



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
AKADEMSKE DOKTORSKE STUDIJE- KLINIČKA MEDICINA

**POVEZANOST ESTARA FTALNE KISELINE I SINDROMA
POLICISTIČNIH JAJNIKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori: prof. dr Milica Medić Stojanoska
prof. dr Artur Bjelica

Kandidat: asist. dr Andrijana Milankov

Novi Sad, 2018.godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Andrijana Milankov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof dr Milica Medić Stojanoska Prof dr Artur Bjelica
Naslov rada: NR	Povezanost estara ftalne kiseline i sindroma policističnih jajnika
Jezik publikacije: JP	Srpski/latinica
Jezik izvoda: JI	sr. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina

Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet Hajduk Veljkova 3 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 8 / stranica 150 / slika 49/ grafikona 1 / tabela 37/ referenci 178)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Endokrinologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	endokrini disruptori; ftalne kiseline; zagađivači životne sredine; faktori rizika; sindrom policističnih jajnika; metabolički sindrom; kardiovaskularne bolesti; metaboličke bolesti
UDK	547.584:616-008.9 547.584:618.11-006
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Uvod: Ftalati su vrsta endokrinih disruptora koji se široko koriste kao plastifikatori i rastvarači ali i kao aditivi brojim proizvodima koji se svakodnevno koriste. Prema dosadašnjim studijama na eksperimentalnim životinjama, ali i u humanoj populaciji, dietri ftalne kiseline utiču na reproduktivni sistem, učestvuju u nastanku insulinske rezistencije i gojaznosti. Sindrom policističnih ovarijuma (PCOS) je najčešći endokrinološki poremećaj reproduktivnog sistema žena u generativnom periodu. Insulinska rezistencija i centralna gojaznost, kao faktori kardiometaboličkog sindroma imaju značajnu ulogu u etiologiji PCOS. Ciljevi: Utvrditi prisustvo

metabolita ftalne kiseline kod žena u reproduktivnom periodu u našoj sredini, kao i da li postoji povezanost ovih endokrinih disruptora sa antropometrijskim parametrima, parametrima glikoregulacije, lipidima i lipoproteinima seruma, gonadotropinima, polnim hormonima, leptinom i indeksima kardiometaboličkog rizika kod žena sa sindromom policističnih jajnika. **Metode:** Istraživanje je obuhvatalo 61 ženu sa sindromom policističnih jajnika koje su podeljene u dve podgrupe: 31 ispitanica sa PCOS i prisutnim ftalatnim metabolitima u urinu i 30 ispitanica sa PCOS bez ftalatnih metabolita u urinu. Kontrolnu grupu je činilo 30 zdravih žena. Kod svih ispitanica vršena su antropometrijska merenja (TV, TM, OS) i određivane vrednosti parametara glikoregulacije (glikemija i insulinemija, izačunat je HOMA index), lipidi i lipoproteini seruma (ukupan holesterol, trigliceridi, LDL i HDL holesterol), gonadotropini (LH i FSH), polni hormoni (estradiol i testosteron) i leptin. U proceni kardiometaboličkog rizika korišćena su dva indeksa LAP i VAI. Iz jutarnjeg uzorka urina određivano je prisustvo i koncentracija 10 ftalatnih metabolita: Mono-metil ftalat- MMP, Mono-etil ftalat - MEP, Mono-n-butil ftalat - MBP, Mono-n-propil ftalat- MPP, Mono-izo-amil ftalat - MiAP, Mono-n-amil ftalat - MnAP, Mono-cikloheksil ftalat - MCHP, Monobenzil ftalat- MBzP, Mono-(2-etilheksil) ftalat- MEHP, Mono-n-octil ftalat-MOP. Za statističku obradu podataka korišćeni su odgovarajući parametarski i neparametarski testovi. **Rezultati:** Kod 51 % ispitanica sa PCOS potvrđeno je prisustvo ftalatnih metabolita u urinu. Najzastupljeniji ftalatni metabolit je bio MEHP, zatim MEP, ali je potvrđeno i prisustvo MMP, MPP i MOP. Kod ispitanica sa PCOS su potvrđene statistički značajne korelacije između ukupnih ftalatnih metabolita i BMI, obima struka, glikemije, insulinemije, HOMA indeksa, ukupnog holesterola, triglicerida, LDL holesterola, leptina i testosterona. Analizom pojedinačnih ftalatnih metabolita utvrđene su pozitivne korelacije između MMP i obima struka, parametara glukoznog metabolizma, ukupnog holesterola, LDL holesterola, triglicerida, LAP i VAI indeksa. **Zaključak:** Kod žena sa PCOS u reproduktivnom periodu u našoj sredini je

	<p>potvrđeno prisustvo ftalnih metabolita. Najviše koncentracije su verifikovane za MEHP i MEP, ukazujući na visoku ekspoziciju di-etilheksil ftalatu (DEHP) i di-etil ftalatu (DEP). Ukupni ftalati značajno povećavaju vrednosti parametara koje učestvuju u razvoju metaboličkog sindroma kod PCOS, ali i povećavaju kardiovaskularni rizik ovih bolesnica. Direktna, značajna veza je potvrđena između MMP i testosterona, parametara i indeksa kardiometaboličkog sindroma.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata:</p> <p>DP</p>	<p>21.01.2016.</p>
<p>Datum odbrane:</p> <p>DO</p>	
<p>Članovi komisije:</p> <p>(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)</p> <p>KO</p>	<p>predsednik:</p> <p>član:</p> <p>član:</p>

University of Novi Sad

Faculty

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Andrijana Milankov
Mentor: MN	Prof dr Milica Medić Stojanoska Prof dr Artur Bjelica
Title: TI	Association between phthalic acid esters and polycystic ovarian syndrome
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	eng. / sr
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication:	Vojvodina

LP	
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Medical faculty, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Serbia
Physical description: PD	8 chapters; 150 pages; 49 pictures; 37 tables; 1 figure; 178 references.
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Endocrinology
Subject, Key words SKW	Endocrine Disruptors; Phthalic Acids; Environmental Pollutants; Risk Factors; Polycystic Ovary Syndrome; Metabolic Syndrome; Cardiovascular Diseases; Metabolic Diseases
UC	547.584:616-008.9 547.584:618.11-006
Holding data: HD	Library of Medical faculty Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	Introduction: Phthalates are a type of endocrine disruptor widely used as plasticizers and solvents but also as additives to many products that are used daily. According to previous studies in experimental animals, but also in the human population, phthalic diesters affect the reproductive system, participate in the onset of insulin resistance and obesity. Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder of the reproductive system of women in the generative period. Insulin resistance and central obesity, as factors of cardiometabolic syndrome, have a significant role in the etiology of PCOS. Objectives: To determine the

presence of phthalic acid metabolites in women in the reproductive period in our environment, and whether there is a connection between these endocrine disruptors with anthropometric parameters, glycoregulation parameters, lipids and serum lipoproteins, gonadotrophins, sex hormones, leptin and indexes of cardiometabolic risk in women with polycystic ovarian syndrome. **Methods:** The study included 61 women with polycystic ovarian syndrome divided into two subgroups: 31 subjects with PCOS and present phthalate metabolites in urine and 30 subjects with PCOS without phthalate metabolites in urine. The control group consisted of 30 healthy women. In all subjects, anthropometric measurements were carried out (TV, TM, WC) and the values of glycoregulation parameters (glycemia and insulinemia, HOMA index), lipids and serum lipoproteins (total cholesterol, triglycerides, LDL I HDL cholesterol), gonadotropins FSH), sex hormones (estradiol and testosterone) and leptin. In the assessment of cardiometabolic risk LAP and VAI indexes were determined. From the morning urine sample, the presence and concentration of 10 phthalate metabolites were determined: Mono-methyl phthalate-MMP, Mono-ethyl phthalate-MEP, Mono-n-butyl phthalate-MBF, Mono-n-propyl phthalate- MPP, Mono-iso-amyl phthalate – MiAP, Mono-n-amyl phthalate – MnAP, Mono-cyclohexyl phthalate-MCHP, Monobenzyl phthalate-MBzP, Mono- (2-ethylhexyl) phthalate-MHEP, Mono-n-octyl phthalate-MOP. For statistical data processing, appropriate parametric and non-parametric tests were used. **Results:** 51% of subjects with PCOS confirmed the presence of phthalate metabolites in urine. The most common phthalate metabolite was MEHP, then MEP, but the presence of MMP, MPP and MOP also was confirmed. In subjects with PCOS, a statistically significant correlations between total phthalate metabolites and BMI, waist circumference, glycemia, insulinemia, HOMA index, total cholesterol, triglyceride, LDL cholesterol, leptin and testosterone were confirmed. By analyzing individual phthalate metabolites, a positive correlations between MMP and waist circumference, glycoregulation parameters, total cholesterol, LDL cholesterol, triglyceride, testosterone and LAP and VAI index were

	<p>determined. Conclusion: In women with PCOS in the reproductive period, the presence of phthalic metabolites in our environment was confirmed. The highest concentrations were verified for MEHP and MEP, indicating a high exposure of DEHP and DEP. Total phthalates significantly increase the values of parameters involved in the development of metabolic syndrome in PCOS, but also increase the cardiovascular risk of these patients. A direct, significant association was confirmed between MMP and testosterone, parameters and index of cardiometabolic syndrome.</p> <p>.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>January 21st 2016</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: member: member:</p>

Zahvaljujem se svojim mentorima, prof dr Milici Medić Stojanoski i prof dr Arturu Bjelici na maksimalnoj pomoći i podršci, a posebno na strpljenju koje su imali.

Zahvaljujem se kolegama sa Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCV i Centra za laboratorijsku medicinu KCV. Posebno se zahvaljujem sestrama Driti Škrbić i Zorici Fargo bez kojih ne bih mogla sprovesti istraživački deo doktorata.

Zahvaljujem se dr Janu Suđi na pomoći oko realizacije istraživanja.

Želim da se zahvalim prof dr Iliji Tanackovu koji mi je pomogao u statističkoj obradi rezultata i njihovom tumačenju.

Ovo je istraživanje deo Pokrajinskog projekta pod nazivom: "Ftalati kao hemijske supstance koje remete rad endokrinog sistema". Nosilac projekta je Medicinski fakultet Novi Sad, a rukovodilac projekta prof dr Milica Medić Stojanoska. Ovom prilikom se zahvaljujem Pokrajinskom sekretarijatu za nauku i tehnološki razvoj na pomoći oko realizacije istraživanja.

Posebno sam zahvalna svojim roditeljima i sestrama koji su uvek verovali u mene.

Najveću zahvalnost dugujem svom suprugu i svojim sinovima, Andriji i Dimitriju, koji su moj neiscrpni izvor snage i motivacije i bez kojih moj rad i borba ne bi imali smisla.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ženski reproduktivni sistem.....	1
1.2. Sindrom policističnih ovarijuma (PCOS)	4
1.2.1. Definicija, etiologija i podela.....	5
1.2.2. Patofiziologija i metabolički poremećaji	6
1.3. Endokrini disruptori	11
1.3.1. Definicija, podela i delovanje	11
1.4. Ftalati	13
1.4.1. Epidemiologija.....	13
1.4.2. Fizičko - hemijske osobine ftalata i podela.....	16
1.4.3. Metabolizam ftalata.....	17
1.4.4. Osnovne karakteristike najčešćih ftalata i njihovi štetni uticaji na čoveka.....	19
1.5. Ftalati i PCOS	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	28
2.1. Ciljevi istraživanja	28
2.2. Hipoteze istraživanja.....	28
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1. Ispitanici.....	29
3.1.1. Kriterijumi za uključivanje u istraživanje	29
3.1.2. Kriterijumi za neuključivanje u istraživanje	29
3.1.3. Podela u ispitivane grupe	30
3.2. Metode rada	30
3.3. Statistička obrada i prezentacija podataka	36
4. REZULTATI	38
4.1. Opšte karakteristike ispitanika	38
4.2. Rezultati ispitivanja ftalatnih metabolita kod ispitanica sa PCOS.....	41
4.3. Analiza starosti i antropometrijskih parametara u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama	43
4.3.1. Analiza starosti u ispitivanim podgrupama.....	43

4.3.2. Analiza telesne mase u ispitivanim podgrupama	44
4.3.3. Analiza indeksa telesne uhranjenosti u ispitivanim podgrupama	46
4.3.4. Analiza obima struka u ispitivanim podgrupama.....	48
4.3.5. Analiza povezanosti ukupnih ftalatnih metabolita sa antropometrijskim parametrima	50
4.4. Analiza glukoznog metabolizma u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama	51
4.4.1. Analiza glikemije u ispitivanim podgrupama	51
4.4.2. Analiza insulinemije u ispitivanim podgrupama.....	53
4.4.3. Analiza indeksa insulinske rezistencije u ispitivanim podgrupama	56
4.4.4. Analiza povezanosti ukupnih ftalatnih metabolita sa glukoznim metabolizmom.....	57
4.5. Analiza lipida i lipoproteina seruma u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama.....	59
4.5.1. Analiza ukupnog holesterola u ispitivanim podgrupama	59
4.5.2. Analiza triglicerida u ispitivanim podgrupama	61
4.5.3. Analiza HDL-holesterola u ispitivanim podgrupama	66
4.5.4. Analiza LDL-holesterola u ispitivanim podgrupama.....	67
4.5.5. Analiza povezanosti ukupnih ftalatnih metabolita sa lipidima i lipoproteinima seruma	68
4.6. Analiza kardiometaboličkog rizika u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama.....	70
4.6.1. Analiza poveznosti ukupnih ftalatnih metabolita sa indeksima kardiometaboličkog rizika	73
4.7. Analiza gonadotropnih i polnih hormona u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama.....	74
4.7.1. Analiza folikulostimulišućeg hormona u ispitivanim podgrupama	74
4.7.2. Analiza lutenizirajućeg hormona u ispitivanim podgrupama	75
4.7.3. Analiza estradiola u ispitivanim podgrupama.....	78
4.7.4. Analiza testosterona u ispitivanim podgrupama	81
4.7.5. Analiza povezanosti ukupnih ftalatnih metabolita sa gonadotropinima i polnim hormonima..	82
4.8. Analiza leptina u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama.....	83
4.8.1. Analiza leptina u ispitivanim podgrupama	83
4.8.2. Analiza povezanosti ukupnih ftalatnih metabolita i leptina	87
4.9. Uticaj pojedinačnih ftalatnih metabolita na ispitivane parametre u PCOS pozitivnoj grupi	88
4.9.1. MMP i ispitivani parametri kod PCOS pozitivnih ispitanica.....	88
4.9.2. MEP i ispitivani parametri kod PCOS pozitivnih ispitanica.....	90
4.9.3. MBP i ispitivani parametri kod PCOS pozitivnih ispitanica.....	91
4.9.4. MEHP i ispitivani parametri kod PCOS pozitivnih ispitanica.....	92
5. DISKUSIJA	94
5.1. Opšte karakteristike ispitanika	94

5.2. Metabolički poremećaji i PCOS	95
5.2.1. Antropometrijski parametri i PCOS.....	95
5.2.2. Glukočni metabolizam i PCOS	97
5.2.3. Lipidi i lipoproteini seruma i PCOS	98
5.2.4. Hormonske karakteristike PCOS	99
5.2.5. Leptin i PCOS	101
5.2.6. Kardiometabolički rizik i PCOS	102
5.3. Ftalati i PCOS	103
5.3.1. Ftalati i antropometrijske karakteristike u PCOS.....	108
5.3.2. Ftalati i glukočni metabolizam u PCOS.....	110
5.3.3. Ftalati i leptin u PCOS	112
5.3.4. Ftalati i lipidi i lipoproteini seruma u PCOS.....	115
5.3.5. Ftalati i kardiometabolički rizik u PCOS	120
5.3.6. Ftalati i gonadna osovina u PCOS	121
6. ZAKLJUČCI	129
7. SKRAĆENICE	131
8. LITERATURA	134

1. UVOD

1.1. Ženski reproduktivni sistem

Polni organi žene su kompleksne anatomske strukture sa višestrukom ulogom. Po svojoj građi i funkciji su dosta složeniji od muških jer nisu namenjeni samo stvaranju jajnih ćelija, već i čuvanju oplođene jajne ćelije, njenom razvoju i rađanju novog organizma. U funkcionalnom smislu ženski polni organi se sastoje od germinativnog i endokrinog dela, a u anatomske od spoljašnjih i unutrašnjih organa.

U spoljašnje polne organe spadaju: klitoris, velike usne (labia majora) i male usne (labia minora), trem vagine (vestibulum vaginae), tremna glavica (bulbus vestibuli), Bartolinijeve žlezde (glandulae vestibulares majores-Bartholini) i male tremne žlezde (glandulae vestibulares minores), a jednim imenom se nazivaju vulva.

U unutrašnje ženske polne organe spadaju: usmina (vagina), materica (uterus), jajnici (ovariumi) i jajovod (tuba uterina Fallopi) (1).

Jajnici su ženske gonade, parni organi spljoštenog ovoidnog oblika (prosečnih dimenzija 3 x 1,5 x 1 cm) smešteni uz lateralne zidove karlične duplje. Imaju ključnu ulogu u svim morfo funkcionalnim promenama ženskih genitalija tokom reproduktivnog perioda žene. Naime, u njima rastu i sazrevaju oocite- ženski gameti , ali je intenzivna i endokrina aktivnost, počev od puberteta a završno sa menopauzom, zasnovana na sintezi ženskih polnih hormona- estrogena i progesterona (2).

Površinu jajnika pokriva jednoslojni kubični ili niski cilindrični epitel koji tokom života i kod uvećanja jajnika postaje spljošten. Taj epitel je od ranije poznat kao germinativni epitel zbog pogrešne pretpostavke da je izvor polnih ćelija. Germinativni epitel se od hilusa mezovarijuma nastavlja naizgled sličnim mezotelom peritoneuma. Tokom života, površina jajnika pokazuje sve veći broj ožiljaka (posledica ovulacije) i uvrata, takođe obloženih germinativnim epitelom. Epitelne ćelije leže na bazalnoj lamini ispod koje je sloj gustog veziva koji se pruža celom površinom jajnika kao tunica albuginea ovarii.

Jajnik čine dva osnovna dela – znatno razvijeniji površni deo je kora jajnika (*cortex ovarii*), a središnji, manji deo čini srž jajnika (*medulla ovarii*). Pored kore i srži, jajnik sadrži i hilus kao deo organa preko koga krvni sudovi, limfatici i nervi ulaze i izlaze iz jajnika.

Cortex ovarii je periferni, voluminozniji deo jajnika koji kompletno okružuje medulu izuzev u području hilusa. Građen je od vezivnog tkiva u kome su sadržane parenhimske komponente kore – jajni folikuli u različitim razvojnim i regresivnim stadijumima, žuta tela i intersticijumske ćelije. Stroma koreksa okružuje jajne folikule tokom celokupnog njihovog razvoja, a osim potporne uloge, stroma čini tkivnu osnovu za nastanak teke interne i teke eksterne (omotači jajnih folikula). Treća važna uloga strome je endokrina, jer pojedine stromalne ćelije sintetišu polne steroide. Stromalne ćelije razdvaja gusta retikulinska mreža udružena sa ređim kolagenim vlaknima koja se, idući ka površini kore, zgušnjavaju formirajući tuniku albugineu jajnika.

Medulla ovarii je znatno manji, središnji deo jajnika sastavljen od veziva, krvnih sudova, limfatika, nerava i specifičnih hilusnih ćelija.

Hilusne ćelije karakteristične su za predeo hilusa, mada se mogu naći i u okolnom mezovarijumu i meduli jajnika. Prisutne su u jajniku fetusa, posle rođenja iščezavaju i ponovo se pojavljuju u pubertetu. Najbrojnije su za vreme trudnoće i posle menopauze. Nalikuju intersticijumskim Lajdigovim ćelijama testisa kako po ultrastrukturi tako u po funkciji jer sadrže Reinke-ove kristale i sekretuju androgene hormone.

Jajni folikuli čine glavnu komponentu kortikalnog parenhima. To su loptaste formacije izgrađene od jajne ćelije omotane jednim ili više slojeva folikulskih (granuloznih) ćelija. Žensko dete se rađa sa oko milion jajnih folikula, ali se u postnatalnom periodu, atrezijom folikula, njihov broj smanjuje sve do potpunog iščezavanja u doba menopauze. Tokom 30-40 godina, koliko traje reproduktivni period žene, iz oba jajnika se oslobodi ukupno 400-450 jajnih ćelija, ostali folikuli i jajne ćelije u njima propadaju.

Tokom sazrevanja, jajni folikuli prolaze kroz nekoliko faza: primordijalni, primarni unilaminarni, primarni multilaminarni, sekundarni i na kraju tercijarni, preovulacioni ili de Graff-ov folikul.

Jajna ćelija tokom rasta i sazrevanja jajnih folikula doživljava postupne promene koje nisu naglašene u istoj meri kao promene histološke strukture folikula. Jedan od razloga je to što primarana oocita za vreme folikulogeneze ostaje u diplotenom stadijumu profaze pre mejotičke deobe. Pošto se ta deoba okončava tek pred ovulaciju, primarna oocita je vrlo dugo izložena

raznim uticajima koji mogu uzrokovati poremećaje. Prva mejotska deoba završava se u tercijarnom folikulu nastankom sekundarne oocite i prvog polarnog tela. Odmah po ovoj redukcionalnoj deobi, sekundarna oocita ulazi u drugu mejotsku deobu koja se zaustavlja u metafazi. Sekundarna oocita završava drugu mejotsku deobu samo u slučaju oplodnje (3) (4).

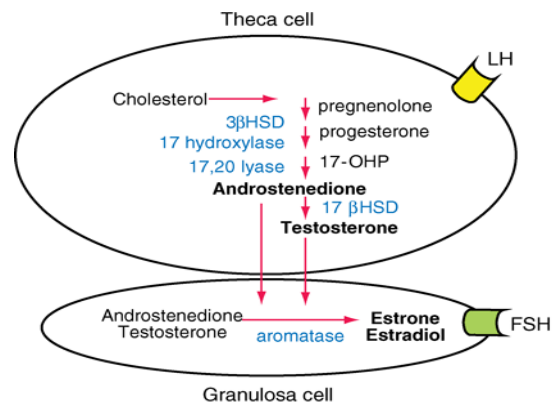
Obeležje normalnih reproduktivnih godina u životu žene su ritmične, mesečne promene u stepenu lučenja ženskih polnih hormona i odgovarajuće fizičke promene u jajnicima i drugim polnim organima.

Promene koje se javljaju u jajniku tokom mesečnog ciklusa u potpunosti zavise od gonadotropina folikulostimulišućeg hormona (*Follicle stimulating hormone* – FSH) i lutenizujućeg hormona (*Luteinizing hormone* - LH), malih glikoproteina, molekulske mase oko 30000, sekretovanih od strane adenohipofize, a stimulisanih od strane gonadotropin oslobađajućeg hormona (*Gonadotropin-releasing hormone* - GnRH). GnRH luče neuroni hipotalamusa i približno njih 7000 su u kontaktu sa kapilarima portnog sistema hipofize, preko čeka ostavaruju svoju ulogu u sintezi i sekreciji gonadotropina.

FSH i LH stimulišu ciljane ćelije u jajnicima, vezujući se za viokospecifične receptore, nakon čega zbog aktivacije sistema adenzin monofosfatnog sekundarnog glasnika u citoplazmi ćelije, stvaranja protein kinaze i fosforilacije ključnih enzima, dolazi do sinteze polnih hormona.

Ćelije ovarijuma ne skladište steroidne hormone koje stvaraju, već ih luče kao odgovor na LH i FSH tokom menstrualnog ciklusa. U toku razvoja folikula, sinteza estrogena od holesterola zahteva integraciju između teka i granuloza ćelija, takozvani “*two-cell model for steroidogenesis*”. FSH receptori se nalaze samo na granuloza ćelijama, dok su LH receptori ograničeni na teka ćelije do kasnog stadijuma folikularnog razvoja, kada se mogu naći i na granuloza ćelijama. Teku ćelije koje okružuju folikul su visoko vaskularizovane i koriste holesterol iz krvi za sintezu androstendiona i testosterona pod kontrolom LH. Androstendion i testosteron se prenose preko bazalne lamine u granuloza ćelije, koje bogate aromatazom, pod kontrolom FSH produkuju estrogen (slika 1). Testosteron koji stvaraju teka ćelije se delimično sekretuje u perifernu krv i pretvara u dihidrotestosteron u koži, odnosno u estrogen u masnom tkivu (5).

Slika 1. Fiziološki procesi nastanka estrogena u ovarijumu (6)



Kako bi se fiziološki procesi u toku menstrualnog ciklusa odvijali nesmetano, potrebna je koordinacija između hormona hipotalamusa, hipofize i gonada koja se ostvaruje preko pozitivne i negativne povratne sprege. Pored ovih hormona, značajnu ulogu igraju i ovarijalni peptidi. Inhibin je heterodimer sastavljen iz α - subjedinice i β A ili β B – subjedinice (inhibin A i inhibin B), sekretovan od strane granulosa ćelija malog antralnog folikula. Inhibin B se koristi kao marker ovarijalne rezerve i značajan je inhibitor FSH, nezavisan od estradiola. Inhibin A je takođe prisutan lutenizirajućim granulosa ćelijama i jedan od glavnih sekretornih produkata žutog tela. Aktivin je homodimer inhibin β subjedinice, sposoban da stimuliše sintezu i sekreciju FSH. Antimulerijan hormon (*Anti mullerian hormone* - AMH), sintetisan od strane granulosa ćelija je kao i Inhibin B pokazatelj ovarijalne rezerve. AMH takođe inhibiše efekte FSH na ekspresiju aromataze (7).

1.2. Sindrom policističnih ovarijuma (PCOS)

Sindrom policističnih ovarijuma (*Polycystic ovary syndrome* - PCOS) je najčešći endokrinološki poremećaj u reproduktivnom dobu žene i glavni uzrok neplodnosti u žena. Još 1935. godine su Stein i Leventhal prvi uočili vezu između bilateralno uvećanih policističnih ovarijuma i kompleksa kliničkih znakova: amenoreja, hirzutizam neplodnost, gojaznost. Po njima je i dobio

ime Stein-Leventhalov sindrom. Kasnija morfološka, biohemijska i endokrinološka istraživanja bolesnica sa ovim sindromom pokazala su da rigidni kriterijumi Steina i Leventhala neadekvatni jer ovaj sindrom obuhvata bolesnice sa različitim biohemijskim i fiziološkim poremećajima. Tako se poseban klinički entitet, za koji se smatralo da predstavlja Stein-Leventhalov sindrom, vremenom izgubio u spektru poremećaja. Da bi se naglasila heterogenost sindroma uveden je i prihvaćen naziv sindrom policističnih ovarijuma koji podrazumeva skup simptoma udruženih sa policističnim jajnicima.

1.2.1. Definicija, etiologija i podela

Postoje dve glavne definicije sindroma policističnih jajnika. Jedna je data 1990. godine od strane *National Institutes of Health* (NIH), prema čijim kriterijumima je za postavljanje dijagnoze potrebna hronična anovulacija i klinički ili biohemijski znaci hiperandrogenizma. S druge strane, Roterdamski kriterijumi (2003.godine) zahtevaju dva ili više simptoma od navedenih: hronična anovulacija, klinički ili biohemijski znaci hiperandrogenizma i policistični ovarijumi. Uključivanjem policističnih ovarijuma kao dijagnostički kriterijum, Roterdamska definicija prepoznaje četiri fenotipa sindroma policističnih ovarijuma (tabela 1).

Tabela 1. Fenotipovi u sindromu policističnih jajnika (8)

SIGNS, RISKS, AND PREVALENCE	SEVERE PCOS	HYPERANDROGENISM AND CHRONIC ANOVULATION	OVULATORY PCOS	MILD PCOS
Periods	Irregular	Irregular	Normal	Irregular
Ovaries on ultrasonography	Polycystic	Normal	Polycystic	Polycystic
Androgen concentrations	High	High	High	Mildly raised
Insulin concentrations	Increased	Increased	Increased	Normal
Risks	Potential long-term	Potential long-term	Unknown	Unknown
Prevalence in affected women	61%	7%	16%	16%

Klinički, biohemijski i patohistološki spektar PCOS je širok. Uvećani cistično degenerisani ovarijumi mogu postojati i bez već opisanih klasičnih kliničkih odlika. Policistični ovarijumi se mogu naći u plodnih žena i bez hirzutizma, u neplodnih sa redovnim menstrualnim ciklusom, pa čak i u žena sa metroragijom. Suprotno tome, klinički znaci oligomenoreja,

hirzutizam i neplodnost mogu postojati bez obostrano uvećanih jajnika, kao što se tipične cistične promene mogu naći u ovarijama normalne veličine. Bez obzira da li ovarijumi uvećani ili ne, karakteristično je prisustvo multiplih subkortikalnih folikularnih cista, hipertrofične centralno postavljene strome i zadebljanje kapsule, po čemu je sindrom i dobio ime.

Iako je PCOS prisutan kod 5-10% žena u reproduktivnom periodu, njegovi uzroci nastanka i dalje ostaju nepoznati. Istraživanja rađena poslednjih godina ukazuju na to da genetski, epigenetski, endokrini, metabolički i faktori spoljašnje sredine učestvuju zajedno u razvoju ovog kompleksnog poremećaja. Iako se pod faktorima spoljašnje sredine najčešće misli na gojaznost i način život (pre svega nedovoljna fizička aktivnost), za koje postoje dokazi da igraju bitnu ulogu u nastanku PCOS, poslednjih godina se sve više govori i o hemikalijama, pre svega sintetskim, koje mogu učestvovati u patogenezi i /ili prezentaciji PCOS (9).

1.2.2. Patofiziologija i metabolički poremećaji

Naziv PCOS je pogodan i adekvatan za opisivanje kliničkih znakova sindroma, ali ne i specifičnog patofiziološkog mehanizma.

Nekontrolisana steroidogeneza može biti prvi poremećaj kod PCOS, obzirom na to da 60-80 % žena ima povišen nivo cirkulišućeg testosterona. Policistični ovarijumi imaju tanak sloj tekalnih ćelija koje sekretuju velike količine androgena i u bazalnim uslovima i kao odgovor na LH stimulaciju. Pretpostavlja se da je ova velika produkcija androgena ima genetsku osnovu, ali do sada nije pronađen polimorfizam ili mutacija gena odgovorna za to. Ipak, utvrđena je hiperaktivnost steroidnih enzima u teka ćelijama, koje mogu poremetiti intracelularni signalni put (10).

Policistični ovarijumi imaju dva do šest puta više primarnih, sekundarnih i malih antralnih folikula nego zdravi ovarijumi. Koji je mehanizam nastanka ovog broja folikula je nepoznat, ali se pretpostavlja da je u osnovi polimorfizam androgenog receptora. Svi ovi folikuli rastu do 10 mm, a to je poslednji stadijum pred stvaranje dominantog folikula. Ovo zaustavljanje rasta folikula je udruženo sa velikom stimulacijom folikularnih ćelija od strane LH i insulina u sredini bogatoj androgenima. Insulin poboljšava odgovor granulosa ćelija na LH i dovodi do prevremene lutenizacije. Granuloza ćelije žena sa PCOS su selektivno rezistentne na insulin te je

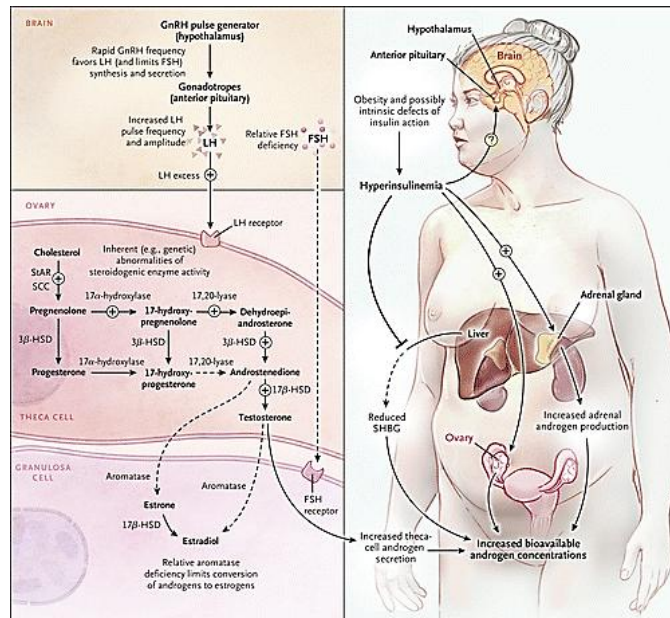
metabolizam glukoze stimulisan insulinom smanjen, dok je insulin stimulisana steroidogeneza normalna. Kao posledica suficitarnog energetskog metabolizma u folikulu dolazi do anovulacije (10).

Žene sa PCOS pokazuju visok nivo insulinske rezistencije, koji se može uporediti sa obolelima od tipa 2 šećerne bolesti. Insulinska rezistencija doprinosi hiperandrogenizmu i poremećaju u lučenju gonadotropina kroz nekoliko mehanizama. Visoka koncentracija insulina redukuje nivo seksualnog steroid vezujućeg-globulina (*Sex hormone-binding globulin* – SHBG), čime se povećava koncentracija biorasploživog testosterona. A može služiti kao ko-faktor u stimulaciji adrenalne i ovarijalne sinteze androgena. Insulin direktno može delovati na hipotalamus, pituitarnu žlezdu delujući na oslobađanje hormona, ali kako se insulinska rezistencija manifestuje na abnormalno oslobađanje gonadotropina u PCOS ostaje neizvesno.

Poremećaj hipotalmusno-hipofizne regulacije sekrecije gonadotropina nisu urođeni defekti, već funkcionalni poremećaji kao posledica hronične anovulacije i neadekvatne sekrecije gonadotropina. Frekvencija i amplituda lučenja lutenizirajućeg hormona su značajno povećane, dok je nivo folikuloštимуlišućeg hormona ostaje u domenu srednje folikularne faze. Frekvencija oslobađanja GnRH je povišena sekundarno zbog smanjene senzitivnosti GnRH pulsno generatora na negativnu povratnu spregu od strane estrogena i progesterona. Ovo povećano pulsno oslobađanje GnRH, dovodi do povećane sekrecije LH koji stimuliše teka ćelije da proizvode veću količinu androgena. Ovi androgeni su nepotpuno aromatizovani u estradiol u granulosa ćelijama zbog zastoja u razvoju folikula kao posledice niskog nivoa FSH (11). Nizak nivo FSH se može objasniti predominantno inhibitornim dejstvom estradiola na FSH, relativnom neosetljivošću FSH na GnRH i hipersekrecijom inhibina od strane ovarijuma.

U patofiziologiji PCOS učestvuje i ekstaglandularna produkcija androgena, pre svega u masnom tkivu. Promene u aktivnosti 11β hidroski-steroid dehidrogenaze kao i 5α reduktaze i 5β reduktaze, koji su uključeni u metabolizam kortizola mogu povećati adrenalnu steroidogenezu i time delimično objasniti povišenu adrenalnu produkciju u PCOS (12).

Uobičajno je bazalna koncentracija LH u serumu bolesnica sa PCOS oko dva puta veća nego u folikularnoj fazi normalnog ciklusa, a izostaje i preovulatorni skok nivoa LH. Koncentracija FSH je na donjoj granici ili ispod granice normalnih vrednosti. U oko tri četvrtine bolesnica odnos LH : FSH je veći od 3. Na slici 2. prikazani su patofiziološki procesi u PCOS.



Slika 2. Patofiziološki mehanizmi nastanka PCOS (13)

Metabolički poremećaji koji su deo PCOS su hiperandrogenemija, hiperinsulinemija i tip 2 šećerne bolesti, infertilitet, dislipdemija, gojaznost i povećan kardiometabolički rizik.

Hiperandrogenizam je najčešći i najviše istaknuti dijagnostički kriterijum PCOS, ali njegova potvrda nije jednostavna i zavisna je od etičke pripadnosti, telesne težine i starosti. Procenjuje se na osnovu kliničkih znaka i /ili biohemijskih analiza. Klinički znaci su pre svega kožne manifestacije – hirsutizam, akne i alopecija.

Prevalenca hirsutizma u opštoj populaciji je u 5 - 15% u zavisnosti o etičkih i geografskih lokacija. U velikoj studiji pacijenta sa kliničkim hiperandrogenizmom, kod 72,1% pacijenta je dijagnostikovano PCOS. Dakle, PCOS predstavlja glavni uzrok hirsutizma, ali prisustvo hirsutizma ne mora uvek da znači ovarijalnu disfunkciju. Generalno, hirsutizam je prisutan kod 65 - 75% pacijenta sa PCOS i može predvideti metaboličke posledice kao i neuspeh u lečenju infertiliteta. Najjednostavniji način vizuelnog procenjivanja hirsutizma je još uvek Ferriman-Gallnjev score.

Akne su česte kod žena sa PCOS ali prevalenca varira u zavisnosti od godina starosti i etičke pripadnosti. Androgena alopecija može biti ocenjena subjektivnim metodama, kao što je Ludnjing skor ali nije česta u PCOS. Može se javiti zajedno sa hirsutizmom i aknama, ali ne postoji jasna korelacija sa povišenim androgenim hormonima u krvi. Neke studije su pokazale

vezu između alopecije, metaboličkog sindroma i insulinske rezistencije, dok druge pokazuju da akne i alopecija nisu dobri pokazatelji hiperandrogenizma, za razliku od hirsutizma.

Procenjivanje postojanja akni, alopecije i hirsutizma kod žena sa PCOS je uvek subjektivno. Potrebno je konsultovati dermatologa i isključiti druge etiološke faktore, naročito ukoliko akne ne reaguju na hormonsku terapiju (14).

Biohemijski, hiperandrogenizam potvrđujemo određivanjem ukupnog serumskog testosterona i SHBG, te izračunavanjem slobodnog testosterona. Radioimunoeseji koji mere slobodan testosteron u serumu su dostupni i široko rasprostranjeni, ali nisu pouzdani, te ne bi trebalo da se koriste. Koncentracija drugih androgena, kao što je androstendion i dihidroepiandroestendion sulfat (*Dehydroepiandrosterone* - DHEAS) su često viši kod žena sa PCOS, ali njihovo merenje nema veliku važnost (15).

Žene sa PCOS imaju povećan rizik za anovulatorne cikluse i infertilitet. Preporučuje se skrining ovulatornog statusa na osnovu menstrualnog kalendara. Međutim, može se desiti da žene sa urednim menstrualnim ciklusom imaju anovuluaciju, te je korisno određivanje nivoa progesterona u lutealnoj fazi ciklusa. Uvek je potrebno isključiti i druge uzorke infertiliteta (14).

Osobe sa PCOS imaju povećan rizik za poremećenu toleranciju glukoze (*Impaired glucose tolerance* – IGT) i tipa 2 šećerne bolesti (T2DM). Prevalenca insulinske glukozne tolerancije kod pacijenata sa PCOS je 30 - 35%, a 3 - 10% ima T2DM. Osobe koje nisu gojazne imaju manji rizik, tj. u 10 - 15% slučajeva postoji IGT, a 1 - 2 % šećerna bolest. Studije pokazuju slabu senzitivnost glikoziliranog hemoglobina u detekciji IGT.

Zbog visokog rizika od ovih poremećaja, preporučuje se 2 h OGTT sa 75 glukoze u cilju skrininga za IGT i T2DM. Nivo HbA1C se može uzeti u obzir ukoliko pacijent ne može ili ne želi da završi test oralne tolerancije glukoze (OGTT – *oral glucose tolerance test*). Retestiranje je potrebno vršiti svakih 3 - 5 godina ili češće, ukoliko klinička slika to zahteva (centralna gojaznost, dobijanje na telesnoj masi, simptomi šećerne bolesti) (14).

Preporučeno je da se kod žena sa PCOS vrši skrining na faktore rizika za kardiovaskularne bolesti: pozitivna porodična anamneza, pušenje cigareta, IGT/T2DM, povišen krvni pritisak, dislipidemije, gojaznost (naročito povećana viscelarna masna masa). Članovi PCOS udruženja na osnovu dosadašnjih analiza i publikovanih studija veliki značaj daju prevenciji kardiovaskularnih bolesti kod žena sa PCOS.

Sindrom policističnih jajnika je povezan sa dislipidemijama uključujući nizak HDL holesterol, povišene vrednosti triglicerida, ukupnog holesterola i LDL holesterola. Iako je serija studija pokazala da su srednje vrednosti cirkulišućih lipida kod žena sa PCOS u granicama referentnih, prema *National Cholesterol Education Program - NCEP-ATPIII* kriterijumima 70% bolesnica ima neki lipidski poremećaj (12).

Povišen krvni pritisak nije uvek prisutan kod PCOS žena, ali ove bolesnice imaju povećan rizik za hipertenziju u kasnijoj životnoj dobi. U nekim studijama i sistolni i dijastolni krvni pritisak bolesnica sa PCOS je u referentnim granicama, dok u drugim, meren srednji arterijski pritisak i sistolni pritisak su povišeni u odnosu na kontrolnu grupu.

Anatomske dokazi rane koronarne i drugih vaskularnih bolesti su dokumentovani na više načina. Povećana debljina intime medije karotidne artreije, prediktor šloga i infarkta miokarda, prisutna je kod bolesnica sa PCOS u poređenju sa ženama iste životne dobi kontrolne grupe. Drugi znaci ateroskleroze, kao što je koronarna kalcifikacija su takođe detektovani kod PCOS bolesnica. Ehokardiografski u verifikovane anatomske i funkcionalne razlike srca u poređenim grupama (sa i bez PCOS) uključujući povećanu levu pretkomoru, zadebljanje zida leve komore i smanjenu ejakcionu frakciju. Zadebljanje zida leve komore je u linearnoj korelaciji sa insulinskom rezistencijom. Postoje studije koje pokazuju oštećenje endotela i smanjenje vaskularne komplijanse kod žena sa PCOS, nezavisno od gojaznosti, insulinske rezistencije i ukupnog holesterola. Smanjenje endotelne disfunkcije je verifikovano smanjenjem insulnske rezistencije medikamentom terapijom i smanjenjem telesne mase.

I epidemiološke studije pokazuju povećan rizik kod PCOS žena. *Case-control* studija, koja se zasniva na *Njomen's Health* studiji pronalazi da žene koje su imale kardiovaskularni insident imaju niske vrednosti SHBG i visoke vrednosti slobodnog androgena (14).

U proceni kardiometaboličkog rizika možemo koristiti dva indeksa.

Lipid accumulation product (LAP) index je jednostavan indeks za procenu akumulacije masnog tkiva kod odraslih osoba, a zasniva se na obimu struka i vrednostima triglicerida. Prema Kahn's studiji ovaj indeks je bolji u proceni kardiometaboličkog rizika u poređenju sa indeksom telesne uhranjenosti (*body mass index - BMI*) (16).

Visceral adiposity index (VAI) je matematički model koji koristi antropometrijske (BMI i obim struka (OS)) i funkcionalne (trigliceridi i HDL holesterol) parametre, a korelira sa

kardiometaboličkim rizikom u opštoj populaciji i u jakoj je vezi sa insulinskom senzitivnošću i visceralnim masnim tkivom (17).

Povećano masno tkivo, pre svega visceralno, je održeno sa hiperandrogenemijom i povećanim metaboličkim rizikom (pre svega kardiovaskularnih komplikacija). Iz tog razloga je kod adolescenata i žena sa PCOS neophodna stalna kontrola BMI i merenje obima struka.

Broj gojaznih osoba u svetu je u stalnom porastu; studije u različitim zemljama sveta pokazuju sličnu prevalencu (30 - 70%) gojaznih među osobama sa PCOS. Gojaznost je jedan od uzroka hiperandrogenemije, koji se ogleda u smanjenom nivou SHBG i posledično visokoj koncentraciji bioraspoloživih androgena. Obzirom na to da je kod gojaznih osoba povećan nivo leptina, hormona sintetisanog od strane masnog tkiva, još uvek su prisutna kontraverzna pitanja oko njegove veze sa reprodukcijom. Receptori za leptin su prisutni na hipotalamusno-pituitarno-ovarijalnoj osi, ali i na granuloza ćelijama, oociti i ranom stadijumu embriona. Ekspresija leptinskih receptora na granuloza ćelijama ukazuje na direktnu ulogu leptina u ovarijalnoj folikulogenezi, a preko mRNA deluje i na LH stimulisanu produkciju estradiola. PCOS je čest poremećaj, prisutan u najvećem procentu kod gojaznih žena, te je veliki broj istraživanja koji pokazuje da postoji pozitivna korelacija između nivoa leptina i žena sa PCOS (18).

