

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj 21.05.2018. godine, broj 5940/5, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

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

kandidata mr sci. med. dr Ilijane Mažibrada, zaposlene na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić” u Beogradu, kao šef Odeljenja za dečiju i adolescentnu ginekologiju, primarijus, lekar specijalista ginekologije i akušerstva.

Mentor je Prof. dr Đuro Macut a komentor Prof. dr Ana Savić-Radojević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Svetlana Vujović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu
2. Prof. dr Marija Plješa Ercegovac, vanredni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Artur Bjelica, vanredni profesor Medicinskog fakulteta,
Univerzitet u Novom Sadu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci. dr Ilijane Mažibrada napisana je na ukupno 112 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati istraživanja, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 8 slika, 20 tabela i 23 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je opisan sindrom policističnih jajnika (PCOS), kao i najnoviji epidemiološki podaci ovog najčešćeg endokrinog poremećaja žena reproduktivnog perioda. Prikazana su i aktuelna saznanja o patofiziologiji PCOS sa posebnim osvrtom na ulogu jajnika, hiperandrogenizma, hiperinsulinemije i insulinske rezistencije, neuroendokrine alteracije i genetskih faktora te na ulogu hronične inflamacije i oksidativnog stresa. Posebna pažnja posvećena je prikazivanju važećih dijagnostičkih kriterijuma kao i simptomima i kliničkoj slici četiri definisana PCOS fenotipa. Posebno je definisana i opisana adolescencija, kao i značaj i dijagnostički kriterijumi PCOS u adolescentnom uzrastu. Pored toga, opisana je i genetska heterogenost superfamilija glutation S-transferaza (GST), enzima koji učestvuju u reakcijama detoksikacije. Dat je prikaz različitih terapijskih pristupa koje se koriste u lečenju PCOS, sa posebnim naglaskom na potrebu da se pri izboru terapije ima u vidu heterogenost PCOS fenotipa, što samo po sebi nameće individualni pristup lečenju. S druge strane, u skladu sa promenama intenziteta simptoma i promenom kliničke slike potrebno je terapiju, koja će žene sa PCOS pratiti tokom celog njihovog života, stalno prilagođavati.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Pored određivanja kliničkih, biohemijskih, hormonskih i ultrazvučnih karakteristika, jedan od ciljeva istraživanja bio je i određivanje pokazatelja oksidativnog stresa i aktivnosti enzima antioksidantne zaštite kod adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika i zdrave kontrolne grupe. Takođe, cilj je bio da se izvrši uporedna analiza efekata različitih terapijskih režima šestomesečne primene oralne hormonske kontracepcije na pokazatelje oksidativnog stresa kod adolescentkinja sa ovim sindromom. Kao cilj istraživanja postavljeno je i određivanje polimorfizama glutation S-transferaza A1, M1, T1 i P1 kod zdravih i adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika.

U poglavlju **materijal i metode** navedeno je da se radi o kohortnoj studiji koja se bazira na longitudinalnom praćenju adolescentkinja kod kojih je dijagnostikovano PCOS. Ispitivanje je sprovedeno u Službi za dečiju i adolescentnu ginekologiju Republičkog centra za planiranje porodice, Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. Detaljno su opisani kriterijumi za uključivanje u studiju, a podaci o ispitivanim adolescentkinjama prikupljeni su uz pomoć upitnika, kliničkim, laboratorijskim i ultrazvučnim pregledom. Upitnikom su prikupljeni podaci iz lične i porodične anamneze, demografske, antropometrijske i kliničke karakteristike. U poglavlju su detaljno opisane metode određivanja biohemijskih parametara, hormonskog statusa i parametara oksidativnog stresa. Koncentracija proteinskih tiol grupa u plazmi određivana je spektrofotometrijski, po metodi *Jocelyn-a*, dok je koncentracija 3-nitrotirozina određivana kompetitivnom ELISA metodom. Aktivnost glutation peroksidaze u plazmi je određivana spektrofotometrijski, korišćenjem metode *Günzler-a* i sar., a aktivnost superoksid dizmutaze spektrofotometrijski, po metodi Misra i Fridovich. Opisana je metodologija izolacije DNK iz periferne krvi, a u cilju određivanja polimorfizama GST. Zatim je detaljno opisana metoda za ispitivanje delecionih polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* gena reakcijom lančanog umnožavanja (*engl. polymerase chain reaction, PCR*), kao i metode za određivanje polimorfizama jednog nukleotida, SNP GSTA1 klasa, analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (*eng. restriction fragment length polymorphism – PCR-RFLP*), odnosno metodom qPCR (*eng. quantitative Polymerase Chain Reaction*) za GSTP1 polimorfizam. Opisana je metodologija ultrazvučnog pregleda male karlice, koji treba da posluži za precizno merenje endometrijuma i jajnika u tri dimenzije, uz detaljan morfološki opis. Ova studija je sprovedena u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Sve pacijentkinje, čiji su lični podaci i biološki materijal korišćeni u studiji, ili njihovi staratelji potpisali su informisani pristanak za učešće u studiji.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 150 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je pokazalo da su adolescentkinje sa PCOS, u odnosu na svoje zdrave vršnjakinje, statistički značajno češće ($p < 0,001$) imale poremećaj menstrualnog ciklusa, kao i ispoljene kliničke simptome hiperandrogenizma (akne lica, akne leđa i viši F-G skor). Analizom bihemijskih parametara adolescentkinja sa PCOS registrovan je značajan porast fibrinogena i hs-CRP ($p \leq 0,001$), kao i povišen odnos LDL/HDL ($p < 0,05$). Među ispitanicama je otkrivena i visoko statistički značajna razlika u nivoima LH, progesterona, testosterona, FAI i SHBG ($p < 0,001$). Ultrazvučnim pregledom je kod adolescentkinja sa PCOS izmeren značajno tanji endometrijum, ali i statistički značajno veća zapremina jajnika i češće prisustvo zadebljane strome ($p < 0,001$). Adolescentkinje sa PCOS su, u odnosu na zdrave kontrole, imale značajno više vrednosti hs-CRP i fibrinogena. Pored toga, u grupi adolescentkinja sa PCOS pokazana je značajna pozitivna korelacija markera inflamacije, hs-CRP i fibrinogena sa antropometrijskim (ITM, obim struka) i lipidnim parameterima (LDL, LDL/HDL). Na osnovu ROC analize definisane su granične vrednosti za hs-CRP od 0,35 mg/L, kao i za fibrinogen od 2,8 g/L. U odnosu na definisane granične vrednosti markera inflamacije, adolescentkinje sa PCOS imale su statistički značajno više vrednosti antropometrijskih i lipidnih parametara u poređenju sa devojakama čije su koncentracije hs-CRP i fibrinogena bile ispod graničnih vrednosti.

