji F-G skor ($p \leq 0,001$).

Biohemijske karakteristike adolescentkinja sa PCOS, pre i posle terapije prikazane su u Tabeli 18.

Tabela 18. Biohemijske karakteristike adolescentkinja sa PCOS stratifikovanih prema primenjenoj OHK

	PRVA GRUPA			DRUGA GRUPA		
	Pre Th	Posle Th	p	Pre Th	Posle Th	p
Glikemija, mmol/L	4,61 ± 0,33	4,42 ± 0,22	0,082	4,54 ± 0,53	4,65 ± 0,49	0,389
Holesterol, mmol/L	4,0 (2,89-6,51)	4,56 (3,42-6,21)	0,009	3,83 (2,9-4,95)	4,18 (3,33-5,08)	0,056
HDL, mmol/L	1,22 ± 0,24	1,65 ± 0,32	<0,001	1,35 ± 0,25	1,70 ± 0,23	0,001
Holesterol/HDL	3,36 ± 0,93	2,84 ± 0,68	0,007	2,91 ± 0,57	2,48 ± 0,31	0,002
LDL, mmol/L	2,42 (1,28-4,66)	2,31 (1,06-4,19)	0,363	2,19 (1,43-3,26)	1,97 (1,27-2,70)	0,078
LDL/HDL	2,06 ± 0,84	1,47 ± 0,60	0,001	1,68 ± 0,53	1,17 ± 0,26	<0,001
Trigliceridi, mmol/L	0,79 ± 0,23	1,31 ± 0,56	0,001	0,65 ± 0,19	1,12 ± 0,42	0,001
HDL/trigliceridi	1,68 ± 0,62	1,44 ± 0,65	0,204	2,22 ± 0,72	1,69 ± 0,53	0,002
Fibrinogen, g/L	3,30 (2,4-5,6)	3,22 (2,50-4,40)	0,887	2,94 (2,1-4,2)	3,07 (2,4-3,8)	0,393
hs-CRP, mg/L	0,85 (0,2-3,20)	2,27 (0,30-6,5)	0,006	0,57 (0,1-1,6)	1,82 (0,2-5,9)	0,003

Vrednosti dobijene analizom hormonskog statusa prikazane su u Tabeli 19.

Tabela 19. Hormonske karakteristike adolescentkinja sa PCOS stratifikovanih prema primenjenoj OHK

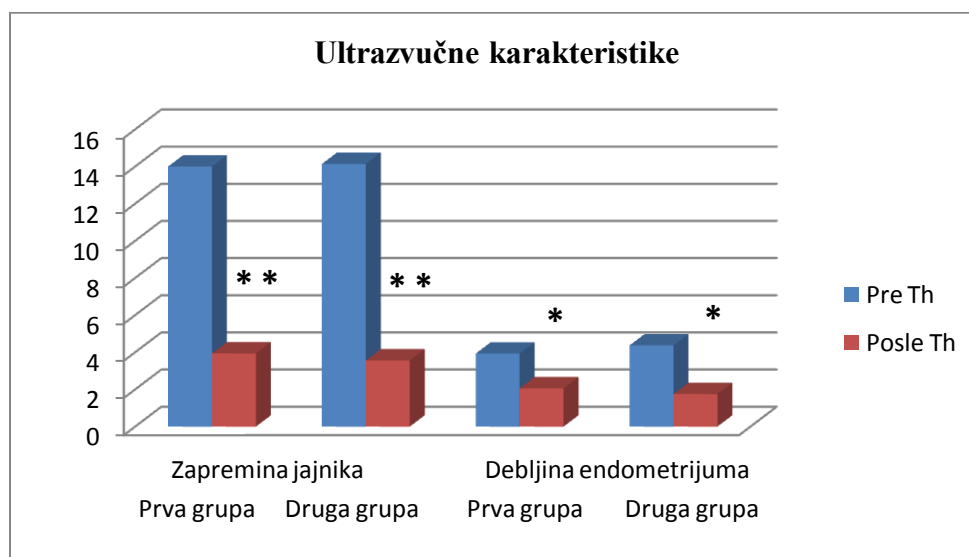
	PRVA GRUPA			DRUGA GRUPA		
	Pre Th	Posle Th	P	Pre Th	Posle Th	p
FSH, U/L	5,16 ± 1,30	1,21 ± 0,97	<0,001	5,53 ± 1,24	1,31 ± 1,08	<0,001
LH, U/L	13,73 ± 4,20	1,43 ± 1,05	<0,001	14,20 (7,10-20,20)	1,15 (0,6-3,8)	<0,001
Insulin, mU/L	10,28 ± 5,34	14,26 ± 5,26	0,016	9,04 ± 2,8	11,72 ± 5,71	0,054
Testosteron, nmol/L	2,08 ± 0,50	0,81 ± 0,42	<0,001	2,15 ± 0,49	0,73 ± 0,30	<0,001
FAI	10,67 (4,31-34,48)	0,41 (0,07-1,18)	0,001	10,21 (5,33-28,13)	0,36 (0,05-0,58)	<0,001
17 OHP, nmol/L	4,87 ± 2,14	3,70 ± 1,68	0,006	4,61 ± 1,88	3,69 ± 1,67	0,073
Androstenedion, ng/mL	1,92 ± 0,34	1,22 ± 0,36	<0,001	2,15 (1,5-2,25)	1,15 (0,65-1,9)	<0,001
DHEAS, nmol/L	6,71 ± 2,60	4,29 ± 2,50	<0,001	7,60 (2,8-10,2)	2,9 (1,7-9,60)	<0,001
SHBG, nmol/L	20,34 ± 9,30	231,95±83,89	0,006	21,42±10,36	247,13±85,89	<0,001

Prosečne izmerene vrednosti glikemije i fibrinogena, kod ispitanica prve grupe, te glikemije, holesterola, LDL holesterola i fibrinogena, kod ispitanica druge grupe, nisu se statistički značajno razlikovale od izmerenih vrednosti pre započinjanja terapije ($p > 0,05$). U obe grupe ispitanica posle sprovedenog lečenja registrovan je statistički značajan porast nivoa triglicerida i HDL holesterola ($p \leq 0,001$), kao i statistički značajan porast hs-CRP ($p = 0,006$ za prvu, odnosno $p = 0,003$ za drugu grupu). U obe grupe ispitanica porast nivoa HDL holesterola, posle sprovedenog lečenja, doveo je do statistički značajnog sniženja odnosa TC/HDL ($p = 0,007$ i $p = 0,002$) i do statistički značajnog smanjenja odnosa LDL/HDL ($p \leq 0,001$), dok je odnos HDL/triglicerida kod ispitanica druge grupe bio statistički značajno niži ($p = 0,002$). Biohemijski parametri (urea, kreatinin, kalijum, natrijum, AST, ALT i HbA_{1c}) kod ispitanica prve grupe nisu se značajno promenili

($p>0,05$), dok su kod ispitanica druge grupe izmerene značajno niže vrednosti magnezijuma, natrijuma i gvožđa ($p=0,017$; $p=0,021$; $p=0,044$; redom) kao i statistički značajno viša vrednost kreatinina ($p=0,001$).

Prosečne izmerene vrednosti prolaktina u obe grupe, kao i vrednosti 17 OHP i insulina u drugoj grupi nisu se statistički značajno razlikovale od izmerenih vrednosti pre započinjanja terapije ($p>0,05$). Posle sprovedene terapije u prvoj grupi došlo je do statistički značajnog povećanja insulina i SHBG te pada serumske vrednosti 17 OHP ($p=0,016$; $p=0,006$; $p=0,006$; redom). U obe ispitivane grupe posle sprovedene terapije registrovane su statistički značajno niže vrednosti FSH, LH, testosterona, FAI, androstenediona i DHEAS ($p\leq 0,001$), kao i statistički značajno više vrednosti SHBG u drugoj grupi ispitanica ($p<0,001$).

U obe grupe ispitanica registrovana je statistički značajno manja zapremina jajnika ($p<0,001$; $p<0,001$) i debljina endometrijuma ($p=0,025$; $p=0,004$; redom), (Grafikon 4).



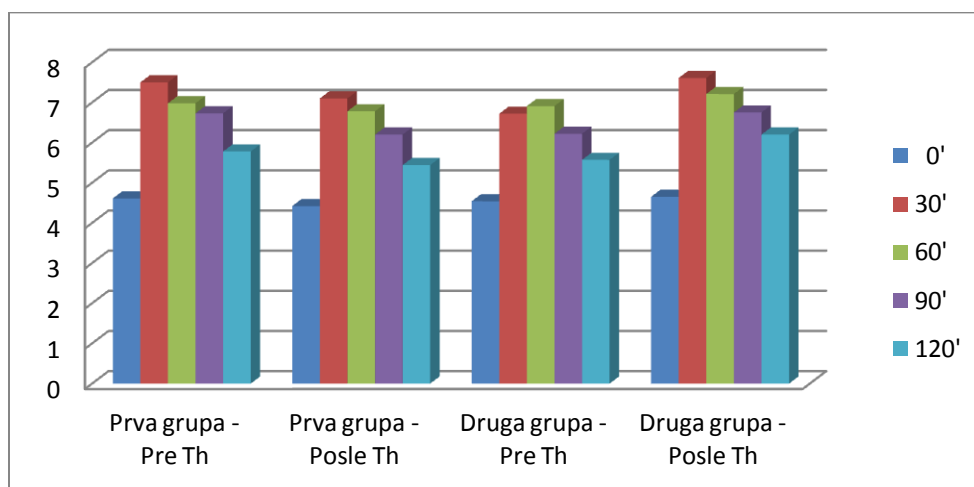
Grafikon 4. Ultrazvučne karakteristike ispitanica sa PCOS stratifikovanih prema primenjenoj OHK

* Statistički značajna razlika ($p=0,025$; $p=0,004$; redom);

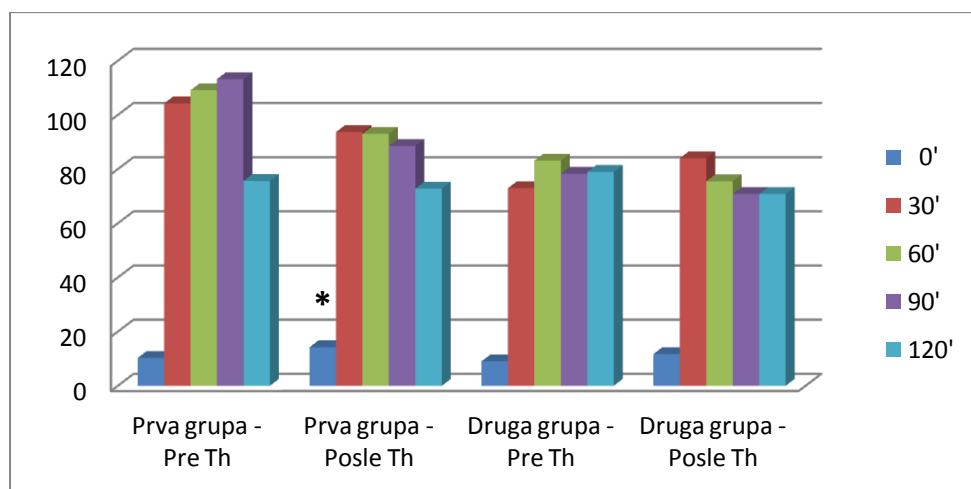
** Visoko statistički značajna razlika ($p<0,001$; $p<0,001$; redom)

4.6. PROMENE TOKOM OGTT POSLE PRIMENJENE TERAPIJE U GRUPI ADOLESCENTKINJA SA PCOS

Promene glikemija i insulinemija, kod ispitanica sa PCOS, tokom OGTT posle sprovedene terapije prikazane su na Grafikonima 5 i 6.