1.3. Endokrini disruptori

1.3.1. Definicija, podela i delovanje

Endokrini disruptori (EDc) su definisani od strane *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) kao „egzogeno unete materije koje interferišu u sintezi, sekreciji, transportu, metabolizmu, vezivanju i eliminaciji hormona koji su prisutni u krvi i odgovorni za homeostazu, reprodukciju i razvoj organizma“.

Prvobitno se smatralo da EDc deluju samo preko nuklearnog receptora uključujući estrogene (ERs), androgene, progesteronske, tiroidne i retinoid receptore. Međutim, dalja istraživanja su pokazala mnogo širi spektar delovanja. Naime, endokrini disruptori svoje dejstvo ostvaruju preko nuklearnih receptora, ne nuklearnih steroidnih receptora (npr. Membranski ERs),

nesteroidnih receptora (npr. Neurotransmitterski receptori kao što su serotoniniski, dopaminski i norepinefrinski receptor), orphan receptora, zatim deluju na enzime koji učestuju u metabolizmu i/ili biosintezi, ali i preko drugih mehanizama ostvaruju svoje dejstvo na endokrini i reproduktivni sistem (19).

Grupa molekula identifikovanih kao endokrini disruptori je veoma heterogena i uključuje sintetske hemikalije koje se koriste kao industrijski rastvarači/lubrikanti i njihovi proizvodi (polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated biphenyls (PBBs), dioxins), plastiku (bisphenol A (BPA)), plastifikatore (phthalates), pesticide (methoxychlor, chlorpyrifos, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)), fungicide (vinclozolin) i farmaceutska sredstva (diethylstilbestrol (DES)). Prirodne materije pronađene u hrani koju konzumiraju ljudi i životinje (npr. Fitoestrogeni) takođe mogu delovati kao endokrini disruptori (19).

Ekspozicija i unošenje EDC u organizam se vrši preko kontaminirane vode, udisanjem kontaminiranog vazduha, konzumiranjem hrane ili transdermalnim kontaktom sa zemljom ili predmetima koji ih sadrže. Međutim, kakav će imati efekat i posledice na ljudski organizam, zavisi od više faktora.

Uzrast tj. godine života su izuzetno važne kada govorimo o delovanju EDC. Danas je usvojen termin „*fetal basis of adult disease*“ (20) kako bi se opisao uticaj faktora spoljašnje sredine na razvoj jedinke i razvoj određenih bolesti ili poremećaja kasnije u adultnom dobu. S toga, periodi u razvoju organizma, kao što su fetalni period prenatalno i dečije doba i doba puberteta postanatalno su najvulnerabilniji na dejstvo EDC.

Iz navedenog proizilazi da postoji određeni latentni period od ekspozicije do manifestacije poremećaja kao posledice delovanja EDC. Ovaj latentni period može postojati i kada EDC deluje na jedinku u adultnom dobu.

Ekspozicija populacije endokrinim disruptorima koji se nalaze u životnoj sredini nikada nije ograničena na jednu vrstu. S toga, efekti različitih klasa EDC se ostvaruju zajedno delujući aditivno ili čak sinergistički (21).

Kakav će biti efekat EDC na organizam zavisi i od doze i dužine ekspozicije. Naime, često niske doze EDC imaju mnogo potentniji efekat na jedinku od visokih doza ukoliko su prisutne u dužem vremenskom periodu i deluju na jedinku u toku kritičnog razvojnog doba (22) (23).

U poslednje vreme se sve više govori o epigenetskom efektu EDC. Istraživanja u ovoj oblasti navode da se prenošenje sa jedne generacije na drugu odigrava ne kroz mutaciju na nivou DNA sekvence, već kroz modifikaciju faktora koji regulišu ekspresiju gena, kao što su DNA metilacija i histon acetilacija (24).

1.4. Ftalati

1.4.1. Epidemiologija

Ftalati se koriste u industriji od 1930-tih godina, prvenstveno kao plastifikatori – u povećanju fleksibilnosti polivinil hlorida (PVC) (25).

U zavisnosti od toga koji alkohol gradi alkil lanac (od metanola do tridekanola), da li je u jednom nizu ili se grana ftalati imaju različite karakteristike, a samim tim i primenu. Ftalati sa dugim lancem di-etilheksil ftalat (*di 2-ethylhexyl phthalate* (DEHP)), di-izo-nonil ftalat (*di-isononyl phthalate* (DiNP)), di-izo-decil ftalat (*di-iso-decyl phthalate* (DiDP)), di 2-propilheptil ftalat (*(di 2-propylheptyl) phthalate* (DPHP)) se pre svega koriste kao PVC polimeri i plastifikatori. Mogu se naći u materijalima za gradnju i konstrukciju, kablovima i žicama, podovima, odeći, nameštaju, enterijeru automobila, igračkama, ali i u ambalažama u kojima se pakuje hrana. Ftalati kratkih lanaca kao što su dimetil ftalat (*dimethyl phthalate* (DMP)), dietil ftalat (*diethyl phthalate* (DEP)), butil benzil ftalat (*butyl benzyl phthalate* (BBZP)), di-n-butil ftalat (*di-n-butyl phthalate* (DnBP)) i di-izo-butil ftalat (*di-iso-butyl phthalate* (DiBP)), se koriste u proizvodnji sredstava za ličnu higijenu i negu, bojama i farmaceutskoj industriji (26).

Ftalati su nekovalentnim vezama vezani za plastiku, tako da se lako otpuštaju zagađujući atmosferu, zemljište i prirodne vodene tokove. Zagađenost vazduha ftalatima se kreće od 1-50 ng/m³, a DEHP je često prisutan u mnogo većoj koncentraciji (do 3640 ng/m³). Takođe su detektabili u sedimentu (0,01-115 mg/kg), poljoprivrednom zemljištu (0,02-264 mg/kg) i urbanom zemljištu (0,01-30,1 mg/kg). Srednji nivo ftalata u industrijskim otpadnim vodama iznosi 3,46 ug/l, otpadnim vodama stanovništva 61,3 ug/l, dok je u fekalnim vodama prisutan u koncentraciji od 66,0 ug/l. Dalje, ftalati su prisutni i u površinskim vodama u količini od 0,29-1,24 ug/l. Obzirom na prisutnost u vodenim tokovima, jedna studija je određivala njihov

koncentracije u ribama, i pronašla je prisustvo DEHP i DBP u nivoima od 1,8 ug/kg. Ovi endokrini disruptori su relativno stabilni u prirodi i opstaju u njoj u dužem vremenskom periodu (27) (28) (29).

Hrana je, generalno gledano, najveći izvor ftalata u opštoj populaciji. Kontaminacija hrane se odigrava u toku njene proizvodnje, rukovanja, transporta, pakovanja i skladištenja. Ftalati su prisutni u svim vrstama hrane, ali ih najviše ima u masnoj hrani (mleko, puter, meso) (30) (31) (32). Majčino mleko je glavni izvor ftalata za novorođenče (33)(34). Najčešće detektovan ftalat u hrani jeste DEHP. Studije rađene između 2003. i 2010. godine analizirale su uzorke urina kod 9000 ispitanika koji su se hranili u restoranima brze hrane i pronašli su mnogo veće koncentracije dve vrste ftalata DEHP i DiNP. Interesantna je činjenica da je i kod ispitanika koji retko unose ovu vrstu hrane prisutna mnogo veća koncentracija ovih ftalata (DEHP nivo je za 15,5 %, a DiNP 25% veći), u odnosu na osobe koji se ne hrane ovom vrstom hrane (35).

Drugi značajan izvor ftalata je vazduh u zatvorenim prostorijama i kozmetska sredstva.

Vazduh u urbanim delovima sadrži mnogo veće koncentracije ftalata od vazduha u ruralnim. Takođe, veća je koncentracija prisutna u zatvorenim prostorijama. Zbog svoje nestabilnosti, DEP i DMP su prisutni u većim koncentracijama u vazduhu za razliku od težeg i stabilnijeg DEH. Veća temperatura vazduha rezultuje većoj koncentraciji ftalata. PVC podovi su izvor veće koncentracije BBP i DEHP, koji su uglavnom prisutni u prašini. 2012. godine Švedska studija ispitivala je prisustvo ftalata iz PVC podova u dečijem organizmu i utvrdila da deca mogu uneti ftalate ne samo preko hrane, već i inhalatornim i dermalnim putem (36).

Odojčad i mala deca su u većem riziku od ekspozicije prvenstveno zbog oralne faze u kojoj se tada nalaze. Losioni i kupke za negu tela koje se koriste za decu sadrže ftalate. Autori studije rađene 2008.godine navode da „dečiji losioni, puderi i šamponi su i vezi sa povećanom koncentracijom ftalatnih metabolita u urinu dece i da je ova veza jača ukoliko je dete mlađe. Ova veza sugerise na to da je dermalna ekspozicija značajno doprinosi prisustvu ftalata u organizmu kod ove populacije“ (37). Dermalno i inhalatarno unošenje ftalata su posebno značajni kod DBP, koji se koristi i mnogim kozmetskim preparatima kao što su parfemi, gelovi i lakovi za kosu, losioni za telo, dezodoransi i lakovi za nokte (38).

Izloženost visokim dozama ftalata je prisutna i tokom medicinskih procedura kao što su transfuzije krvi i hemodijaliza, ali i oralnom upotrebom lekova, pre svega antibiotika,

antihistaminika i laksativa. Biljni preparati i suplementi, uključujući one koji se koriste tokom trudnoće, mogu takođe sadržati ftalate. Ftalate možemo naći u sastavu kapsula koje sadrže aktivne supstance-lek. Lekovi koji sadrže ftalate su omeprazol, didanozin, mesalazin i teofilin. Skorašnje studije su pokazale da je 50 puta veća koncentracija mono butil ftalata, metabolita DBP, kod ispitanika koji koriste lek Asacol (generičko ime – mesalazin), u odnosu na one koji ga ne koriste (39).

Da uzrast igra veoma bitnu ulogu u efektima ftalata na ljudski organizam, smatrali su i autori koji su merili dnevnu ekspoziciju ovim endokrinim disruptorima kod dece u odnosu na odrasle. Kanadska studija rađena devedesetih godina utvrdila je da dnevna ekspozicija DEHP kod odojčeta iznosi 9 ug/kg telesne mase, kod male dece 19 ug/kg telesne mase, kod starije dece 14ug/kg TM, a kod odraslih 6ug/kg TM (40). 2008.godine, *Danish Environmental Protection Agency* (EPA) pronašla je nekoliko ftalata u gumama za masiranje desni kod dece i upozorila na rizik po zdravlje ukoliko se one sisaju ili žvaću. Ipak, *European Commission Scientific Committee on Health and Environmental Risks* (SCHER) smatra da i u slučaju da dete odgrize i proguta parče gume, ne postoji rizik po njegovo zdravlje (41).

Kada poredimo koncentraciju ftalata između polova, utvrđeno je da su žene u svim uzrastnim dobima mnogo izloženije ovim endokrinim disruptorima. Prisustvo MEP, MBP, MbZP i MEHP u ženskoj populaciji je potvrđeno u mnogo većoj koncentraciji u poređenju sa muškarcima, što ukazuje na široku rasprostranjenost ftalata, naročito njihovo prisutvo u kozmetičkim preparatima. U Tabeli 2. prikazani su izvori najčešćih ftalata.

Tabela 2. Izvori najčešće korišćenih ftalata (42)

Ftalati	Izvor
DMP	Insekticidi, plastika
DEP	Šamponi, parfemi, sapuni, losioni, make-up proizvodi, industrijski rastvarači, lekovi
DBP	Lepkovi, make-up proizvodi, industrijski rastvarači, lekovi
DIBP	Lepkovi, make-up proizvodi, industrijski rastvarači
BBP	Vinil podovi, lepkevi, zaptivne mase, rastvarači
DCHP	Gume, polimeri
DEHP	Meka plastika, uključujući tubuse, igračke, proizvode za kući, proizvode za pakovanje i skladištenje hrane
DOP	Meka plastika
DINP	Meka plastika, zamena za DEHP

1.4.2. Fizičko - hemijske osobine ftalata i podela

Ftalati su familija industrijskih jedinjenja sa zajedničkom hemijskom strukturom : dialkil ili alikl/aril estri 1,2-benzendikarbonske kiseline. Ime ftalati potiče od ftalne kiseline, koja u osnovi potiče od reči „naftalin“(43).

Ftalati su supstance sa dvo - estarskom strukturom, koje sadrže benzen prsten sa dve funkcionalne estarske grupe. Ove slabo obojene tečnosti, bez mirisa, nastaju reakcijom ftalnog anhidrida sa odgovarajućim alkoholom. Tečne su konzistencije, slabo rastvorljivi u vodi (rastvorljivost pada sa povećanjem dužine bočnog lanca ili povećanjem molekularne težine), a visoko rastvorljivi u mastima. Nestabilnost na standardnoj temperaturi je niska, posebno za ftalate sa dugim lancem kao što su DEHP i BBP (38).

Hemijska formula ftalata je $C_8H_4O_4$, , srednja molekularna težina 164,116 g/mol. Tačka ključanja je 378.3 ± 25.0 °C na 760 mmHg, Najčešći ftalati prikazani su u Tabela 3.

Tabela 3. Najčešći ftalati (43)

Ime	Skraćenica	Formula	Molekularna težina (g/mol)
Dimethyl phthalate	DMP	$C_6H_4(COOCH_3)_2$	194.18
Diethyl phthalate	DEP	$C_6H_4(COOC_2H_5)_2$	222.24
Diallyl phthalate	DAP	$C_6H_4(COOCH_2CH=CH_2)_2$	246.26
Di-n-propyl phthalate	DPP	$C_6H_4[COO(CH_2)_2CH_3]_2$	250.29
Di-n-butyl phthalate	DBP	$C_6H_4[COO(CH_2)_3CH_3]_2$	278.34
Diisobutyl phthalate	DIBP	$C_6H_4[COOCH_2CH(CH_3)_2]_2$	278.34
Butyl cyclohexyl phthalate	BCP	$CH_3(CH_2)_3OOC C_6H_4COOC_6H_{11}$	304.38
Di-n-pentyl phthalate	DNPP	$C_6H_4[COO(CH_2)_4CH_3]_2$	306.40
Dicyclohexyl phthalate	DCP	$C_6H_4[COOC_6H_{11}]_2$	330.42
Butyl benzyl phthalate	BBP	$CH_3(CH_2)_3OOC C_6H_4COOCH_2C_6H_5$	312.36
Di-n-hexyl phthalate	DNHP	$C_6H_4[COO(CH_2)_5CH_3]_2$	334.45
Diisohexyl phthalate	DIHxP	$C_6H_4[COO(CH_2)_3CH(CH_3)_2]_2$	334.45
Diisooheptyl phthalate	DIHpP	$C_6H_4[COO(CH_2)_4CH(CH_3)_2]_2$	362.50
Butyl decyl phthalate	BDP	$CH_3(CH_2)_3OOC C_6H_4COO(CH_2)_7$	362.50
Di(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP, DOP	$C_6H_4[COOCH_2CH(C_2H_5)(CH_2)_3]_2$	390.56
Di(n-octyl) phthalate	DNOP	$C_6H_4[COO(CH_2)_7CH_3]_2$	390.56
Diisooctyl phthalate	DIOP	$C_6H_4[COO(CH_2)_5CH(CH_3)_2]_2$	390.56
n-Octyl n-decyl phthalate	ODP	$CH_3(CH_2)_7OOC C_6H_4COO(CH_2)_9$	418.61
Diisononyl phthalate	DINP	$C_6H_4[COO(CH_2)_6CH(CH_3)_2]_2$	418.61
Di(2-propylheptyl) phthalate	DPHP	$C_6H_4[COOCH_2CH(CH_2CH_2CH_3)_2]_2$	446.66
Diisodecyl phthalate	DIDP	$C_6H_4[COO(CH_2)_7CH(CH_3)_2]_2$	446.66
Diundecyl phthalate	DUP	$C_6H_4[COO(CH_2)_{10}CH_3]_2$	474.72

Diisoundecyl phthalate	DIUP	$C_6H_4[COO(CH_2)_8CH(CH_3)_2]_2$	474.72
Ditridecyl phthalate	DTDP	$C_6H_4[COO(CH_2)_{12}CH_3]_2$	530.82
Diisotridecyl phthalate	DITP	$C_6H_4[COO(CH_2)_{10}CH(CH_3)_2]_2$	530.82

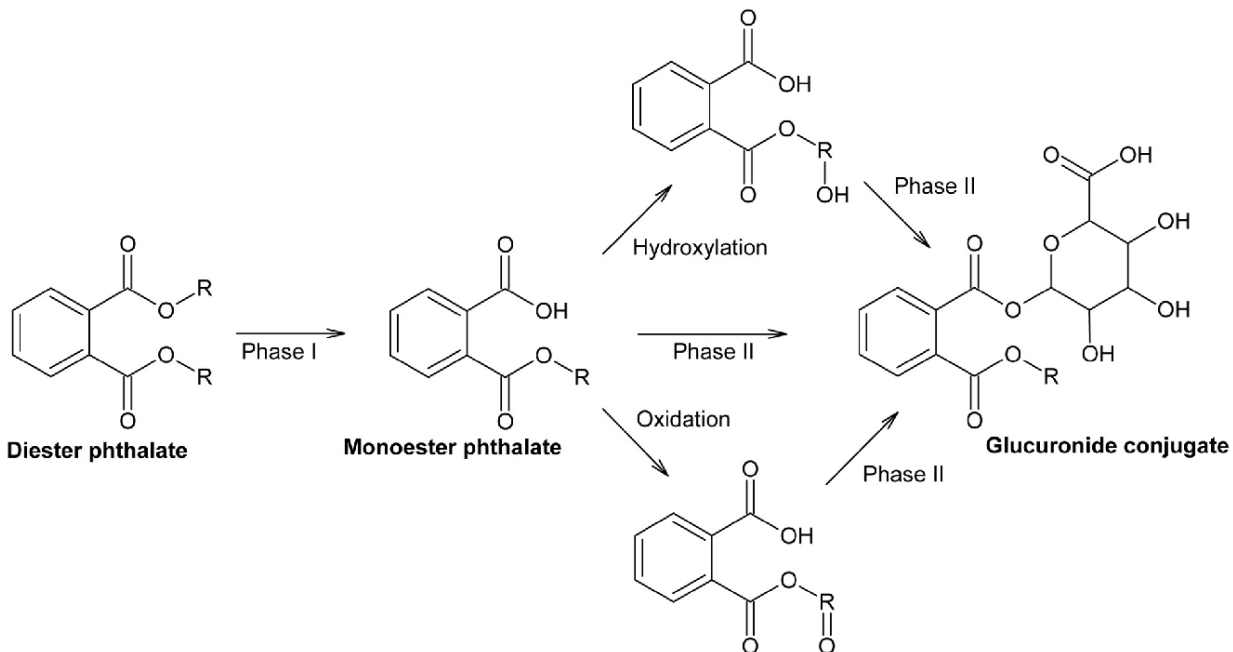
Ftalati se dele u dve grupe na osnovu svoje molekularne težine. Ftalati male molekularne težine (ftalati kratkih lanaca, jedan do četiri ugljenikova atoma) su DMP, DEP i DIBP, dok u grupu ftalata velike molekularne težine (ftalati dugih lanaca, 5 i više ugljenikovih atoma) spadaju DEHP, DOP i DINP.

1.4.3. Metabolizam ftalata

Kao rezultat sve prisutne upotrebe ftalata u kozmetičkim preparatima i ambalažama koje sadrže hranu i piće koje konzumiramo, ekspozicija ftalatima je konstantna i ostvaruje se ingestijom, inhalacijom i transdermalnim putem.

Ftalati se brzo metabolišu nakon ulaska u organizam čoveka, a metabolički put sadrži minimalno dva koraka: faza I hidroliza, faza II konjugacija. U prvoj fazi metabolizma, od diestra ftalata hidrolizom nastaju primarni metaboliti, monoestri ftalata pod dejstvom lipaza i esteraza u crevima i parenhimu (44)(45). Normalno bi ovaj prvi korak metabolizma trebao biti detoksifikacija, ali in vivo i in vitro studije pokazuju da su diestri ftalata mnogo biološki aktivniji kada se hidrolisu u monoestre (46).

Dalji metabolizam ftalata zavisi od dužine karbonskog lanca. Ftalati kratkih lanaca se uglavnom izlučuju kao monoestri, dok se ftalati dugih lanaca nakon nekoliko biotransformacija koje uključuju hidroksilaciju i oksidaciju ekskretuju preko urina i fecesa, što čini fazu konjugacije. U fazi konjugacije pod dejstvom enzima uridin 5- difosfoglukuronil transferaze monoestri ftalata se katališu u formu hidrofilnih glukuronid konjugata, čime se lako izlučuju urinom (Slika 3).



Slika 3. Metabolički put ftalata (47)

Pored urina i fecesa, monoestri ftalata i sekundarni metaboliti se mogu naći i u drugim tečnostima i tkivima ljudskog organizma kao što su krv, amnionska tečnost, majčino mleko, pljuvačka, semena tečnost, mekonijum, jetra i placenta.

Jednostavni kratko lančani ftalati kao što su DMP i DEP se izlučuju urinom kao nekonjugovani monoestri : *monomethyl phthalate* (MMP) i *monoethyl phthalate* (MEP). U urinu čoveka, 70% ekskretovanog MEP je u nekonjugovanoj formi.

Metabolizam DBP je dugi niz godina ispitivan kod pacova. Izlaganjem pacova pojedinačnoj oralnoj dozi, 80-90% DBP je ekskretovano urinom u toku 48 h, dok je 5% izlučeno fecesom. U urinu, jedan veći i tri manja metabolita DBP je detektovano: *monobutyl phthalate* (MBP) 88%, dok je procentualna zastupljenost *mono (3-hydroxybutyl) phthalate*, *mono(4-hydroxybutyl) phthalate* i ftalane kiseline bila 8, 2 i 2%. U studijama na ljudima potvrđeno je da je samo 6% MBP ekskretovano u nekonjugovanoj formi (47).

Metabolički put BBzP je sličan kao DBP.

DEHP je najviše korišćen i najispitivaniji ftalat. Zbog svoje hemijske strukture sa puno bočnih lanaca, metabolizam ovog ftalata je kompleksan. Prvi korak u metabolizmu DEHP je veoma brza hidroliza *mono (2-ethylhexyl) phthalate* (MEHP) katalizovanog nespecifičnim

lipazama (48). Kod glodara, MEHP se dalje metaboliše u veliki broj sekundarnih metabolita (kod miševa se primarno glukuronid konjugati izlučuju urinom, dok se kod pacova primarno ekskretuju nekonjugovani metaboliti).

Danas više od 15 metabolita DEHP je verifikovano u urinu čoveka (49) (50). U studijama koje su rađene, sekundarni metaboliti mono(2-etil-5- hidroksiheksil) ftalat (MEHHP) i mono(2-etil-5-oksoheksil) ftalat (MEOHP) zajedno sa primarnim metabolitom MEHP služe kao prediktori ekspozicije DEHP.

1.4.4. Osnovne karakteristike najčešćih ftalata i njihovi štetni uticaji na čoveka

Di - metil ftalat (DMP): molekularna formula $C_6H_4(COOCH_3)_2$ ili $C_{10}H_{10}O_4$; je vodeno bela tečnost bez značajnog mirisa. Gušća od vode i nerastvorljiva u vodi. Molekularne težine 194.186 g/mol , temperature ključanja $284^{\circ}C$, temperature topljenja $5.5^{\circ}C$. Di metil ftalat ima mnogo upotreba, koristi se u proizvodnji raketa, plastičnih masa i repelenta za insekte. Akutna (kratkotrajna ekspozicija) inhalacijom, kod ljudi i životinja dovodi do iritacije oka, nosa i grla. Nema dokaza o dugotrajnoj ekspoziciji ovog ftalata i njegovom efektu na razvoj, reprodukciju i kancerogenom efektu na ljudima. Studije na životinjama su pokazale efekat ovog ftalata pri dugotrajnoj oralnoj ekspoziciji na rast i oštećenje bubrega. EPA je klasifikovala di-metil ftalat u Grupu D- ne dovodi do nastanka malignih bolesti kod ljudi (51).

Monometil ftalat (MMP): molekularna formula $C_9H_8O_4$; je metabolit di-metil ftalata, izolovan iz urina i salive. Molekularne težine 180.159 g/mol, tačke topljenja $82 - 84^{\circ}C$.

Di-n-butil ftalat (DBP): molekularna formula $C_{16}H_{22}O_4$ ili $C_6H_4(COOC_4H_9)_2$ je uljana bezbojna tečnost, aromatičnog mirisa, nerastvorljiva u vodi ; molekularne težine 278.348 g/mol, tačka ključanja $340^{\circ}C$, tačka topljenja $35^{\circ}C$, veoma je rastvorljiv u acetonu , benzenu i većini drugih organskih rastvarača. Izuzetno je opasan po okolinu. Obzirom na tečno stanje, lako može prodrati u zemlju i kontaminirati podzemne vode i obližnje vodene tokove. Koristi se u proizvodnji plastičnih masa, boja i kao reakcioni medijum za hemijske reakcije. Može se naći u lakovima za nokte, nitroceluloza lakovima, eksplozivima, čvrstim raketnim pogonima, mastilu za

štampanje, rastvaraču za parfemska ulja, lepkovima. Američki kongres je trajno zabranio di butil ftalat u bilo kojoj količini većoj od 0,1 procenta u dečijim igračkama (52).

Di butil ftalat je jedan od najkorišćenijih ftalata. Pokazuje relativno nisku akutnu i hroničnu toksičnost. Nema značajnih podataka o mogućem efektu na ljude nakon inhalatorne ili oralne ekspozicije . Prijavljeno je nekoliko slučajeva iritacije kože i očiju. In vitro studije su pokazale da je koža čoveka manje permeabilna od kože pacova za ovaj ftalat. Verifikovan je minimalni efekat na životinje nakon inhalatornog unosa. Nema studija koje pokazuju efekat na razvoj, reproduktivni sistem, niti kancerogeno dejstvo, te je EPA klasifikovala di butil ftalat u Grupu D (bez kancerogenog efekta na ljude). Međutim , studije na životinjama su pokazale efekat na razvoj i reproduktivni sistem nakon oralne ekspozicije .

Di-izobutil ftalat (DiBP): molekularna formula $C_{16}H_{22}O_4$; je uljana bezbojan tečnost, blagog mirisa. Gušća od vode, nerastvorljiva u vodi, izuzetno stabilna u odnosu na toplotu i svetlost. Diizobutil ftalat ima manju gustinu i tačku zamrzavanja od Di-butil ftalata, iako ima slična svojstva i može se koristiti kao zamena za njega. Pokazuje nisku toksičnost (53).

Di(2-etilheksil) ftalat (DEHP): molekularna formula $C_{24}H_{38}O_4$ or $C_6H_4(COOC_8H_{17})_2$; je bezbojna uljana tečnost, bez mirisa. Molekularne težine 390.564 g/mol, tačke ključanja $385^{\circ}C$, Tačke topljenja $-50^{\circ}C$, rastvorljiva u krvi i tečnostima koje sadrže lipoproteine, nerastvorljiva u vodi, stabilna.

DEHP je estar ftalne kiseline i kao takav se koristi kao plastifikator, pre svega u proizvodnji polivinil hlorida (PVC). Ima nisku toksičnost kod akutne i hronične ekspozicije. Kratkotrajna izloženost velikim oralnim dozama DEHP (5 do 10g) može da uzrokuje gastrointestinalne poremećaje kod ljudi. Nema informacija o mogućem hroničnom, reproduktivnom, razvojnom ili kancerogenom efektu ovog ftalata kod ljudi. Studije na životinjama su pokazale povećanje težine pluća i jetre nakon hronične ekspozicije inhalacijom . Oralna ekspozicija je rezultovala poremećajima u razvoju i reprodukciji kod pacova i miševa. Studija Nacionalnog Toksikološkog Programa (*National Toxicology Program (NTP)*) je pokazala da DEHP nakon oralne izloženosti povećava incidencu tumora jetre kod miševa i pacova. EPA je klasifikovala DEHP u Grupu B2, verovatno kancerogen za Ljude. Referentna doza za DEHP je 0,02 miligrama po kilogramu telesne mase dnevno (mg/kg/d) što je određeno od strane EPA.

Monoetilheksil ftalat (MEHP): molekularna formula $C_{16}H_{22}O_4$; je aktivni metabolit DEHP koji nastaje hidrolizom DEHP pomoću enzima *bis(2-ethylhexyl) phthalate* acilhidroksilaze.

Alkohol koji se oslobađa je sposoban za oksidaciju do aldehida i karboksilne kiseline. MEHP je bistra, beličasta viskozna tečnost, molekularne težine 278.348 g/mol, temperature ključanja više od 572° F . Najviše se može naći u znoju i urinu. MEHP meren u krvi trudnih žena pokazao je značajnu vezu sa anomalijama polnog organa novorođenih muških beba. Studije rađene 2017. godine pokazuju vezu između MEHP, insulinske rezistencije i niskog nivoa testosterona u mlađoj populaciji, dok je u drugim pokazana uloga MEHP u inflamatornom odgovoru adipocita i to u vidu promena u lipidnim i citokinim putevima (54).

Dietil ftalat (DEP): molekularna formula $C_6H_4(COOC_2H_5)_2$ ili $C_{12}H_{14}O_4$; je bezbojna tečnost, koja ima gorak, neprijatan ukus, bez mirisa. Gušća je od vode i ne rastvorljiva u njoj. Rastvorljiva u acetonu, benzenu i karbon tetrahloridu. Molekularna težina 222.24 g/mol , Tačka ključanja 295°C , tačka topljenja -67 - 44°C. Predstavlja opasnost po okruženje i širenje treba odmah zaustaviti. Lako prodire u zemlju, zagađuje podzemne vode i okolne vodene tokove. DEP je klasifikovan kao član estara benzove kiseline. Najčešće se koristi da poboljša fleksibilnost plastike. Produkti u kojima se može naći ovaj ftalat su četkice za zube, delovi automobila, alat, igračke i ambalaža za pakovanje hrane. Takođe se može naći u kozmetičkim preparatima, insekticidima i aspirinu. Di-etil ftalat se lako otpušta u okolinu. Ekspozicija DEP se ostvaruje inhalatornim, oralnim ili dermalnim putem. Akutno izlaganje može dovesti do iritacije očiju i kož, dok se nakon oralnog izlaganja javlja bol u stomaku i povraćanje. Malo se zna o hroničnoj toksičnosti ovog ftalta, a postojeće informacije ukazuju na nisku toksičnost. Ipak, studije na životinjama su pokazale afinitet ovog ftalata za jetru i reproduktivni sistem. DEP utiče na muški reproduktivni sistem kroz inhibiciju sinteze androgena. Kod pacova dovodi do gubitka germinativnih ćelija u testisu. S druge strane, DEP ne pokazuje kancerogeni efekat i klasifikovan je u grupu D (55).

Dioktil ftalat (DNOP): molekularna formula $C_{24}H_{38}O_4$; je slabo obojena, bez mirisa uljana tečnost koja izuzetno teško isparava. Nešto je gušća od vode i nerastvorljiva u njoj. Molekularne težine 390.564 g/mol, tačke ključanja 428° F at 760 mm Hg, tačke topljenja -13° F, stabilna pod preporučenim uslovima. Di-oktil ftalat je supstanca koju je napravio čovek kako bi učinio plastiku mekom i fleksibilnijom. Ovaj tip plastike se koristi u proizvodnji medicinske opreme (tuba, kesa za skladištenje krvnih derivata), žica i kablova, u proizvodnji tepiha, podnih pločica i lepkova. Može biti i sastavni deo kozmetičkih preparata i pesticida.

Postoji nekoliko studija na ljudima koje su pokazale moguće efekte DNOP . Kod 173 ispitanika kod kojih je postavljena sumnja na dermatozu nakon kontakta sa plastikom i lepkom, samo kod 2 slučaja je patch testom sa 2% DNOP potvrđena iritacija. U studiju rađenoj na radnicima koji su kontinuirano izloženi DNOP tokom rada, došlo je do razvoja asmatične reakcije na ovu supstancu. Žene sa endometriozom su pokazale značajno veće koncentracije DNOP u krvi, ali je velika koncentracija verifikovana i kod žena čiji infertilitet je uzrokovan defektima jajovoda, policističnim jajnicima, pelvičnim inflamatornim bolestima ili idiopatskim uzrokom. Studije na životinjama ukazuju na moguće iritacije kože i sluzokože nakon kratkotrajnog kontakta. Potencijalni efekat na razvoj i reproduktivni sistem je nizak. Pokazan je efekat na jetru, pre svega u smislu promene u histološkoj građi i pojačanoj aktivnosti. Verifikovano je toksično dejstvo na tireoidnu žlezdu (56).

Benzil - butil ftalat (BzBP): molekularna formula $C_{19}H_{20}O_4$; je bistro, nebojena tečnost, srednjeg intenziteta mirisa, gorkog ukusa. Molekularne težine 312.365 g/mol, tačke ključanja $370^{\circ}C$, tačke topljenja $-35^{\circ}C$, slabo rastvorljiva u vodi. Predstavlja primarnu opasnost po okolinu i širenje se mora odmah prekinuti. Lako prolazi kod zemlju i kontaminira podzemne vode i obližnje tokove. BzBP je supstanca koja može biti apsorbirana inhalatornim ili oralnim putem. U ispitivanjima ovog ftalata na ljudski organizam, pokazani su mogući efekti. BBP se ne smatra primarni iritans kože iako je utvrđen povećan rizik od nastanka ekcema kod dece nakon prenatalne ekspozicije. U studiji koja je ispitivala promene u proteinima sekretovanih od strane hepatocelularnog karcinoma jetre nakon izlaganja BBP, utvrđeno je da ovi proteini učestvuju u apoptozi, tumorskoj progresiji i metabolizmu. Studije na životinjama su pokazale da su ciljni organi nakon akutne ekspozicije BBP hematološki i centralni nervni sistem. Hroničan toksičnost i kancerogenost BBP ispitivana na miševima i pacovima, pokazala je povećan broj tumora pankreasa kod muških pacova, dok je kod ženskih pacova bio povećan broj tumora pankreasa i mokraćne bešike. Studije rađene na pacovima su pokazale i značajno povećan broj leukemija kod ženskog pola. BBP nije genotoksičan. Benzil butil ftalat je klasifikovan kao mogući kancerogen i svrstan u grupu C (57).

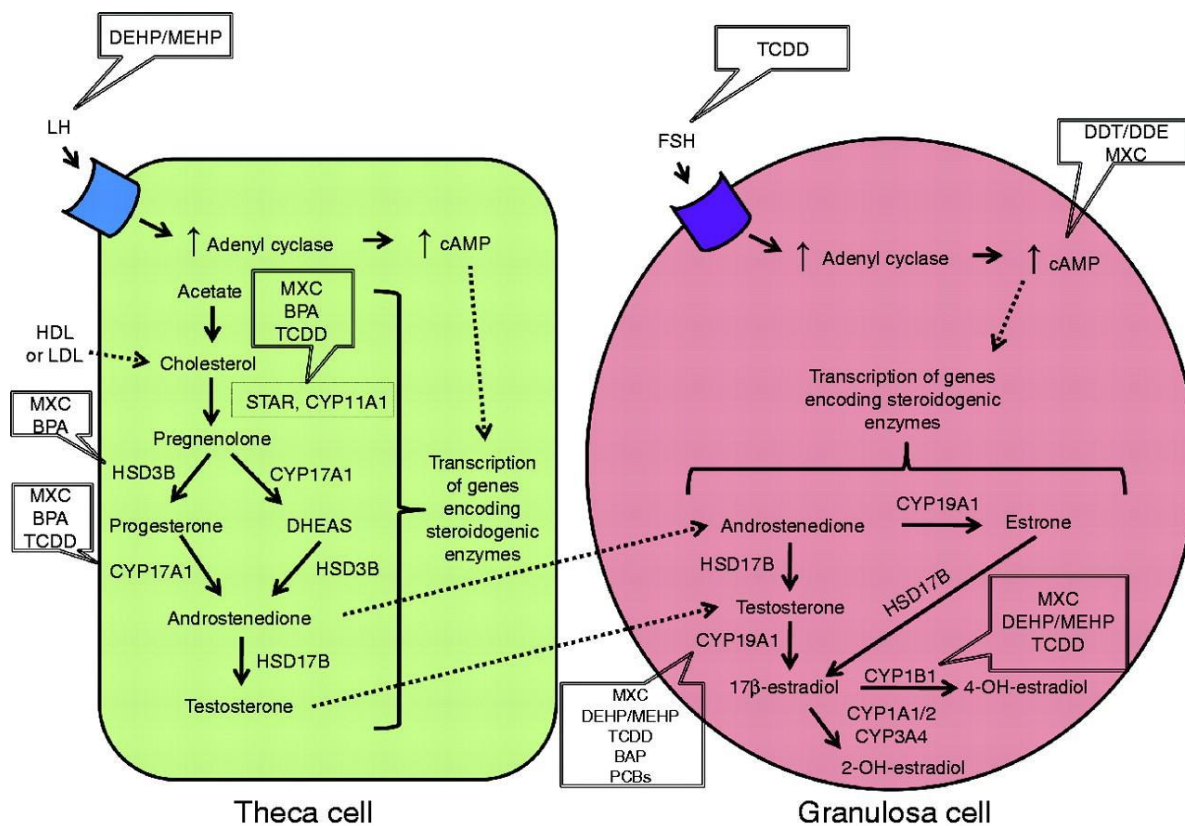
Monobenzil ftalat (MBzP): molekularna formula $C_{15}H_{12}O_4$; je metabolit benzil butil ftalata , prisutan u urinu.

1.5. Ftalati i PCOS

Poslednjih godina, veliki je broj literaturnih dokaza o vezi između EDC i poremećaja reproduktivnog sistema žene. Ove supstance svoj efekat mogu ostvariti putem više mehanizama, ali i njihovi metabolički produkti mogu delovati na različite načine. Obzirom na to da je za reprodukciju oba pola važno uzajamno dejstvo estrogenih i androgenih hormona, ravnoteža između estrogenih i androgenih svojstava EDC koji deluju kao agonisti /antagonisti steroidnih hormona, može biti biološki izuzetno značajna. Pored toga, steroidni hormoni deluju i na druge organe i organske sisteme, te su vulnerabilni na EDC, uključujući hipotalamusno-pituitarno-gonadalni sistem, dojku, cerviks, vaginu, mozak i ne reproduktivna tkiva kao što je koštano, mišićno i koža.

Razvoj i funkcionisanje ženskog reproduktivnog sistema zavisi od različitih bioloških procesa na koji deluju endogeni i egzogeni faktori, tokom kritičnog perioda razvoja (in utero, neonatalni period, detinjstvo, pubertet) i tokom različitih životnih stadijuma u odraslom dobu. Pokazano je da izlaganje EDC tokom ovih perioda dovodi do povećanog rizika od izmenjene polne diferencijacije, poremećaja u razvoju neurološkog i reproduktivnog sistema, od nastanka endometrioze, tumora reproduktivnih organa, poremećaja u sazrevanju oocita, ovarijalne funkcije i menstrualnog ciklusa (58).

U svim stadijumima razvoja jedinke, ali i u odraslom dobu, ovarijum je jedan od ciljnih organa za toksične efekte ftalata. Ovi negativni efekti dovode do anovulacije, prevremenog otkazivanja jajnika, smanjene steroidogeneze i infertiliteta. Nekoliko je mehanizama koji vode reproduktivnim poremećajima na nivou jajnika. Jedan od njih je dejstvo na folikule u različitim stadijumima folikulogeneze, što dovodi do inhibicije rasta, atrezije folikula, nemogućnosti izdvajanja dominantnog folikula, a samim tim i estrogenoj deficijenciji i anovulatornim ciklusima. Ftalati takođe mogu direktno da utiču na ovarijalnu steroidogenezu, menjajući nivo mRNA, proteina i/ili menjajući aktivnost enzima odgovornih za metabolizam polnih hormona. Poremećaji na nivou produkcije i sekrecije polnih hormona u ovarijumu, menjaju hormonski status hipotalamo-pituitarno-ovarijalne osovine, vodeći infertilitetu (59). Na slici 4. prikazana su mesta delovanja ftalata u granulosa i teka ćelijama.



Slika 4. Mesta delovanja ftalata na nivou teka i granulosa ćelija (60)

Veliki je broj ispitivanja na životinjama i laboratorijskih studija sa glodarima, kopitarima i primatima koji ukazuju na uticaj EDC u patogenezi poremećaja ženskog reproduktivnog sistema, uključujući sindrom policističnih jajnika, aneuploidiju, POF, anomalije reproduktivnog trakata, endometriozu i ektopičnu trudnoću (19).

Mehanizmi nastanka PCOS nisu u potpunosti poznati, a obzirom na multiple fiziološke procese regulisane različitim hormonskim i metaboličkim parametrima, endokrini poremećaji izazvani supstancama iz životne sredine mogu zaista učestvovati u patogenezi PCOS.

In vivo ispitivanja na ovcama i majmunima su pokazala da prenatalna izloženost visokim dozama testosterona dovodi do razvoja PCOS karakteristika kod fetusa (61). Posebno, izloženost visokim dozama testosterona od 40-60 i 100-115 dana gestacije kod ženke majmuna u odraslom dobu se manifestuje anovulatornim infertilitetom, povećanim lučenjem LH, povišenim vrednostima cirkulišućeg testosterona, neuroendokrinim *feed-back* poremećajima, centralnom gojazošću i kompenzatornom insulinskom rezistencijom, policističnim jajnicima sa ovarijalnim hiperandrogenizmom (61)(62). Na modelu ovce se dobija sličan PCOS fenotip nakon

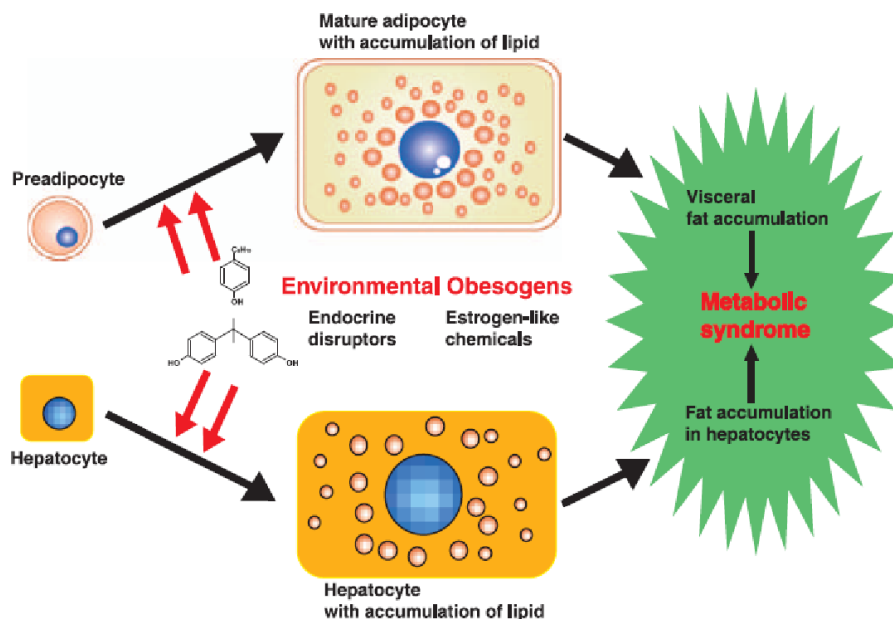
prenatalnog izlaganja egzogenom testosteronu (63). Kod majmuna i ovaca, za razliku od glodara, folikularna diferencijacija se završava tokom fetalnog razvoja. Tako da *in utero* ekspozicija ženskih fetusa androgen-like EDCs može rezultovati razvoju PCOS u odraslom dobu, zajedno sa udruženim metaboličkim poremećajima.

Postoji nekoliko gena koji su udruženi sa predispozicijom za razvoj PCOS, ali da li i kako njihova interakcija sa androgen-like faktorima dovodi do nastanka PCOS fenotipa kod žena, još uvek nije utvrđeno. Ipak, PCOS je poremećaj koji se javlja u 6,6 % žena u reproduktivnom periodu i jedan je od vodećih uzroka subfertiliteta i nastanka metaboličkog sindroma, a samim tim i povećanog rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti. Gojaznost i insulinska rezistencija se javljaju u 50% žena sa PCOS, a 12% gojaznih žena ima rizik od nastanka PCOS.

Belo masno tkivo je pod kontrolom simpatičkog nervnog sistema, ali i hormona kao što su polni steroidi. Uticaj faktora spoljašnje sredine na masno tkivo može da se ostvari direktnim dejstvom na lipolizu, lipogenezu i adipogenezu ili indirektno, delujući na potrošnju unete hrane i sekreciju leptina preko centralnog nervnog sistema.