U uslovima našte, nije pronađena značajna razlika u koncentraciji parametara oksidativnog stresa između adolescentkinja sa PCOS i zdravih kontrola. Tokom OGTT pokazano je da je procenat promene oba parametra oksidativnog oštećenja proteina (nitrotirozin, proteinske tiol grupe) značajno veći kod adolescentkinja sa PCOS u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$), dok promena aktivnosti SOD i GPX nije dostigla statističku značajnost među ispitivanim grupama ($p > 0,05$). Statistički značajna korelacija procenta promene nitrotirozina uočena je za LH, testosteron, FAI, androstenedion i DHEAS, kao i DHEAS i AUC glukoze sa tiol grupama. AUC insulina korelirao je pozitivno sa GPX, dok je LH statistički značajno korelirao sa SOD ($p < 0,001$). Distribucija ispitivanih GST polimorfizama (*GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1* i *GSTT1*) nije statistički značajno razlikovala između adolescentkinja sa PCOS i zdravih kontrola ($p > 0,05$). Adolescentkinje sa PCOS, nosioci *GSTM1*-nultog genotipa imale su znatno niži nivo testosterona u odnosu na one sa *GSTM1*-aktivnim genotipom ($p < 0,05$).

Posle šest meseci na različitim terapijskim režimima oralne hormonske kontracepcije (OHK), registrovana je regulacija menstrualnog ciklusa, statistički značajno manja pojava akni na licu i na leđima, kao i značajno manji F-G skor ($p \leq 0,001$). U obe ispitivane grupe posle sprovedene terapije registrovane su statistički značajno niže vrednosti FSH, LH, testosterona, FAI, androstenediona i DHEAS ($p \leq 0,001$), značajno manja zapremina jajnika ($p < 0,001$), kao i značajne promene u koncentracijama proteina, albumina i bilirubina, bazalno i tokom OGTT. Posle primene OHK pilule u obe grupe ispitanica registrovan je statistički značajan porast hs-CRP ($p < 0,05$), kao i porast koncentracije triglicerida i HDL ($p \leq 0,001$), što je dovelo do značajnog sniženja odnosa TC/HDL i LDL/HDL ($p \leq 0,001$). Kod adolescentkinja na terapijskom režimu sa 30 μ g EE registrovan je i značajan porast ukupnog holesterola. Primenjen terapijski režim kod adolescentkinja sa PCOS nije statistički značajno uticao na promenu parametara oksidativnog oštećenja proteina i aktivnosti GPX, dok je kod ispitanica lečenih OHK pilulom sa 20 μ g etinilestradiola i 3 mg drospirenona registrovana značajno niža koncentracija mokraćne kiseline ($p = 0,007$) i visoko statistički značajan pad aktivnosti SOD ($p < 0,001$).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Sindrom policističnih jajnika predstavlja najčešći endokrini poremećaj žena reproduktivnog perioda, sa učešćalošću i do 20%. Prvi klinički simptomi ispoljavaju u adolescentnom uzrastu a kod 1,14% do 3% adolescentkinja razvijese 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, 2015). Pored toga, različita patogeneza, brzina razvijanja kliničke slike i oblici kliničkih manifestacija ovog sindroma značajno utiču na dijagnostičke kriterijume u adolescenciji. U ovom istraživanju dijagnoza PCOS je kod 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).