Grafikon 5. Vrednosti glikemija tokom OGTT, pre i posle terapije

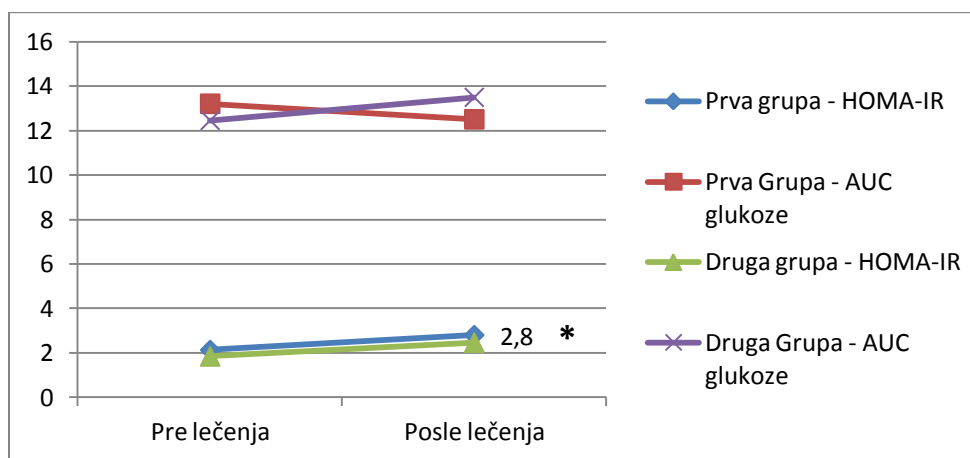


Grafikon 6. Vrednosti insulinemija tokom OGTT, pre i posle terapije

* Statistički značajna razlika ($p=0,016$)

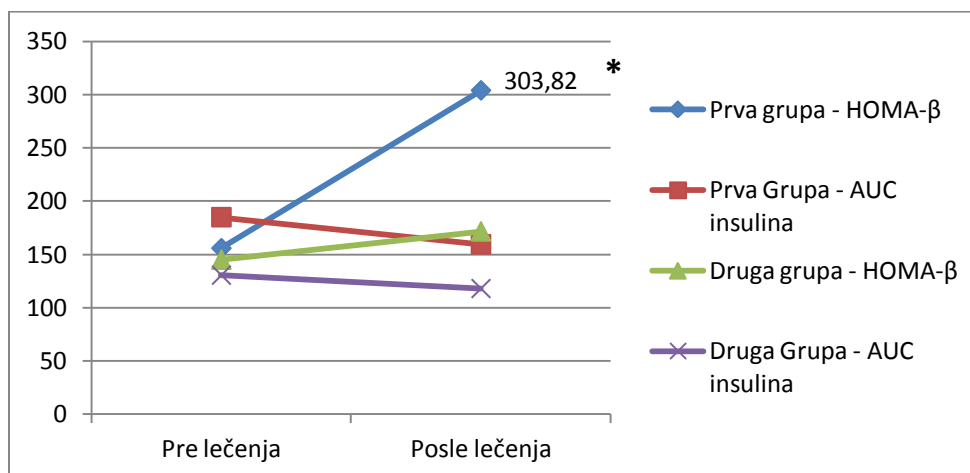
Kod ispitanica druge grupe, tokom OGTT nije uočena statistički značajna promena glikemije i insulinemije, dok je kod ispitanica prve grupe na početku OGTT registrovana statistički značajno veća vrednost bazalne insulinemije ($p=0,016$).

Porast insulina, kod ispitanica prve grupe, rezultovao je značajnim porastom HOMA-IR i HOMA- β ($p=0,045$ i $p=0,006$). Primenjena terapija kod ispitanica sa PCOS nije uticala na AUC glukoze i AUC insulina, IGI i ISI (Matsuda), ($P>0,05$), (Grafikoni 7 i 8).



Grafikon 7. Promene HOMA-IR i AUC glukoze tokom OGTT, pre i posle terapije

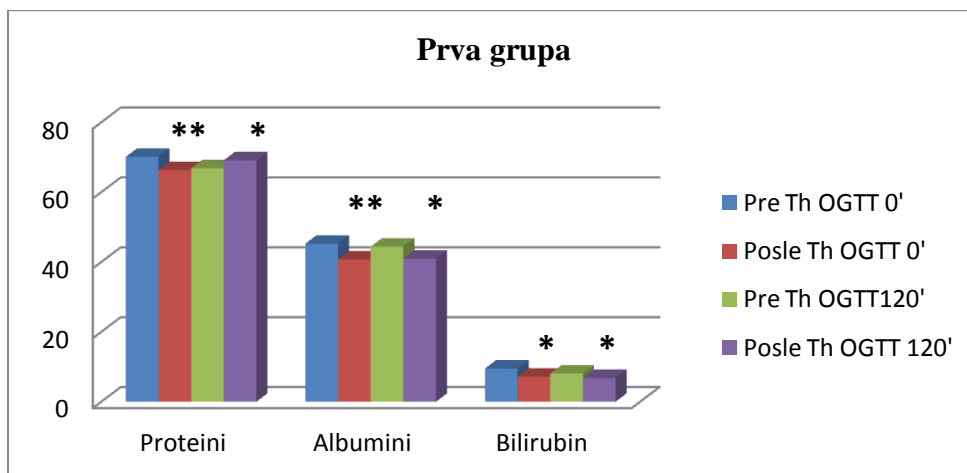
* Statistički značajna razlika ($p=0,045$)



Grafikon 8. Promene HOMA- β i AUC insulina tokom OGTT, pre i posle terapije

* Statistički značajna razlika ($p=0,006$)

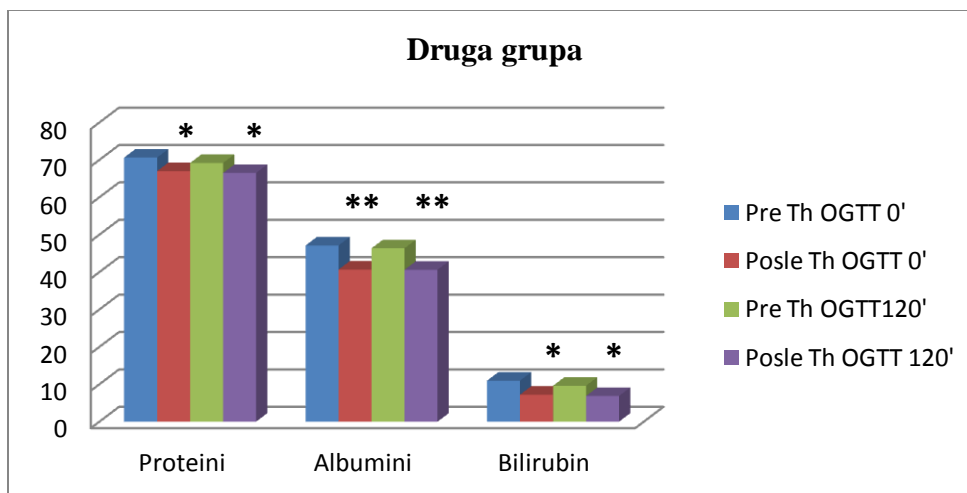
Posle sprovedene šestomesečne terapije kod adolescentkinja sa PCOS registrovane su promene u nivoima proteina, albumina i bilirubina, bazalno i tokom OGTT, Grafikoni 9A i 9B.



Grafikon 9A. Promene koncentracija proteina, albumina i bilirubina tokom OGTT kod ispitanica prve grupe, pre i posle terapije

* Statistički značajna razlika ($p=0,041$; $p=0,015$; $p=0,005$; $p=0,017$; redom);

** Visoko statistički značajna razlika ($p=0,001$; $p<0,001$; redom)



Grafikon 9B. Promene koncentracija proteina, albumina i bilirubina tokom OGTT kod ispitanica druge grupe, pre i posle terapije

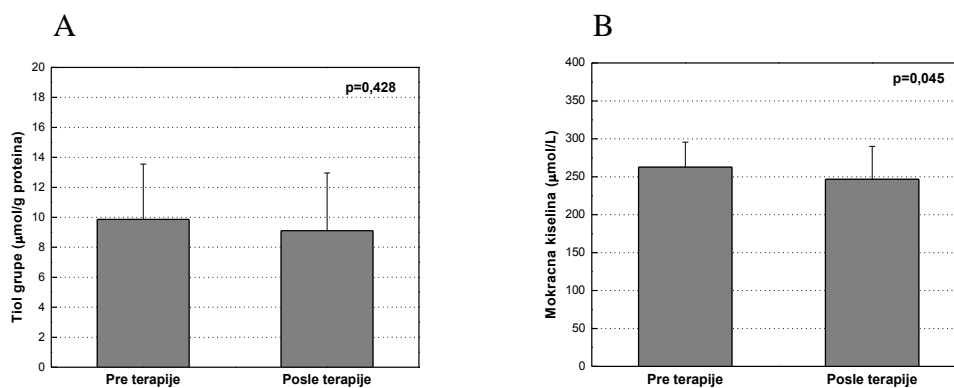
* Statistički značajna razlika ($p=0,002$; $p=0,009$; $p=0,007$; $p=0,010$; redom)

** Visoko statistički značajna razlika ($p<0,001$; $p<0,001$; redom)

Kod ispitanica prve grupe uočen je značajan pad serumskih vrednosti proteina i albumina ($p \leq 0,001$), dok su vrednosti proteina po završetku OGTT bile značajno više, a vrednosti albumina značajno niže u odnosu na dobijene vrednosti posle OGTT pre započinjanja terapije ($p=0,041$ i $p=0,015$). S druge strane, vrednosti bilirubina bile su značajno niže kako na početku tako i na kraju OGTT ($p=0,005$ i $p=0,017$). Kod ispitanica druge grupe posle sprovedene terapije dobijene su značajno niže vrednosti ukupnih proteina i bilirubina, kako na početku tako i na kraju OGTT ($p=0,002$; $p=0,009$; $p=0,010$; $p=0,002$; redom), dok su serumske vrednosti albumina bile značajno niže na početku i na kraju OGTT ($p < 0,001$).

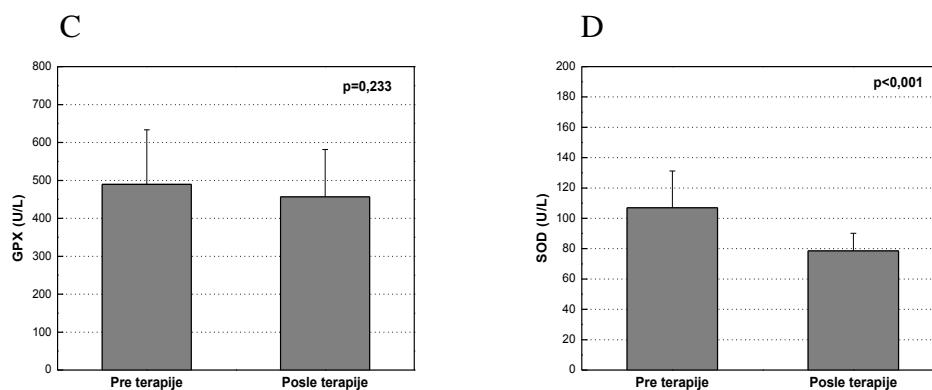
4.7. PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA KOD ADOLESCENTKINJA SA PCOS POSLE PRIMENJENE TERAPIJE

Kod adolescentkinja sa PCOS posle primenjene terapije nije došlo do značajne promene koncentracije tiol grupa (markera oksidativnog oštećenja proteina), a zabeležen je značajan pad koncentracije mokraćne kiseline ($p=0,045$), (Grafikon 10A i 10B).



Grafikon 10A-B. Koncentracije tiol grupa i mokraćne kiseline kod adolescentkinja sa PCOS, pre i posle terapije

Merenjem aktivnosti antioksidantnih enzima, kod pacijentkinja sa PCOS posle primenjene terapije, nije registrovana promena aktivnosti GPX a zabeležena je statistički značajno manja aktivnost SOD ($p < 0,001$), Grafikoni 10C i 10D.



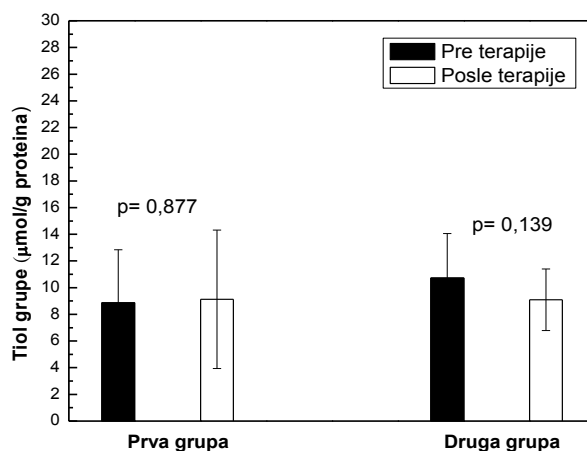
Grafikon 10C-D. Aktivnost GPX i SOD kod adolescentkinja sa PCOS, pre i posle terapije

Dobijene vrednosti parametara oksidativnog statusa, kod ispitanica sa PCOS stratifikovanih prema primenjenoj OHK piluli - prva grupa (30 μ g EE i 3 mg drospirenona) i druga grupa (20 μ g EE i 3 mg drospirenona) prikazani su u Tabeli 20.