Do sada, mnoge studije su pokazale da efekti EDC na reproduktivne i metaboličke procese se ostvaruju preko nuklearnih receptora, kao što su estrogeni i androgeni receptor, ali i preko familije peroksizmalnog proliferator-aktivisanog receptora (*peroxisome proliferator-activated receptors* - PPARs) i retonoid H receptora (RHR) i to direktno aktivirajući receptor i njegov signalni put ili aktivirajući drugi signalni put. Na ovaj način se ostvaruju toksični efekti na reproduktivne organe, dolazi do povećanog oksidativnog stresa i smrtnosti.

PPARs su nuklearni receptori koji vezujući se za specifične DNA sekvence regulišu DNA transkripciju. PPAR α kontroliše gene odgovorne za degradaciju masnih kiselina, PPAR β kontroliše metabolizam masnih kiselina, dok je PPAR γ ključni regulator adipoznog tkiva i glukozne homestaze. Još 2006. godine studije su pokazale da se određeni EDC mogu vezivati za RHR kao ligandi, dovodeći do promena u adipogenezi koje vode nastanku metaboličkog sindroma. Pored aktivacije PPAR gama, koji je poznat i po svojim karakteristikama da poboljšava insulinsku senzitivnost što dovodi do povećanja telesne mase, metaboliti DEHP, MEHP ali i drugi monoestri imaju sposobnost povećanja diferencijacije preadipocita u adipocite (Slika 5). Promene u ekspresiji PPAR α i PPAR γ koje nastaju pod delovanjem ftalata rezultuju i u neadekvatnom oslobađanju leptina i adiponektina iz adipocita, koji igraju ulogu u razvoju insulinske rezistencije. Na ovaj način ftalati imaju ulogu u nastanku gojaznosti (64).



Slika 5. Efekat endokrinih disruptora na adipocita (64)

Aril hidrokarbon receptor (*aryl hydrocarbon receptor* - AhR), koji pripada familiji *basic helix-loop-helix transcription* faktora odgovornih za ksenobiotički metabolizam, je posebno podložan uticaju EDC. Obzirom na to da u metabolizmu steroidnih hormona učestvuju ksenobiotički enzimi kao što je citohrom P450, aktivirani AhR receptor od strane EDC može dovesti do promena u genima i posledično ugroziti signalni put i metabolizam hormona. Skorašnji eksperimenti su pokazali da CYP19B (aromataza), odgovoran za konverziju testosterona u estriol, je pod direktnim uticajem AhR gena, te aktivacija AhR receptora može voditi povećanoj produkciji estrogena, ali i povećanoj produkciji testosterona kao posledici smanjene aromatizacije.

Akil hidrokarbon receptor učestvuje u lipogenezi i glukoznoj homeostazi (65) (66). Istraživanja pokazuju da u nastanku tipa 2 šećerne bolesti ulogu igra *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* - ARNT, heterodimerizacijski partner AhR jer je oslobađanje insulina uzrokovano adekvatnom ARNT genskom ekspresijom. Na taj način, abnormalna ekspresija ARNT, do koje mogu dovesti EDC delujući na AhR/RNT dovodi do metaboličkog sindroma (67).

Poremećaj metaboličke homeostaze može biti i posledica oksidativnog stresa. U do sada rađenim studijama pokazano je da koncentracije ftalatnih metabolite u urinu pozitivno koreliraju sa 8- izoprostanom, markerom lipidne peroksidacije, ali i 8-hidroksidoksigvanozinom, markerom

DNA oksidacije. Istraživanja in vitro i na životinjama potvrđuju da povećana produkcija različitih vrsta kiseonika indukuje insulinsku rezistenciju i disreguliše adipocite, a malobrojna su ispitivanja na ljudima ove vrste.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi istraživanja

1. Utvrditi prisustvo estara ftalne kiseline u organizmu žena sa sindromom policističnih jajnika u našoj sredini.
2. Utvrditi da li postoji veza između nivoa estara ftalne kiseline sa LH, FSH, estrogenom i testosteronom.
3. Utvrditi da li postoji veza između nivoa estara ftalne kiseline sa obimom struka, indeksom telesne uhranjenosti, ukupnim holesterolom, trigliceridima, HDL holesterolom, LDL holesterolom, glikemijom, insulinemijom, leptinom i indeksima kardiometaboličkog rizika.

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Kod žena sa sindromom policističnih jajnika je prisutan povišen nivo estara ftalne kiseline.
2. Povišen nivo estara ftalne kiseline je u pozitivnoj korelaciji sa visokim vrednostima LH, estrogena i testosterona, a u negativnoj korelaciji sa FSH.
3. Povišen nivo estara ftalne kiseline je u pozitivnoj korelaciji sa obimom struka, indeksom telesne uhranjenosti, ukupnim holesterolom, trigliceridima, LDL holesterolom, glikemijom, insulinemijom i indeksima kardiometaboličkog rizika, a u negativnoj korelaciji sa HDL holesterolom i leptinom.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je sprovedeno u vidu prospektivne studije u periodu od jedne godine (2015.godina) na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Vojvodine i Zavodu za zdravstvenu zaštitu radnika Novi Sad.

Obuhvatalo je 91 osobu ženskog pola u reproduktivnom periodu. Svaka osoba je informisana o cilju i značaju ispitivanja, a svoju saglasnost za učestvovanje je potvrdila potpisom na predviđeni obrazac. Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, Etičkog odbora Kliničkog centra Vojvodine i Etičkog odbora Zavoda za zdravstvenu zaštitu radnika Novi Sad.

3.1.1. Kriterijumi za uključivanje u istraživanje

1. Žene sa dokazanim sindromom policističnih jajnika prema važećim kriterijumima.
2. Zdrave žene u reproduktivnom dobu bez prisustva ftalatnih metabolita u urinu.
3. Potpisan obrazac informisanog pristanaka za učestvovanje u ispitivanju

3.1.2. Kriterijumi za neuključivanje u istraživanje

1. Zdrave žene u reproduktivnom dobu sa prisutnim ftalatnim metabolitima u urinu.
2. Prisustvo drugih oboljenja: dijabetes melitus tip 1 ili tip 2, bolesti štitaste žlezde, hiperprolaktinemija, bolesti nadbubrežne žlezde, autoimune bolesti i druge.
3. Upotreba medikamentske terapije za lečenje PCOS, hipolipemika, glukokortikoida i medikamenata za lečenje gojaznosti kao i gladovanje.
4. Graviditet i period laktacije.
5. Ispitanice koje ne potpišu informisani pristanak.

3.1.3. Podela u ispitivane grupe

Nakon regrutacije, sve ispitanice su podeljene u dve grupe. Prvu grupu su činile žene sa dokazanim sindromom policističnih jajnika, dok je druga grupa bila kontrolna grupa i činile su je zdrave žene.

U cilju analize uticaja ftalata, ispitanice sa sindromom policističnih jajnika su podeljene u dve podgrupe:

- PCOS pozitivne (+): Ispitanice sa sindromom policističnih jajnika i prisustnim ftalatnim metabolitima u urinu;
- PCOS negativne (-): Ispitanice sa sindromom policističnih jajnika i bez ftalatnih metabolita u urinu;

Kontrolnu grupu su činile zdrave žene (osobe bez akutnih i hroničnih bolesti) bez ftalatnih metabolita u urinu.

Grupu PCOS+ je činilo 31 ispitanica, dok je u grupi PCOS- i kontrolnoj bilo 30 ispitanica.

3.2. Metode rada

Nakon potpisivanja informisanog pristanka i pismene saglasnosti za uključivanje u ispitivanje kod svih ispitanica su urađena antropometrijska merenja, uzet je jedan uzorak periferne venske krvi i uzorak jutarnjeg urina.

Antropometrijska merenja su obuhvatala:

- Telesnu visinu (TV)- za merenje telesne visine je korišćen antropometar sa postoljem Harpenden (po Martinu) , sa preciznošću od 0,1 cm. Merenje je vršeno bez obuće, sa položajem glave tako da je Frankfurtska ravan (linija koja povezuje tragus ušne školjke sa unutrašnjim uglom oka iste strane) horizontalna.
- Telesna masa (TM) – za merenje korišćena je medicinska decimalna vaga.
- Obim sruga (OS) – meren je plastičnim centrimetrom, sa preciznošću 0,1cm. Merenje je vršeno na sredini linije koja spaja prednji gornji greben ilijačne kosti i luk rebra, dok ispitivana osoba stoji sa razmaknutim nogama 25 do 30 cm. Vršena su tri merenja i uzete srednje vrednosti.
- Indeks telesne mase (BMI)- izračunat kao količnik telesne mase u kilogramima i kvadrata telesne visine izražene u metrima.

$$\text{BMI} = \text{TM}/(\text{TV})^2(\text{kg}/\text{m}^2)$$

Iz uzorka periferne krvi uzete nakon 12h nakon poslednjeg obroka određivali smo:

- Folikulostimulišući hormon (FSH) – analiza je rađena na Odeljenju ua endokrinologiju Centra za laboratorijski medicinu KCV, CLIA metodologijom na aparatu ADIVA Centaur XP
(referentna vrednost : folikularna faza : 3,35-21,63 IU/L; faza ovulacije : 4,97-20,82 IU/L ; luteinska faza: 1,11-13,99 IU/L).
- Lutenizirajući hormon (LH)- – analiza je rađena na Odeljenju ua endokrinološku dijagnostiku Centra za laboratorijski medicinu KCV, CLIA metodologijom na aparatu ADIVA Centaur XP
(referentna vrednost : folikularna faza : 2,39-6,6 IU/L; faza ovulacije : 9,06-74,24 IU/L ; luteinska faza: 0,9-9,33 IU/L).
- Estradiol - analiza je rađena na Odeljenju za endokrinološku dijagnostiku Centra za laboratorijski medicinu KCV, CLIA metodologijom na aparatu ADIVA Centaur XP
(referentna vrednost: folikularna faza : 21-251 pg/mL; faza ovulacije : 38-649 pg/mL ; luteinska faza: 21-312 pg/mL).

- Testosteron - analiza je rađena na Odeljenju za endokrinološku dijagnostiku Centra za laboratorijski medicinu KCV, CLIA metodologijom na aparatu ADIVA Centaur XP (referentna vrednost 0,38-1,97 nmol/L).
- Glikemija našte – analiza je rađena u laboratoriji Zavoda za zdravstvenu zaštinu radnika Novi Sad, kvantitativnom enzimskom GOD/PAP metodom, na aparatu BS-200 Chemistry Analyzer (referentna vrednost 3,8-6,4 mmol/L)
- Kvantitativno nivo insulina našte- analiza je rađena na Odeljenju za endokrinološku dijagnostiku Centra za laboratorijski medicinu KCV, CLIA metodologijom na aparatu ADIVA Centaur XP (referentna vrednost 3.0-25.0 mIU/L).
- Indeks insulinske rezistencije (HOMA-IRI) - je izračunat po sledećoj formuli:

$$\text{HOMA-IRI} = \text{insulin našte (mIU/l)} \times \text{glikemija našte (mmol/l)} / 22,5$$

Pokazatelj insulinske rezistencije je vrednost HOMA-IRI >2,5.

- Ukupni holesterol se određivao u laboratoriji Zavoda za zdravstvenu zaštinu radnika Novi Sad metodom holesterol oksidazom (CHOD-PAP). Referentne vrednosti su 3,1 - 5,9 mmol/L.
- Trigliceridi su određivani u laboratoriji Zavoda za zdravstvenu zaštinu radnika Novi Sad enzimskom metodom GPO-PAP , na aparatu BS-200 Chemistry Analyzer. Referentna vrednost je 0,8 -1,7 mmol/l.
- HDL holesterol se određivao u laboratoriji Zavoda za zdravstvenu zaštinu radnika Novi Sad enzimskom kalorimetrijskom metodom (fenol+4-aminoantipirin uz katalitičko delovanje peroksidaze), merni opseg od 0,08-5,16 mmol/l, detekcioni limit 0,08mmol/l. Refrentna vrednost 0,91-2,00mmol/l.
- LDL holesterol je izračunat preko Friedewaldove formule:

$$\text{LDL holesterol (mmol/l)} = (\text{ukupni holesterol} - \text{HDL holesterol} - \text{trigliceridi}) / 2,2$$
 Referentna vrednost 1.6 -4,78 mmol/L.
- Leptin - analiza je rađena na Odeljenju za endokrinološku dijagnostiku Centra za laboratorijski medicinu KCV, elisa metodologijom na aparatu proizvođača MEDIAGNOST (Germany). Svi uzorci su diluirani u odnosu 1:10 i 1:20, u zavisnosti od

vrednosti BMI. Granica osetljivosti je <0.01 ng/mL, a CV unutar (intra assay CV serije 4,35 % i 2,63 %) I između serija (intra assay CV: 7,2 % , 6,1 % i 7,5 %) su $<10\%$.

Prvi jutarnji urin skupljan je u plastični kontejner, koji je prethodno testiran u laboratoriji Zavoda za zdravstvenu zaštitu radnika-Noví Sad gasnom hromatografijom/masenom spektrometrijom u smislu nivoa ftalatnih metabolita i dobijena vrednost označena kao nulta. Iz uzorka urina određivani su nivo ftalatnih metabolita : mono-metil-ftalat (MMP), mono-etil-ftalat (MEP), mono-n-butíl-ftalat (MBzP), mono-n-propil-ftalat (MPP), mono-izo-amíl-ftalat (MiAP), mono-n-amíl-ftalat (MnAP), mono-cikloheksil-ftalat (MCHP), mono-benzil ftalat (MBzF), mono-2-etílheksil-ftalat (MEHP), mono-n-oktíl ftalat MOP). Urine kod kojih smo kvantifikovali ftalatne metabolite, smatrali smo pozitivnih, dok su urini bez ftalatnih metabolita klasifikovani kao negativni.

Sav pribor i aparature (sem GC MSD), bili su pažljivo oprani acetonom i n-heksanom neposredno pre uporebe. Slepe probe su analizirana pre uzoraka u svakoj seriji i kod njih nisu detekovani monoftalatni estri.

Urin (5 ml) sipati u kivetu za centrifugiranje (odgovarajuće zapremine; ako je urin konzervisan sa NaF, onda pre dodatka amonijačnog pufera dodati na vrh špatule – veličine zrna graška CaCl_2 i promućkati do rastvaranja) zatim dodati amonijumacetatni pufer 1 M (1250 μL). Nakon dodatka β -glukuronidaze (25 μL , 198455 IU/ mL), uzorak inkubirati na 37°C u toku 90 min. Uzorak zatim zakiseliti do $\text{pH}<2$ sa 35 % hloridnom kiselinom. Nakon dodavanja MTBE (metíltetrcbutíletar) (4 mL) i natrijumhlorida (<1 g), uzorak urina se intenzivno mućka (vortex) u toku 2 min a zatim centrifugira na 3000 obrtaja u minuti u toku 15 min. MTBE sloj se odvoji i suši sa anh. Na_2SO_4 i upari u struji N_2 na 35°C . Suvi ostatak se kvantitativno prebaci u GC inserte (zapremine 250 μL) pomoću dihlormetana i upari do suva.

Rastvor diazometana u dihlormetanu (200 μL – napravljen prema navedenim referencama) je dodan na suvi ostatak ekstrakta monoftalatnih estara a zatim nakon 30 minuta stajanja na sobnoj temperaturi u zatvorenim insertima na sobnoj temperaturi rastvarač otparen (stajanjem otvorenih inserata preko noći).

Derivatizovani rezidui ftalatnih estara su rastvoreni u toluenu (50 μL). Alikvot svakog uzorka (2 μL) je injektovan u GC-MS sistem.

GC-MS analiza izvedena je pomoću Agilent 7890A GC System i 5975C VL MSD instrumenta (Agilent Technologies, CA, SAD). Korišćena je kapilarna kolona 30 m DB-5MS (J&W, CA, SAD) sa ID 0,25 mm i debljine filma od 0,25 µm. Temperaturni program: početna temperatura pećnice je bila 50° C. Nakon držanja na početnoj temperaturi za 1 min, temperatura je rasla do 130° C brzinom od 20° C/min i držana 1 min, a zatim na 280° C brzinom od 8° C/min, gdje je ostala konstantna za 6,25 min, ukupno vreme trajanja analize (Run Time) je 31 minut. Helijum je korišćen kao noseći gas uz protok od 1,0916 mL/min. Temperatura jonskog izvora je 230° C, a kao jonizacioni mod korišćena je pozitivna elektronska ionizacija. Temperatura quadrupol-a je bila 150° C. Joni koji se koriste za kvantitaciju i potvrđivanje (SIM) prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Monitorisani joni za kvantitaciju i potvrđivanje, i retenciona vremena za analizirane metil derivate ftalatnih monoestara

Analit	Monitorisani joni (m/z)		Retenciono vreme (min)
	Kvantifikacija	Potvrđivanje	
MMP	163	149, 162	11.230
MEP	163	149, 176	11.304
MPP	163	149, 181	12.619
MBP	163	149, 181	13.961
MiAP	163	149, 181	14.740
MnAP	163	149, 181	15.276
MCHP	163	149, 181	17.488
MBzP	163	149, 164	18.904
MOP	163	149, 181	18.994
MEHP	163	149, 181	23.388

Skraćenice: MMP monometilftalat, MEP monoetilftalat, MPP mono-n-propilftalat, MBP mono-n-butilftalat, MiAP mono-izo-amilftalat, MnAP mono-n-amil-ftalat, MCHP mono-cikloheksilftalat, MOP mono-n-oktilftalat, MEHP mono-2-etilheksilftalat, MBzP monobenzilftalat.

Monoftalatni estri: MMP, MEP, MPP, MiAP, MnAP, MCHP, MOP i MEHP su sintetisani (prema sopstvenom postupku) u Odeljenju laboratorijske dijagnostike Zavoda za zdravstvenu zaštitu radnika, a MBP i MBzP su nabavljeni od Sigma-Aldrich kompanije i korišćeni su za pravljenje standardnih rastvora.

Koncentracije deset ftalatnih monoestara u urinu su određivani metodom eksternih standarda kao metil derivati ftalatnih monoestara. Zbog veoma malog broja uzoraka kod kojih je detektovan MMP, kao i visokih vrednosti CV i "recovery", identifikacija ovog analita izvršena je pomoću jona m/z=163 (za kvantitaciju) i m/z=149 i m/z=162 (za potvrđivanje) na retencionom vremenu 11.230 minuta a kvantitacija na osnovu površina ispod pika m/z=163 i molskih odnosa istog jona

sa ME Ponovljivost kalibracione krive za koncentracije metilderivata devet ftalatnih monoestara dobiveni su s korelacionim koeficijentima većim od 0,99 (poznata koncentracija analita u odnosu/odgovor) i one su linearne u rasponu od 5-200 ng/mL.

Test iskorišćenja ("*recovery*") za metilderivate deset ftalatnih monoestara smo odredili spajkovanjem do koncentracije od 50 ng/mL, a rezultati suprikazani u tabeli 5.

Tabela 5. Test iskorišćenja metode i kvantitacioni limit ftalatnih monoestara

Analit	Recovery (%)	LOQ ^A (ng/mL)	CV ^B (%)
MMP	70.1	1.0	10.8
MEP	85.2	0.5	3.1
MPP	90.8	0.5	2.4
MBP	112.3	0.5	7.6
MiAP	106.5	0.5	2.7
MnAP	89.5	0.5	0.9
MCHP	98.0	0.5	1.4
MBzP	86.1	0.5	2.9
MOP	97.6	0.5	6.2
MEHP	101.8	0.5	5.9

LOQ^A limit kvantitacije; CV^B koeficijent varijacije

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti šest ponavljanja određivanja.

Za potvrđivanje i analizu monoftalatnih estara (određivanih kao metilestri) korišćen je AMDIS Agilent-ov softverski paket sa pripadajućim bibliotekama masenih spektara (Fiehn i NIST08). Mann-Whitney U-test je korišten za statističke analize. Razlike smo smatrali da su značajne na nivou $p \leq 0,05$.

Kod naših ispitanica verifikovano je više različitih vrsta ftalata, te smo koristeći dole navedenu formulu izračunali sumu svih utvrđenih ftalatnih metabolita u urinu. Obzirom da je DEHP tj njegov metabolit MEHP bio u najvećem procentu prisutan, suma ftalata je izražena u molekularnoj težini MEHP.

Kako bi poredili ukupne ftalatne metabolite, količina svakog metabolita izražena u molarnoj koncentraciji pomnožena je sa molekularnom težinom MEHP, što je i prikazano u formuli (61):

$$\Sigma allph = \left(\frac{C_{MMP}}{MW_{MMP}} + \frac{C_{MEP}}{MW_{MEP}} + \frac{C_{MPP}}{MW_{MPP}} + \frac{C_{MBP}}{MW_{MBP}} + \frac{C_{MCHP}}{MW_{MCHP}} + \frac{C_{MOP}}{MW_{MOP}} + \frac{C_{MEHP}}{MW_{MEHP}} \right) \times MW_{MEHP}$$

Na ovaj način je izračunata ukupna količina ftalatnih metabolita.

3.3. Statistička obrada i prezentacija podataka

Ekstrakciju informacija pojedinačnih karakteristikama numeričkih ekspresija iz uzorka je izvedena standardnim statističkim metodama. Usvojen je prag značajnosti svih informacija od $p=0.05$. Parametarske karakteristike su dobijene standardnim metodama deskriptivne statistike. Neparametarske karakteristike raspodele slučajnih promenljivih su verifikovane primenom χ^2 testa. U slučaju bliskih raspodela koje istovremeno ispunjavaju uslov minimalnog praga značajnosti, za promenljivu je usvajana raspodela sa najvećim pragom značajnosti.

Komparacija srednjih vrednosti istih promenljivih iz različitih grupa je izvršena adekvatnim testovima, u zavisnosti od tipa raspodela: t-testom ili Signum testom.

Kvalitativni uticaj faktora ftalata (isključivo sa i bez ftalata) je ispitivan analizom varijanse svih promenljivih za sve evidentirane vrste ftalata.

Za sve promenljive u grupama je proračunat koeficijent linearne korelacije i evidentirane su promene u koeficijentima korelacija između grupa. Promene u vrednostima koeficijenta korelacije istih promenljivih u različitim grupama su verifikovane testom konkordanse. U slučaju verifikacije statistički značajne razlike između koeficijenata korelacije uspostavljen je novi logički odnos sa parametarskom, kvantitativnom analizom odnosa promenljivih između grupa.

U slučaju karakterističnih, statistički verifikovanih direktnih i indirektnih odnosa ftalata, dodatno su uspostavljene aproksimativni funkcijski odnosi dve nezavisne promenljive. Na osnovu ovih

funkcija, ustanovljene su podskupovi vrednosti zavisnih promenljivih koji su dodatno testirani Dankanovim testom iz grupe ANOVA.

Kvalitativni uticaj ftalata je ispitivan formiranjem nove promenljive koja uvažava količnik ftalata. Ova nova promenljiva je obrađena standardnim, već napomenutim statističkim metodama.

4. REZULTATI

Istraživanje je sprovedeno kao studija preseka i uključivalo je 91 osobu ženskog pola u reproduktivnom periodu. Ispitivanu grupu je činilo 61 osoba kod kojih je potvrđena dijagnoza sindroma policističnih jajnika prema Roterdamskim kriterijumima, dok je kontrolna grupa bila sačinjena od 30 zdravih žena bez prisutnih ftalatnih metabolita u urinu.

4.1. Opšte karakteristike ispitanika

Prosečna životna dob ispitanice iznosila je $26,15 \pm 5,20$ godina, dok su kontrolnu grupu činile nešto starije ispitanice ($36,96 \pm 7,87$ godina). Iako postoji statistički značajna razlika u godinama života između ove dve grupe ($p < 0,001$), obe grupe ispitanice se nalaze u reproduktivnom periodu, te se njihov hormonski status ne razlikuje i može se vršiti poređenje.

Antropometrijska ispitivanja u grupi ispitanica ukazala su da je prosečni index telesne mase bio $24,45 \pm 6,56 \text{ kg/m}^2$ sa prosečnim obimom struka od $80,73 \pm 18,49 \text{ cm}$, što znači da je najveći procenat ispitanica sa PCOS normalno uhranjen, bez povećane količine visceralnog masnog tkiva.

I antropometrijske karakteristike kontrolne grupe pokazuju normalni stepen uhranjenosti ($21,64 \pm 1,92 \text{ kg/m}^2$), sa prosečnim obimom struka od $73,04 \pm 6,94 \text{ cm}$.

Iako prosečne vrednosti antropometrijskih karakteristika ukazuju na normalnu uhranjenost obe grupe, statistički značajna razlika postoji između ovih parametara. Vrednosti Indexa telesne mase i obim struka su veće u grupi PCOS ispitanica sa značajno većom standardnom devijacijom. Takav rezultat je očekivan, obzirom da je 20/60 ispitanica imalo BMI veći od 25 kg/m^2 , a njih 12/20 veći od 30 kg/m^2 , dok u kontrolnoj grupi nije bilo ispitanica sa indexom telesne mase većim od 25 kg/m^2 .

U grupi PCOS ispitanica prosečne vrednosti glikemija na tašte su iznosile $4,79 \pm 0,52 \text{ mmol/L}$ i statistički su značajno bile niže u odnosu na prosečne vrednosti glikemija u kontrolnoj

grupi ($5,05 \pm 0,46$ mmol/l). Prosečne vrednosti insulinemije na tašte u PCOS grupi ($12,29 \pm 7,23$ mIU/L) su dva i više puta veće u odnosu na ove vrednosti u kontrolnoj grupi ($6,73 \pm 2,51$ mIU/L), što ukazuje na statistički značajnu razliku ($p < 0,001$). Obzirom da je vrednost HOMA indexa zavisna od glikemije i insulinemije, očekivano je srednja vrednost ovog parametra statistički značajno veća u grupi PCOS ispitanica (PCOS: $2,95 \pm 2,68$ vs Kontrola: $1,53 \pm 0,63$, $p < 0,001$), što nam ukazuje na postojanje insulinske rezistencije u ispitivanoj grupi.

Naša ispitivana PCOS grupa je pokazala statistički značajno niže vrednosti ukupnog holesterola u odnosu na kontrolnu grupu ($4,64 \pm 0,87$ mmol/L vs $5,11 \pm 0,74$ mmol/L, $p = 0,009$), ali i statistički niže vrednosti protektivnog HDL holesterola (PCOS: $1,33 \pm 0,35$ mmol/L vs Kontrola: $1,51 \pm 0,35$ mmol/L, $p = 0,0033$). Srednje vrednosti triglicerida i LDL holesterola nisu pokazale statistički značajnu razliku među grupama (Tabela 6).

Odnos gonadotropnih hormona, FSH/LH u grupi PCOS ispitanica je 1:2 ili 1:3, što je i očekivano u ovom sindromu, dok se takav odnos vrednosti ovih hormona ne nalazi u kontrolnoj grupi. Prosečne vrednosti folikulostimulišućeg hormona ($5,37 \pm 4,25$ IU/L) su statistički značajno niže ($p = 0,025$) u odnosu na ove vrednosti kontrolne grupe ($12,13 \pm 22,36$ IU/L), dok nije postojala statistički značajna razlika u srednjim vrednostima lutenizirajućeg hormona među ispitivanim grupama.

Prosečne vrednosti estradiola u obe grupe su slične i nije postojala statistički značajna razlika (PCOS: $126,46 \pm 122,66$ pg/mL vs Kontrola: $126,31 \pm 99,38$ pg/mL, $p = 0,99$).

Da ispitivana grupa zaista ima sindrom PCO ukazuju i povišene vrednosti testosterona u ovoj grupi koje su iznosile $2,40 \pm 1,13$ nmol/L i bile su značajno više u odnosu na srednje vrednosti kontrolne grupe $1,49 \pm 0,61$ nmol/L, $p < 0,001$.

Obzirom da su srednje vrednosti BMI i OS u obe grupe u granicama referentnih, očekivano ne postoji statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima leptinemije u PCOS ($10,65 \pm 11,50$ ng/ml) i kontrolnoj grupi ($11,10 \pm 10,45$ ng/ml), $p = 0,85$.

Kako bi potvrdili literaturne podatke o povećanom kardiometaboličkom riziku u žena sa PCOS, određivali smo dva indexa- LAP i VAI. Poređenjem PCOS grupe sa zdravom kontrolom, utvrđen je statistički značajno povišen LAP index (PCOS: $26,20 \pm 29,08$ vs Kontrola: $16,90 \pm 13,04$, $p = 0,039$), dok se vrednosti VAI indexa nisu razlikovale među ispitivanim grupama.

Tabela 6. Prosečne vrednosti ispitivanih parametara u PCOS I kontrolnoj grupi

Ispitivani parametar	PCOS (n=61)	Kontrola (n=30)	p
	X±SD	X±SD	
Godine	26,15 ± 5,20	36,96 ± 7,87	<0,001
Telesna masa	68,23±17,02	60,28±6,30	0,002
BMI	24,45 ± 6,56	21,64 ± 1,92	0,003
OS	81,78 ± 15,83	73,17 ± 6,71	<0,001
ŠUK	4,79 ± 0,52	5,05 ± 0,46	0,019
IRI	12,29 ± 7,23	6,73 ± 2,51	<0,001
HOMA-IR	2,68 ± 1,74	1,53 ± 0,63	<0,001
Ukupni holesterol	4,64 ± 0,87	5,11 ± 0,74	0,009
TG	0,91±0,47	1,04 ± 0,49	0,21
HDL	1,33 ± 0,35	1,51 ± 0,35	0,033
LDL	2,90 ± 0,75	3,13 ± 0,65	0,12
LA	2,36 ± 0,97	2,21 ± 0,71	0,40
Hol/HDL	4,19 ± 3,96	3,46 ± 0,92	0,18
FSH	5,37 ± 4,25	12,13 ± 22,36	0,025
LH	11,23 ± 12,08	13,03 ± 15,65	0,58
Estradiol	126,46 ± 122,66	126,31 ± 99,38	0,99
Testosteron	2,40 ± 1,13	1,49 ± 0,61	<0,001
Leptin	10,65 ± 11,50	11,10 ± 10,45	0,85
LAP	26,20±29,08	16,90±13,04	0,039
VAI	1,47±1,16	1,35±0,83	0,55

Legenda: OS-obim struka; BMI- Body mass index; IRI- insulinemija; HOMA IRI- indeks insulinske rezistencije; TG-trigliceridi; HDL-lipoproteini velike gustine; LDL- lipoproteini male gustine; LAP- Lipid accumulation product index; VAI- Visceral adiposity index.

Podelom ispitanica PCOS grupe prema vrednostima BMI dobili smo 6,6 % je bilo pothranjeno, 60 % normalno uhranjeno, 10% predgojazno, 20 % gojazno, a 3,3 % ekstremno gojazno.

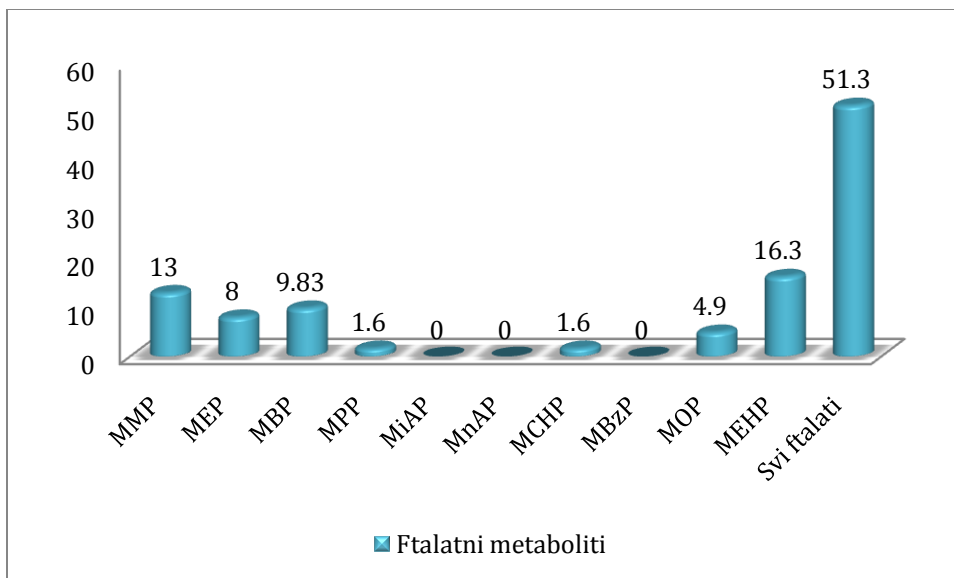
4.2. Rezultati ispitivanja ftalatnih metabolita kod ispitanica sa PCOS

U ispitivanoj grupi žena sa sindromom policističnih jajnika, utvrđeno je prisustvo ftalatnih metabolita u 51,3% ispitanica (31/61). Najveća je bila zastupljenost MEHP i to kod 10 ispitanica (16,3%), zatim MBP u 8 ispitanica (15%) i MPP u 6 ispitanica (10%). Mono-etil ftalat je bio verifikovan u urinu 4 ispitanice (9,83%) , a MOP u urinu 3 ispitanice (4,9%). U jednom uzorku urina je potvrđeno prisustvo MPP i MCHP ftalata, dok MIAP, MNAP i MbzP nisu detektovani u ispitivanim uzorcima(Tabela 7).

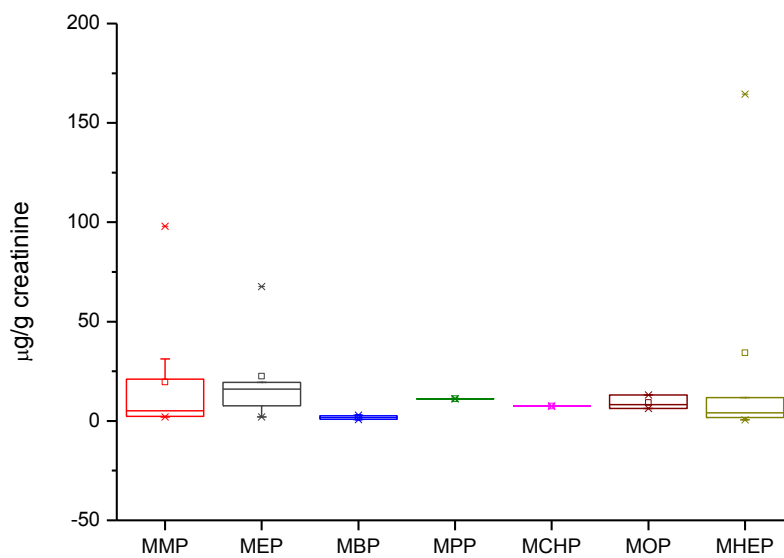
Na Grafikonu 1. prikazana je procentualna zastupljenost ftalatnih metabolita detektovanih u urinu ispitanica, a na Slici 6. njihova srednja vrednost i opseg.

Tabela 7. Zastupljenost ftalatnih metabolita u urinu ispitanica sa PCOS i njihove srednje vrednosti

Ftalati	%	Srednja vrednost($\mu\text{g/g}$ cre)	SD	Min	Max
MMP	13% (8/61)	19.64	33.1	2.0	97.95
MEP	8% (5/61)	22.56	26.075	3.12	20.04
MBP	9.83% (6/61)	1.79	1.02	0.67	2.98
MPP	1.6% (1/61)	11.13	-	11.13	11.13
MiAP	0% (0/61)	0	0		
MnAP	0% (0/61)	0	0		
MCHP	1,6% (1/61)	7.53	-	7.53	7.53
MBzP	0% (0/61)	0	0		
MOP	4.9% (3/61)	9.01	3.61	6.28	13.10
MEHP	16,3% (10/61)	34.38	64.10	0.62	164.52
Svi ftalati	51,3% (31/61)	11.72	14.29	0.624	66.45



Grafikon 1. Relativna zastupljenost ftalata u procentima i svih ftalata



Slika 6. Koncentracije ftalata (srednja vrednost i opseg)

4.3. Analiza starosti i antropometrijskih parametara u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama

4.3.1. Analiza starosti u ispitivanim podgrupama

Prosečna starost ispitanica u kontrolnoj grupi iznosila je 36 ± 8 godina, dok su ispitanice ispitivane grupe sa PCOS bile mlađe životne dobi i to PCOS negativne 25 ± 5 godina i PCOS pozitivne 26 ± 6 godina. Obzirom na normalne raspodele godina života u svim ispitivanim grupama, primenjen je t-test i utvrđeno je da postoji signifikatna razlika u godinama života između kontrolne i PCOS negativne grupe ($p=0.00 < 0.05$), kao i kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.00 < 0.05$). Između grupa sa PCOS, sa ili bez ftalata, nema signifikantne razlike u godinama ($p=0.5339 > 0.05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Srednje vrednosti, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za godine života kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe

Grupa	Mat. očekivanje	Stand. devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	26,5161	5,5068	Normalna	0,1041
PCOS -	25,6000	4,90320	Normalna	25,6000
Kontrolna grupa	36,2333	7,8243	Normalna	0,0502

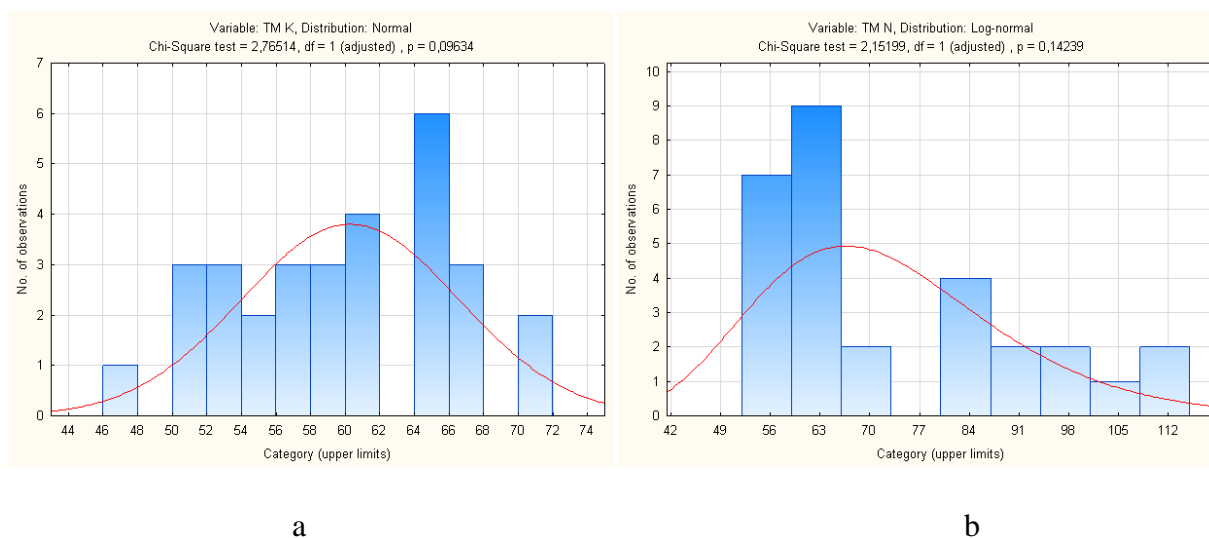
4.3.2. Analiza telesne mase u ispitivanim podgrupama

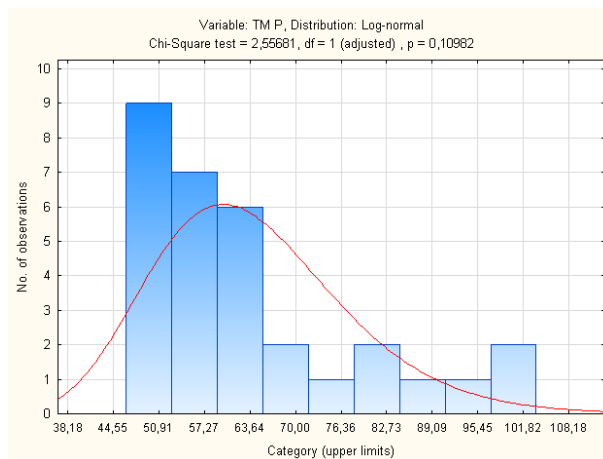
Srednja vrednost telesne mase u kontrolnoj grupi iznosila je $60,28 \pm 6,295$ kg i bila je signifikatno niža u odnosu na telesnu masu ispitanica PCOS negativne grupe $72,49 \pm 17,8$ kg ($p=0.0000 < 0.05$). Nije utvrđena značajna razlika između srednjih vrednosti kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.1988 > 0.05$), kao i ni između PCOS podgrupa ($p=0.0523 > 0.05$) (Tabela 9).

Tabela 9. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela I χ^2 verifikacija za telesnu masu kontrolne, PCOS pozitivne I PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	64,1355	15,0065	Log-normalna	0.1098
PCOS -	72,4933	17,87263	Log-normalna	0.1429
Kontrolna grupa	60,2833	6,2955	Normalna	0.0963

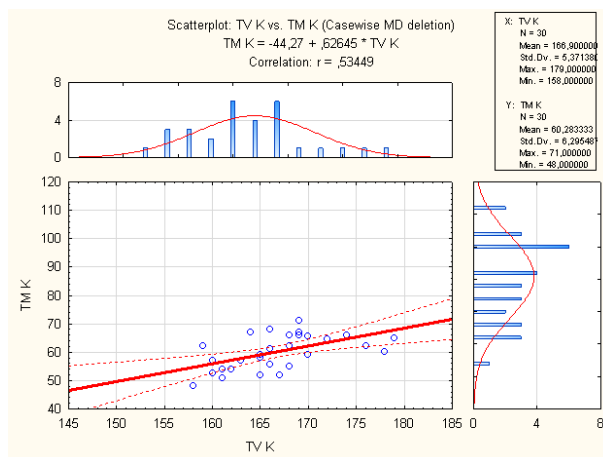
Slika 7. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti telesne mase kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)





C

Iako bliske po srednjim vrednostima bez statistički značajne razlike, kontrolna I PCOS pozitivna grupa imaju veliku razliku u standardnoj devijaciji I razlike u tipovima raspodela.



Slika 8. Korelacioni odnosi TV i TM kontrolne grupe

Na osnovu jednačine linearne regresije (Slika 8) za prosečan broj godina $G=26$ (signifikantno iste u obe PCOS grupe) u kontrolnoj grupi smo mogli očekivati srednju vrednost telesne mase od $TM= 56, 59$ kg. Poređenjem ove vrednosti telesne mase sa PCOS grupama, dobija se signifikatna razlika i definitivno potvrđuje ukupnu razliku između vrednosti telesne mase u svim podgrupama.

4.3.3. Analiza indeksa telesne uhranjenosti u ispitivanim podgrupama

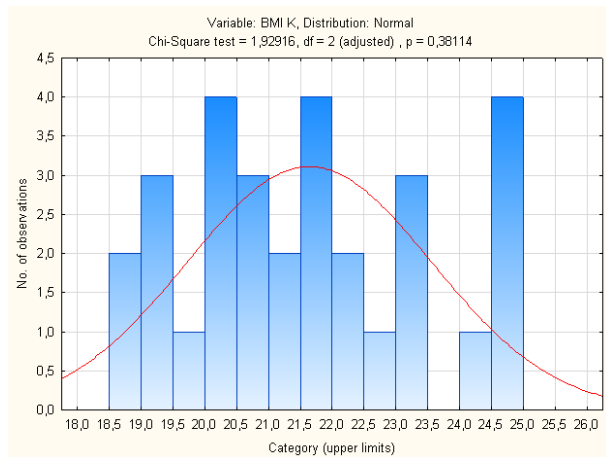
Srednja vrednosti indeksa telesne uhranjenosti ispitanica kontrolne grupe iznosila je $21,64 \pm 1,92$ kg/m², dok su prosečne vrednosti ispitanica PCOS podgrupa bile nešto više i to: PCOS negativne $25,9 \pm 7,6$ kg/m² i PCOS pozitivne $23,03 \pm 5,009$ kg/m². Iako i kontrolna grupa i grupa PCOS ispitanica sa ftalatima u urinu pripadaju grupi normalno uhranjenih, vrednost standardne devijacije u PCOS + grupi nam govori da u ovoj grupi ima i gojaznih ispitanica. Vrednost BMI PCOS – grupe ih svrstava u predgojazne, pa čak i gojazne na osnovu standardne devijacije.

Na osnovu raspodela BMI po grupama, primenjen je t-test kojim je utvrđenja signifikatna razlika u srednjim vrednostima BMI između kontrolne i PCO–negativne grupe ($p=0.0041 < 0.05$), dok nije utvrđena razlika između kontrolne i PCO–pozitivne grupe ($p=0.1600 > 0.05$), kao ni PCOS–negativne i PCOS–pozitivne grupe ($p=0.0858 > 0.05$) (Tabela 10).