Rezultati ove doktorske disertacije 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

nastanak kardiovaskularne bolesti. Iako su dosadašnje studije pokazale da su u PCOS prisutne povišene koncentracije hs-CRP, i dalje su aktuelna neslaganja vezana za dilemu da li je povišen hs-CRP posledica endokrinih poremećaja u PCOS *per se* ili antropometrijskih ili metaboličkih poremećaja koji nastaju u toku PCOS (Ganie i sar., 2014). Dobijeni rezultati povišenih koncentracija fibrinogena kod adolescentkinja sa PCOS u poređenju sa grupom zdravih kontrola u skladu su s rezultatima dobijenim kod odraslih ispitanica sa PCOS (Atiomo i sar., 1998; Mannerås-Holm i sar., 2011; Mohamadin i sar., 2010). Pored toga, dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima više prospektivnih studija sprovedenih kod odraslih ispitanica sa PCOS (Hak i sar., 1999; Mendall i sar., 1996), koji su pokazali negativnu korelaciju HDL-holesterola sa sistemskim markerima inflamacije.

Međusobna povezanost oksidativnog stresa i markera hronične inflamacije niskog stepena s 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., 2015a). 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-oksidge i ksantin oksidge (Jiang i sar., 2011; Macut i sar., 2011). Nakon oralnog opterećenja glukozom kod žena sa PCOS registrovana su povećana proporcionalna povećanja proinflamatornog citokina $TNF\alpha$, aktivnost NADPH-oksidge i različitih markera oksidativnog stresa (González, 2012; Savic-Radojevic i sar., 2015). Čini se da hiperandoregenemija sama po sebi izaziva povećanu proizvodnju slobodnih radikala, pre svega povećanjem ekspresije i aktivnosti NADPH-oksidge (Chignalia i sar., 2015). 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). Kao odgovor na oralni test opterećenja glukozom registrovali smo 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 s 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.

Osim u detoksikaciju ksenobiotika i slobodnih radikala, superfamilija glutation transferaze (GST) katališe reakcije konjugacije različitih endogenih supstrata, uključujući steroide i prostaglandine (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). 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 su kod adolescentkinja sa PCOS nosilaca *GSTM1*-nultog genotipa, kod kojih je GSTM1 enzim odsutan kao posledica delecionog polimorfizma GSTM1, vrednosti cirkulišućeg testosterona bile značajno niže u poređenju sa koncentracijama testosterona izmerenim kod adolescentkinja sa PCOS, nosiocima GSTM1-aktivnog genotipa. 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 natupao 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).

Efekti estradiola i progestina na oksidativni stres i dalje su nekonzistentni, imajući u vidu njihovu pro- i antioksidantnu aktivnost (De Groote i sar., 2009). Pokazano je da devetomesečna primena OHK (20 μ g EE i 150 μ g desogestrela) kod mladih žena dovodi do značajnog porasta aktivnosti antioksidantnih enzima, katalaze i GPX (Massafra i sar., 1993). Iako je potvrđeno da estrogene inhibiraju peroksidaciju lipida izazvanu slobodnim radikalima *in vitro* i *in vivo* (Yagi i Komura, 1986), ipak još uvek nije poznato da li postoji veza između polnih hormona i antioksidantnog enzimskog sistema. 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. S druge strane ni u uslovima oralnog opterećenja glukozom kod lečenih adolescentkinja sa PCOS nije došlo do značajnijih promena aktivnosti GPX i SOD.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Savic-Radojevic A, **Mazibrada I**, Djukic T, Stankovic Z, Pljesa-Ercegovac M, Sedlecky K, Bjekic-Macut J, Simic T, Mastorakos G, Macut Dj. Glutathione S-transferases (GSTs) polymorphism could be an early marker in the development of PCOS: an insight from non-obese and non-insulin resistant adolescents. Endokrynol Pol. 2018. DOI: 10.5603/EP.a2018.0034. (M23, IF: 1.341)

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Analiza pokazatelja oksidativnog stresa u adolescentkinja sa sindromom policističnih jajnika na različitim terapijskim režimima oralne hormonske kontracepcije**“ kandidata mr sci. med dr Ilijane Mažibrada predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uloge oksidativnog stresa u etiologiji i patofiziologiji PCOS u populaciji adolescentkinja. Pored toga, rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju doprinos boljem sagledavanju dugoročnih efekata primenjene terapije, kao i efikasnijoj prevenciji hroničnih metaboličkih sekvela kod pacijentkinja sa PCOS. Do sada se u našoj zemlji nijedna studija nije bavila navedenom problematkom u adolescentnom uzrastu.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju mr sci. med dr Ilijane Mažibrada i odobri njenu javnu odbranu radi

sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 25.06.2018. godine

Članovi Komisije:

Prof. dr Svetlana Vujović

Prof. dr Marija Plješa Ercegovac

Prof. dr Artur Bjelica

Mentor:

Prof. dr Đuro Macut

Komentor:

Prof. dr Ana Savić-Radojević