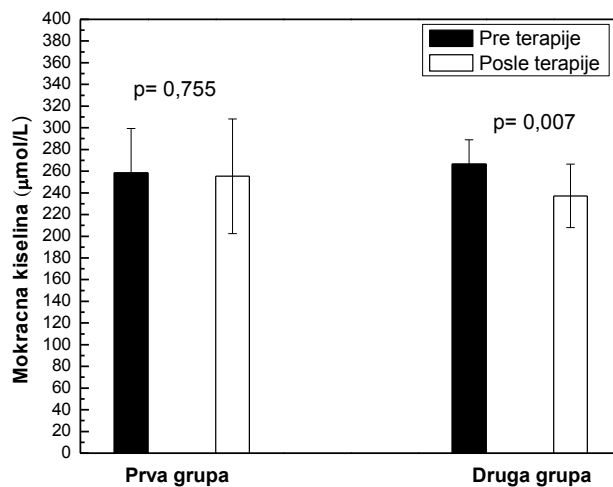
Tabela 20. Parametri oksidativnog stresa i aktivnost antioksidantnih enzima kod adolescentkinja sa PCOS, pre i posle terapije

		Pre terapije	Posle terapije	p
PRVA GRUPA	Mokraćna kiselina (μmol/L)	258,33 \pm 41,04	255,33 \pm 52,82	0,755
	Tiol grupe (μmol/g proteina)	8,8750 \pm 3,967	9,1279 \pm 5,1875	0,877
	GPX (U/L)	461,31 \pm 94,78	439,44 \pm 155,94	0,628
	SOD	97,73 \pm 27,54	79,15 \pm 11,23	0,090
DRUGA GRUPA	Mokraćna kiselina (μmol/L)	266,57 \pm 22,35	237,21 \pm 29,32	0,007
	Tiol grupe (μmol/g proteina)	10,72 \pm 3,33	9,09 \pm 2,31	0,139
	GPX (U/L)	515,99 \pm 177,73	472,35 \pm 88,94	0,216
	SOD	116,58 \pm 15,04	77,82 \pm 12,56	<0,001

Analizom dobijenih podataka po grupama uočeno je da kod ispitanica prve grupe nije došlo do značajnije promene koncentracije tiol grupa ni mokraćne kiseline ($p > 0,05$), dok je u drugoj grupi registrovan statistički značajno niža koncentracija mokraćne kiseline ($p = 0,007$), Grafikoni 11A i 11B.

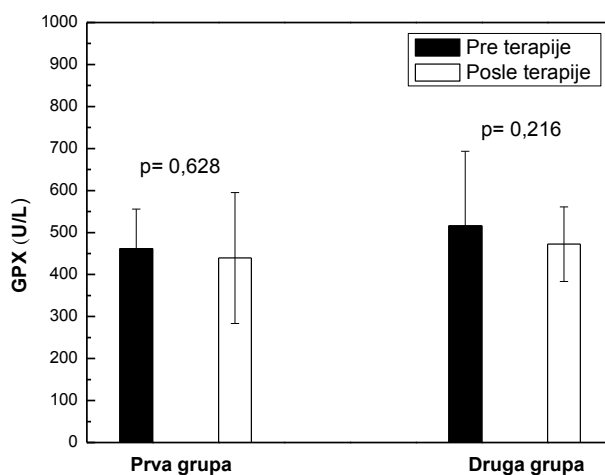


Grafikon 11A. Koncentracije tiol grupa kod adolescentkinja sa PCOS stratifikovanih prema primenjenoj OHK

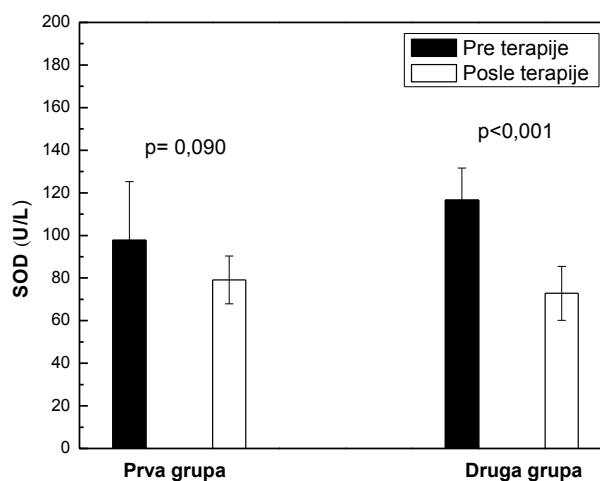


Grafikon 11B. Koncentracije mokraćne kiseline kod adolescentkinja sa PCOS stratifikovanih prema primenjenoj OHK

Primenjena terapija kod adolescentkinja sa PCOS nije uticala na značajniju promenu aktivnosti GPX, dok je u drugoj grupi ispitanica registrovan visoko statistički značajan pad aktivnosti SOD ($p < 0,001$), koji se nije značajnije promenio kod ispitanica prve grupe ($p = 0,090$), Grafikon 11C i 11D.

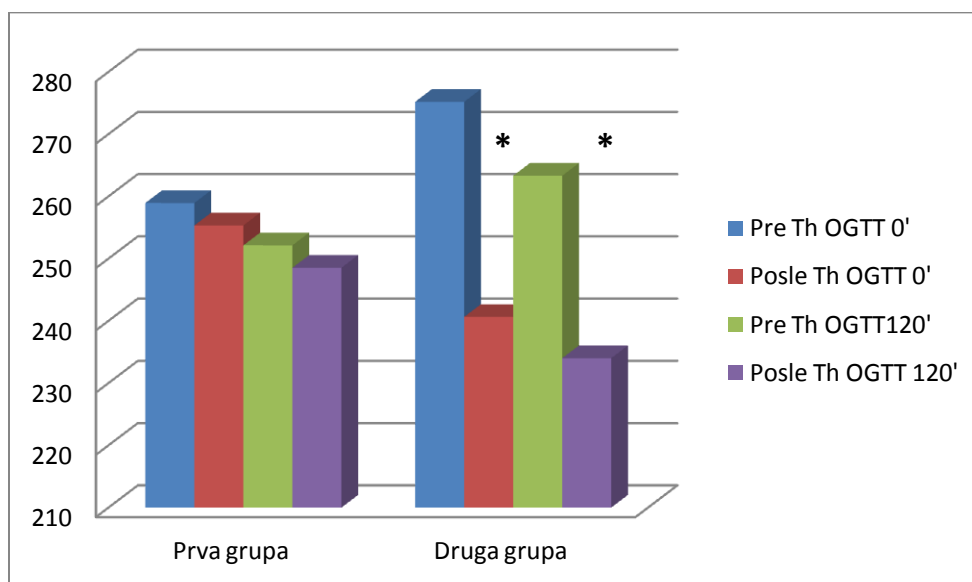


Grafikon 11C. Aktivnost GPX kod adolescentkinja sa PCOS stratifikovanih prema primenjenoj OHK



Grafikon 11D. Aktivnost SOD kod adolescentkinja sa PCOS stratifikovanih prema primenjenoj OHK

Hiperglikemija, izazvana OGTT, kod adolescentkinja sa PCOS nije bila praćena promenama u koncentraciji tiol grupa kao ni promenama u aktivnosti antioksidantnih enzima, GPX i SOD, ($p > 0,05$). Serumske vrednosti mokraćne kiseline, kod ispitanica prve grupe, nisu se razlikovale u odnosu na vrednosti izmerene pre i na kraju OGTT pre započinjanja terapije ($p > 0,05$), dok su kod ispitanica druge grupe posle sprovedene terapije dobijene statistički značajno niže vrednosti mokraćne kiseline kako na početku tako i na kraju OGTT ($p = 0,007$ i $p = 0,032$), Grafikon 12.



Grafikon 12. Promene koncentracije mokraćne kiseline tokom OGTT kod adolescentkinja sa PCOS, pre i posle terapije

* Statistički značajna razlika ($p = 0,007$; $p = 0,032$; redom)

5. DISKUSIJA

Sindrom policističnih jajnika predstavlja najčešći endokrini poremećaj žena reproduktivnog perioda, sa učestalošću i do 20%. Ovaj kompleksan poremećaj je uzrokovan različitim etiopatofiziološkim mehanizmima. PCOS karakterišu hiperandrogenemija, hiperinsulinemija, poremećaj funkcije hipotalamo-hipofizno-ovarijumske osovine i disfunkcija hormonske aktivnosti masnog tkiva. Navedeni poremećaji se mogu ispoljiti u različitom stepenu, vremenom se mogu menjati, a njihova međusobna interakcija u različitim tkivima (jetra, masno tkivo, mišići i jajnici) dodatno doprinosi različitom fenotipskom ispoljavanju ovog sindroma. O učestalosti i značaju sindroma, govori i podatak o postojanju više od 1,500,000 sajtova koji su posvećeni ovoj temi, kao i činjenica da zdravstveni sistem SAD godišnje troši 4 milijarde dolara za lečenje pacijentkinja sa PCOS (Azziz i sar., 2005).

Značaj PCOS se ogleda i u jasnom stavu stručne javnosti da se prvi klinički simptomi ispoljavaju u adolescentnom uzrastu i da se kod 1,14% do 3% adolescentkinja razvije kompletna klinička slika i postavi dijagnoza PCOS (Christensen i sar., 2013; Hashemipour i sar., 2004). Upravo adolescentkinje sa PCOS nose veći rizik za pojavu kardiovaskularne bolesti tokom života (Macut i sar, 2015a). Pored toga, različita patogeneza, brzina razvijanja kliničke slike i oblici kliničkih manifestacija ovog sindroma značajno utiču na dijagnostičke kriterijume u adolescenciji.

U našem istraživanju dijagnoza PCOS je kod 35 ispitivanih adolescentkinja postavljena prema preporukama o ispunjenosti sva tri roterdamska dijagnostička kriterijuma (hronična anovulacija, hiperandrogenizam i ultrazvučno potvrđen policistični izgled jajnika) u periodu od najmanje dve godine po nastupanju menarhe (Carmina i sar., 2010). U skladu s tim pokazatelji hronične anovulacije (dužina menstrualnog ciklusa i serumske vrednosti progesterona) značajno su se razlikovali kod pacijentkinja sa PCOS u

odnosu na odgovarajuću grupu kontrola prema uzrastu i ITM. Među ispitivanim grupama su klinički i laboratorijski pokazatelji hiperandrogenizma (prisustvo akni na licu, prisustvo akni na leđima, vrednost F-G skora, izmerene vrednosti testosterona, SHBG i FAI), kao i izmerene zapremine jajnika (ultrazvučno potvrđen policistični izgled jajnika) bili značajno veći u grupi adolescentkinja sa PCOS.

Na etiološki uticaj okoline za nastajanje PCOS ukazuju zapažanja da niska porođajna težina kao i izloženost fetusa delovanju androgena mogu dovesti do razvoja PCOS fenotipa (Conway i sar., 2014). Naše ispitanice sa PCOS nisu imale nisku porođajnu težinu ali je pokazano postojanje manje porođajne dužine u odnosu na adolescentkinje iz kontrolne grupe ($p=0,036$) što bi moglo ukazati na druge moguće faktore delovanja, verovatno kao uticaj okoline tokom intrauterinog perioda.

Dok neki istraživači ukazuju na povezanost PCOS i povišenih koncentracija hs-CRP kao markera hronične inflamacije niskog stepena i medijatora ateroskleroze, drugi autori negiraju ovu povezanost (Oh i sar., 2009; Zhao i sar., 2016). Značajna neslaganja vezana su za dilemu da li je povišen hs-CRP posledica *per se* endokrinih poremećaja kod PCOS ili je posledica antropometrijskih ili metaboličkih poremećaja koji nastaju tokom života žena sa PCOS (Ganie i sar., 2014). Naime, postojanje hronične inflamacije i povišene koncentracije hs-CRP pokazane su u adultnoj populaciji pacijentkinja sa PCOS sa metaboličkim sindromom (Puder i sar., 2005) ali i kod onih koje nisu imale metabolički sindrom (Verit, 2010). U našem istraživanju koncentracije biomarkera inflamacije, hs-CRP i fibrinogena analizirane su kod normalno uhranjenih normoinsulinemičnih adolescentkinja sa PCOS, bez anamneze pušenja cigareta i bez metaboličkih abnormalnosti. Naši rezultati viših koncentracija fibrinogena kod adolescentkinja sa PCOS u poređenju sa grupom zdravih kontrola u skladu su sa rezultatima dobijenim kod odraslih ispitanica sa PCOS (Atiomo i sar., 1998; Mannerås-Holm i sar., 2011; Mohamadin i sar., 2010).