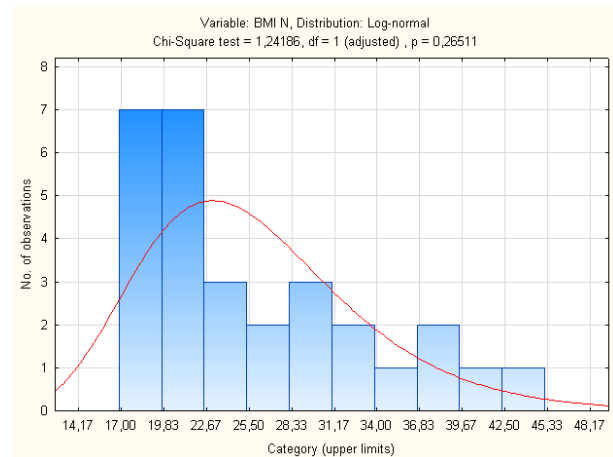
Tabela 10. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za indeks telesne uhranjenosti kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	23,0339	5,0097	Log-normalna	0.0053
PCOS -	25,8953	7,56825	Log-normalna	0.2651
Kontrolna grupa	21,6423	1,9229	Normalna	0.3811

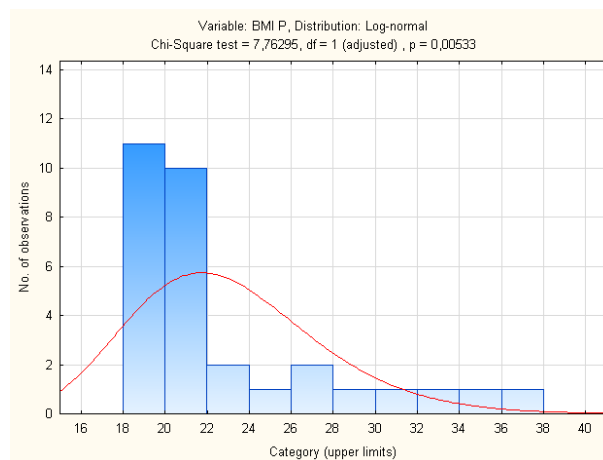
Slika 9. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti indeksa telesne uhranjenosti kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)



a

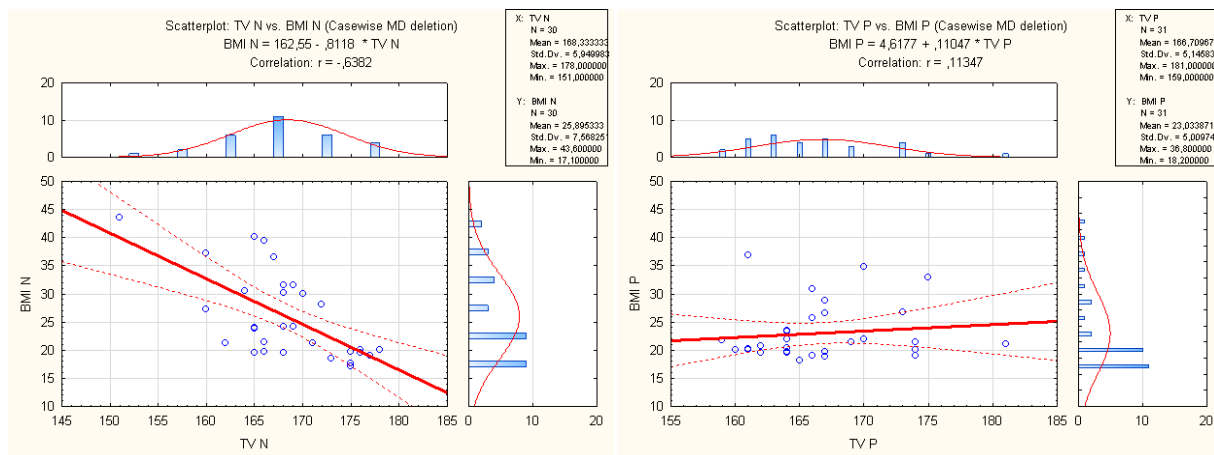


b



c

Analizom korelacionih odnosa indeksa telesne uhranjenosti sa svim ispitivanim parametrima u svim podgrupama, statistički značajna razlika je dobijena u korelacionim odnosima BMI i telesne visine.



Slika 10. Korelacija telesne visine sa BMI u PCOS podgrupama

Na Slici 10. prikazane su prave linearne regresije korelacija telesne visine i BMI u PCOS podgrupama. Utvrđena je statistički značajna razlika između koeficijenta korelacije odnosa ispitivanih parametara u podgrupama ($p=0.0011 < 0.05$).

4.3.4. Analiza obima struka u ispitivanim podgrupama

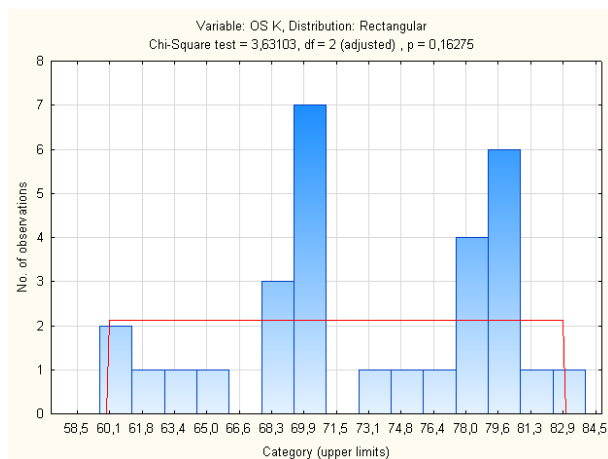
Određivanjem srednjih vrednosti obima struka u ispitivanim grupama, dobijene su najniže vrednosti u kontrolnoj grupi $73,17 \pm 6,71$ cm, zatim u grupi PCOS ispitanica sa ftalnim metabolitima $78,95 \pm 14,55$ cm, dok su PCOS ispitanice bez ftalata imale najviše vrednosti obima struka $84.63 \pm 16,55$ cm.

Na osnovu primene parametarskog t-testa utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne i PCO–negativne grupe ($p=0.0008 < 0.05$). Iako nije verifikovana razlika između kontrolne i PCO–pozitivne grupe ($p=0.0520 > 0.05$), mora se istaknuti da su srednje vrednosti OS PCOS pozitivne grupe bliže graničnoj i da postoji velika standardna devijacija. Da ovu grupu čine i gojazne osobe, potvrđuje i ne postojanje signifikantne razlike između PCO–negativne i PCO–pozitivne grupe ($p=0.1593 > 0.05$) (Tabela 11).

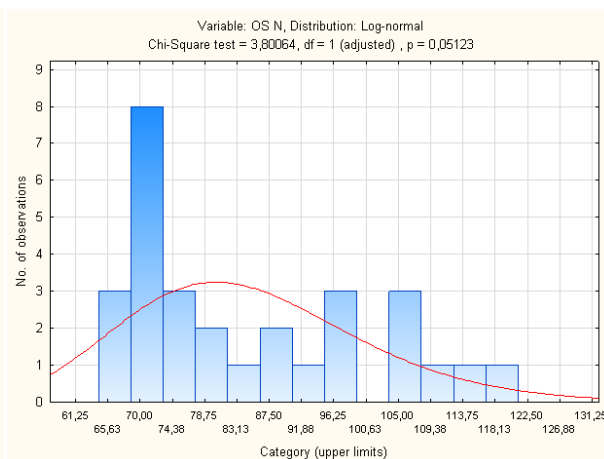
Tabela 11. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela I χ^2 verifikacija za obim struka kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	78,9516	14,5495	Log-normalna	0.4005
PCOS -	84,6333	16,55187	Log-normalna	0.0512
Kontrolna grupa	73,1667	6,7112	Ravnomerna	0.1627

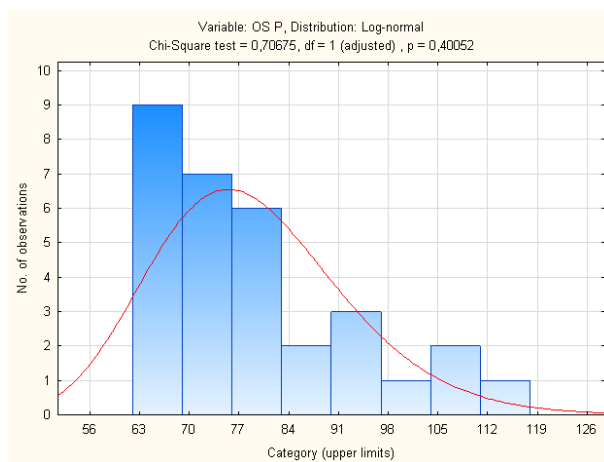
Slika 11. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti za obim struka kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)



a

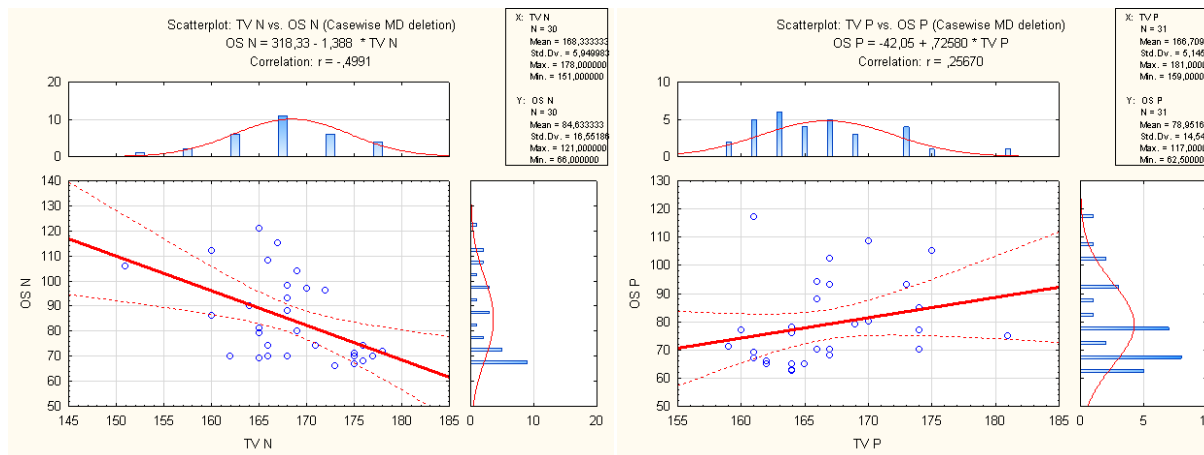


b



c

Analizom korelacionih odnosa obima struka sa svim ispitivanim parametrima u svim podgrupama, statistički značajna razlika je dobijena u korelacionim odnosima obima struka i telesne visine.



Slika 12. Korelacija telesne visine sa obimom struka u PCOS podgrupama

Na slici 12. prikazane su prave linearne regresije korelacija telesne visine i obima struka u PCOS podgrupama. Utvrđena je statistički značajna razlika između koeficijenta korelacije odnosa ispitivanih parametara u pogrupama ($p=0.0021<0.05$).

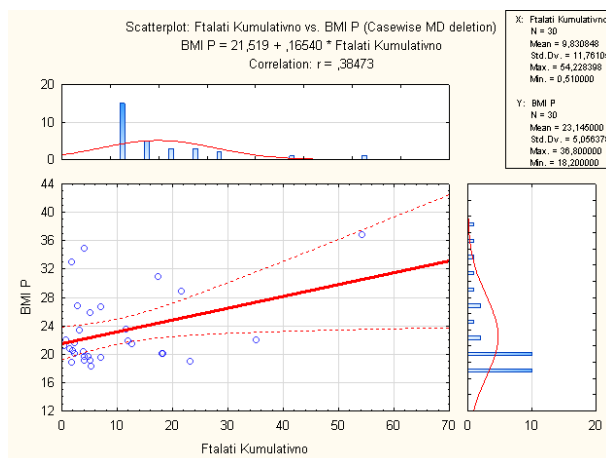
Još jednom je pokazano da iako nema razlike u telesnoj visini ispitanica, njihove antropometrijske karakteristike (TM, BMI i OS) su značajno razlikuju u PCOS podgrupama.

4.3.5. Analiza povezanosti ukupnih ftaltnih metabolita sa antropometrijskim parametrima

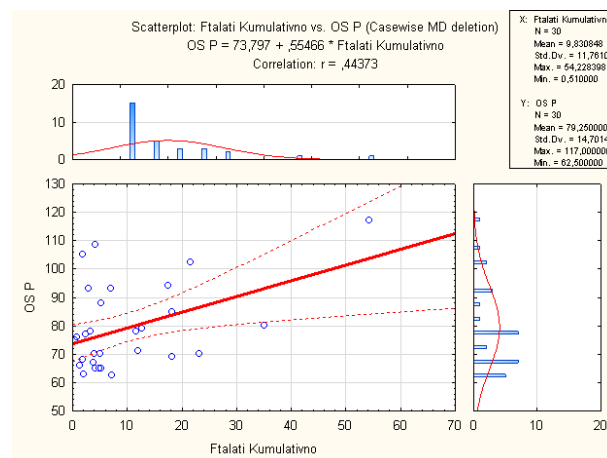
U tabeli 12. prikazani su korelacioni odnosi ukupnih ftaltnih metabolita i antropometrijskih parametara u PCOS pozitivnoj grupi. Dobijeni rezultati ukazuju na statistički značajnu povezanost ukupnih ftaltnih metabolita sa indeksom telesne uhranjenosti ($p=0,032<0,05$) i obimom struka ($0,012<0,05$).

Tabela 12. Korelacije ukupnih ftalatnih metabolita I antropometrijskih parametara u PCOS pozitivnoj grupi

Ispitivani parametar	Ukupni ftalati	
	R	p
TM	0,2874	0,13
BMI	0,3847	0,032
Obim struka	0,4437	0,012



Slika 13. Korelacija BMI i ukupnih ftalata



Slika 14. Korelacija OS i ukupnih ftalata

4.4. Analiza glukoznog metabolizma u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama

4.4.1. Analiza glikemije u ispitivanim podgrupama

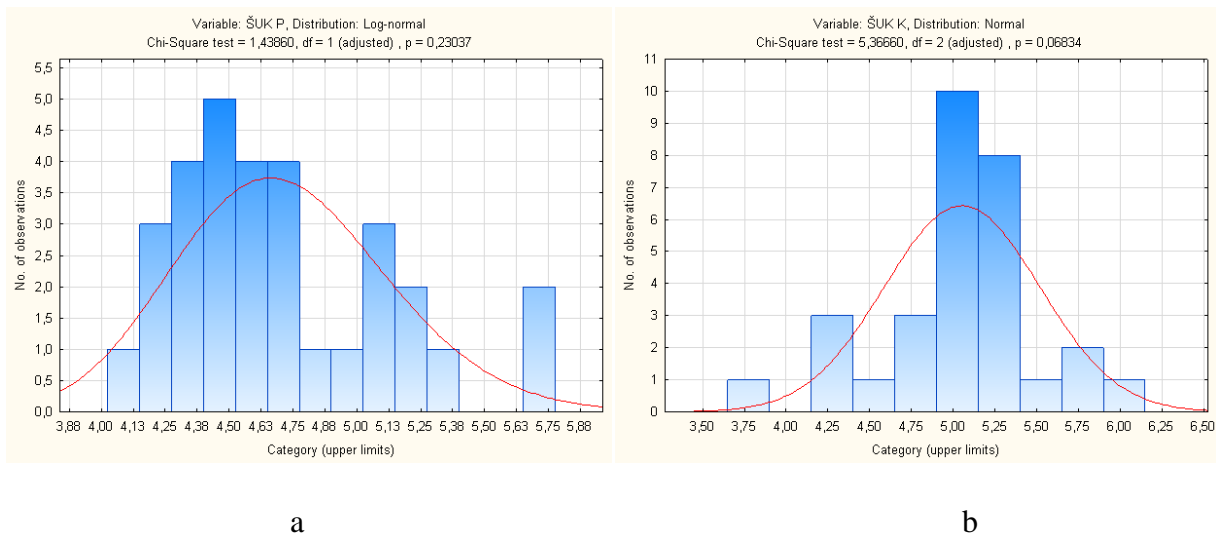
Srednje vrednosti glikemija na tašte u svim ispitivanim podgrupama su bile u referentnom opsegu i to u kontrolnoj grupi: $5,05 \pm 0,46$ mmol/l, PCOS pozitivnoj: $4,72 \pm 0,43$ mmol/l i PCOS negativnoj : $4,86 \pm 0,59$ mmol/l.

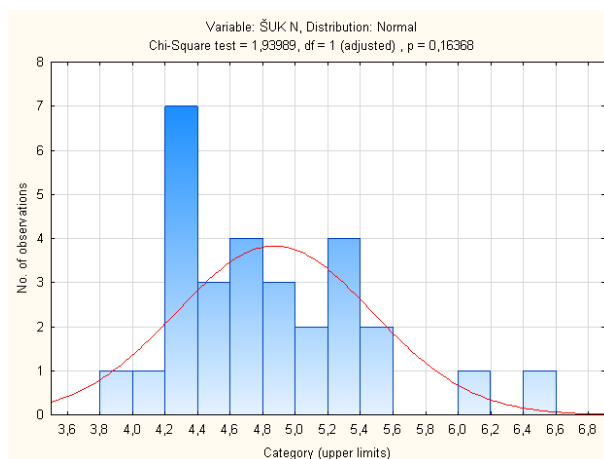
Primenjenim parametarskim t-testom utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne i PCOS–pozitivne grupe ($p=0.0047<0.05$), odnosno da ispitanice PCOS pozitivne grupe imaju niže vrednosti glikemije na tašte. NIje verifikovana razlika između kontrolne i PCO–negativne grupe ($p=0.1584>0.05$), kao ni između PCOS–negativne i PCOS–pozitivne grupe ($p=0.3051>0.05$) (Tabela 13).

Tabela 13. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela I χ^2 verifikacija za glikemiju kontrolne , PCOS pozitivne I PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	4,7181	0,4278	Log-	0.2303
PCOS -	4,8557	0,59964	Normalna	0.1638
Kontrolna grupa	5,0537	0,4654	Normalna	0.0683

Slika 15. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti za glikemiju kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)





C

4.4.2. Analiza insulinemije u ispitivanim podgrupama

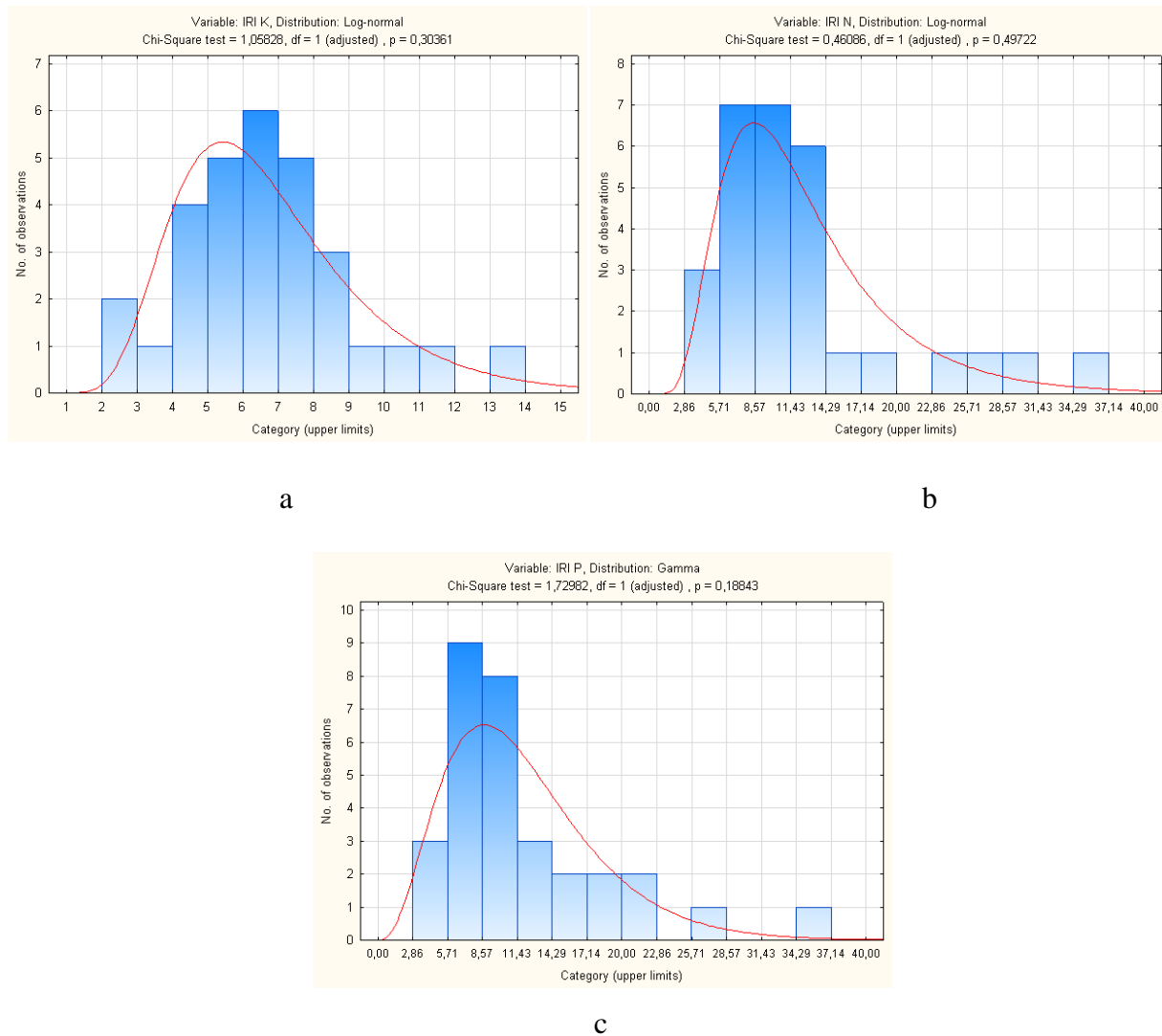
Primenom t-testa utvrđeno je da su vrednosti insulinemije na tašte u ispitivanoj PCOS grupi bile značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu zdravih žena. Naime, srednja vrednost insulinemije u PCOS pozitivnoj grupi je iznosila $11,69 \pm 7,006$ mIU/l i statistički je značajno viša ($p=0.0003 < 0.05$) u odnosu na kontrolnu grupu čija je srednja vrednost $6,73 \pm 2,51$ mIU/l. Statistički značajana razlika je utvrđena i između vrednosti insulinemije PCOS negativne grupe $12,74 \pm 7,46$ mIU/L i kontrolne grupe ($p=0.0000 < 0.05$).

Međutim, kvantitativne razlike u insulinemiji između PCOS podgrupa nisu verifikovane ($p=0.6444 > 0.05$) (Tabela 14).

Tabela 14. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za insulinemiju kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe

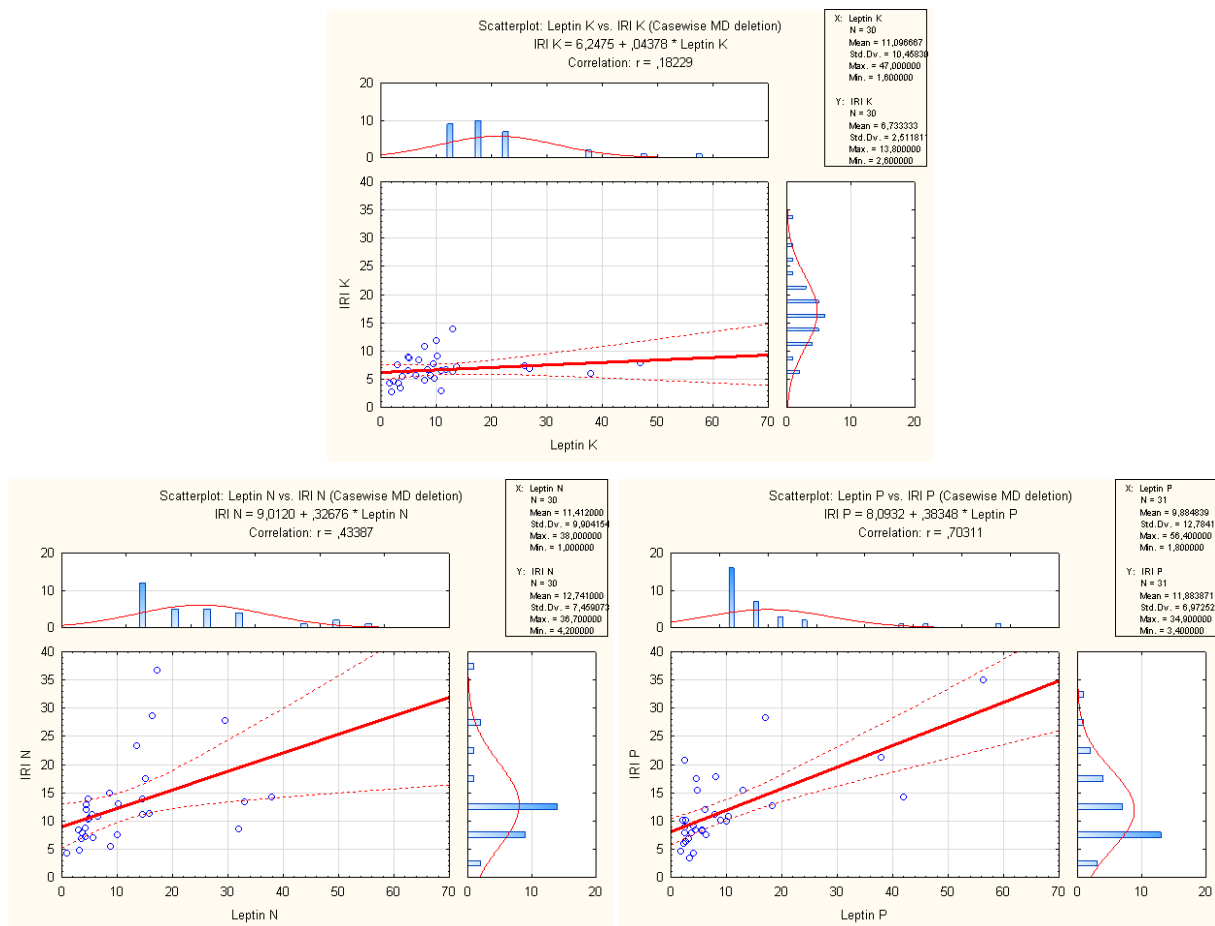
Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	11,8839	6,9725	Gama	0.1884
PCOS -	12,7410	7,45907	Log-normalna	0.4972
Kontrolna grupa	6,7333	2,5118	Log-normalna	0.3036

Slika 16. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti za insulinemiju kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne grupe (c)



Primenjenim statističkim testom utvrđeno je da ispitanice obe PCOS grupe imaju značajno više vrednosti insulinemije u odnosu na kontrolnu grupu. Razlika u srednjim vrednostima insulinemije između PCOS podgrupa nije utvrđena. Ipak, analizom korelacionih odnosa insulinemije ustanovljeni su sledeći kvalitativni odnosi (Slika 17):

- Linearna regresija IRI i leptina u kontrolnoj ($r=+0.18229$) se ne menja signifikantno ($p=0.1158>0.05$) u PCO–negativnoj grupi ($r=+0.4338$)
- Linearna regresija IRI i leptina u kontrolnoj ($r=+0.18229$) se signifikantno ($p=0.0069<0.05$) menja u PCOS–pozitivnoj grupi ($r=+0.7031$).
- Linearna regresija IRI i leptina u PCOS–negativnoj grupi ($r=+0.4338$) se ne menja signifikantno ($p=0.0628>0.05$) u u PCOS–pozitivnoj grupi ($r=+0.7031$).



Slika 17. Korelacioni odnosi insulinemije i leptina u svim ispitivanim podgrupama

Iako su jednačine linearne regresije izuzetno slične u PCOS grupama, koeficijenti korelacije odnosa leptina i IRI u PCOS podgrupama su granični ($p=0.0628>0.05$) što bi u tolerantnijim statističkim uslovima ($p=0.10$) predstavljalo signifikantnu razliku.

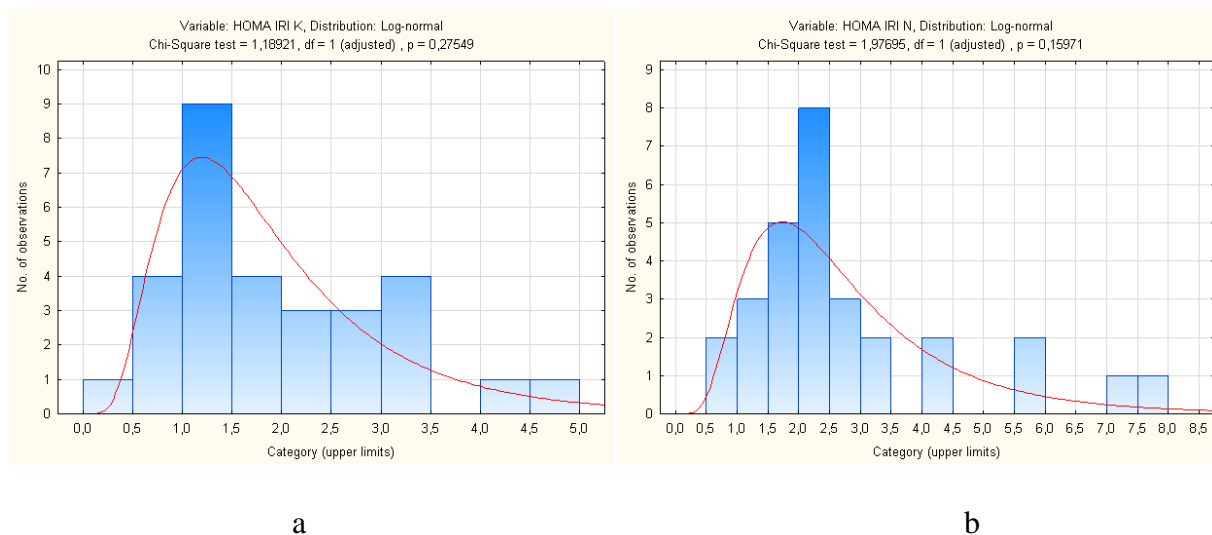
4.4.3. Analiza indeksa insulinske rezistencije u ispitivanim podgrupama

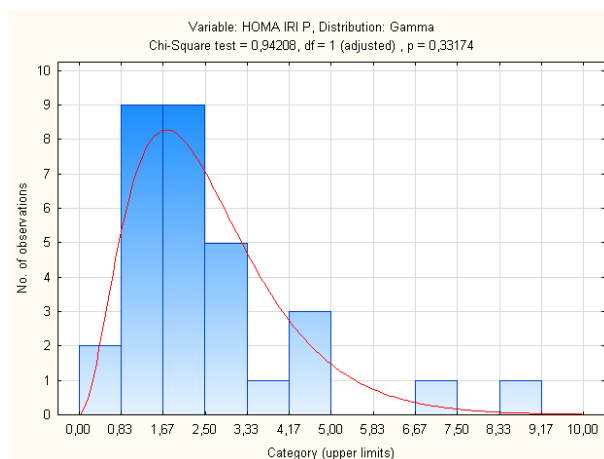
Analizom razlika indeksa insulinske rezistencije u ispitivanim podgrupama, primenom t-testa na osnovu njihove raspodele, dobijene su signifikantne razlike ($p=0.0229<0.05$) između kontrolne grupe čija je srednja vrednost HOMA-IRI $1,93 \pm 1,07$ i PCOS–negativne grupe (srednja vrednost HOMA-IRI $2.79 \pm 1,7184$). Nije utvrđena značajna razlika ($p=0.0960>0.05$) između kontrolne i PCOS–pozitivne grupe (srednja vrednost $2,51 \pm 1,75$), kao ni između PCOS–negativne i PCOS–pozitivne grupe ($p=0.6040>0.05$) (Tabela 15).

Tabela 15. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za HOMA-IRI kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	2,5593	1,7527	Gama	0.3317
PCOS -	2,7911	1,71842	Log-normalna	0.1587
Kontrolna grupa	1,9278	1,0697	Log-normalna	0.2754

Slika 18. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa i prag značajnosti za HOMA/IRI kontrolne (a), PCOS negativne (b) i PCOS pozitivne podgrupe (c)





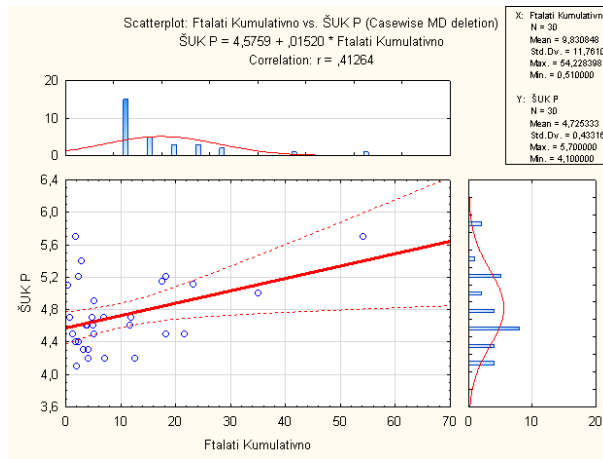
C

4.4.4. Analiza povezanosti ukupnih ftalatnih metabolita sa glukoznim metabolizmom

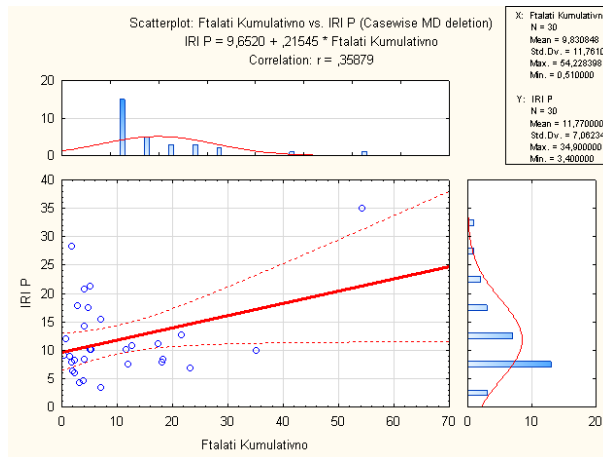
Korelacionom analizom utvrđena je statistički značajna povezanost između ukupnih ftalatnih metabolita i glukoznog metabolizma (glikemije ($p=0,021<0,05$); insulinemije ($p=0,04<0,05$) i HOMA indeksa ($p=0,023<0,05$)) (Tabela 16).

Tabela 16. Korelacije ukupnih ftalatnih metabolita i parametara glukoznog metabolizma u PCOS pozitivnoj grupi

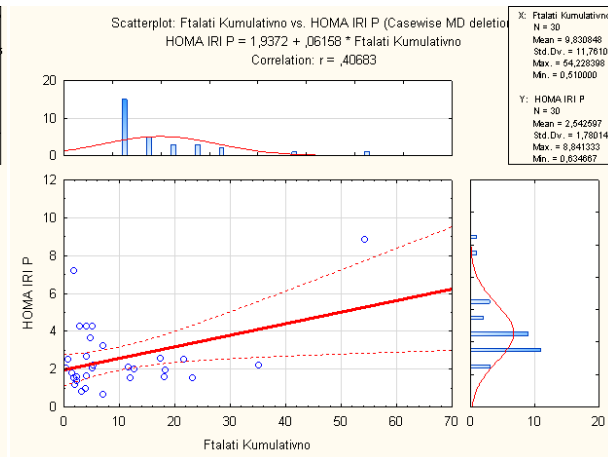
Ispitivani parametar	Ftalati kumulativno	
	R	p
ŠUK	0,4126	0,021
IRI	0,3588	0,04
HOMA IRI	0,4068	0,023



Slika 19. Korelacija ŠUK-a i ukupnih ftalata



Slika 20. Korelacija IRI i ukupnih ftalata



Slika 21. Korelacija HOMA-IRI i ukupnih ftalata

4.5. Analiza lipida i lipoproteina seruma u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama

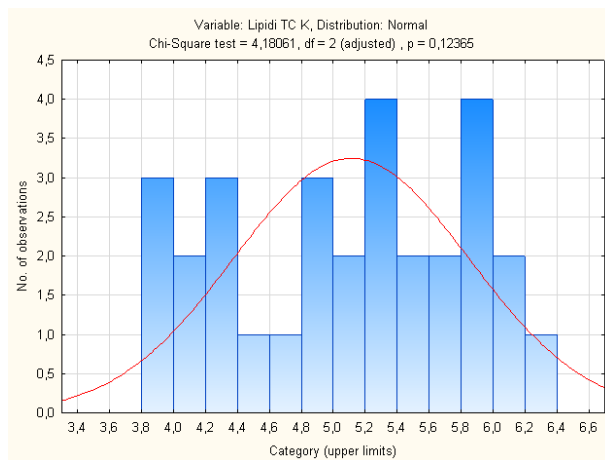
4.5.1. Analiza ukupnog holesterola u ispitivanim podgrupama

Analizom ukupnog holesterola u ispitivanim grupama, utvrđeno je da PCOS negativna grupa imala najnižu vrednost kako u odnosu na kontrolnu grupu, tako i u odnosu na PCOS pozitivnu grupu. Naime, srednja vrednost ukupnog holesterola u PCOS negativnoj grupi je iznosila $4,37 \pm 0,83$ mmol/l i značajno je niža ($p=0.0005<0.05$) u odnosu na srednju vrednost holesterola kontrolne grupe $5,11 \pm 0,74$ mmol/l. Takođe postoji statistički značajna razlika ($p=0.0211<0.05$) između vrednosti holesterola u PCOS negativnoj i PCOS pozitivnoj grupi, čija je srednja vrednost $4,88 \pm 0,84$ mmol/l. Nije utvrđena razlika između kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.2466>0.05$)(Tabela 17).

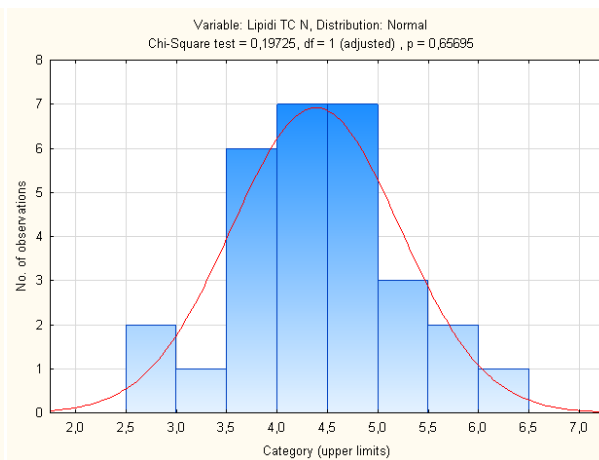
Tabela 17. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za ukupni holesterol kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	4,8758	0,8405	Log-normalna	0.2570
PCOS -	4,3700	0,82658	Normalna	0.6569
Kontrolna grupa	5,1130	0,7372	Normalna	0.1236

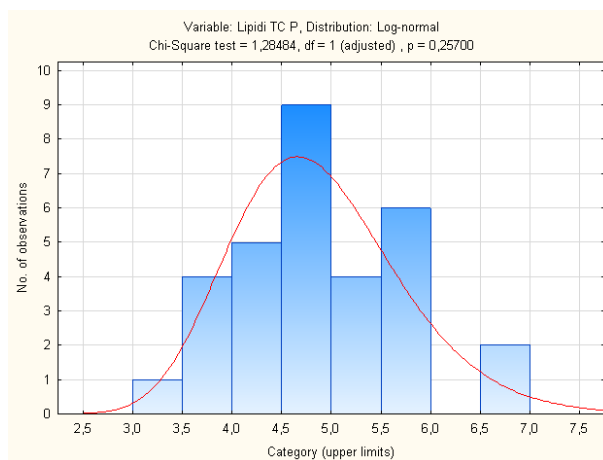
Slika 22. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti za ukupni holesterol kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)



A



b



C

4.5.2. Analiza triglicerida u ispitivanim podgrupama

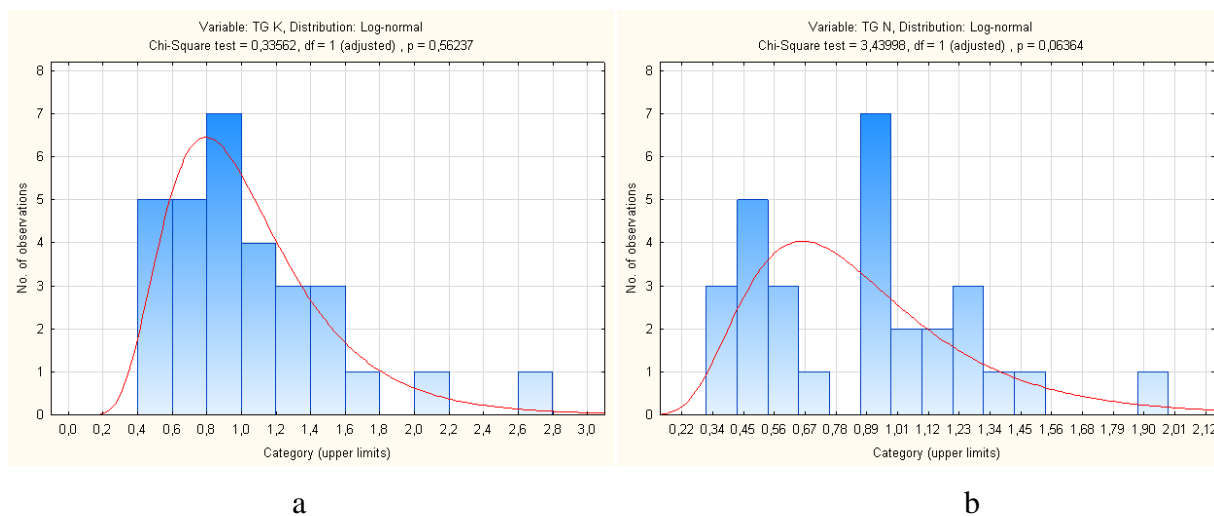
Srednje vrednosti triglicerida u ispitivanim grupama su bile u referentnom opsegu. Srednja vrednost kontrolne grupe iznosila je $1,043 \pm 0,49$ mmol/l, PCOS negativne grupe $0,87 \pm 0,37$ mmol/l I PCOS pozitivne grupe $0,94 \pm 0,55$ mmol/l.

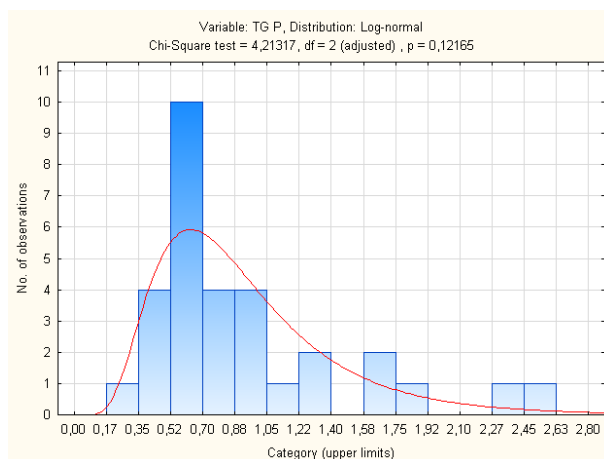
Raspodele triglicerida u svim grupama se mogu verifikovati i kao normalne sa manjim pragom značajnosti koji je veći od 0.05, te je primenjen t-test kojim je utvrđeno da nema signifikantne razlike između kontrolne i PCO–negativne grupe ($p=0.1307 > 0.05$), kontrolne i PCO–pozitivne grupe ($p=0.4303 > 0.05$), kao ni PCO–negativne I PCO–pozitivne grupe ($p=0.5837 > 0.05$) (Tabela 18).