Sve je veći broj dokaza koji ukazuju na potrebu analize markera inflamacije koji bi mogli ukazati na prisustvo aterogenog procesa ili bi mogli biti prediktori razvoja ateroskleroze, a koja se može predstaviti i kao hronično proinflatorno stanje. Dislipidemija je poznata i često prisutna metabolička abnormalnost kod žena sa PCOS-om (Macut i sar., 2013). Među svim lipidnim parametrima, u našoj studiji smo kao marker

hiperlipidemije/dislipidemije koristili odnos LDL/HDL. Upravo je ovaj indeks bio značajno veći kod adolescentkinja sa PCOS kada se uporedi sa kontrolama. Međutim, kada su adolescentkinje sa PCOS bile podeljene u dve grupe prema graničnoj vrednosti fibrinogena izvedenoj iz ROC krive, koncentracije triglicerida, LDL-holesterola i odnosa LDL/HDL bile su više kod ispitanica sa PCOS kod kojih je koncentracija fibrinogena bila iznad granične vrednosti od 2,8 g/L. Slično tome, koncentracije LDL-holesterola bile su više kod ispitanica sa PCOS kod kojih je koncentracija hs-CRP bila viša od granične vrednosti od 0,35 mg/L. Naši rezultati su jasno pokazali povezanost markera hronične inflamacije niskog stepena, hs-CRP i fibrinogena, sa ITM i LDL-holesterolom. Navedena povezanost je potvrđena samo za grupu adolescentkinja sa PCOS nakon stratifikacije nivoa proinflammatoryh markera.

Naši rezultati su u skladu sa poznatim uticajem abdominalne gojaznosti i hronične inflamacije niskog stepena na insulinsku rezistenciju (IR). Štaviše, rezultati novijih istraživanja pokazali su da ITM samostalno pogoršava IR kod žena sa PCOS i da ima veći uticaj na IR kod pacijentkinja sa PCOS u odnosu na zdrave kontrole (Macut i sar., 2017).

Skorija istraživanja su potvrdila postojanje širokog spektra antiaterogenih efekata HDL holesterola, uključujući i njegovo antiinflamatorno delovanje (Barter i sar, 2004). Više prospektivnih studija sprovedenih kod odraslih ispitanica sa PCOS (Hak i sar., 1999; Mendall i sar., 1996) pokazalo je negativnu korelaciju HDL-holesterola sa sistemskim markerima inflamacije. Rezultatima dobijenim u ovoj studiji, u grupi normalno uhranjenih adolescentkinja sa PCOS, utvrdili smo značajnu pozitivnu korelaciju koncentracija hs-CRP i fibrinogena, ne samo sa koncentracijama LDL-holesterola i vrednošću odnosa LDL/HDL (marker dislipidemije), već i sa vrednostima ITM i OS (markeri gojaznosti). Pored toga, dobijena negativna korelacija hs-CRP i HDL holesterola u skladu je sa podacima iz literature (Hak i sar., 1999; Mendall i sar., 1996).

Hak i saradnici su još 1999. godine pronašli značajnu povezanost hs-CRP-a i obima struka, i nakon korekcije ITM (Hak i sar., 1999). Rezultati istraživanja Lemieuxa i saradnika (Lemieux i sar., 2001) pokazali su najvišu koncentraciju hs-CRP u plazmi muškaraca sa centralnom gojaznošću (mereno kao obim struka). Zanimljivo je da je i u studiji koja je ispitivala povezanost hs-CRP i OS kod postmenopauzalnih gojaznih žena

dobjena slična povezanost (Klasic i sar., 2014). I naši rezultati su u skladu sa literaturom, jer smo ovom studijom pronašli značajnu korelaciju između hs-CRP i OS u obe grupe ispitanica, adolescentkinja sa PCOS i zdravih kontrola. Naime, masno tkivo je endokrini organ koji sekretuje široki spektar adipocitokina, uključujući interleukin-1 (IL-1), faktor tumorske nekroze (alfa TNF-a) i interleukin-6 (IL-6), sve relevantne odrednice za buduću sintezu CRP u jetri (Klasic i sar., 2014). Štaviše, sličan odnos između antropometrijskih i kardiovaskularnih indeksa rizika dobjenih u našim grupama ispitivanih adolescentkinja može se objasniti uticajem hiperandrogenemije kod mladih. Naime, pretpostavlja se da hiperandrogena stanja karakterišu poremećeni profil faktora kardiovaskularnog rizika (Balen i sar., 2003) kao što je i bio slučaj kod naših adolescentkinja sa PCOS.

Prethodno je pokazan utjecaj inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI-1) na proinflamatorni status gojaznih adolescentkinja sa PCOS-om (Macut i sar., 2001). Zanimljivo je da je u našoj studiji primećeno proinflamatorno stanje čak u grupi normalno uhranjenih adolescentkinja sa PCOS, koje su imale normalne vrednosti insulina. Rezultati našeg istraživanja sugerišu da se hs-CRP i fibrinogen mogu upotrebiti kao dijagnostički markeri i markeri praćenja inflamatornog procesa kod adolescentkinja sa PCOS, a u nastojanju da se pravovremeno spreče povećanje telesne mase, pojava abdominalne gojaznosti i promena profila lipida koji su poznati faktori rizika za kardiovaskularne bolesti.

Oksidativni stres udružen je sa aterosklerozom, dijabetesom, gojaznošću i metaboličkim sindromom. Dokazana je bliska veza oksidativnog stresa sa hroničnom inflamacijom, a brojni dokazi podržavaju koncept zatvorenog kruga - gde inflamacija indukuje nastajanje ROS dok oksidativni stres sa druge strane indukuje i pojačava inflamaciju (Duleba i Dokras, 2012). Međusobna povezanost oksidativnog stresa i markera hronične inflamacije niskog stepena sa hiperandrogenizmom i insulinskom rezistencijom kod pacijentkinja sa PCOS proučavana je od strane brojnih istraživača (González, 2012; Macut i sar., 2011; Macut i sar., 2013; Savic-Radojevic i sar., 2015). Nedavni dokazi pokazuju da glavni uzrok povećane generacije ROS u žena sa PCOS može biti povezan s oštećenjem respiratornog lanca u mitohondrijama (Victor i sar., 2009) kao i povećanim enzimskim aktivnostima NADPH-oksidade i ksantin oksidade (Jiang i sar., 2011; Macut i

sar., 2011). Nakon oralnog opterećenja glukozom kod žena sa PCOS, za razliku od zdravih žena sa ovulacijama, registrovana su proporcionalna povećanja proinflatarnog citokina TNF α , aktivnost NADPH-oksidade i različitih markera oksidativnog stresa (González, 2012; Savic-Radojevic i sar., 2015). Čini se da hiperandrogenemija sama po sebi izaziva povećanu proizvodnju slobodnih radikala, pre svega povećanjem ekspresije i aktivnosti NADPH-oksidade (Chignalia i sar., 2015). Slično hormonskom statusu kod žena sa PCOS, akutna primena androgena kod zdravih žena uzrokuje povećanu osetljivost njihovih leukocita na opterećenje glukozom (González, 2012). Štaviše, značajno prolazno smanjenje aktivnosti GPX, ključnog enzima antioksidantne zaštite, tokom oralnog testa opterećenja glukozom čini se da dodatno narušava redoks ravnotežu i pridonosi pro-oksidantnom statusu žena sa PCOS (Savic-Radojevic i sar., 2015).

U našoj studiji smo kao odgovor na oralni test opterećenja glukozom registrovali izraženiju promenu biomarkera oksidativnog stresa, nitrotirozina i proteinskih tiol grupa, kod normalno uhranjenih adolescentkinja sa PCOS u odnosu na zdrave adolescentkinje iz kontrolne grupe. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja sprovedenih kod odraslih žena sa PCOS (Macut i sar., 2011; Savic-Radojevic i sar., 2015). Upravo ovi podaci o većim koncentracijama markera oksidativnog stresa u plazmi zajedno sa nepromenjenim aktivnostima ključnih enzima antioksidantne zaštite, GPX i SOD, kod adolescentkinja sa PCOS ukazuju na suptilne promene oksidativnog statusa i redoks ravnoteže u ovoj ranoj fazi ispoljavanja kliničke slike PCOS.

Na osnovu vrednosti bazalnog insulina i različitih pokazatelja osetljivosti i otpornosti na insulin, koje se nisu razlikovale među grupama ispitanica, kod adolescentkinja sa PCOS nije potvrđeno prisustvo insulinske rezistencije. Stoga je i povećana proizvodnja ROS kod adolescentkinja sa PCOS najverojatnije povezana sa hiperandrogenizmom. Ipak, u našoj studiji dobijena, značajna negativna korelacija između ISI i LH kao i korelacija AUC za glukozu s procentom promene proteinskih tiol grupa tokom OGTT (pokazatelj oksidativnog stresa) mogla bi pružiti važne informacije u predikciji insulinske rezistencije kod novodijagnostikovanih adolescentkinja sa PCOS. Buduća ispitivanja potencijalne veze između insulinske rezistencije i oksidativnog stresa trebala bi uključiti ispitivanje tih parametara nakon euglikemijsko-hiperinsulinemijskog

klampa, posebno imajući u vidu nedavnu studiju o ograničenoj vrednosti aktuelnih indeksa za procenu insulinske rezistencije kod pacijentkinja sa PCOS (Tosi i sar., 2017). Ipak, jasne korelacije između nivoa testosterona, DHEAS, androstenediona i LH u plazmi sa izmenjenim koncentracijama parametara oksidativnog stresa tokom akutne hiperglikemije, izazvane OGTT, govore u prilog pretpostavke da hiperandrogenizam može prethoditi ishranom izazvanom oksidativnom stresu kod pacijentkinja sa PCOS. Za dalju potvrdu povezanosti hormonskog statusa i oksidativnog stresa potrebna su dalja ispitivanja kao i duže praćenje većeg broja pacijentkinja sa PCOS-om.

Pored toga, kompleksne uloge slobodnih radikala i oksidativnog stresa trebalo bi posmatrati i u svetlu nove definicije, u kojoj bi fiziološki oksidativni stres (“*oxidative eustress*”) trebalo razlikovati od oksidativnog stresa u užem smislu (“*oxidative distress*”), koji uzrokuje oksidativno oštećenje zbog prekomerne produkcije ROS (Sies, 2017). U tom smislu, važno je naglasiti da prolazno smanjenje aktivnosti GPX zajedno sa povećanom produkcijom biomarkera oksidativnog stresa tokom oralnog testa opterećenja glukozom kod zdravih adolescentkinja iz kontrolne grupe zapravo predstavlja fiziološki odgovor, neophodan za pravilno funkcionisanje insulinske signalne kaskade. Naime, kao rezultat vezivanja insulina za insulinski receptor dolazi i do povećane produkcije ROS, koja nastaje prvenstveno kao posledica aktivacije NADPH-oksidaza i istovremene inhibicije membranskog antioksidantnog enzima peroksiredoksina I (Parker i sar., 2017). Ovaj kratkotrajni prooksidativni ćelijski redoks status stimuliše prenos signala, pre svega povećanjem aktivnosti kinaze uz istovremenu inhibiciju proteinske tirozin fosfataze (PTP) (Parker i sar., 2017; Pessin i Saltiel, 2000). Sa druge strane, prekomerna produkcija ROS može uticati na aktivnost redoks-senzitivne PI₃K-PDK1-Akt signalne osovine, kao što je pokazano za slobodni radikal peroksinitrit, što sve doprinosi razvoju insulinske rezistencije (Parker i sar., 2017).