Tabela 18. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela I χ^2 verifikacija za trigliceride kontrolne, PCOS pozitivne I PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	0,9381	0,5481	Log-normalna	0.1216
PCOS -	0,8717	0,37383	Log-normalna	0.0336
Kontrolna grupa	1,0437	0,4877	Log-normalna	0.5623

Slika 23. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti za trigliceride kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)





C

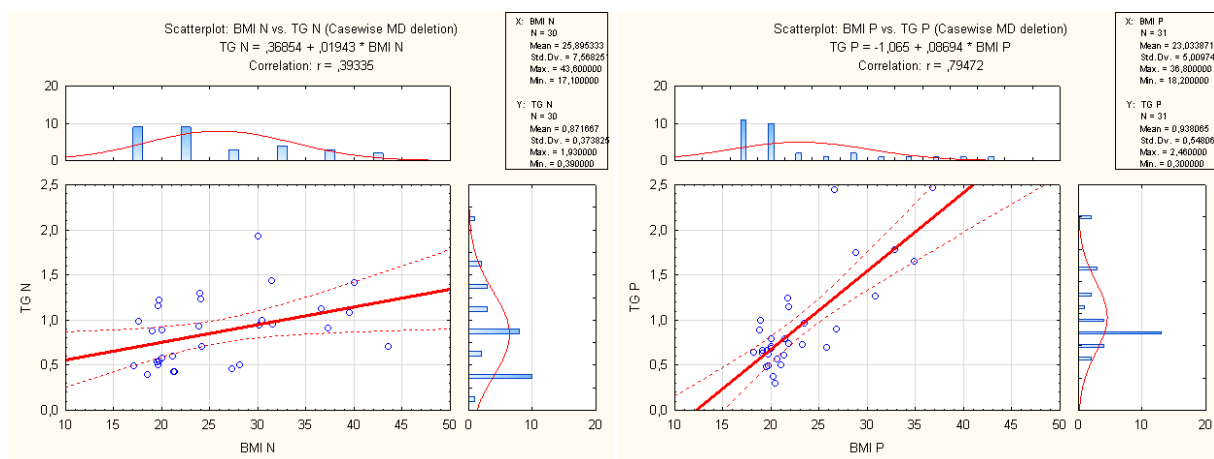
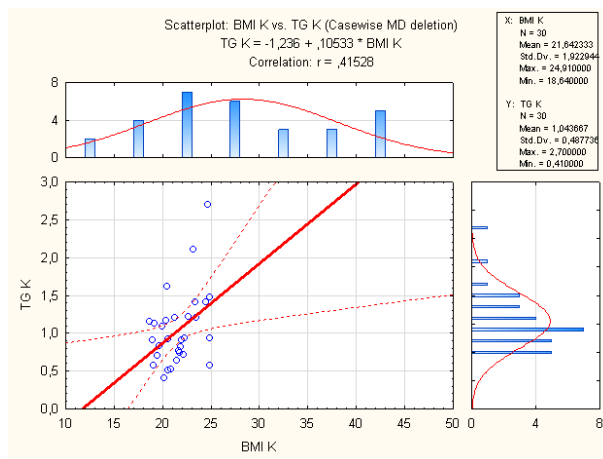
Iako vrednosti triglicerida nisu pokazale kvantitativno značajne razlike između ispitivanih podgrupa, korelacioni odnosi triglicerida sa BMI, ukupnim holesterolom i LDL holesterolom se značajano razlikuju po podgrupama.

Korelacija između BMI i triglicerida u PCOS grupi bez ftalata pokazuje slabu do umerenu vezu ova dva parametra, dok je u PCOS grupi sa ftalatima pozitivna korelacija BMI i triglicerida izrazito jaka.

Linearna regresija BMI i Triglicerida u Kontrolnoj ($r=+0.4152$) i PCO–negativnoj grupi ($r=+0.3933$) se ne menja signifikantno ($p=0.9306 < 0.05$), dok linearna regresija BMI i Triglicerida u Kontrolnoj grupi ($r=+0.4152$) se signifikantno ($p=0.0457 < 0.05$) menja u PCOS–pozitivnoj grupi ($r=+0.7942$).

Takođe, linearna regresija BMI i Triglicerida u PCOS–negativnoj grupi ($r=+0.3933$) se signifikantno ($p=0.0097 < 0.05$) menja u PCOS–pozitivnoj grupi ($r=+0.7942$).

Količnik slobodnog člana u jednačini linerne regresije u PCOS–pozitivnoj grupi (+0.0869) i PCOS–negativnoj grupi (+0.0194) daju vrednost povećanja “emisije” od $K=4.47$. To znači da će u PCOS pozitivnoj grupi ispitanice sa istim BMI kao u PCOS negativnoj grupi imati značajno veće vrednosti triglicerida (Slika 24).

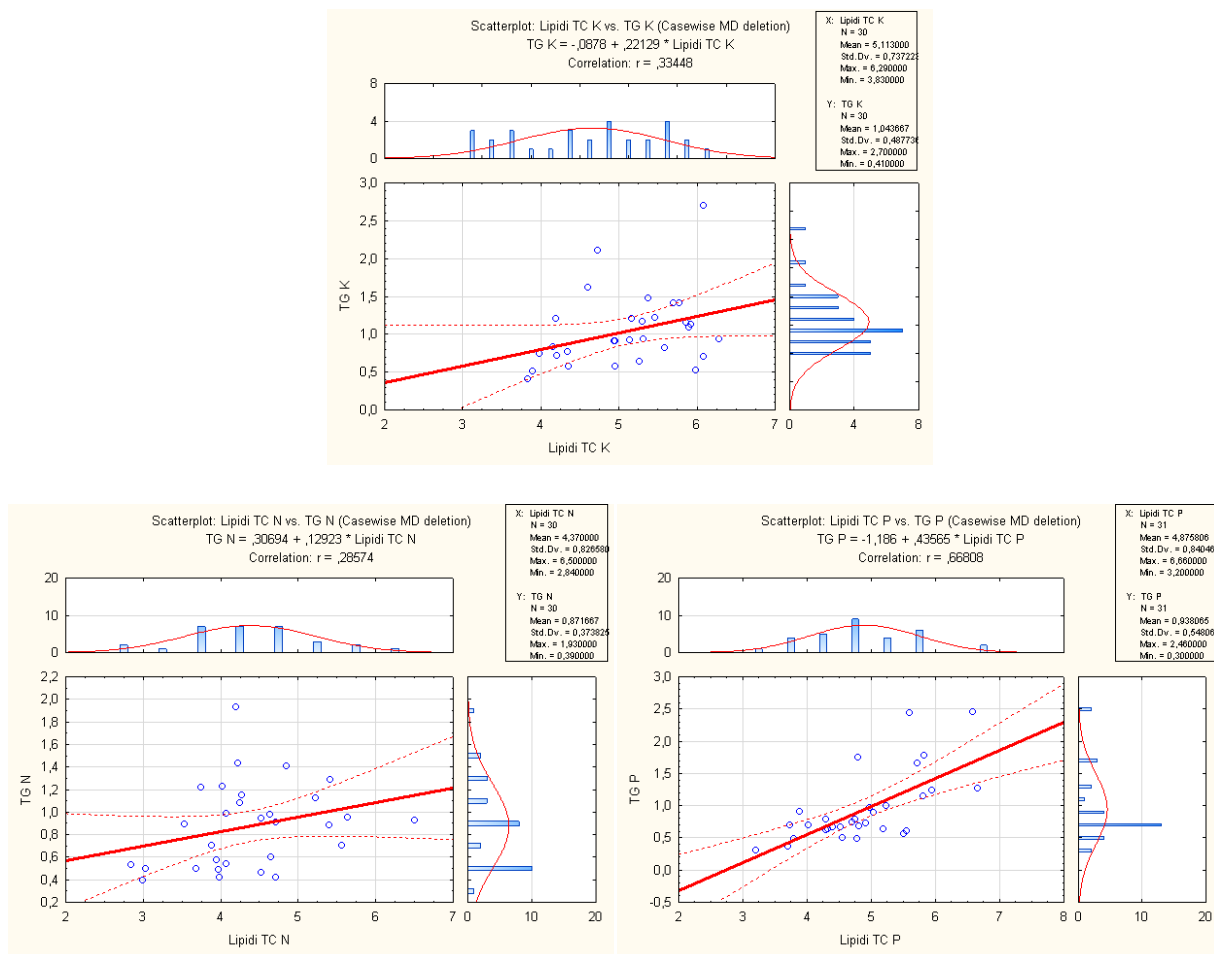


Slika 24. Korelacioni odnosi BMI i triglicerida u svim ispitivanim podgrupama

Kada posmatramo korelacione odnose ukupnog holesterola i triglicerida, takođe se verifikuju značajne razlike. Naime, linearna regresija ukupnog holesterola i triglicerida u kontrolnoj ($r=+0.3344$) i PCOS–negativnoj grupi ($r=+0.2857$) se ne menja signifikantno ($p=0.7248 < 0.05$).

Međutim, linearna regresija ukupnog holesterola i Triglicerida u Kontrolnoj ($r=+0.3344$) i PCOS–pozitivnoj grupi ($r=+0.6680$) se menja signifikantno ($p=0.0441 < 0.05$). Takođe, linearna regresija navedena dva parametra u PCOS–negativnoj grupi ($r=+0.2587$) se signifikantno ($p=0.0287 < 0.05$) menja u PCOS–pozitivnoj grupi ($r=+0.6680$).

Količnik slobodnog člana u jednačini linearne regresije u PCO–pozitivnoj grupi (+0.4356) PCO–negativnoj grupi (+0.1292) daje vrednost povećanja “emisije” od K=3.37, što znači da će PCOS ispitanice sa ftalatima u urinu, za iste vrednosti ukupnog holesterola imati značajno više vrednosti triglicerida (Slika 25).



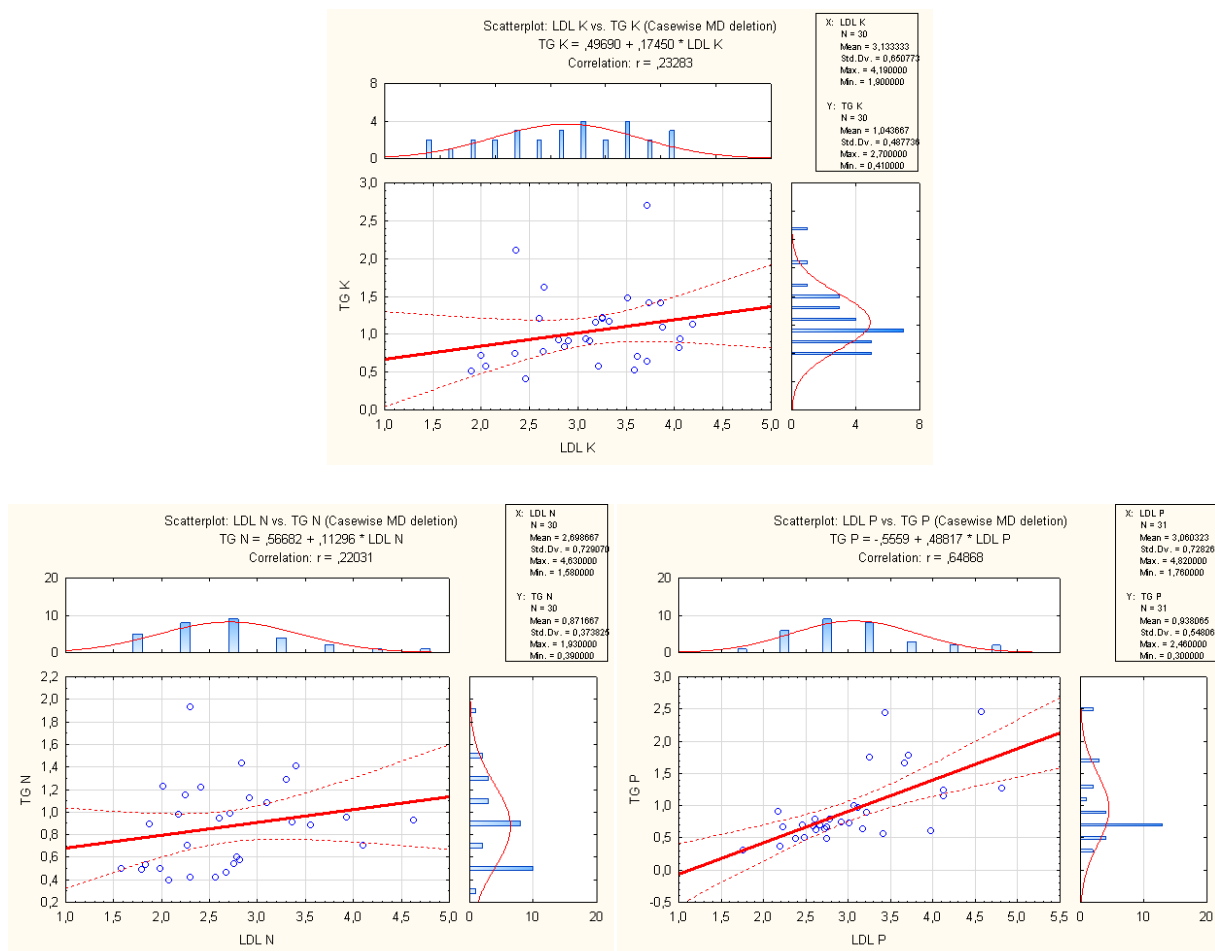
Slika 25. Korelacioni odnosi ukupnog holesterola i triglicerida u svim podgrupama

Slično prethodnim, i kod korelacije LDL sa trigliceridima dobijamo pozitivne korelacione odnose ova dva parametra, ali su oni statistički značajno različiti u PCOS grupi sa ftalatima.

Linearna regresija LDL i triglicerida u Kontrolnoj ($r=+0.2328$) PCOS –negativnoj grupi ($r=+0.2231$) se ne menja signifikantno ($p=0.9448>0.05$), dok linearna regresija LDL i triglicerida u kontrolnoj ($r=+0.2328$) se signifikantno ($p=0.0285<0.05$) menja u PCOS–pozitivnoj grupi ($r=+0.6486$). Takođe, linearna regresija LDL i triglicerida u PCOS negativnoj grupi ($r=+0.2231$) se signifikantno ($p=0.0262<0.05$) menja u PCOS pozitivnoj grupi ($r=+0.6486$).

Količnik slobodnog člana u jednačini linearne regresije u PCOS pozitivnoj grupi (+0.4887) PCO negativnoj grupi (+0.1129) daje vrednost povećanja “emisije” od $K=4.32$, što znači da će PCOS pozitivne ispitanice imati značajno veće vrednosti LDL za ispu vrednost triglicerida (slika 26).

Da PCOS pozitivne ispitanice imaju više vrednosti LDL holesterola pokazano je i kvantitativnom analizom (srednja vrednost u PCOS negativnoj od 2,6987 mmol/L raste u PCOS pozitivnoj na 3,0603 mmol/l).



Slika 26. Korelacioni odnosi LDL holesterola i triglicerida u svim ispitivanim podgrupama

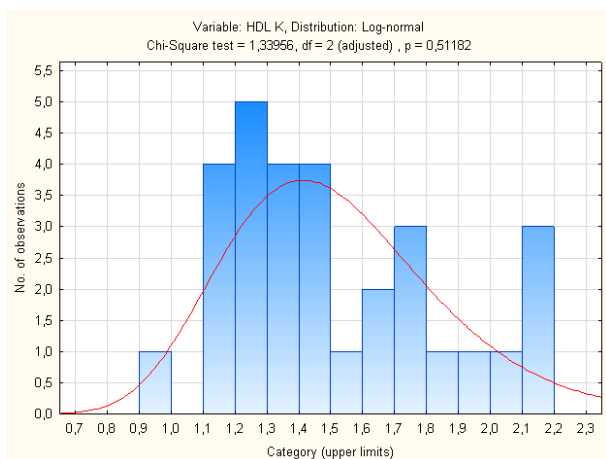
4.5.3. Analiza HDL-holesterola u ispitivanim podgrupama

Srednje vrednosti protektivnog holesterola su u referentnom opsegu za kontrolnu ($1,51 \pm 0,34 \text{ mmol/l}$) i PCOS grupu sa ftalatima ($1,39 \pm 0,30 \text{ mmol/l}$), dok PCOS grupa bez ftalata ima niže vrednosti ovog holesterola ($1,27 \pm 0,39 \text{ mmol/l}$). Primenom parametarskog t-testa na osnovu prisutnih raspodela vrednosti HDL-holesterola, utvrđeno je da postoji signifikantna razlika između srednjih vrednosti kontrolne i PCO–negativne grupe ($p=0.0138 < 0.05$), dok ova razlika nije verifikovana između kontrolne i PCO–pozitivne grupe ($p=0.1127 > 0.05$), kao ni PCO–negativne i PCO–pozitivne grupe ($p=0.2286 > 0.05$) (Tabela 19).

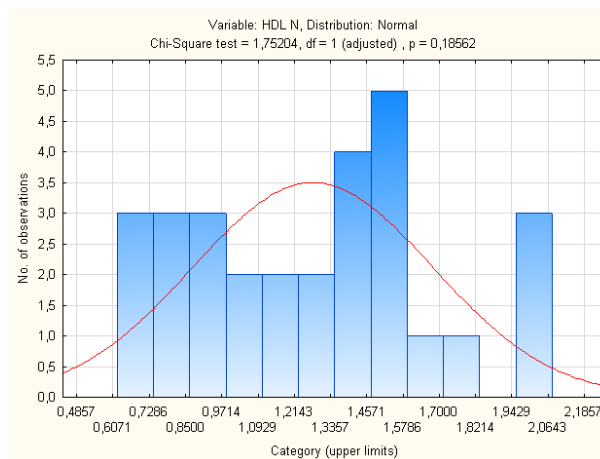
Tabela 19. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za HDL-holesterol kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	1,3865	0,3016	Log-normalna	0.2351
PCOS -	1,2773	0,39431	Normalna	0.1856
Kontrolna grupa	1,5190	0,3408	Log-normalna	0.5118

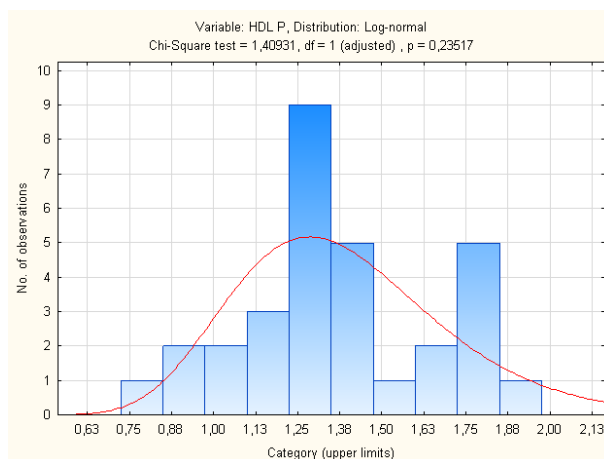
Slika 27. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa i prag značajnosti HDL holesterol kontrolne (a), PCOS negativne (b) i PCOS pozitivne podgrupe (c)



a



b



C

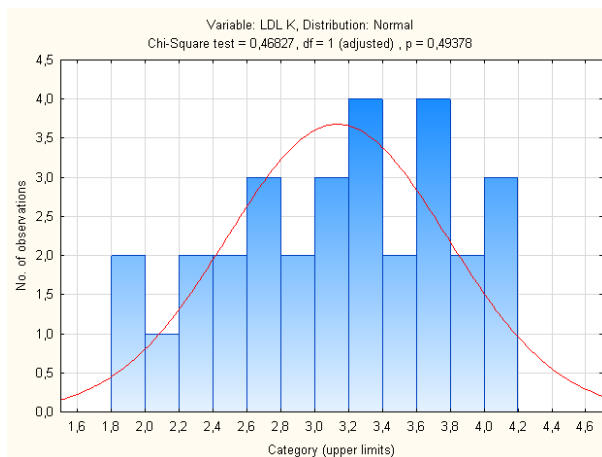
4.5.4. Analiza LDL-holesterola u ispitivanim podgrupama

Obzirom na poznatu vezu ukupnog holesterola i LDL holesterola, očekivano su srednje vrenosti PCOS negativne grupe najniže I iznose $2,69 \pm 0,72\text{mmol/l}$ i značajno se razlikuju ($p=0.0179<0.05$) od srednjih vrednosti kontrolne grupe $3,13 \pm 0,65\text{mmol/l}$. Primenjenim t-testom nije utvrđena značajna razlika ($p=0.5741>0.05$) između vrednosti LDL holesterola PCOS negativne I PCOS pozitivne grupe (srednja vrednost $3,06 \pm 0,73\text{mmol/l}$), kao ni između kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.6815>0.05$) (Tabela 20).

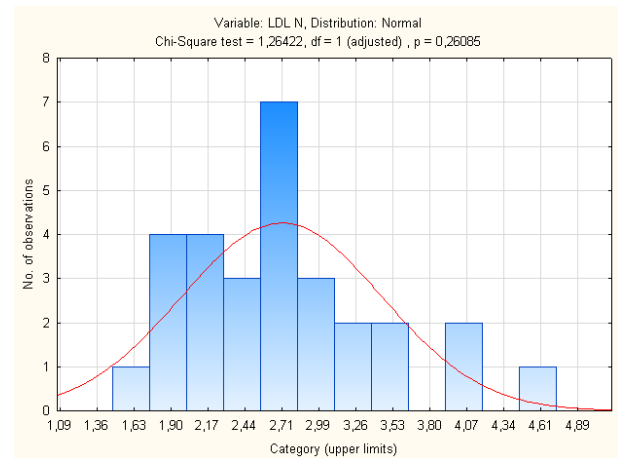
Tabela 20. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela I χ^2 verifikacija za LDL-holesterol kontrolne, PCOS pozitivne I PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	3,0603	0,7283	Log-normalna	0.5859
PCOS -	2,6987	0,72907	Normalna	0.2608
Kontrolna grupa	3,1333	0,6508	Normalna	0.4937

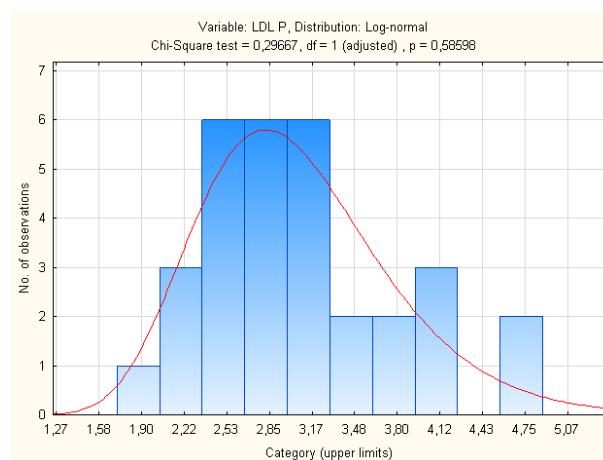
Slika 28. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti za LDL holesterol kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)



a



b



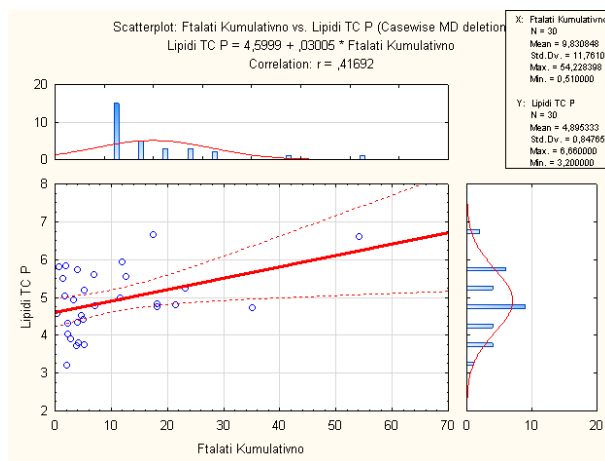
c

4.5.5. Analiza povezanosti ukupnih ftalatnih metabolita sa lipidima i lipoproteinima seruma

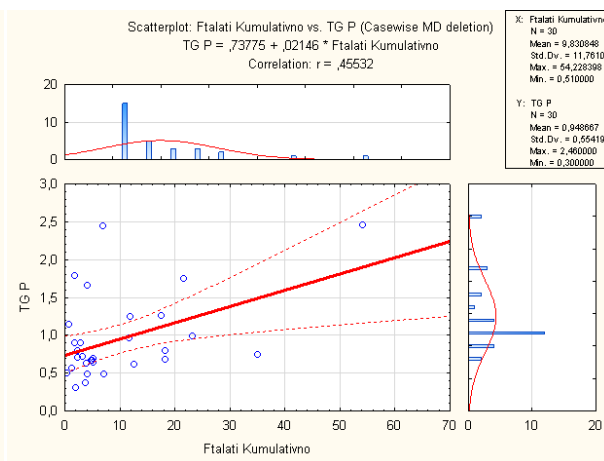
Pozitivna, statistički značajna korelacija je utvrđena između ukupne količine ftalata i ukupnog holesterola ($p=0,019<0,05$), LDL holesterola ($p=0,027<0,05$) i triglicerida ($p=0,010<0,05$). Nismo utvrdili statistički značajnu povezanost između koncentracije ukupnih ftalatnih metabolita i HDL holesterola, iako je ova korelacija bila negativna.

Tabela 21. Korelacije ukupnih ftalatih metabolita i svih određivanih parametara u PCOS pozitivnoj grupi

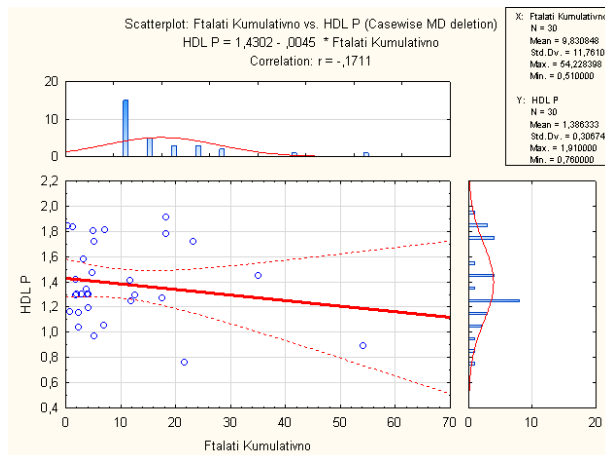
Ispitivani parametar	Ftalati ukupni	
	R	p
Uk. holesterol	0,4169	0,019
TG	0,4553	0,010
HDL	-0,1711	0,35
LDL	0,3965	0,027



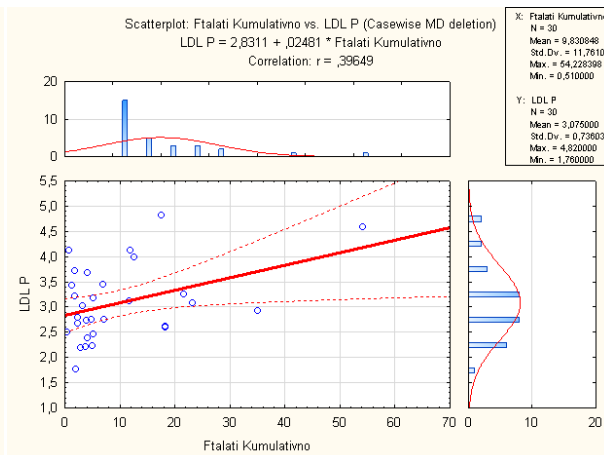
Slika 29 . Korelacija uk.holestrola i ukupnih ftalata



Slika 30 . Korelacija TG i ukupnih ftalata



Slika 31. Korelacija HDL i ukupnih ftalata



Slika 32 . Korelacija LDL i ukupnih ftalata

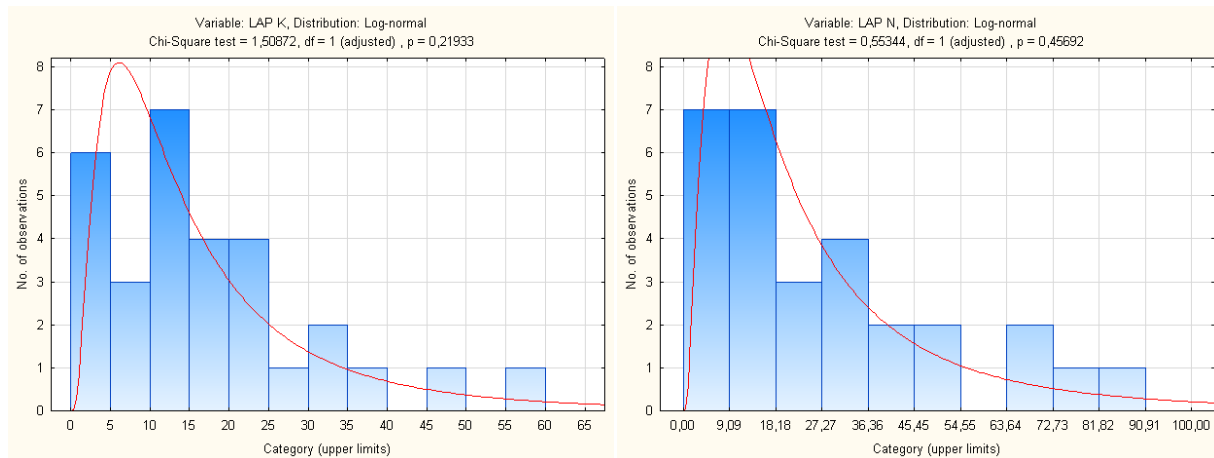
4.6. Analiza kardiometaboličkog rizika u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama

U cilju procene kardiometaboličkog rizika određivani su LAP i VAI indeksi. LAP indeks i je bio najviši u grupi ispitanica sa sindromom policističnih jajnika bez ftalata ($26,76 \pm 23,16$), a najniži u kontrolnoj grupi ($16,9 \pm 13,04$). Između srednjih vrednosti LAP indeksa u navedenim grupama, postojala je statistički značajna razlika ($p=0.0486 < 0.05$). Srednja vrednost LAP indeksa u PCOS grupi sa ftalatima je nešto niža u odnosu na PCOS negativnu grupu i iznosila je $25,92 \pm 33,67$. Primenom t testa nije utvrđena značajna razlika između kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.1758 > 0.05$), kao ni između PCOS podgrupa ($p=0.9186 > 0.05$) (Tabela 22).

Tabela 22. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za LAP index kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe

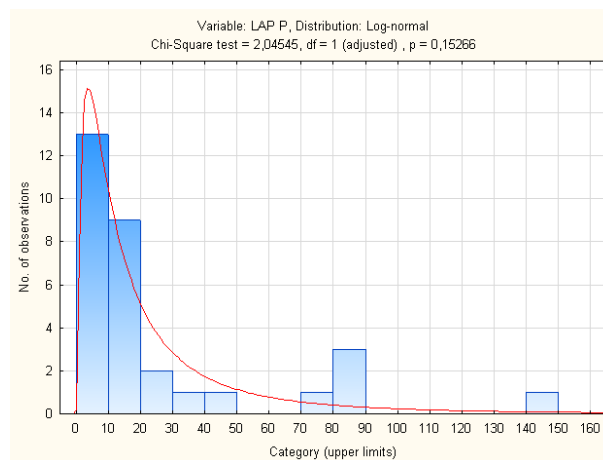
Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	25,9163	33,6715	Log-normalna	0.1526
PCOS -	26,6777	23,16252	Log-normalna	0.4569
Kontrolna grupa	16,9017	13,0376	Log-normalna	0.2193

Slika 33. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti za LAP indeks kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)



a

b



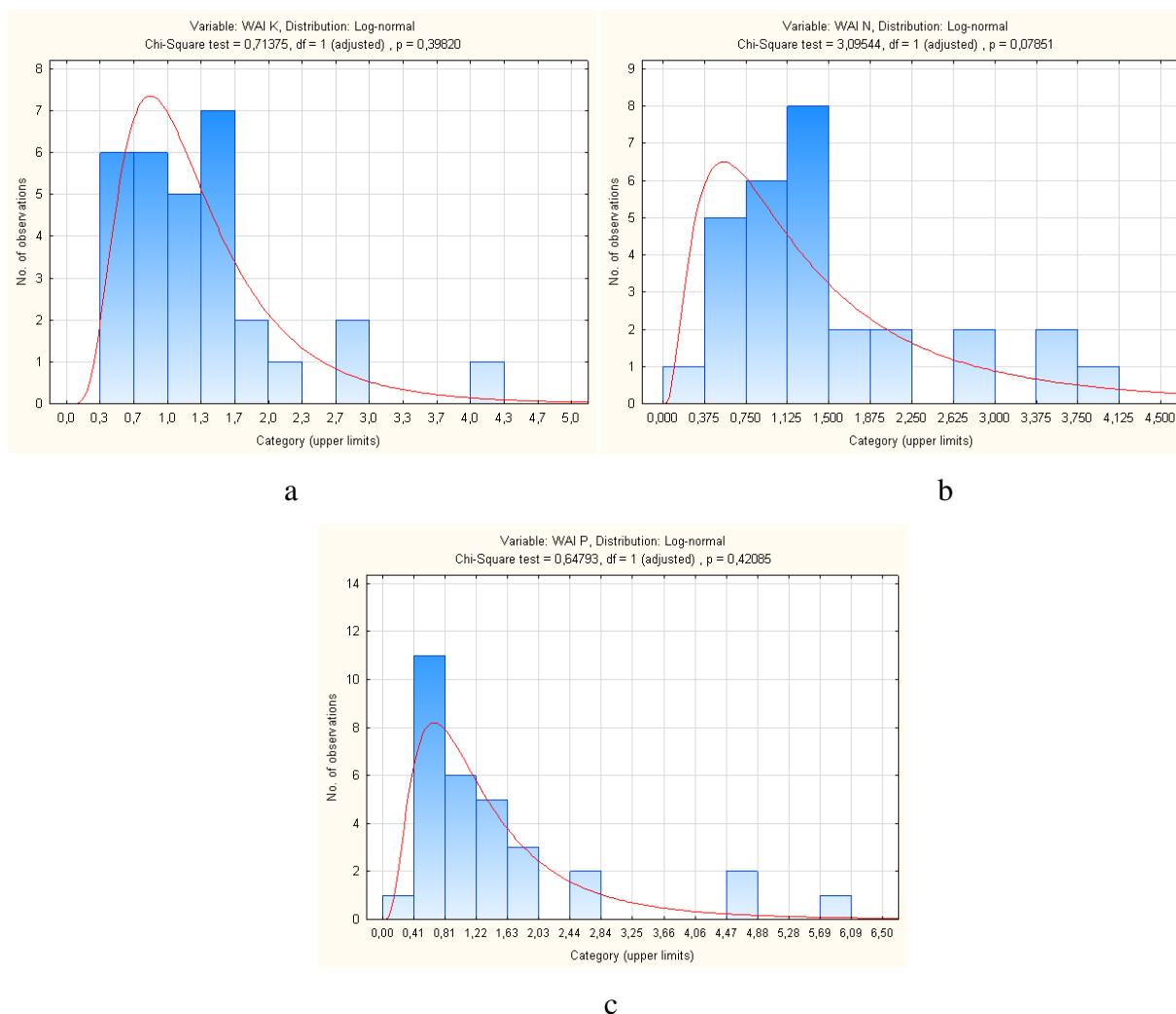
c

Srednje vrednosti VAI indeksa se nisu razlikovale u ispitivanim podgrupama. Primenjenim t-testom, nije utvrđena statistički značajna razlika u srednjim vrednostima između kontrolne i PCOS negativne grupe ($p=0.6168 > 0.05$), kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.9354 > 0.05$), kao ni PCOS negativne I PCOS pozitivne grupe ($p=0.9669 > 0.05$). Srednje vrednosti VAI indeksa prikazane su u Tabeli 23.

Tabela 23. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela I χ^2 verifikacija za WAI index kontrolne, PCOS pozitivne I PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	1,4671	1,3365	Log-normalna	0.4208
PCOS -	1,4426	0,97631	Log-normalna	0.0785
Kontrolna grupa	1,3254	0,8218	Log-normalna	0.3982

Slika 34. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti za VAI indeks kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)

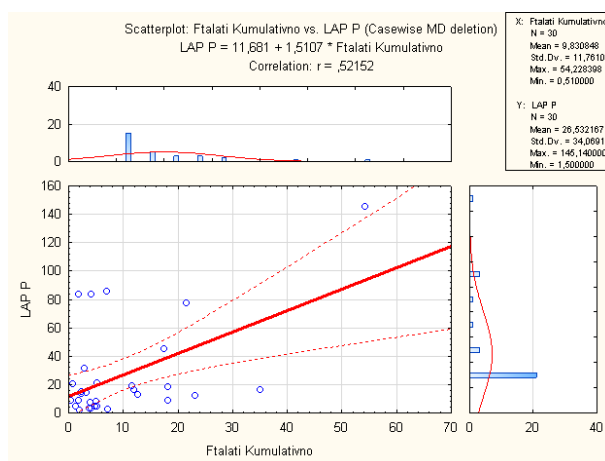


4.6.1. Analiza poveznosti ukupnih ftalatnih metabolita sa indeksima kardiometaboličkog rizika

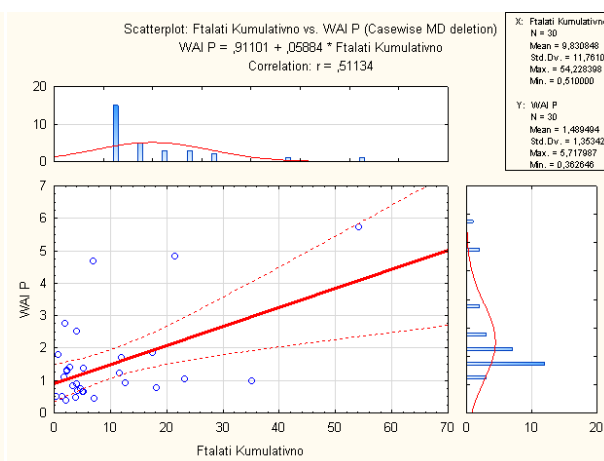
Jaka pozitivna korelacija, potvrđena je između ukupnih ftalatnih metabolita i oba parametra kardiometaboličkog rizika (LAP ($p=0,002<0,05$); VAI ($p=0,003<0,05$)) (Tabela 24).

Tabela 24. Korelacije ukupnih ftalatnih metabolita i svih određivanih parametara u PCOS pozitivnoj grupi

Ispitivani parametar	Ftalati ukupni	
	R	p
LAP	0,5215	0,002
VAI	0,5113	0,003



Slika 35. Korelacija LAP i ukupnih ftalata



Slika 36. Korelacija VAI i ukupnih ftalata

4.7. Analiza gonadotropnih i polnih hormona u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama

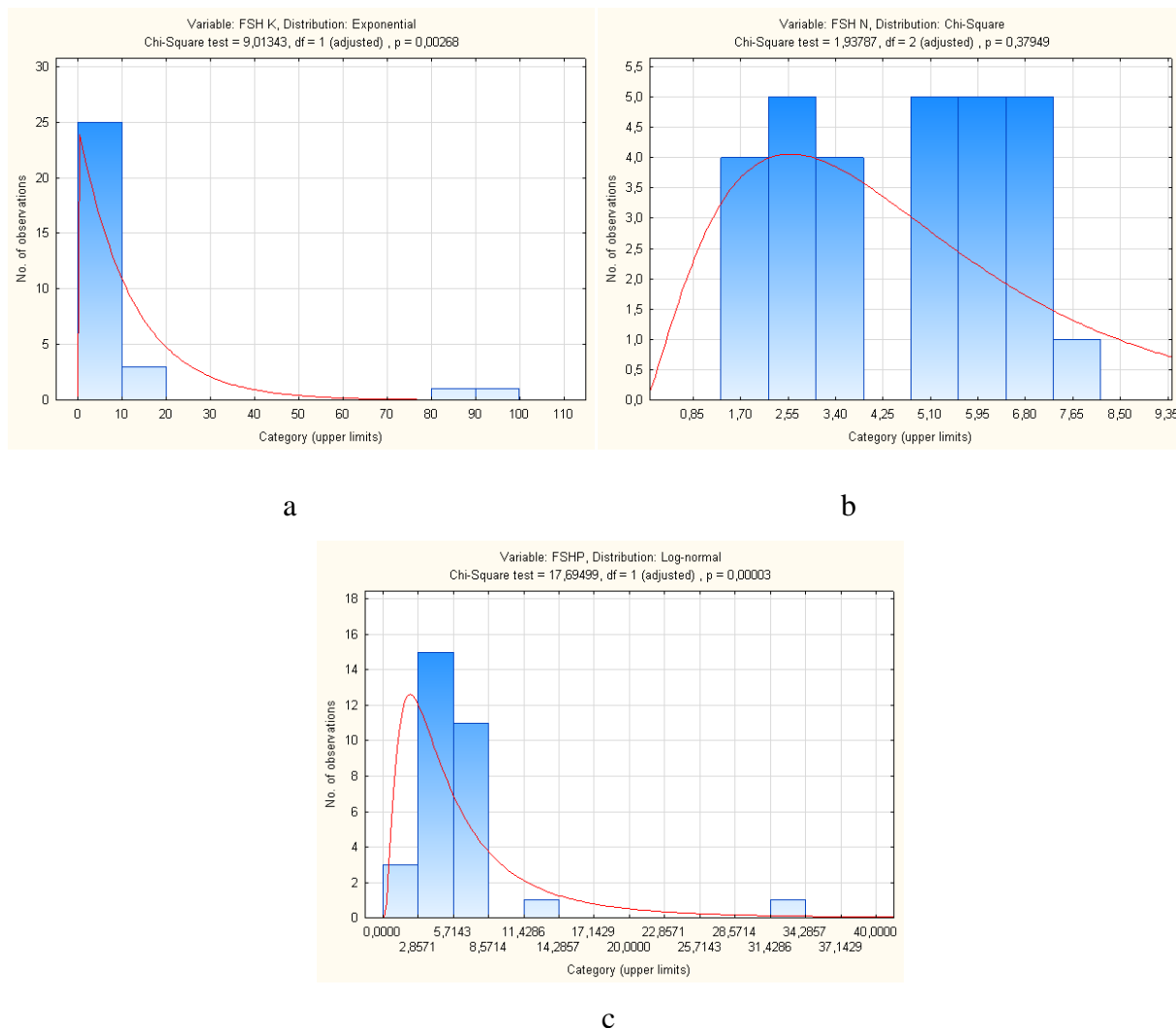
4.7.1. Analiza folikulostimulišućeg hormona u ispitivanim podgrupama

Vrednost folikulostimulišućeg hormona u grupi ispitanica sa sindromom policističnih jajnika su niže u odnosu na kontrolnu grupu. Srednja vrednost ovog hormona u PCOS grupi sa ftalatima je iznosila $6,09 \pm 5,57$ IU/l, u PCOS grupi bez ftalata $4,48 \pm 1,96$ IU/l, dok je u kontrolnoj grupi ova vrednost bila $12,13 \pm 22,35$ IU/l. Zbog različitih raspodela vrednosti FSH po grupama, primenom testa za poređenje jednakosti srednjih vrednosti nezavisnih skupova (bez obzira na raspodele) je ustanovljeno da postoji signifikantne razlike između kontrolne i PCOS negativne grupe ($p=0.0021 < 0.05$), kao i kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.0042 < 0.05$). Međutim, nije utvrđena značajna razlika između PCOS negativne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.1897 > 0.05$) (Tabela 25).

Tabela 25. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za FSH kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe.

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	6,0968	5,5711	Log-normalna	0.0003
PCOS -	4,4820	1,96273	Hi-kvadrat	0.3794
Kontrolna grupa	12,1293	22,3584	Eksponecijalna	0.0026

Slika 37. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa i prag značajnosti za FSH kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)



4.7.2. Analiza lutenizirajućeg hormona u ispitivanim podgrupama

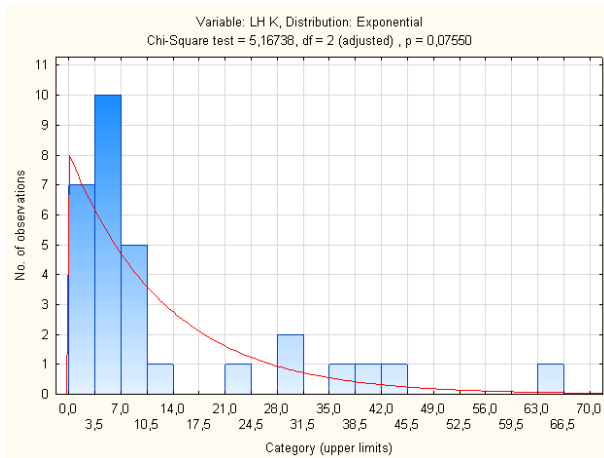
Primenom testa za poređenje jednakosti srednjih vrednosti nezavisnih skupova (bez obzira na raspodele) utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između vrednosti LH u ispitivanim podgrupama. Naime, između srednjih vrednosti LH kontrolne grupe $13,02 \pm 15,65$ IU/l I PCOS negativne grupe $8,94 \pm 7,04$ IU/L ne postoji statistički značajna razlika ($p=0.4166 > 0.05$). Nije verifikovana razlika ($p=0.8425 > 0.05$) ni između srednjih vrednosti

kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($13,71 \pm 15,57$ IU/l), kao ni između PCOS podgrupa ($p=0.4545>0.05$)(Tabela 26).