Osim detoksikacije ksenobiotika i slobodnih radikala, superfamilija glutacion transferaze (GST) katališe reakcije konjugacije različitih endogenih supstrata, uključujući steroide i prostaglandine (Hayes i Strange, 2000). Štaviše, GST takođe mogu delovati kao vezujući proteini za žučne kiseline, steroidne hormone i neurotransmitere (Hayes i Strange, 2000). Gotovo sve citosolne GST pokazuju genetski polimorfizam, što rezultuje potpunim

nedostatkom ili izmenjenom enzimskom aktivnošću (Hayes i Strange, 2000; Wu i Dong, 2012). Posledično, postoje velike međusobne razlike u GST genotipovima, koje utiču na sposobnost jedinki za biotransformaciju, kao i na sposobnost vezanja različitih liganada. Pored svoje katalitičke uloge, pokazano je da GSTM1 enzim predstavlja i steroid-vezujući protein, sa sposobnošću vezivanja testosterona i estradiola. Prema našim saznanjima, polimorfizmi citosolnih GST u kontekstu sindroma policističnih jajnika do danas nisu bili analizirani. Zanimljivo je da smo kod adolescentkinja sa PCOS koje su bile nosioci *GSTM1-nultog* genotipa, kod kojih je GSTM1 enzim odsutan kao posledica delecionog polimorfizma GSTM1, registrovali znatno niži nivo cirkulišućeg testosterona u odnosu na nivoje testosterona izmerene kod adolescentkinja sa PCOS koje su imale *GSTM1-aktivan* genotip. Buduća ispitivanja potencijalne uloge GST u poremećajima hormonskog statusa kod pacijentkinja sa PCOS, mogla bi biti novi obećavajući terapijski pristup.

Dosadašnja istraživanja su pokazala visoku efikasnost OHK pilule u lečenju poremećaja materičnih krvarenja, čiju regulaciju postiže sprečavajući proliferaciju endometrijuma (Ibáñez i sar., 2017), a skorašnja meta analiza je pokazala superiornu efikasnost OHK pilule u odnosu na metformin, jer je pokazala da je kod korisnica pilule materično krvarenje nastupalo jednom mesečno (Al Khalifah i sar., 2016). I kod naših ispitanica OHK pilula je regulisala poremećaj ciklusa koji je nastupao na oko 28 dana, ne utičući na promenu TM i ITM kao ni na vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, što je u skladu sa rezultatima pomenute meta analize (Al Khalifah i sar., 2016).

Antiandrogeni efekat OHK pilula postiže delovanjem estrogene komponente, jer dovodi do porasta SHBG i pada LH što dovodi do sniženja FAI i efikasne redukcije kliničkih znakova hiperandrogenizma, hirsutizma i akni, čije se 60%-100% poboljšanje očekuje posle šestomesečne primene (Ibáñez i sar., 2017). Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa rezultatima iz literature, jer smo pokazali da je šestomesečna primena OHK pilule dovela do visoko statistički značajnih sniženja serumskih vrednosti gonadotropina, testosterona, androstenediona, DHEAS i statistički značajnog povećanja SHBG. Ovo delovanje je za posledicu imalo smanjenje FAI i kliničkih znakova hiperandrogenizma, hirsutizma i F-G skora te akni na licu i leđima, što je u skladu i sa rezultatima sprovedene meta analize (Al Khalifah i sar., 2016). Pomenuta meta analiza je pokazala visoku

efikasnost OHK pilule, u odnosu na meformin, u lečenju kliničkih znakova hiperandrogenizma.

U različitim studijama je uočen porast hs-CRP kod korisnica OHK pilule što može povećati rizik za kardiovaskularna oboljenja i venski tromboembolizam. Bird je još 2013. godine objavio da žene sa PCOS imaju 1,2 puta veći rizik za pojavu venskog tromboembolizma, dok je on kod žena sa PCOS koje koriste OHK pilulu 2 puta veći (Bird i sar., 2013). Kao što Kahramanova randomizovana klinička studija otkrila porast hs-CRP kod korisnica OHK pilule sa drospirenonom (Kahraman i sar., 2014) i naše istraživanje je u obe grupe ispitanica, posle šestomesenog lečenja, registrovalo značajan porast hs-CRP.

Do danas je dostupno samo nekoliko studija koje porede efikasnost i uticaj različitih OHK pilula na metaboličke parametre kod adolescentkinja (Kahraman i sar., 2014). Smatra se da doza etinil estradiola kao i vrsta progestagena mogu uticati na fluktuacije u metabolizmu ugljenih hidrata i metabolizmu lipida. Međutim, navedene promene nisu dovoljno izražene da bi predstavljale značajan dugoročni rizik po zdravlje korisnica OHK pilula. Nedavna meta analiza na pacijentkinjama sa PCOS lečenih OHK pilulom sa različitim progestagenskim komponentama pokazala je da nije bilo promene glikemije našte, bazalnog insulina i HOMA-IR kod žena sa PCOS (Halperin i sar., 2011). Međutim, dostupni su nam i rezultati istraživanja koji ukazuju da OHK pilula može povećati insulinsku rezistenciju, a bez značajne razlike u odnosu na primenjen tip gestagena (Mastorakos i sar., 2006). Kahraman je svojom kliničkom studijom pokazao da se promene metabolizma ugljenih hidrata nastale posle dvanaestomesečne primene terapije, nisu razlikovale kod korisnica pilula sa ciproteron acetatom i drospirenonom (Kahraman i sar., 2014). Kod naših ispitanica sa PCOS nije registrovana insulinska rezistencija, a posle šestomesečne primene terapije nije došlo do značajne promene u nivou glikemije dok je vrednost bazalnog insulina u prvoj grupi bila statistički značajno viša ($p=0,016$), a u drugoj grupi granično viša ($p=0,054$). Analogno dobijenom, dobijen je porast HOMA-IR i HOMA- β u prvoj grupi ispitanica lečenih sa 30 μg EE i 3 mg drospirenona.

U pomenutoj meta analizi Halperina i saradnika (Halperin i sar., 2011) uočena je povezanost OHK pilule sa porastom HDL holesterola i triglicerida. Kod korisnica OHK pilule sa drospirenonom došlo je do porasta ukupnog holesterola, triglicerida, VLDL i HDL

kao i pada LDL holesterola, što potkrepljuju i rezultati novije studije u kojoj je kod OHK pilulom lečenih žena sa PCOS registrovan parast triglicerida i VLDL holesterola za oko 50%, dok su promene u ostalim parametrima metabolizma lipida bile diskretnije (Kahraman i sar., 2014). Kod naših ispitanica registrovan je uticaj OHK pilule na metabolizam lipida, te je za razliku od adolescentkinja koje su lečene sa 20 µg EE i imale granično više vrednosti holesterola kod adolescentkinja lečenih sa 30 µg EE registrovan značajan porast ukupnog holesterola. Visoko statistički značajan porast HDL holesterola i triglicerida registrovan je kod svih ispitanica, dok su serumske vrednosti LDL holesterola ostale nepromenjene.

Efekti estradiola i progestina na oksidativni stres i dalje su nekonzistentni, imajući u vidu njihovu pro i antioksidantnu aktivnost. Naime, estrogeni ispoljavaju antioksidantnu aktivnost tako što inhibiraju ekspresiju i aktivnost NADP⁺/NADPH oksidaze, a stimulišu ekspresiju i aktivnost endotelne isoforme NO sintetaze, Mn-SOD i ekstracelularne SOD. Sa druge strane, antioksidantna aktivnost estrogena se poništava delovanjem progestina, aktivacijom NADP oksidaze i inhibicijom ekspresije i aktivnosti Mn-SOD (De Groote i sar., 2009). Tokom oralnog opterećenja glukozom kod svih adolescentkinja sa PCOS registrovan je značajan pad serumskih nivoa proteina, albumina i bilirubina, a kod adolescentkinja lečenih sa 20 µg EE i pad nivoa mokraćne kiseline, u odnosu na vrednosti dobijene pre i na kraju OGTT pre uvođenja terapije.

Još pre 25 godina Massafra je pokazao da devetomesečna primena OHK (20 µg EE i 150 µg desogestrela) kod mladih žena dovodi do značajnog porasta aktivnosti antioksidantnih enzima, katalaze i GPX (Massafra i sar., 1993). Iako je i in vitro i in vivo potvrđeno da estrogeni inhibiraju peroksidaciju lipida izazvanu slobodnim radikalima (Yagi i Komura, 1986), ipak još uvek nije poznato da li postoji veza između polnih steroidnih hormona i enzimskog sistema ćelijskih antioksidanasa. I Massafra je svojom studijom pokazao da su žene sa urednim ovulacijama, polovinom folikularne faze ciklusa, imale značajno višu aktivnost GPX u eritrocitima u odnosu na amenoroične žene. Međutim, nakon primene 8 mg transdermalnog estradiola, koji je oslobađao dnevno 100 µg estradiola, kod amenoroičnih žena došlo je do statistički značajnog porasta estradiola u plazmi ali i aktivnosti GPX, do vrednosti sličnih onima koje su imale žene sa urednim

ovulacijama polovinom folikularne faze ciklusa. Svoje prethodne rezultate Massafra je potvrdio i ispitivanjem žena sa prolongiranom upotrebom niskodozne OHK pilule, kod kojih je uočen značajan porast najpre aktivnosti GPX (6 ciklusa), a kasnije i katalaze (9 ciklusa), (Massafra i sar., 1997). Ovi rezultati ukazuju da polni steroidi mogu stimulisati aktivnost antioksidantnih enzima. Ova studija je pokazala da je razlika u aktivnosti GPX kod zdravih i amenoroičnih žena kao i porast aktivnosti GPX posle primene OHK pilule uslovljena koncentracijom estrogena u plazmi koji stimuliše aktivnost GPX. Ovo potvrđuje i značajno pozitivna korelacija aktivnosti GPX i nivoa estradiola u plazmi što dovodi do zaključka da je smanjena ovarijalna produkcija estrogena udružena sa sniženom antioksidantnom zaštitom (Massafra i sar., 1997). U skladu sa dostupnim rezultatima iz literature, ni kod naših ispitanica lečenih OHK pilulom nije došlo do značajnijih promena u aktivnosti GPX ali je došlo do visoko statistički značajnog smanjenja aktivnosti SOD u grupi ispitanica lečenjih sa 20 µg EE i 3 mg drospirenona. Sa druge strane ni u uslovima oralnog opterećenja glukozom kod lečenih adolescentkinja sa PCOS nije došlo do značajnijih promena aktivnosti GPX i SOD.

Lečenje pacijentkinja sa PCOS treba da bude simptomatsko i individualno, u odnosu na želje i potrebe pacijentkinje. Najčešće se leči poremećaj menstrualnog ciklusa, promene na koži izazvane hiperandrogenemijom i komorbiditeti metaboličkog sindroma. Za dalju analizu povezanosti hormonskog statusa i oksidativnog stresa, posebno u cilju predikcije rane ateroskleroze, potrebna su dalja detaljna ispitivanja i višegodišnje praćenje većeg broja pacijentkinja sa PCOS-om.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- U odnosu na zdrave vršnjakinje, adolescentkinje sa PCOS imale su:
 - Značajniji poremećaj menstrualnog ciklusa;
 - Hiperandrogenemiju, koju karakterišu povišene vrednosti testosterona i DHEAS i FAI;
 - Izraženo prisustvo akni i hirzutizma;
 - Promene u metabolizmu lipida;
 - Povišene biomarkere inflamacije, hs-CRP i fibrinogen i
 - Značajno zadebljanu stromu i povećanu zapreminu jajnika.

- U odnosu na promene parametara oksidativnog stresa i redoks ravnoteže, kod normoinsulinemičnih adolescentkinja sa PCOS:
 - Nije zabeležena značajna razlika u koncentraciji markera oksidativnog oštećenja proteina, nitrotirozina i tiolnih grupa, kao ni u aktivnosti ključnih enzima antioksidantne zaštite, GPX i SOD između adolescentkinja sa PCOS i kontrolne grupe;
 - Pokazano je značajno povećanje koncentracija markera oksidativnog oštećenja proteina, nitrotirozina i tiolnih grupa, sa neizmenjenom aktivnošću antioksidatnih enzima u grupi adolescentkinja sa PCOS posle OGTT;
 - Procenat promene markera oksidativnog oštećenja tokom OGTT je korelirao sa testosteronom, DHEAS, androstenedionom i LH;
 - Povećana produkcija slobodnih radikala koja se događa u ranoj fazi PCOS verovatno je posledica hiperandrogenemije i

- Povećana produkcija slobodnih radikala može doprineti daljem razvoju insulinske rezistencije i posledičnih metaboličkih poremećaja povezanih sa PCOS.
- U odnosu na GST polimorfizam (GSTA1, GSTM1, GSTP1 i GSTT1):
 - Distribucija GST polimorfizma se nije značajno razlikovala između adolescentkinja sa PCOS i kontrola i
 - Devojke sa PCOS, nosioci *GSTM1-nultog* genotipa, imaju značajno nižu koncentraciju testosterona u plazmi u odnosu na pacijentkinje sa PCOS nosiocima *GSTM1-aktivnog* genotipa, koje se može objasniti i potencijalnom nekatalitičkom ulogom GSTM1 enzima kao steroid-vezujućeg proteina.
- Ciklična primena estrogen-progestagenske terapije u obliku OHK kod adolescentkinja sa PCOS:
 - Reguliše materična krvarenja;
 - Snižava hiperandrogenemiju i leči kliničke simptome hiperandrogenizma;
 - Smanjuje zapreminu jajnika i debljinu endometrijuma i
 - Pilula sa 30 µg EE u odnosu na pilulu sa 20 µg EE značajnije utiče na metabolizam masti i ugljenih hidrata.
- Nezavisno o koncentraciji EE, primena OHK pilule bila je praćena porastom hs-CRP.
- OHK pilula, u uslovima opterećenja glukozom, nije izazvala promene serumskih nivoa glukoze i insulina.
- U uslovima opterećenja glukozom, OHK pilula dovodi do promena u ne-nezimskom sistemu antioksidantne zaštite, sniženja nivoa proteina, albumina i bilirubina u serumu.
- OHK pilula sa 20 µg EE značajno je uticala na smanjenje aktivnosti SOD.

7. LITERATURA

- Abdel-Rahman S. Z., el-Zein R. A., Anwar W. A. & Au W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Letters* 1996; 107 (2): 229-233.
- Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B. J., Shaman A. & Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB & E* 2012; 10-49.
- Al Khalifah R. A., Florez I. D., Dennis B., Thabane L. & Bassilious E. Metformin or Oral Contraceptives for Adolescents With Polycystic Ovarian Syndrome: A Meta-analysis. *Pediatrics* 2016; 137 (5).
- Alexander C. J., Tangchitnob E. P. & Lepor N. E. Polycystic ovary syndrome: a major unrecognized cardiovascular risk factor in women. *Reviews in Cardiovascular Medicine* 2009; 10 (2): 83-90.
- Al-Zubeidi H. & Klein K. O. Randomized clinical trial evaluating metformin versus oral contraceptive pills in the treatment of adolescents with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM* 2015; 28 (7-8): 853-858.
- Amiel S. A., Sherwin R. S., Simonson D. C., Lauritano A. A. & Tamborlane W. V. Impaired Insulin Action in Puberty. *New England Journal of Medicine* 1986; 315 (4): 215-219.
- Anderson M. E. & Meister A. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 80 (3): 707-711.
- Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Current Researches in Anesthesia & Analgesia* 1953; 32 (4): 260-267.

- Arthur J. R. & Beckett G. J. New metabolic roles for selenium. *The Proceedings of the Nutrition Society* 1994; 53 (3): 615-624.
- Artini P. G., Monteleone P., Toldin M. R. P., Matteucci C., Ruggiero M., Cela V. & Genazzani A. R. Growth factors and folliculogenesis in polycystic ovary patients. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 2007; 2 (2): 215-223.
- Atiomo W. U., Bates S. A., Condon J. E., Shaw S., West J. H. & Prentice A. G. The plasminogen activator system in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 1998; 69 (2): 236-241.
- Azziz R., Hincapie L. A., Knochenhauer E. S., Dewailly D., Fox L. & Boots L. R. Screening for 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women: a prospective study. *Fertility and Sterility* 1999; 72 (5): 915-925.
- Azziz R. & Adashi E. Y. Stein and Leventhal: 80 years on. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2016; 214 (2): 247.
- Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale H. F., Futterweit W., Janssen O. E., Legro R. S., Norman R. J., Taylor A. E. & Witchel S. F. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertility and Sterility* 2009; 91 (2): 456-488.
- Azziz R., Marin C., Hoq L., Badamgarav E. & Song P. Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90 (8): 4650-4658.
- Balen A. H., Laven J. S. E., Tan S.-L. & Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Human Reproduction Update* 2003; 9 (6): 505-514.
- Bani D. Relaxin as a natural agent for vascular health. *Vascular Health and Risk Management* 2008; 4 (3): 515-524.
- Baptiste C. G., Battista M.-C., Trottier A. & Baillargeon J.-P. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2010; 122 (1-3): 42-52.

- Barp J., Araújo A. S. R., Fernandes T. R. G., Rigatto K. V., Llesuy S., Belló-Klein A. & Singal P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 2002; 35 (9): 1075-1081.
- Barter P. J., Nicholls S., Rye K.-A., Anantharamaiah G. M., Navab M. & Fogelman A. M. Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation Research* 2004; 95 (8): 764-772.
- Baskol G., Aygen E., Erdem F., Caniklioğlu 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 Et Gynecologica Scandinavica* 2012; 91 (3): 326-330.
- Bird S. T., Hartzema A. G., Brophy J. M., Etminan M. & Delaney J. A. C. Risk of venous thromboembolism in women with polycystic ovary syndrome: a population-based matched cohort analysis. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne* 2013; 185 (2): 115-120.
- Blank S. K., McCartney C. R., Helm K. D. & Marshall J. C. Neuroendocrine effects of androgens in adult polycystic ovary syndrome and female puberty. *Seminars in Reproductive Medicine* 2007; 25 (5): 352-359.
- Borek-Dohalska L., Valaskova P., Kubickova B., Sulc M., Kresinova Z., Cajthaml T. & Stiborova M. A study on 17alpha-ethinylestradiol metabolism in rat and *Pleurotus ostreatus*. *Neuro Endocrinology Letters* 2015; 36 Suppl 1, 5-12.
- Bozdag G. & Yildiz B. O. Combined oral contraceptives in polycystic ovary syndrome - indications and cautions. *Frontiers of Hormone Research* 2013; 40: 115-127.
- Capel I. D., Jenner M., Williams D. C., Donaldson D. & Nath A. The effect of prolonged oral contraceptive steroid use on erythrocyte glutathione peroxidase activity. *Journal of Steroid Biochemistry* 1981; 14 (8): 729-732.
- Carmina E. Obesity, adipokines and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Frontiers of Hormone Research* 2013; 40: 40-50.
- Carmina E., Bucchieri S., Esposito A., Del Puente A., Mansueto P., Orio F., Di Fede G. & Rini G. Abdominal fat quantity and distribution in women with polycystic ovary

- syndrome and extent of its relation to insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92 (7): 2500-2505.
- Carmina E., Oberfield S. E. & Lobo R. A. The diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2010; 203 (3): 201.
- Catteau-Jonard S. & Dewailly D. Pathophysiology of polycystic ovary syndrome: the role of hyperandrogenism. *Frontiers of Hormone Research* 2013; 40: 22-27.
- Chang A. Y., Abdullah S. M., Jain T., Stanek H. G., Das S. R., McGuire D. K., Auchus R. J. & de Lemos J. A. Associations among androgens, estrogens, and natriuretic peptides in young women: observations from the Dallas Heart Study. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 49 (1): 109-116.
- Chen, Z.J., Zhao H., He L., Shi Y., Qin Y., Shi Y., Li Z., You L., Zhao J., Liu J., Liang X., Zhao X., Zhao J., Sun Y., Zhang B., Jiang H., Zhao D., Bian Y., Gao X., Geng L., Li Y., Zhu D., Sun X., Xu J. E., Hao C., Ren C. E., Zhang Y., Chen S., Zhang W., Yang A., Yan J., Li Y., Ma J. & Zhao Y. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nature Genetics* 2011; 43 (1): 55-59.
- Chignalia A. Z., Oliveira M. A., Debbas V., Dull R. O., Laurindo F. R. M., Touyz R. M., Carvalho M. H., Fortes Z.B. & Tostes R. C. Testosterone induces leucocyte migration by NADPH oxidase-driven ROS- and COX2-dependent mechanisms. *Clinical Science (London, England: 1979)* 2015; 129 (1): 39-48.
- Christensen S. B., Black M. H., Smith N., Martinez M. M., Jacobsen S. J., Porter A. H. & Koebnick C. Prevalence of polycystic ovary syndrome in adolescents. *Fertility and Sterility* 2013; 100 (2): 470-477.
- Clauss A. (1957). Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematologica* 1975; 17 (4): 237-246.
- Coles B. F., Morel F., Rauch C., Huber W. W., Yang M., Teitel C. H., Green B., Lang N. P. & Kadlubar F. F. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics* 2001; 11 (8): 663-669.

- Collins F. S., Guyer M. S. & Chakravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science (New York, N.Y.)* 1997; 278 (5343): 1580-1581.
- Conway G., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale H. F., Franks S., Gambineri A., Kelestimur F., Macut D., Micic D., Pasquali R., Pfeifer M., Pignatelli D., Pugeat M. & Yildiz B. O.; ESE PCOS Special Interest Group. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *European Journal of Endocrinology* 2014; 171 (4): 1-29.
- Daka B., Rosen T., Jansson P. A., Råstam L., Larsson C. A. & Lindblad U. Inverse association between serum insulin and sex hormone-binding globulin in a population survey in Sweden. *Endocrine Connections* 2012; 2 (1): 18-22.
- De Groote D., Perrier d'Hauterive S., Pintiaux A., Balteau B., Gerday C., Claesen J. & Foidart J. M. Effects of oral contraception with ethinylestradiol and drospirenone on oxidative stress in women 18-35 years old. *Contraception* 2009; 80 (2): 187-193.
- Dewailly D., Lujan M. E., Carmina E., Cedars M. I., Laven J., Norman R. J. & Escobar-Morreale H. F. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Human Reproduction Update* 2014; 20 (3): 334-352.
- Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2008; 10: e3.
- Diamanti-Kandarakis E. & Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine Reviews* 2012; 33 (6): 981-1030.
- Duleba A. J. & Dokras A. Is PCOS an inflammatory process? *Fertility and Sterility* 2012; 97 (1): 7-12.
- Dumas B. T., Watson W. A. & Biggs H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. 1971. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 1997; 258 (1): 21-30.
- Dunaif A., Segal K. R., Shelley D. R., Green G., Dobrjansky A. & Licholai T. Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1992; 41 (10): 1257-1266.

- Ellman G. & Lysko H. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Analytical Biochemistry* 1979; 93 (1): 98-102.
- Fallah S., Valinejad Sani F. & Firoozrai M. Effect of contraceptive pills on the activity status of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase in healthy subjects. *Contraception* 2011; 83 (4): 385-389.
- Fauser B. C. J. M., Tarlatzis B. C., Rebar R. W., Legro R. S., Balen A. H., Lobo R., Carmina E., Chang J., Yildiz B. O., Laven J. S., Boivin J., Petraglia F., Wijeyeratne C. N., Norman R. J., Dunaif A., Franks S., Wild R. A., Dumesic D. & Barnhart K. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertility and Sterility* 2012; 97 (1): 28-38.
- Finco A., Belcaro G. & Cesarone M. R. Assessment of the activity of an oral contraceptive on the levels of oxidative stress and changes in oxidative stress after co-treatment with two different types of physiological modulators with antioxidant action. *Contraception* 2011; 84 (4): 418-422.
- Finco A., Belcaro G. & Cesarone M. R. Evaluation of oxidative stress after treatment with low estrogen contraceptive either alone or associated with specific antioxidant therapy. *Contraception* 2012; 85 (5): 503-508.
- Francis J. K. R. & Gold M. A. Long-Acting Reversible Contraception for Adolescents: A Review. *JAMA Pediatrics* 2017; 171 (7): 694-701.
- Franks S. Polycystic Ovary Syndrome. *New England Journal of Medicine* 1995; 333 (13): 853-861.
- Friedewald W. T., Levy R. I. & Fredrickson D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; 18 (6): 499-502.
- Galkina E. & Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annual Review of Immunology* 2009; 27: 165-197.
- Ganie M. A., Hassan S., Nisar S., Shamas N., Rashid A., Ahmed I., Douhat S., Mudassar S., Jan V. M. & Rashid F. High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels and its relationship with components of polycystic ovary syndrome in Indian adolescent

- women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2014; 30 (11): 781-784.
- Garibaldi S., Valentini S., Aragno I., Pronzato M. A., Traverso N. & Odetti P. Plasma protein oxidation and antioxidant defense during aging. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin - Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition* 2001; 71 (6): 332-338.
- González F. Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids* 2012; 77 (4): 300-305.
- González F., Rote N. S., Minium J. & Kirwan J. P. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91 (1): 336-340.
- Günzler W. A., Kremers H. & Flohé L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Zeitschrift Fur Klinische Chemie Und Klinische Biochemie* 1974; 12 (10): 444-448.
- Habig W. H., Pabst M. J. & Jakoby W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 1974; 249 (22): 7130-7139.
- Hak A. E., Stehouwer C. D., Bots M. L., Polderman K. H., Schalkwijk C. G., Westendorp I. C., Hofman A. & Witteman J. C. Associations of C-reactive protein with measures of obesity, insulin resistance, and subclinical atherosclerosis in healthy, middle-aged women. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999; 19 (8): 1986-1991.
- Halperin I. J., Kumar S. S., Stroup D. F. & Laredo S. E. The association between the combined oral contraceptive pill and insulin resistance, dysglycemia and dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2011; 26 (1): 191-201.

- Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1992; 43 (8): 779-804.
- Hashemipour M., Faghihimani S., Zolfaghary B., Hovsepian S., Ahmadi F. & Haghighi S. Prevalence of polycystic ovary syndrome in girls aged 14-18 years in Isfahan, Iran. *Hormone Research* 2004; 62 (6): 278-282.
- Hatch R., Rosenfield R. L., Kim M. H. & Tredway D. Hirsutism: implications, etiology, and management. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1981; 140 (7): 815-830.
- Hayes J. D. & Strange R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000; 61 (3): 154-166.
- Hsueh A. J. W., Kawamura K., Cheng Y. & Fauser B. C. J. M. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews* 2015; 36 (1): 1-24.
- Hu M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology* 1994; 233: 380-385.
- Ibáñez L., Oberfield S. E., Witchel S., Auchus R. J., Chang R. J., Codner E., Dabadghao P., Darendeliler F., Elbarbary N. S., Gambineri A., Garcia Rudaz C., Hoeger K.M., López-Bermejo A., Ong K., Peña A. S., Reinehr T., Santoro N., Tena-Sempere M., Tao R., Yildiz B. O., Alkhayat H., Deeb A., Joel D., Horikawa R., de Zegher F. & Lee P. A. An International Consortium Update: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Polycystic Ovarian Syndrome in Adolescence. *Hormone Research in Paediatrics* 2017; 88 (6): 371-395.
- Jendryczko A., Tomala J. & Janosz P. Effects of two low-dose oral contraceptives on erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities. *Zentralblatt Fur Gynakologie* 1992; 115 (11): 469-472.
- Jiang F., Zhang Y. & Dusting G. J. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacological Reviews* 2011; 63 (1): 218-242.

- Kageyama N. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 1971; 31 (2): 421-426.
- Kahraman K., Sükür Y. E., Atabekoğlu C. S., Ateş C., Taşkın S., Cetinkaya S. E., Tolunay H. E., Ozmen B., Sönmezer M. & Berker B. Comparison of two oral contraceptive forms containing cyproterone acetate and drospirenone in the treatment of patients with polycystic ovary syndrome: a randomized clinical trial. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2014; 290 (2): 321-328.
- Ketterer B., Harris J. M., Talaska G., Meyer D. J., Pemble S. E., Taylor J. B., Lang N. P. & Kadlubar F. F. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environmental Health Perspectives* 1992; 98: 87-94.
- Klisic A. N., Vasiljevic N. D., Simic T. P., Djukic T. I., Maksimovic M. Z. & Matic M. G. Association between C-reactive protein, anthropometric and lipid parameters among healthy normal weight and overweight postmenopausal women in Montenegro. *Laboratory Medicine* 2014; 45 (1): 12-16.
- Lass N., Kleber M., Winkel K., Wunsch R. & Reinehr T. Effect of lifestyle intervention on features of polycystic ovarian syndrome, metabolic syndrome, and intima-media thickness in obese adolescent girls. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011; 96 (11): 3533-3540.
- Le Floch J. P., Escuyer P., Baudin E., Baudon D. & Perlemuter L. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. *Diabetes Care* 1990; 13 (2): 172-175.
- Lee T. T. & Rausch M. E. Polycystic ovarian syndrome: role of imaging in diagnosis. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America* 2012; Inc, 32 (6): 1643-1657.
- Legro R. S., Arslanian S. A., Ehrmann D. A., Hoeger K. M., Murad M. H., Pasquali R. & Welt C. K. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013; 98 (12): 4565-4592.

- Lemieux I., Pascot A., Prud'homme D., Alméras N., Bogaty P., Nadeau A., Bergeron J. & Després J. P. Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2001; 21 (6): 961-967.
- Ling S., Komesaroff P. & Sudhir K. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clinical Science (London, England: 1979)* 2006; 111 (2): 107-118.
- Lujan M. E., Chizen D. R. & Pierson R. A. Diagnostic Criteria for Polycystic Ovary Syndrome: Pitfalls and Controversies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada : JOGC = Journal D'obstetrique et Gynecologie Du Canada : JOGC* 2008; 30 (8): 671-679.
- Macut D., Antić I. B. & Bjekić-Macut J. Cardiovascular risk factors and events in women with androgen excess. *Journal of Endocrinological Investigation* 2015a; 38 (3): 295-301.
- Macut D., Micić D., Cvijović G., Sumarac M., Kendereski A., Zorić S. & Pejković D. Cardiovascular risk in adolescent and young adult obese females with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM* 2001; 14 Suppl 5: 1353-1359; discussion 1365.
- Macut D., Simić T., Lissounov A., Pljesa-Ercegovac M., Božić I., Djukić T., Bjekić-Macut J., Matic M., Petakov M., Suvakov S., Damjanović S. & Savić-Radojević A. Insulin resistance in non-obese women with polycystic ovary syndrome: relation to byproducts of oxidative stress. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 2011; 119 (7): 451-455.
- Macut D., Bačević M., Božić-Antić I., Bjekić-Macut J., Čivčić M., Erceg S., Vojnović Milutinović D., Stanojlović O., Andrić Z., Kastratović-Kotlić B. & Šukilović T. Predictors of subclinical cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome: interrelationship of dyslipidemia and arterial blood pressure. *International Journal of Endocrinology* 2015b; 2015: ID 812610.

- Macut D., Bjekić-Macut J., Rahelić D. & Doknić M. Insulin and the polycystic ovary syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2017; 130: 163-170.
- Macut D., Bjekić-Macut J. & Savić-Radojević A. Dyslipidemia and oxidative stress in PCOS. *Frontiers of Hormone Research* 2013; 40: 51-63.
- Mannerås-Holm L., Baghaei F., Holm G., Janson P. O., Ohlsson C., Lönn M. & Stener-Victorin E. Coagulation and fibrinolytic disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011; 96 (4): 1068-1076.
- Mannervik B., Board P. G., Hayes J. D., Listowsky I. & Pearson W. R. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in Enzymology* 2005; 401: 1-8.
- Marti N., Galván J. A., Pandey A. V., Trippel M., Tapia C., Müller M., Perren A. & Flück C. E. Genes and proteins of the alternative steroid backdoor pathway for dihydrotestosterone synthesis are expressed in the human ovary and seem enhanced in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2017; 441: 116-123.
- Massafra C., Buonocore G., Berni S., Gioia D., Giuliani A. & Vezzosi P. Antioxidant erythrocyte enzyme activities during oral contraception. *Contraception* 1993; 47 (6): 590-596.
- Massafra C., Buonocore G., Gioia D., Sargentini I. & Farina G. Effects of estradiol and medroxyprogesterone-acetate treatment on erythrocyte antioxidant enzyme activities and malondialdehyde plasma levels in amenorrhoeic women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82 (1): 173-175.
- Mastorakos G., Koliopoulos C., Deligeoroglou E., Diamanti-Kandarakis E. & Creatsas G. Effects of two forms of combined oral contraceptives on carbohydrate metabolism in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2006; 85 (2): 420-427.
- Matés J. M., Pérez-Gómez C. & Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 1999; 32 (8): 595-603.

- Matsuda M. & De Fronzo R. A. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22 (9): 1462-1470.
- Matthews D. R., Hosker J. P., Rudenski A. S., Naylor B. A., Treacher D. F. & Turner R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28 (7): 412-419.
- Mendall M. A., Patel P., Ballam L., Strachan D. & Northfield T. C. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 1996; 312 (7038): 1061-1065.
- Meyer M. L., Malek A. M., Wild R. A., Korytkowski M. T. & Talbott E. O. Carotid artery intima-media thickness in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2012; 18 (2): 112-126.
- Michiels C., Raes M., Toussaint O. & Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 1994; 17 (3): 235-248.
- Mills G. C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry* 1957; 229 (1): 189-197.
- Mimić-Oka J., Simić T., Djukanović L., Reljić Z. & Davicević Z. Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clinical Nephrology* 1999; 51 (4): 233-241.
- Misra H. P. & Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* 1972; 247 (10): 3170-3175.
- Mohamadin A. M., Habib F. A. & Al-Saggaf A. A. Cardiovascular disease markers in women with polycystic ovary syndrome with emphasis on asymmetric dimethylarginine and homocysteine. *Annals of Saudi Medicine* 2010; 30 (4): 278-283.

- Moran L. J., Misso M. L., Wild R. A. & Norman R. J. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2010; 16 (4): 347-363.
- Morciano A., Romani F., Sagnella F., Scarinci E., Palla C., Moro F., Policola C., Della Casa S., Guido M., Lanzonea A. & Apa R. Assessment of insulin resistance in lean women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2014; 102 (1): 250-256.
- Moret M., Stettler R., Rodieux F., Gaillard R. C., Waeber G., Wirthner D., Giusti V., Tappy L. & Pralong F. P. Insulin modulation of luteinizing hormone secretion in normal female volunteers and lean polycystic ovary syndrome patients. *Neuroendocrinology* 2009; 89 (2): 131-139.
- Naderpoor N., Shorakae S., de Courten B., Misso M. L., Moran L. J. & Teede H. J. Metformin and lifestyle modification in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2015; 21 (5): 560-574.
- O'Brien R. F. & Emans S. J. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology* 2008; 21 (3): 119-128.
- Odegaard A. O., Jacobs D. R., Sanchez O. A., Goff D. C., Reiner A. P. & Gross M. D. Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and incidence of type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2016; 15.
- Oh J. Y., Lee J.-A., Lee H., Oh J.-Y., Sung Y.-A. & Chung H. Serum C-Reactive Protein Levels in Normal-Weight Polycystic Ovary Syndrome. *The Korean Journal of Internal Medicine* 2009; 24 (4): 350-355.
- Parker L., Shaw C. S., Stepto N. K. & Levinger I. Exercise and Glycemic Control: Focus on Redox Homeostasis and Redox-Sensitive Protein Signaling. *Frontiers in Endocrinology* 2017; 8: 87.
- Patel K., Coffler M. S., Dahan M. H., Yoo R. Y., Lawson M. A., Malcom P. J. & Chang R. J. Increased luteinizing hormone secretion in women with polycystic ovary syndrome is unaltered by prolonged insulin infusion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88 (11): 5456-5461.

- Pemble S., Schroeder K. R., Spencer S. R., Meyer D. J., Hallier E., Bolt H.M., Ketterer B. & Taylor J B. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *The Biochemical Journal* 1994; 300 (Pt 1): 271-276.
- Pessin J. E. & Saltiel A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 106 (2): 165-169.
- Pincemail J., Vanbelle S., Gaspard U., Collette G., Haleng J., Cheramy-Bien J. P., Charlier C., Chapelle J. P., Giet D., Albert A., Limet R. & Defraigne J. O. Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40-48 years from the ELAN study in the province of Liege, Belgium. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2007; 22 (8): 2335-2343.
- Puder J. J., Varga S., Kraenzlin M., De Geyter C., Keller U. & Müller B. Central fat excess in polycystic ovary syndrome: relation to low-grade inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90 (11): 6014-6021.
- Qiao J. & Feng H. L. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Human Reproduction Update* 2011; 17 (1): 17-33.
- Repaci A., Gambineri A. & Pasquali R. The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011; 335 (1): 30-41.
- Rosenfield R. L. The Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome in Adolescents. *Pediatrics* 2015; 136 (6): 1154-1165.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction (Oxford, England)* 2004; 19 (1): 41-47.
- Sabuncu T., Vural H., Harma M. & Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry* 2001; 34 (5): 407-413.

- Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S. C., Kakol J. M., Stein L. D., Marth G., Sherry S., Mullikin J. C., Mortimore B. J., Willey D. L., Hunt S. E., Cole C. G., Coggill P. C., Rice C. M., Ning Z., Rogers J., Bentley D. R., Kwok P. Y., Mardis E. R., Yeh R. T., Schultz B., Cook L., Davenport R., Dante M., Fulton L., Hillier L., Waterston R. H., McPherson J. D., Gilman B., Schaffner S., Van Etten W. J., Reich D., Higgins J., Daly M. J., Blumenstiel B., Baldwin J., Stange-Thomann N., Zody M. C., Linton L., Lander E. S. & Altshuler D.; International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409 (6822): 928-933.
- Savic-Radojevic A., Bozic Antic I., Coric V., Bjekic-Macut J., Radic T., Zarkovic M., Djukic T., Pljesa-Ercegovac M., Panidis D., Katsikis I., Simic T. & Macut D. Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on glutathione peroxidase activity in non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Hormones (Athens, Greece)* 2015; 14 (1): 101-108.
- Shayya R. & Chang R. J. Reproductive endocrinology of adolescent polycystic ovary syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2010; 117 (2): 150-155.
- Shi Y., Zhao H., Shi Y., Cao Y., Yang D., Li Z., Zhang B., Liang X., Li T., Chen J., Shen J., Zhao J., You L., Gao X., Zhu D., Zhao X., Yan Y., Qin Y., Li W., Yan J., Wang Q., Zhao J., Geng L., Ma J., Zhao Y., He G., Zhang A., Zou S., Yang A., Liu J., Li W., Li B., Wan C., Qin Y., Shi J., Yang J., Jiang H., Xu J. E., Qi X., Sun Y., Zhang Y., Hao C., Ju X., Zhao D., Ren C. E., Li X., Zhang W., Zhang Y., Zhang J., Wu D., Zhang C., He L. & Chen Z. J. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nature Genetics* 2012; 44 (9): 1020-1025.
- Sidhu P., Garg M. L. & Dhawan D. K. Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats. *Nutricion Hospitalaria* 2004; 19 (6): 341-347.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* 1991; 91 (3C): 31S-38S.

- Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology* 2017; 11: 613-619.
- Sundberg K., Johansson A. S., Stenberg G., Widersten M., Seidel A., Mannervik B. & Jernström B. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 1998; 19 (3): 433-436.
- Talbott E. O., Guzick D. S., Sutton-Tyrrell K., McHugh-Pemu K. P., Zborowski J. V., Rensberg K. E. & Kuller L. H. Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2000; 20 (11): 2414-2421.
- Tosi F., Bonora E. & Moghetti P. Insulin resistance in a large cohort of women with polycystic ovary syndrome: a comparison between euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp and surrogate indexes. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2017; 32 (12): 2515-2521.
- Toto R. D. Conventional measurement of renal function utilizing serum creatinine, creatinine clearance, inulin and para-aminohippuric acid clearance. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 1995; 4 (6): 505-509.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. & Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160 (1): 1-40.
- Verit F. F. High sensitive serum C-reactive protein and its relationship with other cardiovascular risk factors in normoinsulinemic polycystic ovary patients without metabolic syndrome. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2010; 281 (6): 1009-1014.
- Victor V. M., Rocha M., Bañuls C., Sanchez-Serrano M., Sola E., Gomez M. & Hernandez-Mijares A. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 94 (9): 3505-3512.

- Vos R. M. & Van Bladeren P. J. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 1990; 75 (3): 241-265.
- Waggoner W., Boots L. R. & Azziz R. Total testosterone and DHEAS levels as predictors of androgen-secreting neoplasms: a populational study. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 1999; 13 (6): 394-400.
- Wang P., Zhao H., Li T., Zhang W., Wu K., Li M., Bian Y., Liu H., Ning Y., Li G. & Chen Z.-J. Hypomethylation of the LH/choriogonadotropin receptor promoter region is a potential mechanism underlying susceptibility to polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 2014; 155 (4): 1445-1452.
- Wang X.-X., We J.-Z., Jiao J., Jiang S.-Y., Yu D.-H. & Li D. Genome-wide DNA methylation and gene expression patterns provide insight into polycystic ovary syndrome development. *Oncotarget* 2014; 5 (16): 6603-6610.
- Wu B. & Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* 2012; 33 (12): 656-668.
- Xu S., Wang Y., Roe B. & Pearson W. R. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273 (6): 3517-3527.
- Yagi K. & Komura S. Inhibitory effect of female hormones on lipid peroxidation. *Biochemistry International* 1986; 13 (6): 1051-1055.
- Yasmin E., Balen A. H. & Barth J. H. The association of body mass index and biochemical hyperandrogenaemia in women with and without polycystic ovary syndrome. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 2013; 166 (2): 173-177.
- Yilmaz M., Bukan N., Ayvaz G., Karakoç A., Törüner F., Cakir N. & Arslan M. The effects of rosiglitazone and metformin on oxidative stress and homocysteine levels in lean patients with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2005; 20 (12): 3333-3340.

Yu Y.-Y., Sun C.-X., Liu Y.-K., Li Y., Wang L. & Zhang W. Genome-wide screen of ovary-specific DNA methylation in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2015; 104 (1): 145-153.

Zachara B. A. Mammalian selenoproteins. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease* 1992; 6 (3): 137-151.

Zhao L., Zhu Z., Lou H., Zhu G., Huang W., Zhang S. & Liu F. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and the risk of coronary heart disease (CHD): a meta-analysis. *Oncotarget* 2016; 7 (23): 33715-33721.

Zhu J.-Q., Zhu L., Liang X.-W., Xing F.-Q., Schatten H. & Sun Q.-Y. Demethylation of LHR in dehydroepiandrosterone-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *Molecular Human Reproduction* 2010; 16 (4): 260-266.

SKRAĆENICE KORIŠĆENE U TEKSTU

AEPCOS	Androgen excess PCOS Society
ALT	alanin amino transferaza
AS	apgar skor
AST	aspartat amino transferaza
CRP	C-reaktivni protein
Cu/Zn-SOD	bakar-cink superoksid dizmutaze
DHEA	dihidroepiandrosteron
DHEAS	dihidroepiandrosteron sulfat
DKP	diastolni krvni pritisak
EC-SOD	ekstracelularna superoksid dizmutaza
ELISA	(eng. <i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA</i>)
FAI	indeks slobodnih androgena (eng. <i>Free androgen index, FAI</i>)
F-G skor	(eng. <i>Ferriman–Gallwey score</i>)
FSH	folikulostimulirajući hormon
G0'	glikemija našte
G120'	glikemija u 120. minutu oralnog testa opterećenja glukozom
G30'	glikemija u 30. minutu oralnog testa opterećenja glukozom
G60'	glikemija u 60. minutu oralnog testa opterećenja glukozom
G90'	glikemija u 90. minutu oralnog testa opterećenja glukozom
GM-CSF	faktor stimulacije kolonije makrofaga (eng. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF</i>)
GnRH	gonadotropin-oslobađajući hormon (eng. <i>gonadotropin-releasing hormone, GnRH</i>)
GPX	glutation peroksidaze
GSH	glutation
GSH-Px 1	ćelijska (citosolna ili klasična) glutacion peroksidaza
GSH-Px 3	ekstracelularna glutacion peroksidaza

GSSG	oksidovani glutation
GST	Glutation S-transferaze
HAIRAN	Hiperandrogenizam, insulinska rezistencija i akantozna nigrikans
HbA _{1c}	hemoglobin A _{1c}
HOMA-IR	homeostatski indeks rezistencije na insulin
HOMA-β	homeostatski indeks funkcije β ćelija
I0'	insulin našte
I120'	insulinemija u 120. minutu oralnog testa opterećenja glukozom
I30'	insulinemija u 30. minutu oralnog testa opterećenja glukozom
I60'	insulinemija u 60. minutu oralnog testa opterećenja glukozom
I90'	insulinemija u 90. minutu oralnog testa opterećenja glukozom
IFCC	Međunarodna federacija za kliničku hemiju i laboratorijsku medicinu
IGFs	insulinu sličan faktor rasta (<i>eng. Insulin-like growth factors</i>)
IGI	insulinogeni indeks u 60. minutu testa oralnog opterećenja glukozom
IL-6	interleukin 6
IR	insulinska rezistencija
ISI _(Matsuda)	“Matsuda” indeks osetljivosti na insulin
ITM	indeks telesne mase
KAH	kongenitalna adrenalna hiperplazija
KSR	kiseonični slobodni radikali (<i>eng. Reactive oxygen species, ROS</i>)
LDL	lipoproteini niske gustoće
LH	luteinizirajući hormon
Mn-SOD	mangan superoksid dizmutaze
NIH	National Institute of Health
NO	azotni oksid (<i>eng. Nitric oxide</i>)
OGTT	test oralnog opterećenja glukozom
OHK	oralna hormonska kontracepcija
OK	obim kuka
OS	obim struka
OS/OK	odnos obim struka/obim kuka

PAI-1	inhibitor aktivatora plazminogena 1 (<i>eng. Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1</i>)
PCOS	sindrom policističnih jajnika (<i>engl. polycystic ovary syndrome</i>)
PCR	(<i>eng. polimerase chain reaction, PCR</i>)
PCR-RFLP	(<i>eng. polimerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP</i>)
PTP	proteinska tirozin fosfataza
RGF- β	transformirajući faktor rasta- β (<i>eng. transforming growth factor-β, TGF-β</i>),
ROC	krive operativnih karakteristika (<i>eng. receiver operating characteristics, ROC</i>)
ROS	reaktivne kiseonične vrste (<i>eng. Reactive oxygen species</i>)
SAD	Sjedinjene Američke Sržave
SD	standardna devijacija
SHBG	globulin koji vezuje polne hormone (<i>eng. Sex hormone binding globulin, SHBG</i>)
SKP	sistolni krvni pritisak
SNPs	polimorfizmi jednog nukleotida (<i>eng. Simple nucleotide polymorphisms, SNPs</i>)
SOD	superoksid dizmutaze
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
TAOS	totalni antioksidantni status
TG	trigliceridi
TM	telesna masa
TNF α	(<i>eng. tumor necrosis factor alfa</i>)
TV	telesna visina
UZ	ultrazvuk
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (<i>eng. Vascular endothelial growth factor, VEGF</i>)

BIOGRAFIJA

Ilijana I. Mažibrada (devojačko Krajnović) rođena je 26.12.1966. godine u Šibeniku, SFRJ. Osnovnu i Srednju medicinsku školu završila je u Kninu. Medicinski fakultet Sveučilišta „Vladimir Bakarić“ u Rijeci upisala je 1985. godine i na njemu diplomirala 24.10.1990. godine sa prosečnom ocenom 4,20/5,00. Pripravnički staž obavila je u OOB „Sveti Sava“ u Kninu, te 1993. godine položila stručni ispit. Specijalistički ispit iz ginekologije i akušerstva položila je 30.10.1997. godine na Institutu za ginekologiju i akušerstvo Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, Novi Beograd, dr Mažibrada se zaposlila 1998. godine, a od 28.01.2014. godine šef je Odeljenja za dečiju i adolescentnu ginekologiju u Republičkom centru za planiranje porodice. Magistarsku tezu pod nazivom „Alternativna hormonska kontracepcija i adolescentno doba“ odbranila je 27.12.2004. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Polaznik je brojnih kurseva kontinuirane medicinske edukacije na kojima je uzela aktivno učešće kao i na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu. Odlukom Ministarstva zdravlja Republike Srbije 28.01.2016. godine dobila je naziv Primarijus. Majka je dvoje dece, govori engleski jezik.

PRILOZI

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Ilijana I. Mažibrada

Broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Analiza pokazatelja oksidativnog stresa u adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika na različitim terapijskim režimima oralne hormonske kontracepcije”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

Ilijana Mažibrada

U Beogradu, 17.07.2018.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ilijana I. Mažibrada

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada **“Analiza pokazatelja oksidativnog stresa u adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika na različitim terapijskim režimima oralne hormonske kontracepcije”**

Mentor Prof. dr Đuro Macut

Komentor Prof. dr Ana Savić Radojević

Potpisana Ilijana I. Mažibrada

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

Ilijana Mažibrada

U Beogradu, 17.07.2018.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Analiza pokazatelja oksidativnog stresa u adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika na različitim terapijskim režimima oralne hormonske kontracepcije”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

Jeljana Mazibrada

U Beogradu, 17.07.2018.

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.