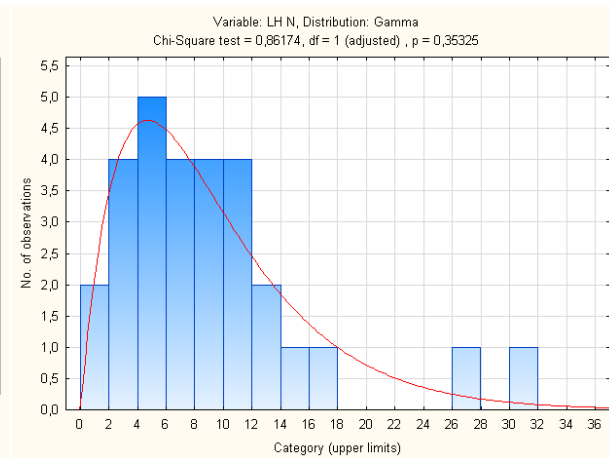
Tabela 26. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela I χ^2 verifikacija za LH kontrolne , PCOS pozitivne I PCOS negativne podgrupe.

Grupa	Srednja vrednost	Stand. devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	13,2710	15,4951	Log-normalna	0.3960
PCOS -	9,0963	6,90224	Gama	0.3532
Kontrolna grupa	13,0287	15,6538	Eksponecijalna	0.0755

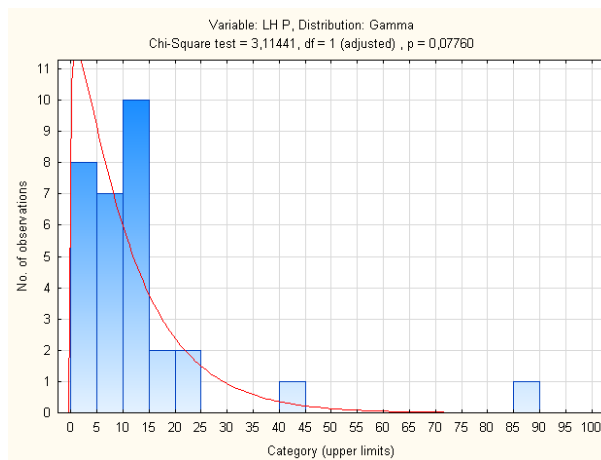
Slika 38. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti za LH kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)



a



b



c

Iako je poređenjem srednjih vrednosti samo dobijena značajna razlika u nivou FSH u PCOS podgrupama u odnosu na kontrolnu, odnos gonadotropnih hormona i njihovi korelacioni odnosi se signifikatno razlikuju u ispitivanim podgrupama.

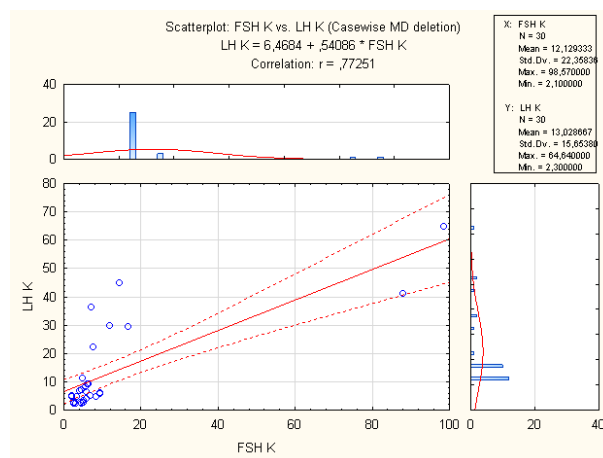
- Linearna regresija FSH i LH u Kontrolnoj ($r=+0.7725$) se signifikantno ($p=0.0299<0.05$) menja u PCOS negativnoj grupi ($r=+0.9485$).
- Linearna regresija FSH i LH u Kontrolnoj ($r=+0.7725$) se signifikantno ($p=0.0108<0.05$) menja u PCOS pozitivnoj grupi ($r=+0.9485$).
- Linearna regresija FSH i LH u PCOS negativnoj grupi ($r=+0.4649$) se signifikantno ($p=0.0000<0.05$) apsolutno menja u PCOS pozitivnoj grupi ($r=+0.9485$) (Slika 39).

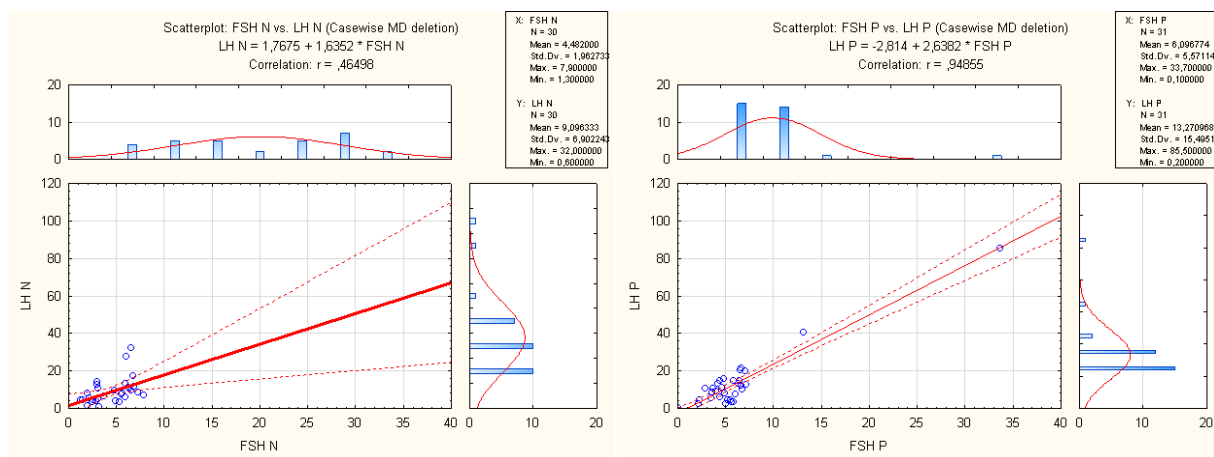
Analizom koeficijenta korelacije, vidimo da povećanje nivoa FSH dovodi do porasta LH u podgrupama.

U Kontrolnoj grupi koja ima signifikantno najveću srednju vrednost FSH u odnosu na obe PCOS grupe, porast LH po jediničnoj vrednosti FSH iznosi ≈ 0.55 .

U PCO-negativnoj grupi koja ima signifikantno manju vrednost FSH od kontrolne, porast LH po jediničnoj vrednosti FSH iznosi ≈ 1.63 .

U PCO-pozitivnoj grupi koja ima signifikantno manju vrednost FSH od kontrolne, porast LH po jediničnoj vrednosti FSH iznosi ≈ 2.64 .





Slika 39. Korelacioni odnosi FSH i LH u svim ispitivanim podgrupama

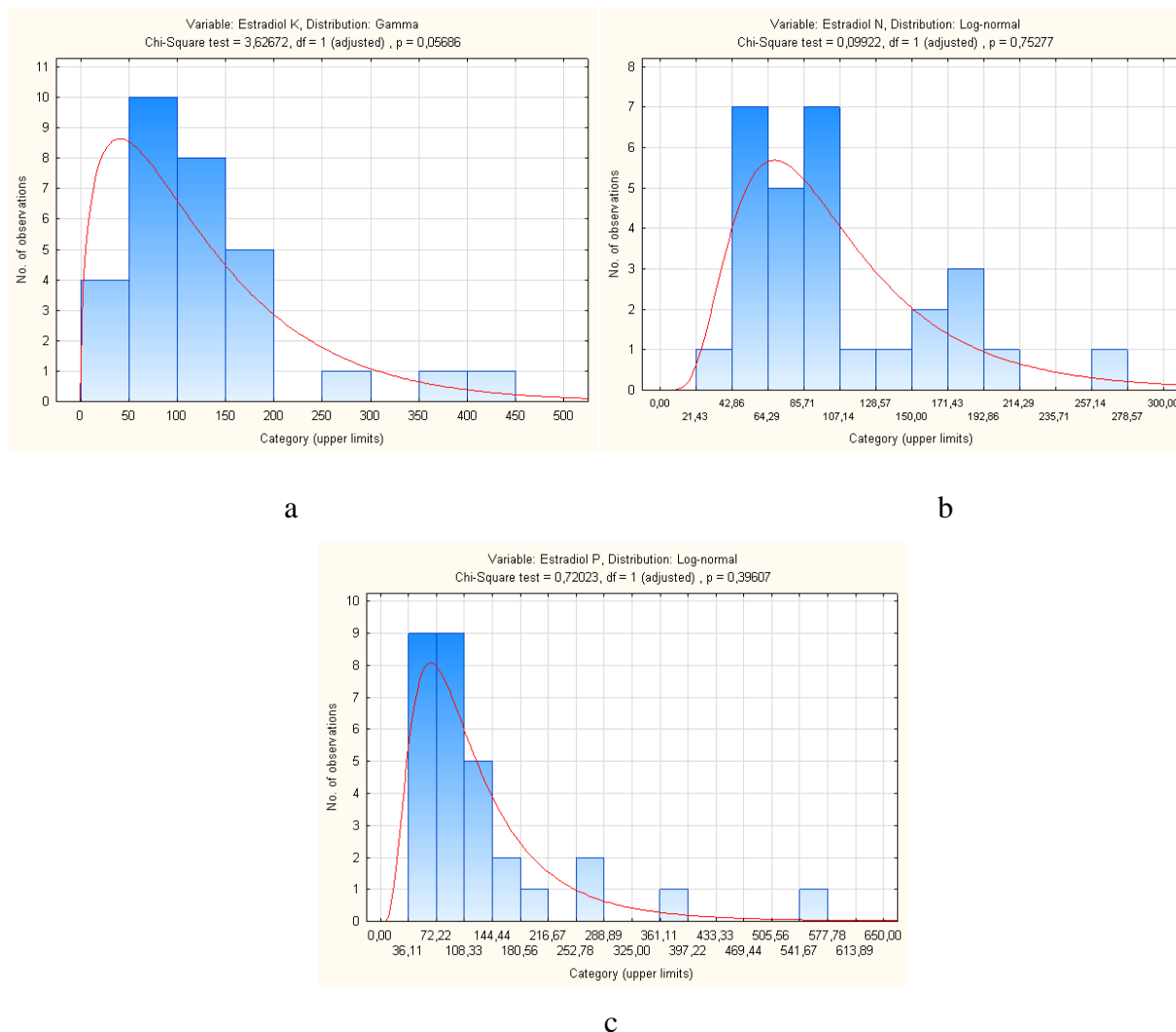
4.7.3. Analiza estradiola u ispitivanim podgrupama

Srednje vrednosti estradiola se nisu razlikovale u ispitivanim podgrupama. Primenjenim t-testom, nije utvrđena statistički značajna razlika u srednjim vrednostima između kontrolne i PCOS negativne grupe ($p=0.3554 > 0.05$), kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.9499 > 0.05$), kao ni PCOS negativne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.3547 > 0.05$). Srednje vrednosti estradiola prikazane su u Tabeli 28.

Tabela 28. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za estradiol kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe

Grupa	Srednje vrednosti	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	128,0157	110,6486	Gamma	0.0776
PCOS -	106,7350	58,03263	Log-normalna	0.7527
Kontrolna grupa	126,3053	99,3775	Gamma	0.0568

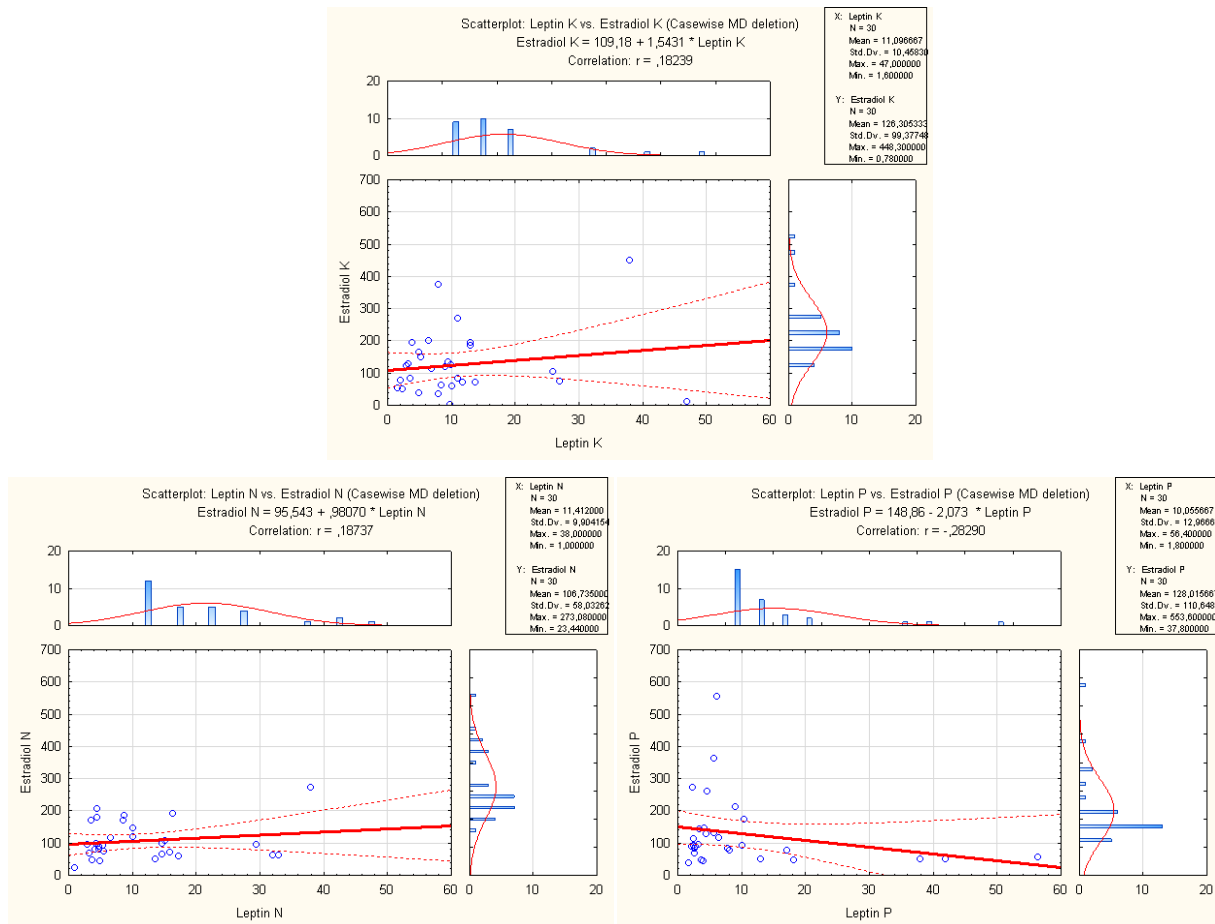
Slika 40. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa i prag značajnosti za estradiol kontrolne (a), PCOS negativne (b) i PCOS pozitivne podgrupe (c)



Iako nismo dobili statistički značajne razlike u kvantitativnim vrednostima estradiola između ispitivanih podgrupa, detaljnijom analizom korelacija između leptina i estradiola ustanovljeni su sledeći kvalitativni odnosi (Slika 41):

- Linearna regresija leptina i estradiola u kontrolnoj ($r=+0.18239$) se ne menja signifikantno ($p=0.4849>0.05$) u PCOS negativnoj grupi ($r=+0.18737$).
- Linearna regresija leptina i estradiola u kontrolnoj ($r=+0.18239$) se signifikantno ($p=0.0402<0.05$) menja u PCOS pozitivnoj grupi ($r=+0.28290$).

- Linearna regresija leptina i estradiola u PCOS negativnoj grupi ($r=+0.18737$) se signifikantno ($p=0.0435 < 0.05$) menja u PCOS pozitivnoj grupi ($r=+0.28290$).



Slika 41. Korelacioni odnosi estradiola i leptina u ispitiavnim podgrupama

Na slici 41. Prikazana je negativna korelacija između leptina i estradiola u PCOS pozitivnoj grupi koja je signifikatno različita u odnosu na pozitivnu korelaciju u PCOS negativnoj grupi.

4.7.4. Analiza testosterona u ispitivanim podgrupama

Shodno poređenjem vrednosti testosterona u celoj PCOS grupi u odnosu na kontrolnu, srednje vrednosti ovog hormona su značajno povišene u obe PCOS podgrupe.

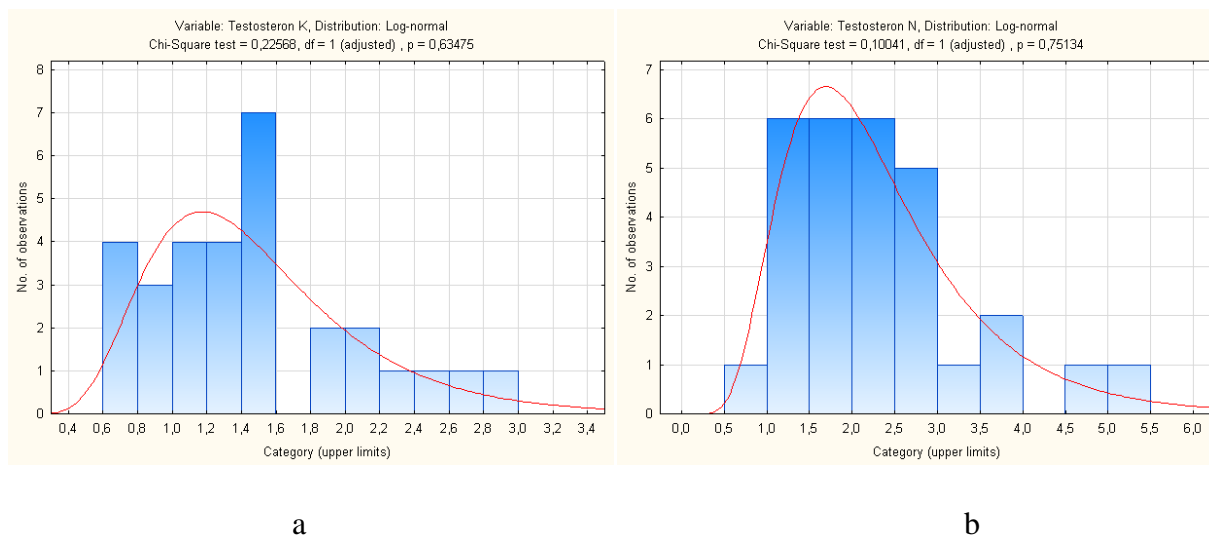
Prosečna vrednost testosterona u PCOS grupi bez ftalata je iznosila $2,27 \pm 1,09$ nmol/L i bila je značajno viša ($p=0.0010 < 0.05$) u odnosu na vrednost kontrolne grupe ($1,48 \pm 0,61$ nmol/L).

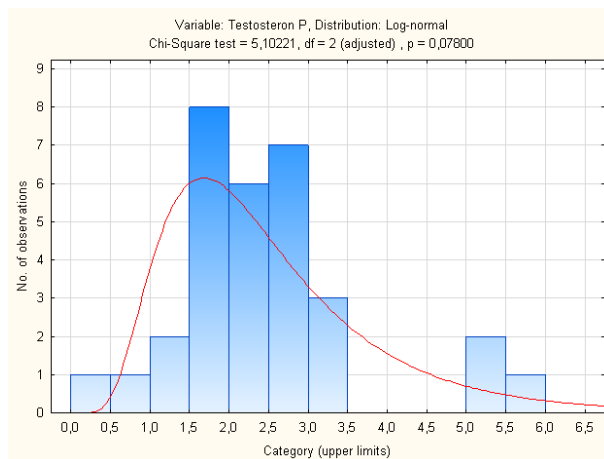
I grupa PCOS ispitnica sa ftalatima ($2,48 \pm 1,18$ nmol/L) je pokazala značajno više ($p=0.0001 < 0.05$) vrednosti testosterona u odnosu na kontrolnu grupu. Ipak, nije utvrđena razlika u vrednostima ukupnog testosterona između PCOS ispitnica sa i bez ftalatnih metabolita u urinu (Tabela 29).

Tabela 29. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela i χ^2 verifikacija za testostosterone kontrolne, PCOS pozitivne i PCOS negativne podgrupe.

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	2,4783	1,1871	Log-normalna	0.0780
PCOS -	2,2747	1,08957	Log-normalna	0.7513
Kontrolna grupa	1,4890	0,6133	Log-normalna	0.6347

Slika 42. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa i prag značajnosti testostosterone kontrolne (a), PCOS negativne (b) i PCOS pozitivne podgrupe (c)





C

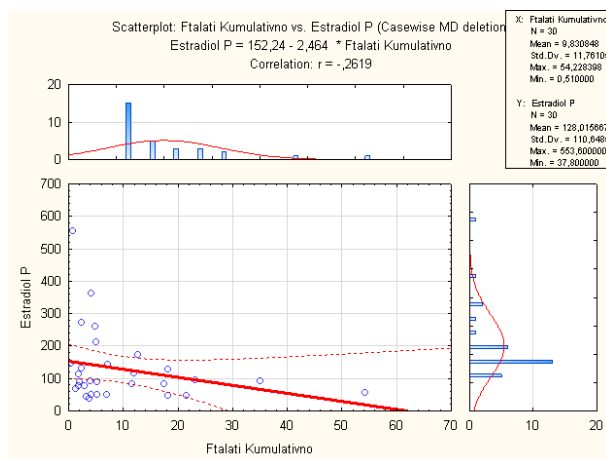
4.7.5. Analiza povezanosti ukupnih ftalatnih metabolita sa gonadotropinima i polnim hormonima

Korelacionom analizom povezanosti ukupnih ftalatnih metabolita i gonadotropina (FSH i LH), nije utvrđena statistički značajna veza. Takođe nije potvrđena povezanost ukupnih ftalanih metabolita i estradiola, iako je ova korelacija bila negativna.

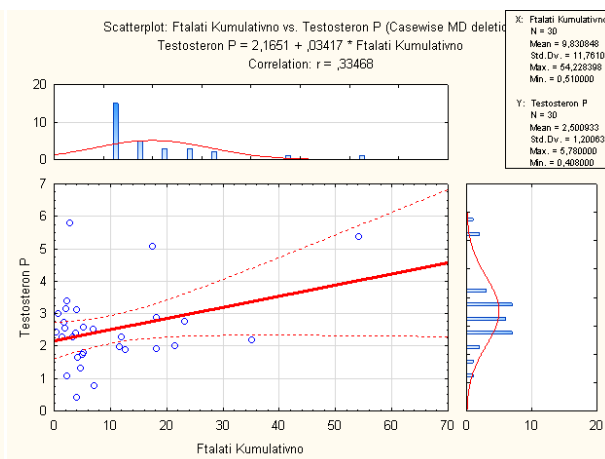
Pozitivna, statistički značajna korelacija utvrđena je između ukupnih ftalatnih metabolita i testosterona ($p=0,058 < 0,05$) (Tabela 30).

Tabela 30, Korelacije ukupnih ftalatnih metabolita I svih određivanih parametara u PCOS pozitivnoj podgrupi

Ispitivani parametar	Ftalati ukupni	
	R	p
FSH	-0,0598	0,75
LH	-0,0656	0,72
Estradiol	-0,2619	0,15
Testosteron	0,3347	0,058



Slika 43. Korelacija estradiola i ukupnih ftalata



Slika 44. Korelacija testosterona i ukupnih ftalata

4.8. Analiza leptina u ftalat pozitivnim i ftalat negativnim podgrupama

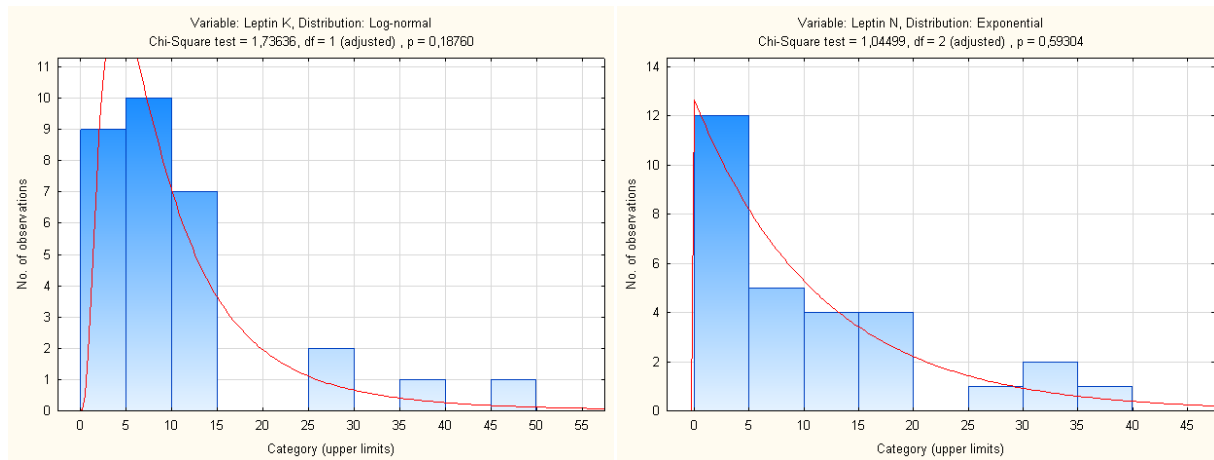
4.8.1. Analiza leptina u ispitivanim podgrupama

Srednje vrednosti leptina se nisu razlikovale u ispitivanim podgrupama. Zbog prisutnih raspodela vrednosti leptina u grupama, primenjen je neparametarski Signum test kojim nije utvrđena statistički značajna razlika u srednjim vrednostima između kontrolne i PCOS negativne grupe ($p=0.8551>0.05$), kontrolne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.2304>0.05$), kao ni PCOS negativne i PCOS pozitivne grupe ($p=0.2705>0.05$). Srednje vrednosti leptina po podgrupama prikazane su u Tabeli 31.

Tabela 31. Srednja vrednost, standardna devijacija, raspodela I χ^2 verifikacija za leptin kontrolne, PCOS pozitivne I PCOS negativne podgrupe

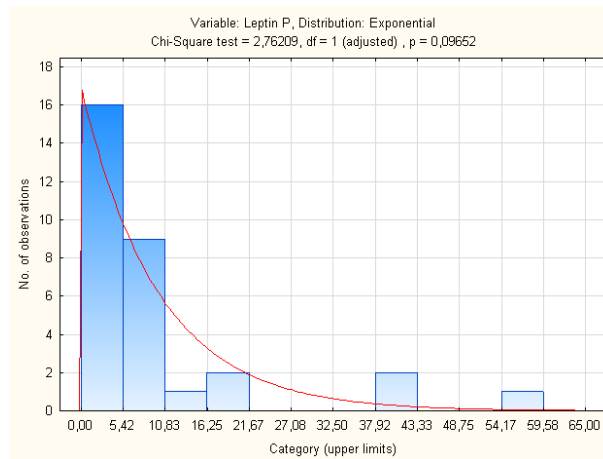
Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Raspodela	Verifikacija
PCOS +	9,8848	12,7842	Eksponecijalna	0.0960
PCOS -	11,4120	9,90415	Eksponecijalna	0.5930
Kontrolna grupa	11,0967	10,4583	Log-normalna	0.1876

Slika 45. Histogrami, pretpostavljene raspodele, vrednosti χ^2 testa I prag značajnosti leptina kontrolne (a), PCOS negativne (b) I PCOS pozitivne podgrupe (c)



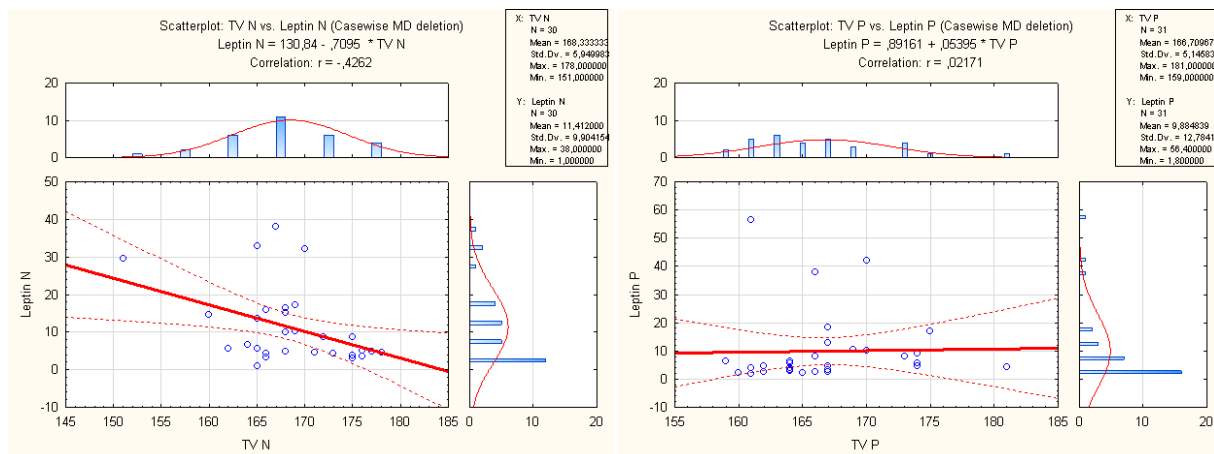
a

b



c

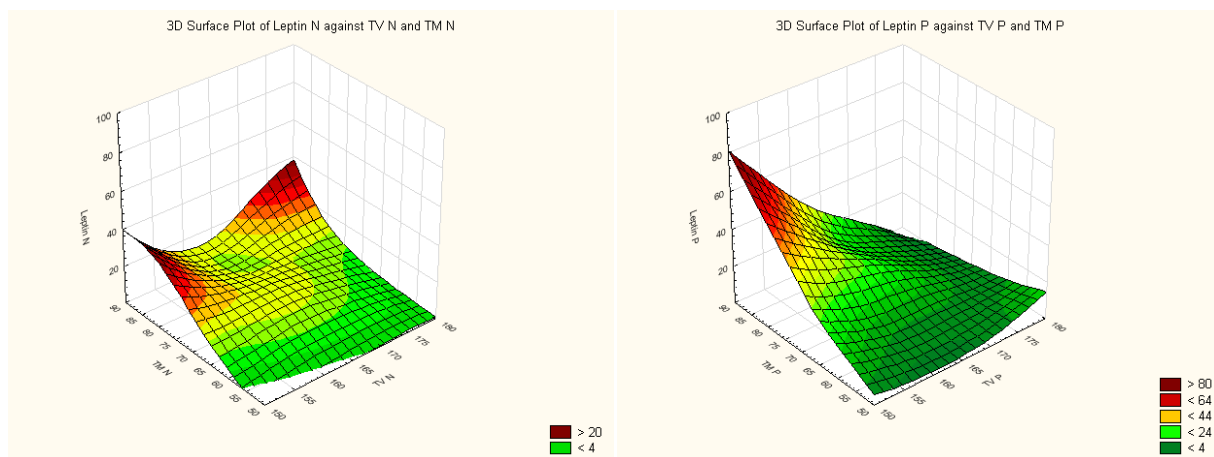
Iako kvantitativan odnos između ispitivanih podgrupa nije pokazao signifikantnih razlika u vrednostima leptina, deo korelacionih odnosa koji se odnosi na PCOS podgrupe je iskazao signifikantnu promenu u kvalitativnom odnosu. Vrednost koeficijenta korelacije u PCOS negativnoj grupi ($r=-0.4262$) se menja signifikantno ($p=0.0403<0.05$) u PCOS pozitivnoj grupi ($r=+0.0217$). Kontrolna grupa nema ovih razlika (Slika 46).



Slika 46. Korelacije telesne visine i leptina u svim PCOS podgrupama

Dalja analiza izdvaja posebno grupe ispitanica sa telesnom visinom manjom od 170 cm i telesnom masom većom od 70 kilograma.

Na slici 47. je data dvodimenzionalna funkcionalna zavisnosti leptina od nezavisnih promenljivih telesne visine i telesne mase.



Slika 47. Dvodimenzionalna funkcionalna zavisnosti leptina od nezavisnih promenljivih TV i TM u PCOS podgrupama

Grupa PCOS ispitanica bez ftalata sa telesnom visinom manjom od 170 cm i telesnom masom većom od 70 kilograma (ukupno 9 ispitanica) je imala vrednost leptina od 18.004 ng/ml,

dok su vrednosti leptina u ostatku PCOS negativne grupe bile 8.5867 ng/ml. Ova razlika je značajna i potvrđena je analizom varijanse ($p=0.0143<0.05$)

S druge strane, PCOS grupa sa ftalatima, telesnom visinom manjom od 170 cm i telesnom masom većom od 70 kilograma (ukupno 5 ispitanica) je imala vrednost leptina od 26.714 ng/ml, što je značajno više u odnosu na ostatak ispitanica ove grupe čije su vrednosti leptina iznosile 6.648 ng/ml. Ova razlika je potvrđena analizom varijanse ($p=0.00064<0.05$)

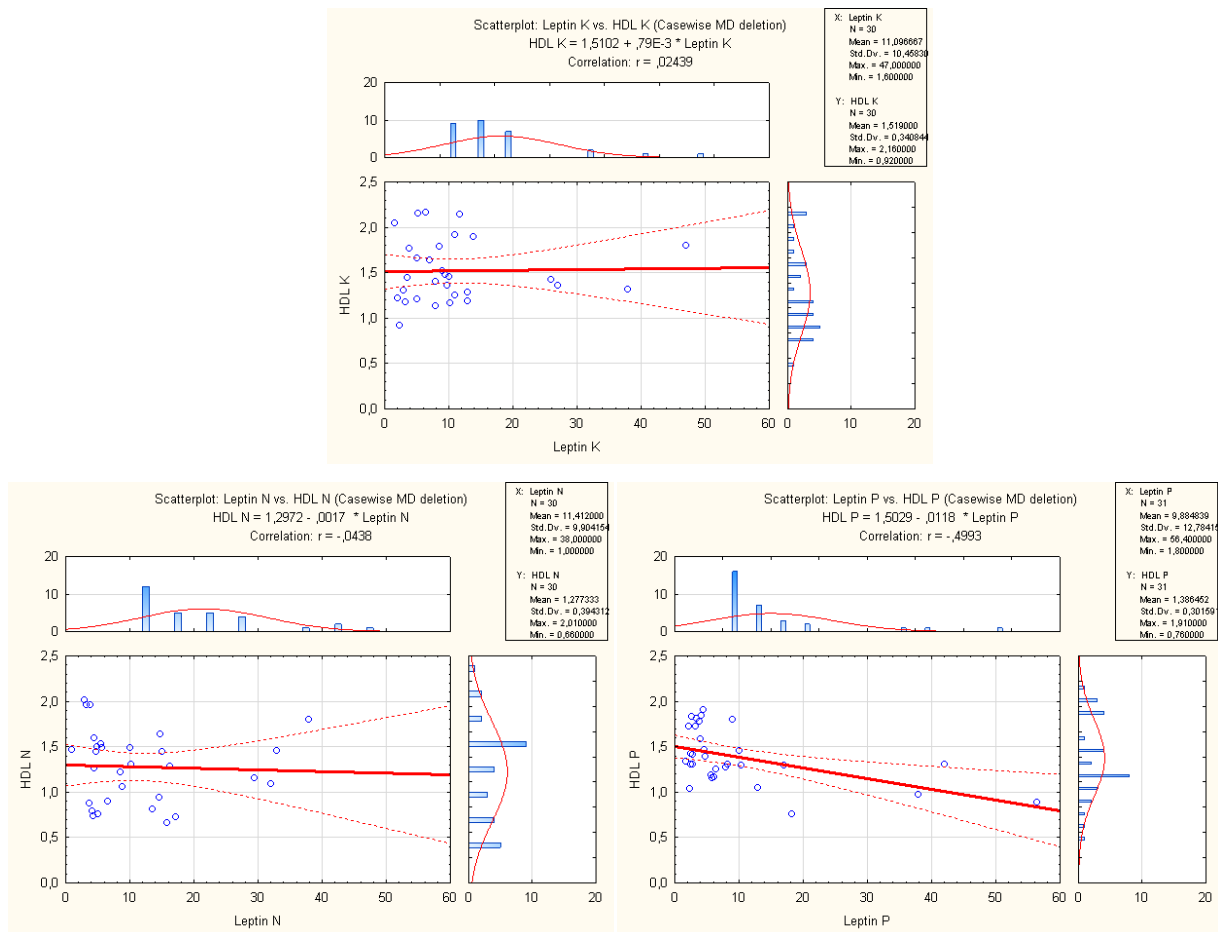
Proporcija leptina u grupi PCOS negativnoj je $P=8.586/18.004=0.4768$, a u grupi PCOS pozitivnoj je: $P=6.648/26.714=0.2488$. Na osnovu testa odnosa proporcije dva skupa, za $n=30$ u PCO negativnoj i $n=31$ u PCOS pozitivnoj ustanovljena je signifikantna razlika proporcija ($p=0.0325<0.05$) u PCOS grupama.

Ovom analizom se pokazano da ispitanice sa ftalatima, telesnom visinom manjom od 170 cm i telesnom masom većom od 70 kilograma imaju značajno veće vrednosti leptina u odnosu na ispitanice ispitih antropometrijskih karakteristika PCOS grupe bez ftalatnih metabolita.

Za vrednosti leptina je takođe potrebno naglasiti da je raspodeljen po eksponencijalnoj raspodelu u PCOS grupama. Eksponencijalna raspodela od svih kontinualnih raspodela ima najveću entropiju, što znači da je leptin senzitivn na uticaj veliki broj parametara i da je njegovu vrednost teško organizovati.

Iako kvantitativnom analizom nije utvrđena razlika između vrednosti leptina i HDL holesterola među grupama, analizom korelacionih odnosa ova dva parametra dobijeno je da (Slika 48):

- Linearna regresija HDL i leptina u kontrolnoj ($r=+0.02439$) i PCOS negativnoj grupi ($r=-0.0438$) se ne menja signifikantno ($p=0.4131>0.05$),
- Linearna regresija HDL i leptina u kontrolnoj ($r=+0.02439$) se signifikantno ($p=0.0219<0.05$) menja u PCOS pozitivnoj grupi ($r=-0.4993$),
- Linearna regresija HDL i leptina u PCOS negativnoj grupi ($r=-0.0438$) i PCOS pozitivnoj grupi ($r=-0.4993$) se menja signifikantno ($p=0.0356<0.05$).



Slika 48. Korelacije leptina i HDL holesterola u svim ispitivanim podgrupama

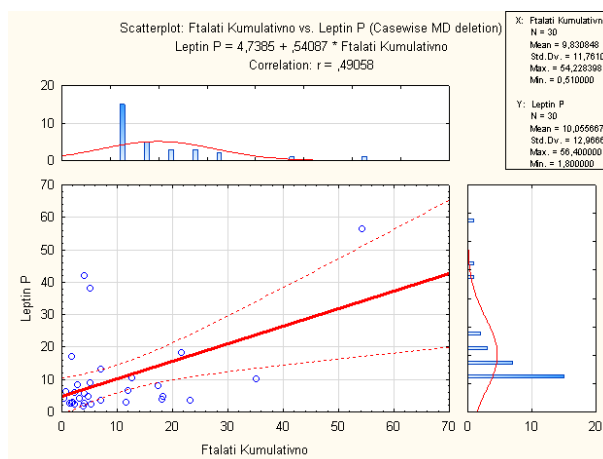
Kao što je prikazano u jednačinama linearne regresije, u kontrolnoj i PCOS negativnoj grupi vrednosti HDL holesterola se ne menjaju u odnosu na vrednosti leptina. Ovaj odnos je poremećen u PCOS grupi ispitanica sa ftaltnim metabolitima u urinu. Naime, sa povećanjem vrednosti leptina, dolazi do pada vrednosti HDL holesterola.

4.8.2. Analiza povezanosti ukupnih ftaltnih metabolita i leptina

Primenjenom korelacionom analizom utvrđena je pozitivna, statistički značajna korelacija između ukupnih ftaltnih metabolita sa vrednostima leptina ($p=0,005<0,05$) (Tabela 32).

Tabela 32. Korelacije ukupnih ftalatnih metabolita i leptina u PCOS pozitivnoj grupi

Ispitivani parametar	Ftalati ukupni	
	R	p
Leptin	0,4906	0,005



Slika 49. Korelacija leptina i ukupnih ftalata

4.9. Uticaj pojedinačnih ftalatnih metabolita na ispitivane parametre u PCOS pozitivnoj grupi

Rezultati analize varijanse uticaja jednog ftalatnog metabolita dati su u narednim tabelama. Za ftalate MPP i MCHP analiza varijanse se nije mogla uraditi zbog prisustva kod samo jedne ispitanice.

4.9.1. MMP i ispitivani parametri kod PCOS pozitivnih ispitanica

Srednja vrednost leptina u grupi ispitanica kod kojih je potvrđeno prisustvo samo MMP u urinu je iznosila 20,69 ng/ml i statistički je značajno viša ($p=0.0037<0.05$) u odnosu na grupu

PCOS pozitivnih ispitanica bez ovog ftalatnog metabolita (srednja vrednost leptinemije 6,12 ng/ml).

Takođe, u grupa ispitanica sa MMP ima niže vrednosti glikemije na tašte u odnosu na ostale ispitanice PCOS pozitivne grupe, sa graničnom statističkom značajnosti ($p=0,0947$) (Tabela 33).

Tabela 33. Srednje vrednosti ispitivanih parametara u pogrupama PCOS pozitivnih bez i sa MMP

Parametri	Bez MMP	Sa MMP	Prag značajnosti
Telesna masa	62.48	68.87	0.3077
BMI	22.36	24.96	0.2117
OS	77.45	83.25	0.3406
Glikemija	4.79	4.50	0.0947
IRI	11.29	13.57	0.4352
HOMA-IRI	2.44	2.88	0.5485
Lipidi	4.86	4.90	0.9191
Trigliceridi	0.91	0.99	0.7393
HDL	1.41	1.29	0.3414
LDL	3.02	3.15	0.6850
LAP	22.26	36.40	0.3144
VAI	1.38	1.71	0.5586
FSH	6.49	4.95	0.5084
LH	14.40	10.00	0.4976
Estradiol	128.64	126.31	0.9604
Testosteron	2.55	2.26	0.5591
Leptin	6.12	20.69	0.0037

Legenda: OS-obim struka; BMI- Body mass index; IRI_insulinemija; HOMA IRI- indeks insulinske rezistencije; TG-trigliceridi; HDL-lipoproteini velike gustine; LDL- lipoproteini male gustine; LAP- Lipid accumulation product index; VAI- Visceral adiposity index.

Analizom korelacionih odnosa MMP i svih ispitiavnih parametara dobijene su statistički značajne pozitivne korelacije ($p < 0,05$) između ovog ftalatnog metabolita i vrednosti glikemije ($p=0001 < 0,05$), insulinemije ($p=0,024 < 0,05$), ukupnog holesterola ($p=0,025 < 0,05$), triglicerida ($p=0,012 < 0,05$), LDL holesterola ($p=0,031 < 0,05$), testosterona ($p=0,008 < 0,05$) i indeksa kardiometaboličkog rizika (LAP: $p= 0,013 < 0,05$; VAI: $p= 0,0088 < 0,05$). Pozitvna korelacija između MMP i leptina je utvrđena, ali je bila srednjeg intenziteta i nije statistički značajna (Tabela 34).

Tabela 34. Korelacije MMP i svih ispitivanih parametara PCOS pozitivne grupe

	R ²	p
BMI	0,25	0,10
O struka	0,26	0,09
ŠUK	0,76	0,001
IRI	0,47	0,024
HOMA-IR	0,61	0,079
Ukupni holesterol	0,47	0,025
TG	0,56	0,012
HDL	-0,02	0,40
LDL	0,44	0,031
FSH	-0,13	0,77
LH	-0,11	0,66
Estradiol	-0,01	0,33
Testosteron	0,61	0,008
Leptin	0,25	0,10
LAP	0,55	0,013
VAI	0,70	0,0088

4.9.2. MEP i ispitivani parametri kod PCOS pozitivnih ispitanica

Srednje vrednosti gonadotropnih hormona se značajno razlikuju kod ispitanica sa verifikovanim MEP u urinu u odnosu na preostale PCOS pozitivne ispitanice. U grupi bez MEP srednja vrednost FSH je iznosila 5.18 IU/L a dok je grupa sa ftalatom MEP imala srednju vrednost FSH 10.860 IU/L, što je statistički značajno ($p=0.0070<0.05$). Vrednost LH u grupi bez MEP je iznosila 10.46 IU/L, dok je u grupi koja je imala MEP u urinu bila 27,88 IU/L, a ova razlika u srednjim vrednostima je takođe statistički značajna ($p=0.0187<0.05$).

Poređenjem srednjih vrednosti VAI indeksa, dobijene su značajno više vrednosti ($p=0.0345<0.05$) u grupi ispitanica MEP u odnosu na preostale PCOS pozitivne. U grupi bez MEP srednja vrednost VAI indeksa je iznosila 1.27 , dok su ispitanice sa MEP imale srednju vrednosti VAI indeksa 2.45 .

Takođe, MEP pozitivne ispitanice imaju više srednje vrednosti triglicerida sa graničnom statističkom značajnošću ($p=0,0945$).

Tabela 35. Srednje vrednosti ispitivanih parametara u pogrupama PCOS pozitivnih bez i sa MEP

Parametri	Bez MEP	Sa MEP	Prag značajnosti
Telesna masa	64.07	64.44	0.9615
BMI	23.01	23.16	0.9522
Obim struka	78.34	82.10	0.6058
ŠUK	4.70	4.80	0.6400
IRI	11.79	12.40	0.8548
HOMA-IRI	2.54	2.62	0.9309
Lipidi	4.85	4.97	0.7809
Trigliceridi	0.86	1.31	0.0945
HDL	1.40	1.29	0.4443
LDL	3.05	3.08	0.9332
LAP	23.37	39.12	0.3470
VAI	1.27	2.45	0.0070
FSH	5.18	10.86	0.0345
LH	10.46	27.88	0.0187
Estradiol	131.81	109.04	0.6822
Testosteron	2.5418	2.1480	0.5063
Leptin	9.89	9.85	0.9955

Legenda: OS-obim struka; BMI- Body mass index; IRI_insulinemija; HOMA IRI- indeks insulinske rezistencije; TG-trigliceridi; HDL-lipoproteini velike gustine; LDL- lipoproteini male gustine; LAP- Lipid accumulation product index; VAI- Visceral adiposity index.

Obzirom na mali broj ispitanica sa MEP i bez drugih ftalatnih metabolita u urinu, nije bilo moguće uraditi korelacionu analizu između mono-etil ftalata I svih ispitivanih parametara.

4.9.3. MBP i ispitivani parametri kod PCOS pozitivnih ispitanica

Poređenjem srednjih vrednosti ispitivanih parametara između grupa PCOS pozitivnih ispitanica sa MBP i onih sa ostalim ftalatnim metabolitima u urinu, nije dobijena statistički značajna razlika (Tabela 36).

Tabela 36. Srednje vrednosti ispitivanih parametara u pogrupama PCOS pozitivnih bez I sa MBP

Parametri	Bez MBP	Sa MBP	Prag značajnosti
Telesna masa	65.924	56.86	0.1799
BMI	23.62	20.58	0.1867
Obim struka	80.62	72.00	0.1975
ŠUK	4.75	4.55	0.2916
IRI	12.06	11.15	0.7795
HOMA-IRI	2.62	2.26	0.6601
Lipidi	4.89	4.79	0.8023
Ttrigliceridi	0.99	0.69	0.2293
HDL	1.36	1.49	0.3347
LDL	3.07	2.98	0.7879
LAP	29.74	9.84	0.1979
WAI	1.61	0.84	0.2121
FSH	6.38	4.91	0.5723
LH	14.36	8.73	0.4338
Estradiol	137.12	82.5	0.3222
Testosteron	2.49	2.39	0.8432
Leptin	11.20	4.40	0.2488

Legenda: OS-obim struka; BMI- Body mass index; IRI_insulinemija; HOMA IRI- indeks insulinske rezistencije; TG-trigliceridi; HDL-lipoproteini velike gustine; LDL- lipoproteini male gustine; LAP- Lipid accumulation product index; VAI- Visceral adiposity index.

Korelacionom analizom nije dobijena značajna veza između MBP i ispitivanih parametara.

4.9.4. MEHP i ispitivani parametri kod PCOS pozitivnih ispitanica

Poređenjem srednjih vrednosti ispitivanih parametara u grupi ispitanica sa MEHP i preostalih PCOS pozitivnih, dobijena je statistički značajno veća vrednost glikemije ($p=0.0301<0.05$). U grupi bez MHEP srednja vrednost ŠUK-a je bila 4.60 mmol/L , dok su ispitanice sa MEHP imale vrednost glikemije 4.95 mmol/L (Tabela 37).

Tabela 37. Srednje vrednosti ispitivanih parametara u pogrupama PCOS pozitivnih bez i sa MEHP

Parametri	Bez MHEP	Sa MHEP	Prag značajnosti
Telesna masa	63.33	65.80	0.6734
BMI	23.06	22.97	0.9650
Obim struka	78.81	79.10	0.9696
ŠUK	4.60	4.95	0.0301
IRI	12.21	11.18	0.7051
HOMA- IRI	2.57	2.53	0.9520
Lipidi	4.77	5.09	0.3202
Trigliceridi	0.95	0.89	0.7895
HDL	1.32	1.50	0.1267
LDL	3.00	3.18	0.5370
LAP	27.31	22.97	0.7433
WAI	1.59	1.1918	0.4381
FSH	6.14	5.99	0.9428
LH	12.86	14.12	0.8375
Estradiol	120.04	143.96	0.5858
Testosteron	2.34	2.75	0.3796
Leptin	11.68	6.09	0.2621

Legenda: OS-obim struka; BMI- Body mass index; IRI_insulinemija; HOMA IRI- indeks insulinske rezistencije; TG-trigliceridi; HDL-lipoproteini velike gustine; LDL- lipoproteini male gustine; LAP- Lipid accumulation product index; VAI- Visceral adiposity index.

Analizom korelacionih odnosa MEHP, nije utvrđena povezanost ovog ftalatnog metabolita sa ispitivanim parametrima kod ispitiavnica sa sindromom policističnih jajnika.

Multipla analiza varijanse (uticaj istovremenog dejstva više ftalata) nije mogla da se primeni zbog malog broja ispitanica kod kojih je pronađeni više tipova ftalatnih metabolita.

5. DISKUSIJA

Eksplozivni napredak hemijske industrije nakon Drugog Svetskog rata, doveo je do razvoja i porasta proizvodnje plastike za 6-12% u odnosu na 1940.godinu. Preko 80000 hemikalija se trenutno koristi, a približno 1500 novih se proizvede svake godine. Od njih, u 870 je verifikovano prisustvo endokrinih disruptora, iako mnoge nisu podvrgnute ovom ispitivanju (69).

Ovaj značajan napredak industrijalizacije i tehnologije ima veliki uticaj na životnu sredinu na način koji je jedinstven u ljudskoj istoriji. Proizvodnja sintetskih i biomedicinskih supstanci ima sve veće destruktivne posledice na naš ekosistem i negativan efekat na zdravlje svih živih bića. Skorašnje studije naglašavaju da je oko 40% smrtnosti (62 miliona godišnje) povezano sa ekspozicijom hemijski zagađujućim materijama. Najzabrinjavajuće od svih supstance koje su klasifikovane kao endokrini disruptori zbog svoje sposobnosti da menjaju produkciju, sekreciju, transport, metabolizam, delovanje i ekskreciju hormona sintetisanih u organizmu. Ovaj štetan efekat EDCs su potvrdile epidemiološke studije koje su pokazale da postoji korelacija između ekspozicije EDCs i određenih patofizioloških stanja u ljudskom organizmu, kao što je gojaznost, smanjena fertilitet i imunološka disfunkcija (70).

Iako je sindrom policističnih jajnika zastupljen u 5-10% žena u reproduktivnom periodu, tačan uzrok njegovog nastanka je i dalje nepoznat. Istraživanja poslednjih godina ukazuju na moguće genetske, epigenetske, endokrine, metaboličke, ali i faktore spoljašnje sredine koji dovode do razvoja ovog kompleksnog poremećaja. PCOS – like simptomi su prvi put dokumentovani 1700-tih godina, mnogo pre razvoja moderene hemijske industrije, tako da EDCs nisu primarni uzrok nastanka PCOS. Ali, veoma je verovatno da EDCs učestvuju u etiologiji zajedno sa drugim faktorima ili menjaju prezentaciju ovog heterogenog poremećaja (69).

5.1. Opšte karakteristike ispitanika

U ispitivanju je učestvovala 61 ispitanica, kao ispitivana grupa i kod njih je postavljena dijagnoza sindroma policističnih jajnika na osnovu Roterdamskih kriteriuma. Kontrolnu grupu, je činilo 30 zdravih žena (bez akutnih i hroničnih komplikacija) bez prisustva fetalnih

metabolita u urinu. Ispitivana grupa je podeljena na dve podgrupe na osnovu prisustva ftalatnih metabolita u urinu (PCOS pozitivna i PCOS negativna). Prosečna starost ispitivane grupe iznosila je 26 ± 5 godina, dok je prosečna starost kontrolne grupe iznosila $36, 23 \pm 7,8$ godina. Kontrolna grupa je signifikantno starija u odnosu na ispitivanu grupu, ali ova razlika nije imala uticaj na dalje istraživanje, obzirom da se obe grupe ispitanica nalaze u reproduktivnom periodu, te se njihov hormonski status može porediti.

5.2. Metabolički poremećaji i PCOS

Obzirom da sindrom policističnih jajnika karakteriše izuzetna heterogenost, poređenjem antropometrijskih i biohemijskih parametara između grupa, utvrđene su statistički očekivane razlike.

5.2.1. Antropometrijski parametri i PCOS

Indeks telesne uhranjenosti i obim struka su glavni markeri gojaznosti, naročito visceralne gojaznosti, koji se koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi. U zavisnosti od etničke pripadnosti, parametri za BMI se razlikuju, ali i vrednosti obima struka. Poznato je da je centralna gojaznost čiji je prediktor obim struka, jedna od glavnih karika metaboličkog sindroma, a da žene sa sindromom policističnih jajnika imaju veću predispoziciju za njegov razvoj u odnosu na zdrave žene. Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da je 50-60% žena sa PCOS gojazno.

Prema Nacionalnom vodiču za lečenje gojaznosti R.Srbije, gde je za postavljanje dijagnoze predgojaznosti/gojaznosti potreban $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$, naše PCOS ispitanice sa prosečnim vrednostima indeksa telesne uhranjenosti od $24,45 \text{ kg/m}^2$ spadaju u grupu normalno uhranjenih. Istraživanja rađena u drugim evropskim zemljama na ženama sa sindromom policističnih jajnika, dobila su sledeće rezultate: $BMI = 25 \text{ kg/m}^2$ u Engleskoj (71), 28 kg/m^2 u Finskoj (72), 31 kg/m^2 u Nemačkoj (73) i 29 kg/m^2 u Italiji (74). U poređenju sa ovim vrednostima, multicentrične studije rađene u 22 grada u SAD, dobile su vrednosti BMI u rasponu od 35 do 38 kg/m^2 . Da je prevalenca gojaznosti kod PCOS bolesnica znatno veća u SAD potvrđuju i podaci drugi studija,

a razlog za ovakav broj gojaznih najverovanije leži u činjenici da je prevalenca gojaznosti u SAD značajno veća i da su navike u ishrani, a posebno vrsta hrane obesogena.

S druge strane, rizik za razvoj PCOS je mnogo veći kod gojaznih žena. U studiji 675 žena, odabranih metodom slučajnog izbora, Azziz i saradnika (75) su utvrdili prisustvo PCOS kod 8,2% pothranjenih, 9,8% normalno uhranjenih, 9,9% predgojaznih i 9% gojaznih osoba. Prevalenca stope PCOS iznosi 12,4% kod žena sa BMI 35 - 40 kg/m², dok je 11,5% kod žena kod kojih je BMI > 40 kg/m², što je statistički neznačajno. Srednje vrednosti BMI kod osoba sa PCOS praćene u 15-to godišnjem periodu pokazuju rapidni porast, ali su u korelaciji sa povećanjem prevalencije gojaznosti u opštoj populaciji (76).

Iako su naši rezultati pokazali da grupa ispitanica sa sindromom policističnih jajnika ima srednje vrednosti BMI i OS, koji pripadaju normalno uhranjenim osobama, vrednosti standardne devijacije nam ukazuju na raznolikost u našoj grupi. Kada posmatramo celu grupu PCOS ispitanica, 6,6 % je bilo pothranjeno, 60 % normalno uhranjeno, 10% predgojazno, 20 % gojazno, a 3,3 % ekstremno gojazno.

Najveći procenat ovih ispitanica sa povećanom telesnom masom i obimom struka je pripadalo grupi bez ftalata. U poređenju sa kontrolnom grupom zdravih žena, dobijena je statistički značajna razlika, kako u vrednostima telesne mase i BMI, tako i u vrednostima obima struka poređenjem cele PCOS grupe i kontrole.

Da postoji značajna razlika u ovim parametrima između žena sa PCOS i zdrave populacije, pokazuju i drugi autori. Prospektivna studija rađena na grčkoj populaciji, pokazala je signifikatno više vrednosti BMI u PCOS grupi, što je bilo udruženo sa povišenim vrednostima glikemije na tašte, trigliceridima i povećanim rizikom od nastanka metaboličkog sindroma (77). I studija preseka rađena na ženama Indije sa PCOS, gde su granične vrednosti za BMI 22,5 kg/m², došla je do zaključka da su ove bolesnice u većem riziku za nastanak metaboličkog sindroma (78). Dou i saradnici su u svojoj komparativnoj studiji konvencionalnih parametara gojaznosti, vršenoj na 300 žena Kine sa PCOS u reproduktivnom periodu i 110 zdravih žena, došli do zaključka da su tri parametra (BMI, OS i procenat masne mase) značajno povišeni kod žena sa PCOS, a da je obim struka prvi u proceni kardiometaboličkog rizika zbog svoje jednostavnosti. U ovoj studiji granične vrednosti za OS, BMI i procenat masne mase su iznosile 80,5 cm, 26,6 kg/m² i 29%. Procenat masne mase ima veću senzitivnost u proceni kardiometaboličkog rizika, a BMI je specifičniji (79).

5.2.2. Glukozni metabolizam i PCOS

Česta je pretpostavka da sve žene sa sindromom policističnih jajnika imaju insulinsku rezistenciju (IR). Ipak, invazivnim dinamičkim testovima kao što su euglikemijski klamp, intravenski glukoza tolerans test sa više uzoraka, insulinski tolerans test i bazalni indeksi, nije kod svih bolesnica potvrđeno prisustvo IR. Prevalenca je veća kod gojaznih osoba u odnosu na normalno uhranjene, tako da između 50% i 70% žena sa PCOS ima ovaj poremećaj.

Insulinska rezistencija je kompenzatorno povećano lučenje insulina od strane beta ćelija pankreasa, kako bi se održala glukoza homeostaza. Hiperinsulinemija dovodi do povećane produkcije androgena u ovarijalnim teka ćelijama i smanjenom stvaranju SHBG u jetri.

Najveći procenat žena sa PCOS je mlađe životne dobi sa očuvanom funkcijom pankreasa, te je razvoj značajne hiperinsulinemije odložen. Ova činjenica je u osnovi relativne ne senzitivnosti bazalnih testova u proceni insulinske rezistencije.

Iako veliki broj žena sa PCOS ima normalnu ili povećanu insulinsku sekreciju, mnoge od njih pokazuju poremećenu funkciju beta ćelija kada se uzme u obzir stepen insulinske rezistencije. Ovo je potvrđeno i činjenicom da je kod mnogih PCOS bolesnica ``*disposition index*`` (odnos prve faze insulinske sekrecije i insulinske senzitivnosti) niži od normalnog i da je sposobnost beta ćelije da odgovori na oscilacije glukoze u plazmi ili deksametazona redukovana. Ipak, iako je disfunkcija beta ćelija prisutna u PCOS, stepen ovog poremećaja je u bliskoj vezi sa porodičnom anamnezom za tip 2 šećerne bolesti (76).

Prevalenca metaboličkog sindroma, poremećaja koji je u bliskoj vezi sa insulinskom rezistencijom, je veća kod žena sa PCOS i to u SAD u procentu od 33% do > 50% (80). Isto se odnosi i na prevalencu tipa 2 šećerne bolesti, koja je prisutna u 4-10% mladih žena sa PCOS. Ipak, u drugim zemljama vršene studije pokazuju značajno manju prevalencu metaboličkog sindroma i tipa 2 šećerne bolesti, najverovatnije zbog razlike u telesnoj masi i faktora spoljašnje sredine (81).

U našem istraživanju vrednosti glikemije u grupi ispitanica sa sindromom policističnih jajnika su signifikatno veće u odnosu na kontrolnu grupu (PCOS: $12,29 \pm 7,23$ mmol/l vs kontrolna g.: $6,73 \pm 2,51$ mmol/l , $p < 0,001$) sa statistički značajno nižim vrednostima glikemija na tašte ($4,79 \pm 0,52$ vs $5,05 \pm 0,46$, $p = 0,019$). Povišene vrednosti insulinemije na tašte uz niže

vrednosti glikemije dovode do povećanog indeksa insulinske rezistencije i to signifikatno u odnosu na kontrolnu grupu. Naši rezultati su u skladu sa literaturnim podacima o povećanoj insulinskoj rezistenciji kod žena sa sindromom policističnih jajnika. Takođe postoji određen stepen disfunkcije beta ćelija što je potvrđeno činjenicom da su vrednosti glikemije kod ispitanica sa PCOS niže u odnosu na kontrolnu grupu sa signifikatno prisutnom hiperinsulinemijom. Ovo je posebno izraženo u podgrupi PCOS sa prisutnim fetalnim metabolitima u urinu, gde iako su vrednosti insulinemije bez značajne razlike u odnosu na PCOS grupu bez fetalata, vrednosti glikemije su značajno niže. Ipak, ispitanice sa PCOS su mlade ženske osobe, te se razvoj insulinske rezistencije većeg stepena očekuje u budućnosti.

5.2.3. Lipidi i lipoproteini seruma i PCOS

Dislipidemija je jedan od češćih poremećaja koji prate sindrom policističnih jajnika, iako tip i stepen pokazuju veliku varijabilnost. Prevalenca poremećaja bar jednog lipida (granična vrednost ili povišena) je prisutna kod 70% žena, prema *National Cholesterol Education Program guidelines* (82). Ipak, kod velikog broja žena sa PCOS prisutan je lipidni status u referentnom opsegu. Insulinska rezistencija i hiperinsulinemija, povezane su sa dislipidemijom. Lipidni status koji se karakteriše sniženim nivoom HDL holesterola, povišenim LDL holesterolom i trigliceridima je potvrđen od strane različitih studija. Ipak, više velikih studija koje su kao kontrolu koristile osobe ženskog pola iste telesne mase, pokazale su da je povišen nivo LDL holesterola nezavisan od insulinske rezistencije. Razlog ove hiperlipidemije može ležati u povišenom nivou cirkulišućih androgena, ali može biti i u vezi sa povišenim nivoom LDL holesterola kod rođaka u prvom stepenu srodstva, tako da genetski faktori, ali i faktor spoljašnje sredine imaju ulogu u etiologiji ovog poremećaja (76).

Da je raznolikost u vrednostima lipida i lipoproteina seruma prisutna kod osoba sa sindromom policističnih jajnika, potvrdili su i naši rezultati. Naime, kada posmatramo celu grupu PCOS ispitanica, vrednosti ukupnog holesterola su statistički značajno niže u odnosu na kontrolu grupu ($4,64 \pm 0,87$ mmol/l vs $5,11 \pm 0,74$ mmol/l, $p=0,009$). Ovakav rezultat je posledica nižih vrednosti ovog lipida u grupi ispitanica PCOS bez fetalata. Pokazano je da iako ova podgrupa ispitanica ima značajno više vrednosti BMI i obima struka, tj da je gojazna, ima signifikatno niže

vrednosti ukupnog holesterola kako u odnosu na podgrupu PCOS sa ftalatima, tako i kontrolnu grupu.

Sve grupe ispitanica imale su vrednosti kako ukupnog holesterola, tako i LDL holesterola i triglicerida u referentnih granicama. Vrednosti HDL holesterola su bile statistički značajno niže u PCOS grupi u odnosu na kontrolnu grupu ($1,33 \pm 0,35$ mmol/l vs $1,51 \pm 0,35$ mmol/l, $p=0,033$).

Poređenjem vrednosti protektivnog holesterola u odnosu na podgrupe, dobili smo signifikatno niže vrednosti u PCOS grupi bez ftalata, dok među ostalim grupama nije bilo razlike. Nedovoljna fizička aktivnost ove podgrupe je najverotanije posledica ovakve dislipidemije, na šta nam ukazuje i povećan BMI. Ipak, u skladu sa dosadašnjim istraživanjima, ne može se isključiti i genetski faktori. Obzirom da našu grupu PCOS čine mlade osobe, velika je verovatnoća razvoja hiperlipoproteinemije u njihovoj budućnosti.

5.2.4. Hormonske karakteristike PCOS

Iako je prosečna starost kontrolne grupe veća u odnosu na ispitivanu grupu, sve ispitanice su se nalazile u reproduktivnom periodu, te se njihov hormonski status može porediti.

Poremećaj u sekreciji gonadotropnih hormona u sindromu policističnih jajnika poznat je više od 40 godina. Povećana sekrecija lutenizirajućeg hormona je rezultat GnRH pulsno lučenja, dok je nivo folikulostimulišućeg hormona u referentnom opsegu ili snižen. Studije koje su koristile više uzoraka krvi u toku jednog dana i precizne testove za određivanje nivoa gonadotropina pokazale su da više od 75% žena sa PCOS ima disregulaciju gonadotropne funkcije. Najveći procenat normalno uhranjenih žena sa PCOS ima povećanu LH pulsnu amplitudu, dok je kod gojaznih bazalni nivo LH u referentnim granicama, a odnos LH/FSH nije povećan. Veliki je procenat gojaznosti u PCOS koji remeti merenja gonadotropina, naročito ako se vrši samo jedno merenje bazalne sekrecije, te se često dobija normalan LH/FSH odnos kod ovih bolesnica.

Kod naših ispitanica su potvrđene signifikantno niže vrednosti FSH u odnosu na kontrolnu grupu, dok nije bilo značajne razlike u LH parametru. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da uzorkovane vrednosti gonadotropnih hormona nisu vršene u istoj fazi menstrualnog ciklusa kod ispitanica kontrolne grupe. Ipak, kada posmatramo odnos LH/FSH, vidimo da je značajno veći

kod ispitanica sa PCOS u odnosu na kontrolnu grupu. Čak i u grupi predgojaznih - gojaznih PCOS žena, odnos LH/FSH je bio poremećen.

Hiperandrogenemija je takođe poremećaj koji prati sindrom policističnih jajnika. Serumski testosteron je najznačajniji androgen u organizmu žene. U plazmi se nalazi vezan za protein SHBG ili druge proteine kao što su albumini, a samo kao slobodna frakcija ulazi u ciljane ćelije. Iako je merenje slobodnog testosterona mnogo sezivnije u potvrđivanju dijagnoze sindroma policističnih jajnika u odnosu na merenje ukupnog testosterona, u praksi oba merenja imaju svoja ograničenja. Adekvatna merenja slobodnog testosterona zahtevaju posebnu tehniku i ekonomsku potporu. S druge strane, testovi za merenje ukupnog testosterona pokazuju veliku varijabilnost, naročito ukoliko su snižene vrednosti SHBG, kao što je slučaj kod žena sa PCOS. Pored ukupnog i slobodnog testosterona, markeri hiperandrogenemije su i androstendion i DHEA.

Povišen nivo slobodnog testosterona je prisutan kod 70% žena sa PCOS, dok su supranormalne vrednosti DHEAS prisutne kod 20-30% bolesnica, tako da možemo reći da svega 20-40% žena sa PCOS ima povišene vrednosti androgena (77).

U našem istraživanju, pokazali smo da obe grupe ispitanica sa PCOS imaju signifikantno veće vrednosti ukupnog testosterona u odnosu na kontrolnu grupu. Iako nismo bili u mogućnosti da odredimo nivo slobodnog testosterona, možemo indirektno zaključiti da je ispitivana grupa ima hiperandrogenemiju obzirom na prisutnu hiperinsulinemiju koja dovodi do smanjene produkcije SHBG.

Sekreciju estrogena u sindromu policističnih jajnika karakteriše izostanak cikličnih promena koji postoje u ovulatornom ciklusu. Lučenje estrogena je hronično i konstantno. Vrednost serumskog estradiola (E2) obično je u opsegu srednje folikularne faze ciklusa, dok je nivo serumskog estrona (E1) znatno viši. Ovakav poremećaj je posledica periferene aromatizacije androgena u estrogene u ekstraslandularnim tkivima.

U našem istraživanju, srednje vrednosti merenog estradiola u krvi ispitanica sa PCOS nisu pokazale značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Ovakav rezultat je najverovatnije posledica uzorkovanja estradiola u različitim fazama menstrualnog ciklusa kod ispitanica kontrolne grupe.

5.2.5. Leptin i PCOS

Leptin, produkt „*obesogenog*“ gena nije samo glasnik između masnog tkiva i mozga, već je izuzetno značajan hormon za veliki broj fizioloških procesa, uključujući funkciju gonada i reprodukciju. Ekspresija gena za leptin je regulisana od strane nekoliko hormona, faktora rasta i citokina. Uprkos dokazima da leptin može regulisati gonadotropnu sekreciju, da interferiše sa steroidnom produkcijom, kao i njegovoj ulozi u metaboličkom sindromu, definitivno mesto leptina u patofiziologiji sindroma policističnih jajnika nije utvrđeno. Kontraverzni su rezultati o nivou leptina kod bolesnica sa PCOS. Dok neki autori navode povećan nivo leptina, drugi ne nalaze razliku u vrednostima između PCOS ispitanica i zdravih žena. Studija rađena na 45 žena, starosti između 15 i 34 godine, sa prisutnim kriterijuma za PCOS potvrdila je prisustvo hiperleptinemije kod bolesnica sa PCOS kao i verovatnu vezu ovog hormona sa insulinskom rezistencijom. Vrednosti leptina kod ispitanica u ovoj studiji su bile dvostruko veće u odnosu na kontrolnu grupu (83). Poznato je da je leptin predominantno sintetisan od strane adipocita, te se njegove povišene vrednosti očekuju kod PCOS bolesnica, obzirom na više vrednosti BMI u odnosu na zdrave žene. Ipak, oprečni su stavovi oko ovakve teorije. Da gojaznost nije u direktnoj vezi sa hiperleptinemijom, pokazao je Chakrabari (84) u svom istraživanju, kada je PCOS bolesnice podelio prema BMI na gojazne (BMI >25) i normalno uhranjene (BMI <25). Povišene vrednosti leptina su bile prisutne u obe podgrupe u odnosu na kontrolnu, ali su i ostale više nakon redukcije telesne mase. Drugi autori nisu dobili ovakve rezultate. Routru i saradnici (85) i Laughlin i saradnici (86) su pokazali da razlike u leptinemiji ne postoje između PCOS bolesnica i kontrole grupe.

I naše istraživanje je potvrdilo da nema statistički značajne razlike u srednjim vrednostima leptina kada se poredi PCOS i kontrolna grupa. Ali, ovakav rezultat je i očekivan, obzirom da su PCOS ispitanice normalno uhranjene (gledajući srednju vrednost BMI). Međutim, podelom PCOS grupe na gojazne (BMI>25) i normalno uhranjene (BMI<25) dobijamo da gojazne žene sa sindromom policističnih jajnika imaju više vrednosti leptinemije u odnosu na normalno uhranjene, ali i da ta razlika postoji poređenjem sa kontrolnom grupom.

5.2.6. Kardiometabolički rizik i PCOS

Metabolički sindrom je čest poremećaj koji podrazumeva visceralnu gojaznost, hipertenziju, dislipidemiju, insulinsku rezistenciju i smanjenu glukoznu toleranciju. Njegova prevalenca raste sa godinama života, tako da je prisutan u ~5% kod žena starosti 20-29 godina do ~15% kod žena između 30 i 39 godina života (87). U istraživanju Conn i saradnika, od 38 ispitanica sa tipom 2 šećerne bolesti, 82% je imalo ultrazvučno potvrđene policistične jajnike, a među njima 32% je imalo hirzutizam, 6% akne i 26% oligo-amenoreju (88). I drugi autori navode da se u većem procentu javlja PCOS ukoliko je prisutna hiperinsulinemija, ali i šećerna bolest (89) (90).

Obzirom da veliku prevalencu metaboličkog sindroma u sindromu policističnih jajnika, procena kardiometaboličkog rizika je izuzetno važna.

U 49 godina vođenoj studiji koja je obuhvatala 786 žena sa dijagnozom PCOS nije utvrđena razlika u riziku od fatalnih kardiovaskularnih bolesti u odnosu na kontrolnu grupu (91). Slično ovom, 21 godišnja studija na ženama sa histološki potvrđenim PCOS potvrdila je da iako su hipertenzija i hipertrigliceridemija češće među ženama sa PCOS, ove žene nemaju povećan rizik od nastanka infarkta miokarda, šloga ili iznenadne smrti u odnosu na žene bez PCOS (92). Retrospektivna studija na 319 žena kod kojih je postavljena dijagnoza PCOS prema strogim kriterijumima (hiperandrogenemija i oligoovulacija) potvrdila je da kod ovih bolesnica ne postoji povećan kardiovaskularni mortalitet, iako su žene sa PCOS sklonije kardiovaskularnim događajima, čak i nakon regulisanja BMI (93).

S druge strane, rađena meta analiza ukazuje na dva puta povećan rizik za razvoj koronarnih bolesti i šloga kod bolesnica sa PCOS u odnosu na one koje nemaju ovaj poremećaj, kao i da povećan BMI nije jedini razlog ove incidence (94). I retrospektivne studije pokazuju slične rezultate. Studija koja je obuhvatala 2300 žena sa PCOS lečenih u periodu od 1988-2009 godine, pokazala je značajnu prevalencu kardiovaskularnih događaja (infarkt miokarda, angina pectoris, šlog, iznenadna srčana smrt) kod žena sa PCOS u odnosu na populaciju žena bez PCOS iste životnog doba (95).

U našem istraživanju, kardiometabolički rizik smo procenjivali na osnovu dva indeksa: *Lipid accumulation product (LAP) index* i *Visceral adiposity index (VAI)*. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrednosti LAP indeksa između PCOS- grupe i kontrolne grupe, dok ova razlika nije potvrđena poređenjem sa VAI indeksom. Statistički značajna razlika u

vrednostima LAP indeksa je utvrđena između PCOS negativne grupe i kontrolne, što je posledica povećanog obima struka u ovoj grupi, tako da možemo zaključiti da ove ispitanice imaju povećan kardiometabolički rizik. S druge strane, referentne vrednosti lipida i lipoproteina u PCOS grupi dovode do niskih vrednosti VAI indeksa, bez razlike u odnosu na kontrolnu grupu zdravih.

Naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pokazali da je kod žena sa PCOS LAP indeks značajno povišen, kao i da je nezavisan i precizna determinanta metaboličkog sindroma (96) (16). Takođe, srednje vrednosti LAP u našoj grupi žena sa sindromom policističnih jajnika je iznosila $26,20 \pm 29,08$ što je u skladu sa rezultatima Macut i saradnika, ali i rezultatima velike evropske studije na PCOS ženama (97) (98).

5.3. Ftalati i PCOS

Od početka novog milenijuma, značajno je porastao broj studija koje su istraživale izloženost ftalatima u opštoj populaciji, ali i specifičnim grupama po uzrastu i polu. Sve ove studije su potvrdile široku rasprostranjenost velikog broja ftalata. Metaboliti DMP, DEP, DiBP, DnBP, BBzP, DEHP, DiNP i DiDP su detektovani u visokom procentu u opštoj populaciji.

Najveći broj biomonitoringa o ftalatnoj ekspoziciji je vršen na nemačkoj i SAD populaciji. Uopšteno gledano, podaci iz obe zemlje su veoma saglasni. Ipak, uzimajući u obzir broj godina istraživanja, nivoi MnBP i MiBP u urinu su bili veći u Nemačkoj, dok je koncentracija MEP i MBzP pokazala veći trend u SAD. Studija na opštoj nemačkoj populaciji potvrdila je prisustvo MnBP u dva do tri puta većoj koncentraciji, kao i MiBP u deset puta većoj koncentraciji u odnosu na istraživanje *US National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) rađeno u periodu od 2001. do 2002. godine, kao i srednje vrednosti MBzP dva do tri puta niže. Razlog za ovakve rezultate može ležati u korišćenju različitih vrsta ftalata u proizvodnji produkata za ličnu higijenu.

Uzorci urina za studiju koja je rađena tokom 1988-1994 godine kao deo *Third National and Nutrition Examination Survey* (NHANES III), objavljena od strane Blounta i saradnika 2000. godine, testirani su na prisustvo ftalatnih metabolita. Ftalatni monoestri sa najvećim nivoom u urinu bili su MEP (6,790 $\mu\text{g/g}$ kreatinina), MBP (2,760 $\mu\text{g/g}$ kreatinina) i MBzP (540 $\mu\text{g/g}$

kreatinina). Najveća koncentracija MEHP (192 µg/g kreatinina) je pronađena u populaciji koja je profesionalno bila izložena ovom ftalatu (radnici u fabrikama), dok je u opštoj populaciji ova koncentracija bila i do 70 puta niža. Žene u reproduktivnom dobu (20-40 godina) su pokazale značajno viši nivo MBP (46,9 µg/g kreatinina). U čak 10 ispitivanih žena ove grupe pronađene su vrednosti urinarnog MBP >300 µg/g kreatinina, uključujući tri žene sa nivoom MBP >2000 µg/g kreatinina. Slična analiza za MBzP je pokazala da žene u reproduktivnom dobu koje žive u ruralnim predelima imaju više vrednosti MBzP (31,6 µg/g kreatinina) u odnosu na starije žene (41-60g) (21,1 µg/g kreatinina) (99).

Podaci NHANES dobijeni u periodu od 1999-2000 godine, analiziranjem 2540 uzoraka urina na prisustvo sedam najčešćih ftalata, pokazali su prisustvo ovih materija u više od 75% uzoraka, navodeći široku rasprostranjenost dietil ftalata (DEP), dibutil ili diizobutil ftalata (DBP/DiBP), benzilbutil ftalata (BBP) i di-(2-etil heksil) ftalata (DEHP) u populaciji SAD. Prisustvo različitih vrsta ftalatnih metabolita se razlikuje u odnosu na pol, uzrast i etičku pripadnost. U svim testiranim uzorcima urina detektovano je prisustvo MEP, dok je MBP bio prisutan u 99% uzoraka, MBzP u 97%, a MEHP u 78%. Ftalatni metaboliti MCHP, MOP i MiNP su verifikovani u manje od 16% slučajeva. Prisustvo navedenih ftalatnih metabolita je bilo u znatnoj većoj koncentraciji prisutno u ženskoj populaciji u odnosu na muškarce i to MEP (194,4 ug/l vs 152,6 ug/l), MBP (29,8 ug/l vs 18,5 ug/l), MBzP (16,9 ug/l vs 13,5 ug/l) i MEHP (3,5 ug/l vs 3,2 ug/l). U svim navedenim slučajevima je postojala statistički značajna razlika u nivou ftalata u urinu, sem kod MEH. Žene u reproduktivnom dobu (20-29 godina) su imale visoke vrednosti ftalatnih metabolita i veoma slične koncentracije sa adolescentima i ženama mlađim od 40 godina (100).

Retrospektivna nemačka studija, koja je obuhvatala 634 osobe, starosne dobi 20-29 godina, sa podjednakom zastupljenošću oba pola, u periodu od 1988. do 2003.godine utvrdila je prisustvo pet ispitivanih ftalata ((DnBP), di-izo-butil ftalat (DiBP), butilbenzil ftalat (BBzP), di(2-etilheksil) ftalat (DEHP) i di-izo-nonil ftalat (DiNP)) u čak 98% uzoraka testiranih urina. U svim uzorcima je bilo detektabilno prisustvo metabolita dibutil ftalata (MnBP i MiBP). Prisustvo MEHP monoestara DEHP je bilo u 98% uzoraka, MBzP, glavni metabolit BBzB je bio prisutan u svim analiziranim urinima, dok su metaboliti DiNP (OH-MiNP i oxo-MiNP) verifikovani u 99% i 92% urina. Među ftalatnim metabolitima merenim u ovoj studiji najveća koncentracija je izmerena za MnBP (112 ug/ L) koji je najviše prisutan u proizvodnji kapsula lekova za lečenje

gastrointestinalnog trakta. Srednje izmerene vrednosti MiBP iznosile su 34,5 ug/l, MBzP 7,4ug/L, dok je za MEHP iznosila 33,6 ug/L. Kod osoba ženskog pola u većoj koncentraciji su bili prisutni MnBP (117 ug/l vs 106 ug/l) I MiBP (183 ug/l vs 150 ug/l), dok su nešto više vrednosti MEHP (8,5 ug/l vs 6, ug/l) I MBzP (8,0 ug/l vs 7,2 ug/l) zabeležene kod muških studenata (101).

Još jedna retrospektivna studija rađena na nemačkoj populaciji studenata (između 20 I 29 godina) u periodu od 2002-2008 godine je pokazala prisustvo ftalatnih metabolita MnBP, MBzP, MEHP i MiN U ovoj studiji vršeno je poređenje sa prethodnom I praćenje u smislu trenda porasta ili pada srednjih vrednosti navedenih ftalata u populaciji. Dobijeni rezultati su pokazali je od 2002. do 2008. godine značajno smanjena ekspozicija ftalatima kao što su DnBP, DEHP i BzBP, dok je ekspozicija DiNP ostala nepromenjena ili blago povećana (102).

Obe navedene studije su pokazale da je zakonskim regulativima značajno redukovano korišćenje ftalata u populaciji Nemačke i SAD, ali su i dalje prisutni . Pojedinačne su studije koje su vođene u drugim zemljama sa ciljem verifikovanja prisustva ftalata u populaciji.

Studija objavljena od strane izraelskih autora, vršena je na 19 trudnih žena, prosečne starosti 31 godina, merila je koncentracije 11 ftalatnih metabolita u urinu. Devet metabolita je detektovano u skoro 95% uzoraka i to: mono(2-etil-5-carboksipentil) ftalat, mono(2-etil-5-hidroksiheksil) ftalat, mono(2-etil-5-oksoheksil) ftalat, mono(3-carboksipropil) ftalat, mono(n-butil) ftalat, monobenzil ftalat (MBzP), monoetil ftalat (MEP), mono(2-etillheksil) ftalat i monoizobutil ftalat. Koncentracije ovih ftalatnih metabolita su bile veoma slične koncentraciji ovih jedinjenja kod žena u SAD. Najveća koncentracija ftalata je zabeležena za MEP (270 ug/g kreatinina) i MBP (32,6 ug/g kreatinina). Pronađene su značajne razlike u koncentraciji ftalatnih metabolita kod žena u odnosu na vreme stanovanja u zgradama, koje su bile signifikantne. Ftalat koji je bio najviše prisutan kod ovih ispitanica je BBzP tj njegov metabolit MBzP. S druge strane, ispitanice koje su koristile više od jednog proizvoda za ličnu higijenu, imale su značajno veće koncentracije MEP u urinu (103).

Da su ftalatni prisutni u opštoj populaciji potvrdila je i studija na stanovnicima Hong Konga. U periodu između 2010. i 2011.godine ispitano je 153 osoba, podeljenih u grupe po starosti i polu, čiji su uzorci krvi testirani na prisustvo bisfenola A i ftalata. Istraživanje je pokazalo da je kod svih uzoraka bio prisutan bis(2-methoxyethyl) ftalat (DMEP) , dok su DEHP, DnOP, DiBP i DBP bili prisutni u 95% uzoraka. Koncentracije DiDP i DHP su bile ispod limita

za detekciju (LOD). Srednje vrednosti koncentracija su bile najveće za osam ftalata i to DEHP 11.13 ng/ml \pm 3.95, DMEP 11.01 ng/ml \pm 6.57, DnOP 6.53 ng/ml \pm 3.95 i DiBP 5.84 ng/ml \pm 2.64. U poređenju sa studijom koja je rađena na švetskoj populaciji vrednosti navedenih ftalata su bile 1,9-7,2 puta veće (104) (105).

Ftalati se smatraju endokrinim disruptorima i pokazuju potencijalno teratogene efekte, ali i negativne efekte na razvoj i reproduktivno zdravlje. U cilju procene rizika na opštu populaciju, Koch i saradnici su testirali uzorke jutarnjeg urina kod 53 žene i 32 muškarca, uzrasta 7-64 godina koji nisu bili profesionalno izloženi ftalatima. Srednje koncentracije za metabolite DEHP su iznosile 46.8 mg/L za 5 OH- MEHP (0.5–818 mg/L), 36.5 mg/L za 5 oxo-MEHP (0.5–544 mg/L), i 10.3 mg/L za MEHP (<0.5 (limit za kvantifikaciju, LOQ) do 177 mg/L). Srednje vrednosti koncentracija za druge ftalatne metabolite su: mono-n-butil ftalat (MnBuP) 181 mg/L, mono-benzil ftalat (MBzP) 21.0 mg/L, monoetil ftalat (MEP) 90.2 mg/L i mono-n-oetil ftalat (MOP) <1.0 mg/L (LOQ). Muškarci i žene su pokazali slične karakteristike u ekskreciji DEHP, tako da nije bilo statistički značajne razlike u njihovim koncentracijama. Za razliku od ovog ftalata, metaboliti ftalata sa kratkim lancem su bili značajno više prisutni u urinu žena u odnosu na muškarce ($p=0,001$) i to MEP (781 ug/g kreatinina vs. 673 ug/g kreatinina), MnBP (534 ug/g kreatinina vs. 381 ug/g kreatinina) i MBzP (82,8 ug/g kreatinina vs. 61,8 ug/g kreatinina) (106). I drugi autori su u svojim istraživanjima nastojili da pokažu negativan uticaj zagađujućih materija koje se nalaze u životnoj sredini i naprave vezu sa patofiziološkim poremećajima u ljudskom organizmu.

Tako je 2014. godine objavljena studija američkih autora koja je istraživala potencijalnu vezu između endokrinih disruptora (bromid di-fenil etri, polihlorovani fenoli (PCB), organohlorni pesticidi, ftalati i bisfenol A) i sindroma policističnih jajnika. U periodu od 2007.-2008.godine analizirani su uzorci krvi i urina kod 52 bolesnice sa dokazanim sindromom policističnih jajnika i vršeno je poređenje sa 50 kontrolnih ispitanica. U više od 50% ispitanica je detektovano 11 vrsta ftalata. Urinarne koncentracije monobenzil ftalata (MbzP) su bile niže u odnosu na kontrolu (7,5 ug/g kreatina vs. 11,7 ug/g kreatinina), kao i vrednosti MBP (17,7 ug/g kreatinina vs. 23,2 ug/g kreatinina) i MEP (11,1 ug/g kreatinina vs. 195,8 ug/g kreatinina), dok se koncentracije ostalih detektovanih ftalatnih metabolita nisu razlikovale među ispitivanim grupama. Niže koncentracije navedenih ftalata su povezane sa povećanom verovatnoćom za PCOS. Dosadašnja istraživanja ukazuju da neki ftalati, uključujući DEHP imaju anti androgena

svojstva (107). Takođe, epidemiološke studije su pronašle vezu između MEHP i DiNP sa smanjenom produkcijom testosterona (108), a da MBP, MbzP, DEHP i DiNP odlažu pubertet kod žena (109). Obzirom da PCOS karakteriše hiperandrogenemija, rezultati ovog istraživanja su u skladu sa dosadašnjim dokazima o efektu ftalata (110).

Naše istraživanje je obuhvatalo 61 osobu ženskog pola sa dijagnozom sindroma policističnih jajnika i kod 31 (51,3 %) su bili prisutni ftalatni metaboliti u urinu. U jednom uzorku jutarnjeg urina ispitanica testirano je prisustvo 10 ftalatnih metabolita: MMP, MEP, MBP, MOP, MEHP, MPP, MCHP, MiAP, MnAP i MBz. Ftalatni metaboliti MiAP, MNAP i MBzP nisu bili prisutni ni u jednom uzorku urina. Odsustvo MBzP u urinu ispitanica nije u skladu sa dosadašnjim ispitivanjima u opštoj populaciji. BBzP je ftalat koji je najviše prisutan u građevinskim materijalima (enterijeru i eksterijeru) stambenih zgrada, a rezultati istraživanja pokazuju da je dužina ekspozicije u vezi sa koncentracijom njegovog metabolita u urinu osoba ženskog pola. Naša ispitivana grupa su studenkinje uglavnom iz ruralnih predela, te su najverovatnije godine života i stambeni prostor doprineli manjoj izloženosti ovom ftalatu, a samim tim i ovakav rezultat.

Ostali ispitivani metaboliti su bili prisutni iznad limita kvantifikacije. U 3,2% slučajeva su verifikovani MCHP u koncentraciji 7,54 ug/g kreatinina i MBP u koncentraciji 11,139 ug/g kreatinina. Kod 30% ispitanica bilo je potvrđeno prisustvo MMP, 13% je imalo MEP, 19% MPP, 16% MOP, dok je kod najvećeg procenata ispitanica (>30%) verifikovano prisustvo MEH. Naši rezultati, kao i rezultati velike NHANES američke studije i nemačkih studijama pokazuju da je DEHP najzastupljeniji ftalat, tj da je najveći procenat žena u kontaktu sa plastikom (plastične posude, igračke, medicinska oprema) kao njegovim glavnim izvorom. Prisustvo ostalih detektovanih ftalata, pre svega MEP kao metabolita DEP i MBP, metabolita BBP je u značajano nižem procentu bilo zastupljeno kod naših ispitanica u odnosu na sve druge do sada rađene studije. Ipak, njihovo prisustvo nam ukazuje na činjenicu da naše ispitanice koriste u velikom procentu kozmetičke preparate i preparate za negu tela. I druga istraživanja u našoj zemlji su pokazala da je izloženost ftalatima velika, posebno MEHP i MEP, što je u skladu sa našim rezultatima (111).

Srednje vrednosti koncentracija detektovanih ftalatnih metabolita iznosile su: MMP: 19,64 ug/g kreatinina, MEP: 26,28 ug/g kreatinina, MBP: 1,79 ug/g kreatinina, MOP: 9,69 ug/g kreatinina i MEHP: 37,45 ug/g kreatinina. Sve navedene srednje vrednosti su niže u odnosu na

srednje izmerene vrednosti američkih i nemačkih autora, a relativno mali uzorak može biti razlog tome. Ipak, rezultati istraživanja Sare Vagi i kolega koji su pokušali da pronađu vezu između ftalata i sindroma policističnih jajnika, potvrđuju naše rezultate, ukazujući na niže srednje vrednosti ftalatnih metabolita kod bolesnica sa PCOS u odnosu na zdrave žene, čime se i objašnjava hiperandrogenemija u ovom sindromu.

5.3.1. Ftalati i antropometrijske karakteristike u PCOS

Termin „obesogen“ je nastao 2006. godine i po definiciji predstavlja „molekule koje neadekvatno regulišu metabolizam masti i adipogenezu što dovodi do gojaznosti“ (112). Dosadašnja istraživanja su dala spisak hemijskih supstanci koje su potencijalno obesogene, a na njenom vrhu se nalaze ftalati. Abdominalna i visceralna gojaznost je karakteristika oko 30-75% žena sa sindromom policističnih jajnika i ima značajan uticaj na patofiziološke i kliničke manifestacije ovog sindroma.

Poznato je da PPARs receptori igraju ključnu ulogu u adipogenezi i metabolizmu lipida, a da je PPAR- γ glavni regulator razvoja, diferencijacije i maturacije adipocita. Više studija na životinjama je pokazalo da neke hemijske supstance, uključujući ftalate, pokazuju afinitet ka PPAR receptorima, te vezujući se za PPAR- γ povećavaju insulinsku rezistenciju, ali povećavaju i telesnu masu, delujući kao agonisti ovih receptora (112).

Polni hormoni takođe imaju uticaj na količinu i distribuciju masnog tkiva (113). Androgeni su povezani sa nižim BMI kod osoba muškog pola, dok nivo estrogena obrnuto korelira sa gojaznošću i odnosom obima struka i kuka kod žena. Rađena istraživanja pokazuju antiandrogeni uticaj nekoliko ftalata, što se može dovesti u vezu sa povećanim BMI (114) (115).

Pojedinačne su studije koje su ispitivale vezu između ekspozicije EDc prenatalno i parametara gojaznosti. Još manji je broj literarnih podataka o postnatalnoj ekspoziciji ili ekspoziciji EDc u adultnom periodu. Za nestabilne supstance, kao što su ftalati, samo je nekoliko studija pokušalo da pronađe vezu između ekspozicije ftalatima i antropometrijskih parametara. Mala, studija preseka koja je obuhvatala 90 devojčica je pronašla nešto više nivoa ftalatnih metabolita (MEP (ug/g kreatinina): 144 vs.102; MEHP (ug/g kreatinina): 56,1 vs.43; MBP (ug/g kreatinina): 47.6 vs.43,3) u grupi devojčica sa BMI većim od 85% u odnosu na one mršavije, iako statistički značajna razlika nije postojala (116). Više autora je u svojim

istraživanjima pronašlo pozitivnu vezu između ftalatnih metabolita - obima struka i HOMA indexa kod odraslih osoba muškog pola, ali ove studije nisu uključivale osobe ženskog pola (117).

Velika NHANES studija rađena 1999 - 2002. godine ispitala je vezu između šest najčešćih ftalatnih metabolita (MEP; MEHP, MBP, MBzP, MEOHP, MEHHP), BMI i obima struka kod osoba ženskog i muškog pola. Efekat ftalata na ispitivane antropometrijske parametre se razlikovao kako po polu, tako i to uzrastu ispitanika. Kod žena uzrasta 20-59 godina starosti utvrđeno je da ne postoji veza između MBzP, MEHHP i MEOHP sa BMI i OS, dok MBP i MEHP pokazuju negativnu korelaciju sa BMI i OS. Odnos MEP i BMI je drugačiji, tj postoji pozitivna korelacija između navedena dva parametra.

Razlike u rezultatima između muškog i ženskog pola su pre svega posledica različitog hormonskog statusa. Poznat je anti androgeni efekat nekoliko ftalata, te su povišeni androgeni kod osoba ženskog pola udruženi sa većim BMI i većim rizikom od nastanka metaboličkog sindroma, što je prisutno u sindromu policističnih jajnika. Tako da, žene kod kojih je prisutna visoka koncentracija MEHP (metabolit sa najjačom negativnom korelacijom sa BMI i OS) mogu imati niže vrednosti androgena ili veći estrogen/androgen odnos, čime se i objašnjava veza između MEHP i BMI (118).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da ukupni ftalatni metaboliti pokazuju pozitivnu korelaciju sa antropometrijskim parametrima BMI i OS. Analizom pojedinačnih ftalatnih metabolita dobijena je značajna pozitivna korelacija između MMP i obima struka, te se ovaj ftalat može smatrati najviše odgovornim za visceralnu gojaznost. Da je količina ftalata proporcionalna antropometrijskim parametrima, potvrđuju naši rezultati. Najveća količina ftalatnih metabolita je verifikovana kod ispitanice sa najvećim BMI i OS. Kada analiziramo pojedinačno ostale ispitanice, vidimo da najveći broj ispitanica kod kojih je verifikovano prisustvo MEHP ima niske vrednosti BMI i OS, ali povišene vrednosti testosterona, što nije u skladu sa prethodno navedenom studijom Hacha i saradnika i NAHANES studijom. Samo u dva slučaja, ispitanice sa MEHP su bile gojazne, a njihove vrednosti testosterona bile izrazito visoke uz niske vrednosti estradiola. Ipak, ispitanice prethodno citiranih autora su zdrave osobe ženskog pola u reproduktivnom periodu, dok su u našem istraživanju žene sa hormonskim i metaboličkim poremećajima. Pokazano je da MEHP može delovati na PPAR γ , što vodi povećanju insulinske rezistencije i povećanom oslobađanju leptina, te povećanju telesne mase. S

druge strane pokazuje i anti-androgena svojstva. Kakav će efekat ispoljiti na nivou ćelije najverovatnije zavisi od njegove koncentracije, ali i dužine ekspozicije.

Da MEHP kao ftalat sa velikom molekularnom masom negativno korelira sa BMI i OS pokazuju i druge studije. Deirleina i saradnika (119) su došli do zaključaka da ftalati sa niskom molekularnom masom dovode do povećanja telesne mase, a samim tim i BMI i obima struka, dok ftalati sa velikom molekularnom masom imaju negativan uticaj na ove parametre. I velika NAHANES (1999-2010) studija preseka je potvrdila da su BMI i OS značajno veći kod ispitanica sa MEP (ftalatom male molekularne mase), a niži kod onih kod kojih je bio prisutan DEHP (120). Među poslednjim, objavljeni rezultati Majeeda i sar takođe su pokazali da DBP, kao ftalat male molekularne mase, značajno povećava kako telesnu masu, tako i obim struka kod pacova, kao i da je povećanje ovih parametara dozna zavisno (121).

I naši rezultati potvrđuju da ispitanice sa niskomolekulrnim ftalatima imaju veći BMI i OS. Ftalat koji je bio prisutan kod najgojaznih ispitanica je bio MMP, a utvrdili smo da postoji statistički značajna korelacija između ovog ftalatnog metabolita i obima struka. Obzirom na njegovu masu od 180g/mol, on spada u ftalate niske molekularne mase, te se može naći veza između njega i povećanih parametara gojaznosti. Kod gojaznih ispitanica je bio verifikovan i MEP u urinu, što je u skladu sa prethodnim studijama o vezi između ovog ftalata i gojaznosti.

5.3.2. Ftalati i glukozni metabolizam u PCOS

Hiperinsulinemija i insulinska rezistencija su prisutne u 50-80% žena sa sindromom policističnih jajnika, što u kasnijoj životnoj dobi može dovesti do hiperglikemije i tipa 2 šećerne bolesti. Hiperinsulinemija dovodi i do hiperandrogenemije, kao posledice insulin stimulisane produkcije testosterona od strane ovarijuma, što vodi anovulaciji i poremećaju reprodukcije.

Veliki je broj studija je pokazao uticaj ftalata na poremećaj gukozne homeostaze, a samo nekoliko je posmatralo uticaj više hemijskih supstanci zajedno. U studiji na miševima koji su bili izloženi niskim dozama hemijskih supstanci koje sadrži hrana bogata mastima (ftalati, BPA, digoksin i PCBs), pokazano je da u adultom dobu ženki dolazi do razvoja IGT (122). Kombinacija ftalata DBP i BPA na embrionima ribe (*zebrafish*) dovode do značajnih metaboličkih poremećaja (123). U svom ispitivanju uticaja više ftalata na ćelijama placente

vršenoj in vitro, Adibi i sar su pokazali da MnBP, MzBp, MEHP I MEP zajedno menjaju ekspresiju PPAR γ receptora i deluju kao njihovi agonisti (124). Poznato je da familija PPAR nuklearnih receptora igra ulogu u glukoznoj homeostazi, pre svega PPAR γ , te se promenom ekspresije ovog receptora, ali i delovanjem kao agonisti receptora, može očekivati povećanje insulinske rezistencije koja vodi hiperglikemiji.

Rezultati naše studije su u skladu sa dosadašnjim malobrojnim istraživanja o efektu više vrsta ftalata zajedno. Utvrđena je pozitivna korelacija između ukupnih ftalatnih metabolita i kako vrednosti glikemije, tako i vrednosti insulinemije i indeksa insulinske rezistencije, što znači da ftalati igraju ulogu u poremećaju glukozne homeostaze kod žena sa sindromom policističnih jajnika.

Veliki je broj studija koje je ispitivao uticaj pojedinačnih ftalata na parametre glikoregulacije, ali i poredio ovaj uticaj sa uticajem drugih endokrinih disruptora.

In vitro ispitivanja na pacovima Lin i saradnici su vršili u cilju potvrđivanja hipoteze da ekspozicija DEHP tokom razvojnog perioda može dovesti do poremećaja glukozne homeostaze u kasnijem životu. Rezultati ove studija ukazuju da nakon dugotrajnog izlaganja DEHP dolazi do mitohondrijalnog ultrastrukturnog defekta ćelija pankreasa, što dovodi do poremećaja u glukozom indukovanoj sekreciji insulina. Kod ženki pacova, dolazi do smanjenja mase i broja β -ćelija, a samim tim i količine insulina. Rezultati ove studije ukazuju da izlaganje DEHP prenatalno dovodi do ozbiljne glukozne intolerancije u odraslom dobu i predispozicije za razvoj metaboličkih poremećaja (125).

Iako među poslednjim objavljenim, rezultati istraživanja Weldingh i saradnika pokazuju da je BPA mnogo potentniji od ftalata u redukovanju funkcije beta ćelije, potrebna je potvrda ovakvih zaključaka, obzirom da je veliki broj studija došao do zaključka da na kulturama ćelija DEHP značajno redukuje sekreciju insulina i dovodi do smrti beta ćelije. Mehanizam aktivacije apoptoze beta ćelije je pre svega oksidativni stres i smanjenje protektivnih sposobnosti ove ćelije. U niskim dozama, DEHP mogu da dovedu do proliferacije i povećanja količine insulina u humanim beta ćelijama. Iako ovo zvuči pozitivno, u dužem vremenskom periodu ipak dovodi do razvoja insulinske rezistencije. Mehanizam kojim ftalati menjaju beta ćelije je i dalje u ispitivanju, ali oksidativni stres koji nastaje pod uticajem ovih endokrinih disruptora se i dalje smatra najznačajnijim (126) (127) (128).

I naši rezultati su u saglasnosti sa navedenim radovima da MEHP utiče na glukoznu homeostazu. Pokazali smo da PCOS ispitanice sa prisutim MEHP u urinu imaju značajno više vrednosti glikemija u odnosu na ostale. Ipak, direktna korelacija između MEHP i glikemije nije potvrđena.

S druge strane, dobili smo suprotne rezultate kada je u pitanju MMP. Naime, ispitanice sa MMP imaju značajno niže vrednosti glikemija u odnosu na one bez ovog fetalnog metabolita. Ovakav rezultat se može objasniti hiperinsulinemijom ove grupa ispitanica, ali se i efekat drugi faktora ne mogu isključiti. S druge strane, potvrdili smo statistički značajnu pozitivnu korelaciju između MMP i glikemije na tašte, ali i pozitivnu korelaciju ovog fetalnog metabolita i insulinemije i HOMA indeksa. Ovakavi rezultati su u skladu sa rezultatima Lind i saradnika (129) koji su pokazali značajnu vezu između MMP i HOMA indeksa, ali i veću prevalencu dijabetesa kod ispitanika sa ovim fetalnim metabolitom. Agonistički efekat MMP na PPAR γ receptore može objasniti ovakav njegov efekat na parametre glikoregulacije, ali se ne može isključiti i efekat MMP na beta ćeliju u smislu stvaranja oksidativnog stresa.

5.3.3. Ftalati i leptin u PCOS

Sindrom policističnih jajnika, čest uzrok infertiliteta, karakteriše se hroničnom anovulacijom, hiperandrogenemijom, insulinskom rezistencijom i povećanom incidencom gojaznosti, a u poslednje vreme ga povezuju sa leptinom i njegovim receptorom.

Još 1997.godine Chapman i saradnici (130) su objavili svoj rad u kome su pokušali da nađu vezu između leptina i antropometrijskih i metaboličkih parametara kod bolesnica sa sindromom policističnih jajnika. Utvrdili su da postoji jaka pozitivna korelacija između nivoa leptina i BMI kod PCOS ispitanica, ali nije bilo statistički značajno u odnosu na korelacione odnose u kontrolnoj grupi. Takođe je potvrđena pozitivna korelacija sa HDL holesterolom. Nije pokazano da postoje korelacioni odnosi između leptina i polnih hormona, gonadotropina, insulina i insulinske rezistencije.

Za razliku od navedenih autora, naše istraživanje je pokazalo drugačije rezultate. Naime, korelacioni odnosi leptina i BMI se nisu razlikovali kako između PCOS grupa, tako između ovih

grupa i kontrolne grupe zdravih. Ipak, postojala je razlika u vrednosti leptina između PCOS ispitanica sa i bez ftalata kada se iz obe grupe izdvoje gojazne (sa TV <170 cm i TM >70kg). Uvrđeno je da ispitanice sa ftalatim metabolitima u urinu i istim antropometrijskim karakteristikama imaju značajno veće vrednosti leptina. Ovaj rezultat se može pripisati dejstvu nekog spoljašnjeg faktora, obzirom da je kod svih ispitanica dokazan PCOS.

Slično Chapaman - ovim rezultatima i naši su utvrdili pozitivnu korelaciju između leptina i HDL holesterola, ali u PCOS grupi ispitanica bez ftalata. Njihov odnos se menja kod ispitanica sa sindromom policističnih jajnika i ftalataima. Naime, pokazano je da sa povećanjem nivoa leptina dolazi do pada vrednosti protektivnog holesterola. Obzirom da obe grupe imaju PCOS, ovakva promena odnosa leptina i HDL holesterola se može pripisati faktoru spoljašnje sredine.

Veza leptina i insulinemije je još uvek kontravezna, a njihov odnos u sindromu policističnih jajnika nejasan.

S jedne strane, poznat je pozitivan uticaj insulina na nivo leptina naše, nezavisno od insulinske rezistencije i gojaznosti. Insulin povećava broj mRNA leptina u adipocitima, što može dovesti do njegove povećane sekrecije, tako da je hiperleptinemija sekundarna konsekvencija hiperinsulinemije. Sa druge strane, hiperleptinemija može dovesti do hiperinsulinemije. Leptinski receptori prisutni u pankreasu mogu uticati na sekreciju insulina. Leptin održava insulinsku senzitivnost masnog i nemasnog tkiva, prevenirajući esterifikaciju masnih kiselina u trigliceride kasnijom leptin zavisnom oksidacijom. In vitro studije su pokazale da leptin umanjuje fosforilaciju na insulinskom receptoru (IRS-1), dok povećava vezu IRS-1 i fosfatidilinozitol 3 kinaze. Takođe, leptin može antagonizovati neke aktivnosti insulina, a samim tim i igrati ulogu u nastanku gojaznosti indukovane insulinskom rezistencijom (131).

Više studija do sada je ispitivalo međusobni uticaj ova dva hormona i još uvek nije utvrđeno šta dolazi prvo - hiperinsulinemija kao rezultat insulinske rezistencije ili hiperleptinemija kao rezultat leptinske rezistencije. U objavljenom članku Romualdi i saradnika (132) terapija metforminom, iako smanjuje nivo insulina u krvi, ne dovodi do pada nivoa leptina kod gojaznih žena sa PCOS. Ovo je potvrdila i studija Sepilian i saradnika u kojoj je smanjenje insulinske rezistencije nakon terapije rosiglitazonom nije imalo uticaj na nivo ukupnog leptina (133).

Rezultati naše studije potvrđuju da postoji veza između leptina i insulina i da se ona razlikuje u grupi PCOS u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. Pokazana je pozitivna korelacija

između leptina i insulinemije u PCOS grupama, koja nije utvrđena u kontrolnoj grupi. Ipak, ova korelacija tj. da sa povećanjem nivoa leptina dolazi do povećanja insulinemije, je jača i statistički značajnija u grupi ispitanica sa sindromom policističnih jajnika i ftalatnim metabolitima. Obzirom da smo utvrdili da PCOS ispitanice kod kojih je verifikovan MMP imaju značajno više vrednosti leptina, kao i da postoji pozitivna korelacija MMP i leptinemije, možemo zaključiti da ispitanice sa ftalatima imaju hiperinsulinemiju kao posledicu povećanog lučenja leptina.

Leptin i insulin su povezani, a kakav je njihov odnos još uvek je nejasno. Veliki je broj faktora spoljne sredine koji može da remeti ovaj odnos.

Rezultati *in vitro* studije rađene na ženskim pacovima pokazuju da nakon izlaganja ženskih pacova PPAR agonistima, kao što su ftalati, paraebni i rosiglitazoni dolazi do značajnog smanjenja nivoa insulina, ali i leptina. Takođe je utvrđena redukcija telesne mase kod pacova izlaganim dibutil ftalatu, što može biti u vezi sa sniženjem nivoa leptina, obzirom da je leptin produkt masnog tkiva (134). I studija Toruner i saradnika je pokazala redukciju glikemije, insulinemije i leptinemije kod gojaznih pacova nakon izlaganja PPAR agonistima (135).

S druge strane veliki broj animalnih i *in vitro* studija pokazuje suprotne rezultate. Naime, pokazano je da ftalati i njihovi metaboliti menjaju PPAR- γ ekspresiju, što rezultuje promenama u diferencijaciji adipocita i povećanom oslobađanju leptina i adiponektina. Obzirom da su PPAR- γ u najvećem procentu prisutni na površini masnih ćelija i kontrolišu ekspresiju kako leptina tako i drugih faktora koji igraju ulogu u insulinskoj senzitivnosti, aktivacija ovih receptora ftalatima može uticati na metabolizam.

Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u srednjim vrednostima leptina između PCOS podgrupa i kontrolne grupe zdravih u našem istraživanju, pozitivna korelacija između ukupnih ftalatnih metabolita i leptina postoji i ona je signifikantna. Analizom pojedinačnih ftalata dobili smo da ispitanice sa MMP imaju najviše vrednosti leptina. Da li je pozitivna korelacija ukupnih ftalatnih metabolita i leptina posledica dejstva MMP ili su uključeni i drugi ftalati kao PPAR agonisti (pre svega MEHP), nismo dokazali. Poznato je da su ftalati, samim tim i MMP, aktivatori oksidativnog stresa, koji povećanjem markera lipidne peroksidacije i DNA oksidacije dovode do disregulacije adipocita i insulinske rezistencije. Možemo pretpostaviti da je ovaj mehanizam dejstva MMP odgovoran za povećano oslobađanje leptina i razvoja insulinske rezistencije.

Interakcija na nivou ćelije između gonadotropina, insulina i leptina je izuzetno kompleksna i pod uticajem faktora spoljašnje sredine. Poznato je da leptin inhibiše uticaj insulina na gonadotropin - stimulisanu steroidogenezu, ali i smanjuje glukozom indukovanu sekreciju insulina preko receptora u hipotalamusu. Srednje vrednosti serumskog testostosterona kod PCOS žena su značajno više u odnosu na zdrave žene. Ipak, kada se analizira nivo testostosterona u funkciji leptina, nema statistički značajne razlike u korelacijama između testostosterona i leptina u PCOS i kontrolnoj grupi. Visok nivo leptina, iako teoretski smanjuje steroidogenezu, kod PCOS bolesnica je udružen da povišenim vrednostima testostosterona (85).

Dosadašnja istraživanja pojedinačnih autora pokazala su suprotne rezultate. Studije Pehlivanov I saradnika, ali i drugih autora nisu potvrdili korelaciju između leptina i slobodnog testostosterona (84) (85), dok su studije Brzechffa I saradnika i Rouru I saradnika došle do pozitivnih korelacija između ova dva hormona (86).

Obzirom na ovako kontraverzne rezultate, pretpostavlja se da postoji još neki nedefinisani mehanizam koji leži u osnovi ovakve insulinom posredovane ovarijalno androgene produkcije.

U našem istraživanju iako su sve PCOS ispitanice imale značajno više vrednosti testostosterona u odnosu na zdrave žene, nije utvrđena korelacija između ovog hormona i leptina. Ovako heterogeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da je broj PCOS ispitanica sa hiperandrogenemijom bio mali, kao i da su korišćeni Roterdamski kriterijumi.

5.3.4. Ftalati i lipidi i lipoproteini seruma u PCOS

Sindrom policističnih jajnika, kao jedna od najčešćih endokrinopatija reproduktivnog doba karakteriše i metabolički sindrom koji dovodi do ozbiljnih posledica. Dislipidemija, uključujući povišen nivo LDL holesterola i triglicerida, kao i snižen nivo protektivnog HDL holesterola su često prisutni kod ovih bolesnica. Jasno je da gojaznost, insulinska rezistencija i hiperandrogenemija koje su prisutne u PCOS imaju nezavisne i interaktivne efekte na ovu dislipidemiju, ali tačan mehanizam njenog nastanka još uvek nije jasan. Veliki je broj faktora

spoljašnje sredine koji delujući dovode po poremećaja reprodukcije, ali i do metaboličkih poremećaja.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelaciju između ukupnih detektovanih ftalata u urinu i ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida. Iako postoji negativna korelacija između ukupnih ftalata i HDL holesterola, ona nije bila statistički značajna. Naši rezultati su u skladu sa nekim od malobrojnih istraživanja o vezi i uticaju ftalata na dislipidemiju kod ženskog pola. Studije na miševima (138) (139) su pokazale da subhronična ili hronična ekspozicija ftalatima dovodi do povećanog nivo triglicerida u serumu, što potvrđuje i istraživanje Hines i saradnika koji su utvrdili značajne pozitivne korelacije između MEHP, MECPP, MEHHP, MEOHP i triglicerida kod žena u reproduktivnom periodu. Međutim, akutno izlaganje DEHP i/ili di(n heksil) ftalatu kod glodara je udruženo sa smanjenjem nivoa triglicerida (140). I studija na pacovima dolazi do rezultata da je povremeno izlaganje DEHP 21 dan dovodi do smanjenja nivoa triglicerida (141). Očigledno je da doza i vreme ekspozicije značajno menjaju efekat ftalata na nivo triglicerida, ali ovakave studije na ljudima još uvek nisu rađene.

Uloga gojaznosti u nastanku dislipidemije kod PCOS se pre svega ogleda u povećanoj produkciji VLDL čestica i poremećajima u lipoprotein lipaza (LPL) posredovanoj lipolizi. Žene sa sindromom policističnih jajnika karakteriše pre svega visceralni tip gojaznosti koja za razliku od perifernog masnog tkiva poseduje izrazitu insulinsku rezistenciju i metaboliše masne kiseline lipolizom znatno brže. Pokazano da intraabdominalno visceralno masno tkivo doprinosi poremećajima u metabolizmu lipida čak i kod mršavih i normalno uhranjenih bolesnica.

Analizom korelacionih odnosa indeksa telesne uhranjenosti i triglicerida, dobijeni su statistički značajno različite vrednosti koeficijenta korelacije. Iako su srednje vrednosti BMI bile u referentnom opsegu u svim ispitivanim grupama, grupa PCOS ispitanica bez ftalata je imala najviše vrednosti ovog parametra sa najvećom standardnom devijacijom, što znači da je u ovoj grupi bilo gojaznih bolesnica. Ipak, odnos BMI i triglicerida u ovoj grupi se nije razlikovao u odnosu na odnos ova dva parametra u kontrolnoj grupi zdravih, normalno uhranjenih. Ali korelacioni koeficijent u PCOS pozitivnoj grupi, koja je imala niže vrednosti BMI sa manjom standardnom devijacijom od PCOS negativne grupe, se značajno razlikuje od koeficijenta kontrolne grupe. Ovo je u saglasnosti sa dosadašnjim literaturnim podacima da intraabdominalno visceralno masno tkivo doprinosi poremećajima u metabolizmu lipida čak i kod mršavih i normalno uhranjenih bolesnica sa sindromom policističnih jajnika.

Međutim, da samo PCO sindrom ne igra ulogu u poremećaju metabolizma masti pokazuje pozitivna korelacija BMI i triglicerida, koja je u PCOS negativnoj grupi statistički nesignifikatna, a u grupi PCOS sa ftalatima postaje izrazito jaka, te sa povećanjem BMI dolazi do značajno porasta triglicerida, kao i da postoji značajna razlika u navedenim korelacionim odnosima. Na ovaj način je potvrđen mogući uticaj ftalata na porast triglicerida. Analizom varijanse pojedinačnih ftalata, utvrdili smo da ispitanice sa MEP imaju značajno više vrednosti triglicerida u odnosu na sve druge PCOS ispitanice sa ftalatima, ali se zbog malog uzorka nije mogao ispitati njihov korelacioni odnos.

Da MEP povećava nivo triglicerida, ali i drugih lipida i lipoproteina potvrđeno je od strane Pereira i saradnika (139) koji su ispitivali uticaj različitih doza DEP na Wistar pacovima. Rezultati ove studije pokazuju da visoke koncentracije DEP dovode do mitohondrijalne proliferacije i akumulacije i povećanja glikogena, holesterola i triglicerida u jetri pacova, dok ekspozicija niskim dozama ovog ftalata rezultuje hepatocelularnim promenama što dovodi do povećanja volumena jetre, ali i povećanja aktivnosti jetrenih enzima i posledično remećenje metabolizma glikogena, holesterola i triglicerida.

Do poremećaja metabolizma lipida MEP može dovesti povećanjem BMI i OS tj povećanjem visceralne gojaznosti, ali se ne može isključiti i njegova efekat na lipoprotein i hepatičku lipazu. Iako je dokumentovano da polni hormoni regulišu LPL aktivnost, nije u potpunosti jasno na koji način se to odvija. Kod gojaznih žena, postprandijalna aktivnost LPL pozitivno korelira sa slobodnim testosteronom u plazmi, dok je ova korelacija kod žena sa PCOS negativna (142).

Anderson i saradnici (143) su ispitivali uticaj androgena na LPL aktivnost koristeći adipocite subkutanog masnog tkiva žena. Dihidrotestosteron je stimulisao LPL aktivnost, dok je flutamin, antagonist androgena, imao negativan uticaj.

Obzirom na navedeni uticaj testosterona na aktivnost LPL u PCOS, kao i rezultate studije Huanga i saradnika (144) da DEP negativno korelira sa ovim hormonom, možemo zaključiti da ovaj ftalat dovodi do povećanja aktivnosti LPL što ima za posledicu povećanje slobodnih masnih kiselina i dalje uz hiperinsulinemiju i insulinsku rezistenciju povećanu produkciju triglicerida ali malih aterogenih molekula LDL.

Takođe je poznato da di-etil ftalat kao i njegov metabolit (MEP) može delovati kao agonista PPAR γ receptora, što dovodi po razvoja insulinske rezistencije, a insulinska rezistencija

svakako doprinosi dislipidemiji kod gojaznih. Na koji način IR dovodi do poremećaja lipidnog statusa u PCOS bila je tema ispitivanja većeg broja studija, obzirom da oko 81% bolesnica sa PCOS pokazuje neke lipidne poremećaje. Hiperprodukcija VLDL –apo B u jetri je se smatra glavnu vezi između insulinemije i hipertrigliceridemije. Prisustvo povećane količine triglicerida i, u manjoj meri, holesterola u kombinaciji sa povećanom ekspresijom mikrozomalnog proteina triglicerida (*microsomal triglyceride transfer protein* - MTP) favorizuje sekreciju apo B, a samim tim i produkciju VLDL. Insulin akutno smanjuje MTP mRNA transkripciju i nivo proteina (145). U hroničnoj hiperinsulinemiji i insulinskoj rezistenciji, na animalnom modelu, ekspresija MTP je povećana, što dovodi do povećane produkcije VLDL-a (146). Takođe, insulinska rezistencija može dovesti do smanjenog efekta insulina na lipoprotein lipazu, što smanjuje klirens triglicerida i dovodi do dislipidemije u sindromu policističnih jajnika.

Na ovaj način je objašnjen mogući indirektni uticaj MEP na povećanje triglicerida, ali i ukupnog holesterola i LDL holesterola kod žena sa PCOS. Međutim, nije isključena uloga i drugih verifikovanih ftalata, tj ftalatnih metabolita. Kakav efekat DEHP tj njegov metabolit MEHP ima na lipidni status pokazano je na animalnim studijama i to uglavnom pacovima muškog pola.

Jia i saradnici (147) su 2016. godine objavili rezultate svog istraživanja vršenog na Wistar pacovima muškog i ženskog pola. Podelom u četiri grupe i izlaganjem pacova dozama od 0, 5, 50 i 500 mg/kg/d DEHP dobijeni su različiti efekti na lipidni status. Nakon 4 nedelje određivani nivoi lipida i lipoproteina seruma pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika u nivou triglicerida između grupa. Nivo holesterola u grupi izloženoj dozi od 500 mg/kg/d je pokazao značano više vrednosti u odnosu na vrednosti holesterola u grupi izloženoj 5mg/kg/d DEHP i kontrolnoj grupi. Takođe, nivo serumskog LDL u grupi sa najvećom dozom DEHP je bio značajno veći u odnosu na vrednosti drugih grupa. Ali, i HDL holesterol je bio najviši u grupi izloženoj 500mg/kg/d u odnosu na kontrolnu. Autori ovakav rezultat objašnjavaju efektom DEHP na mRNA i proteine JAK3 i STAT5 i to povećanjem njihovog nivoa i u jetri i u adipocitima, ali i inhibicijom u jetri i aktivacijom u masnom tkivu. U jetri, dolazi do smanjene ekspresije lipogenih gena, što dovodi do redukcije sposobnosti jetre za sintezu i sprovođenje lipolize. S druge strane, ekspozicijom DEHP JAK/STAT put u adipoznom tkivu se povećava nivo i akumulacija triglicerida. Sve ovo rezultuje redukovanjem hidrolize lipida promovišući akumulaciju triglicerida.

I studije na mužjacima pacova su u skladu sa prethodnim istraživanjem, ali obzirom na pol, nismo tražili vezu sa našim istraživanjem.

Polni hormoni takođe imaju ulogu u metabolizmu masti u PCOS. Androgeni mogu uticati i na nivo LDL holesterola. Interakcijom sa androgen receptorom (AR), ovi hormon smanjuju uklanjanje LDL-a otežavajući aktivnost LDL receptora (LDLR), što ima za posledicu porast aterogenog LDL holesterola (148). Ovakav efekat na LDLR androgeni imaju samo u prisustvu ER. Kakva je interakcije između AR I ER još nije utvrđeno. Jedan od mogućih mehanizama je direktna interakcija i blokiranje ER androgen receptorom, a drugi je postojanje nekog kofaktora. Ne možemo isključiti da neki ftalati imaju ulogu ovog kofaktora.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je kod ispitanica sa najvišim vrednostima ukupnog holesterola i LDL holesterola u najvećem procentu verifikovan MEHP. Ne možemo reći da je ovo posledica gojaznosti, obzirom da je mali broj njih imao BMI veći od 25kg/m². Ono što se izdvaja je definitivno prisutna hiperandrogenemija kod ovih ispitanica, kao i hiperinsulinemija, ali ne u svim slučajevima. Na osnovu navedenog možemo pretpostaviti da DEHP ima uticaj na porast ukupnog holesterola i LDL holesterola kod ispitanica sa PCOS, a da svoj efekat može ispoljiti na dva načina: hiperandrogenemijom, delujući na LDL receptor, ali i dovodeći do insulinske rezistencije.

Da su hipertrigliceridemija i hiperholesterolemija u jakom korelacionom odnosu kod ispitanica sa PCOS i ftalatima potvrđeno je našim rezultatima. Iako je pozitivna korelacija navedena dva parametra bila prisutna i kod PCOS ispitanica bez ftalata, ova veza nije bila jaka i uvrđena je statistički značajna razlika u koeficijentima korelacije između PCOS pozitivnih i negativnih ispitanica. Već smo objasnili mogući mehanizam dejstva MEP koji bi mogao da doprinese dislipidemiji kod naših ispitanica. Međutim, pojedinačnom analizom korelacionih odnosa ispitivanih ftalatnih metabolita i svih određivanih parametara, jedino smo direktnu, značajnu korelaciju utvrdili između MMP i ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida. Dobijena značajna korelacija između MMP i LDL holesterola je potvrđena i od strane Olsen i saradnika (149), a nisu nam poznati drugi literaturni navodi o vezi ovog ftalatnog metabolita i triglicerida i holesterola. Međutim, potvrđena je povezanost MMP i glikemije, tako se može pretpostaviti mehanizam dejstva ovog ftalata na povećanje vrednosti triglicerida.

Nismo utvrdili vezu između ispitivanih ftalatnih metabolita i HDL holesterola. Posmatrajući pojedinačno ispitanice, vidimo da one sa najvišim vrednostima HDL holesterola

imaju u najvećem procentu prisutan DEHP što je u skladu sa istraživanjem Jia i saradnika (147). Ali, ove ispitanice imaju i najniže vrednosti BMI, tako da se ne može isključiti i faktor fizičke aktivnosti, obzirom da su one sa najnižim vrednostima HDL-a gojazne. Ali niska vrednost HDL holesterola može biti i posledica povišenog nivoa testosterona kod ovih bolesnica.

Metabolizam HDL holesterola je kompleksan i uključuje enzime za remodelovanje HDL-a, proteine za transport i receptore na površini ćelije. Svaki od ovih procesa može biti mesto delovanja androgena. Efekti testosterona se uglavnom pripisuju povećanoj aktivnosti gena koji su uključeni u katabolizam HDL-a, a zaduženi su za *scavenger receptor B1* (SR-B1) i hepatičku lipazu (HL). SR-B1 učestuje u selektivnom preuzimanju holesterola iz HDL lipoproteina od strane hepatocita i steroidogenih ćelija, ali i u preuzimanju holesterola iz perifernih ćelija, uključujući makrofage. Na taj način dolazi do eliminacije holesterola žučnim putevima ili se koristi za sintezu steroidnih hormona. Studija na miševima, pokazala je da povećana ekspresija Sr-B1 na hepatocitima dramatično redukuje nivo HDL holesterola (150). Testosteron dovodi do doznno zavisne upregulacije Sr-B1 i na kulturama HepG2 hepatocita i primarnim humanim monocitnim makrofagima, što vodi smanjenju protektivnog holesterola (151).

Obzirom na povećane vrednosti ukupnog testosterona, kod ispitanica sa niskim nivoima HDL holesterola ne možemo isključiti navedeni efekat androgena. Obzirom na značajnu pozitivnu korelaciju između MMP i ukupnog testosterona, ne možemo isključiti efekat ovog ftalatnog metabolita na sniženje vrednosti HDL holesterola.

5.3.5. Ftalati i kardometabolički rizik u PCOS

Pored ispitivanja uticaja endokrinih disruptora na razvoj, reprodukciju i endokrini sistem uopšte, potvrđeno je da ove supstance mogu imati uticaj i na nastanak kardiovaskularnih bolesti i to pre svega povećanjem faktora kardiovaskularnog rizika.

U proceni kardiomataboličkog rizika kod naših ispitanica koristili smo dva klinička indexa- *lipid accumulation product* (LAP) indeks i *visceral adiposity index* (VAI). Ovi indeksi se smatraju reprezentativnim prediktorima u nastanku metaboličkog sindroma, kardiovaskularnih bolesti i tipa 2 šećerne bolesti. Potvrđena je pozitivna korelacija između ukupnih ftalatnih metabolita sa LAP i VAI indeksom, što znači da ispitanice sa PCOS i ftalatima imaju povećan kardiomatabolički rizik. Analizom pojedinačnih ftalata, utvrdili smo da ispitanice sa MEP imaju

statistički značajno više vrednosti VAI indeksa u odnosu na PCOS ispitanice sa drugim fталatnim metabolitima. Iako je i vrednost LAP najviša u grupi sa MEP-om, razlika nije bila statistički značajna. Imajući u vidu navedene rezultate možemo pretpostaviti da MEP najviše doprinosi povećanom kardiometaboličkom riziku kod žena sa PCOS, ali njihov korelacioni odnos nije bilo moguće utvrditi zbog malog broja ispitanica sa ovim fталatnim metabolitom.

Malobrojne su studije koje su pokušavale da utvrde vezu između fталata i LAP i VAI indeksa i one su uglavnom vršene na muškarcima. Rezultati ovih studija potvrđuju naše rezultate, tj. da MEP dovodi po povećanja oba indeksa kardiometaboličkog rizika (152) (153).

Međutim, analizom korelacionih odnosa MMP i indeksa kardiometaboličkog rizika, utvrdili smo pozitivnu povezanost ovog fталatnog metabolita sa LAP i VAI. Ovakav rezultat se može objasniti značajnom vezom između MMP sa obimom struka i lipidima i lipoproteinima seruma kod naših ispitanica. Nisu nam poznati literaturni podaci o vezi MMP sa indeksima kardiometaboličkog rizika.

5.3.6. Fталati i gonadna osovina u PCOS

Endokrini disruptori su egzogene supstance koje imaju sposobnost da interferiraju sa procesima regulisanim od strane endogenih hormona. Jedan od tih procesa je i reproduktivna funkcija, a glavni polni organ žene je ovarijum. EDC delujući na fiziološke procese u ovarijumu dovode do anoovulacije, infertiliteta, deficijencije estrogena i prevremene menopauze. Mehanizam dejstva ovih supstanci na reprodukciju se ogleda u promenama u vezivanju hormona za receptore i njihovoj aktivaciji. Na ovarijumu su prisutni kako steroidni (estrogenski, progesteronski i androgeni) i gonadotropni receptori (FSH i LH), tako i orphan receptori (aril hidroksikarbon receptor – AhR). Steroidni hormonski receptori, kao i AhR su ligand-zavisni transkriptorni faktori koji se vezuju za DNA i kontrolišu ekspresiju gena. S druge strane, LH i FSH receptori su G protein strukture i deluju na ćeliju, aktivirajući signalni put preko sekundarnog mesendžera. Veliki je broj studija koje ukazuju na ovotoksičnost supstanci iz životne sredine, a najveći broj je fokusiran na efekat EDC na estrogen, androgen i AhR (61).

Fталatni estri su klasa sintetskih supstanci rastvorljivih u mastima, koji su široko rasprostranjeni u životnoj sredini. Nekoliko grupa autora je dokumentovala sposobnost fталata da

dovedu do poremećaja reproduktivne funkcije, a veliki broj njih je ukazalo na činjenicu da je DEHP jedan od najtoksičnih ftalata po reproduktivni sistem. Xu i saradnici su svojom studijom na ženka pacova potvrdili ranije opisane efekte ovog ftalata. U svom istraživanju, davali su DEHP i bezopiren per os, pojedinačno i u kombinaciji. Utvrdili su da oba endokrina disruptora imaju indirektni toksični efekat na rast i razvoj folikula i oocite, da povećavaju oslobađanje citohroma C koji dovodi do oštećenja mitohondrija granuloza ćelija, a nakon toga na direktan ili indirektan način do apoptoze ili nekroze ovih ćelija. Takođe je verifikovana uloga ovih EDC na aktivaciju PPAR signalnih puteva i smanjivanje ekspresije citohroma P450, što ima za posledicu poremećaj balansa između polnih hormona (154). Kod miševa, DEHP, ali i njegov metabolit MEHP inhibišu rast antralnog folikula, redukuju in vitro produkciju E₂ i smanjuju ekspresiju citohrom P450 19A1 – aromataze (CYP19A1) (155). U izolovanim malim antralnim folikulima miševa, MEHP dovodi do povećane inaktivacije konverzije estradiola u estron i prevremene sinteze progesterona (156).

Ekspozicijom odraslih ženki pacova DEHP, dolazi do supresije preovulatorne produkcije estradiola od strane granuloza ćelija, što ima za posledicu sekundarno povećanje FSH i onemogućava skok LH neophodan za ovulaciju (1507). Takai i saradnici su 2009 godine objavili studiju kojom su potvrdili da MEHP, metabolit DEHP, dovodi do atrezije oocite, suprimira sekreciju estradiola i ovulaciju kod ženki pacova (158). MEHP takođe dovodi do redukcije veličine preovulatornog folikula i suprimira razvoj folikula (159).

Iako je najveći broj studija fokusirano na efekte DEHP i njegovog metabolita MEHP, postoje pojedinačna istraživanja koja potvrđuju uticaj i drugih ftalata na reproduktivni sistem. Tako su, Mlynarcikova i saradnici u svom istraživanju pokazali da di-okcil ftalat (DOP), diizodecil ftalat (DiDP) i diizononil ftalat (DiNP) poseduju sposobnost endokrine disrupcije, obzirom da povećavaju produkciju progesterona u granuloza ćelijama (160).

Testikularna, hepatička i ovarijalna ekspresija PPAR alfa i gama receptora je poslednjih godina u žiži ispitivanja, obzirom na moguće toksične efekte ftalata kao PPAR antagonista. In vitro ispitivanje na pacovima nakon izlaganja DiBP, pokazalo je povećanje mRNA aromataze u ovarijumima i produženje anogenitalne distance, što može dovesti do maskulinizacije kao smanjene konverzije testosterona u estradiol. Maskulinizacija, kao i promene u nivou insulina i leptina nakon izlaganja DiBP pacova ženskog pola, Bomberg i saradnici (136) navode kao moguću vezu između ekspozicije ftalatima i nastanku PCOS. Ali, da li će doći do razvoja ovog

sindroma, zavisi od životne dobi jedinke, obzirom da se fetalni period smatra najvulnerabilnijim od strane ovih autora. I Manikkam je u svom istraživanju publikovanom 2013.godine potvrdio da izlaganje DBP, DEHP i BPA tokom gestacije pacova, dovodi do značajno veće incidence javljanja PCOS kod prve i treće generacije potomaka. Ali ova studija nije utvrdila da li je ovakav rezultat posledica zajedničkog efekta tri EDc ili samog DBP (161).

Pored navedenih mogućih efekata DEHP, pojedina ispitivanja na pacovima su pokazala da ovaj ftalat može imati uticaj i produkciju gonadotropina. DEHP tretirani nezreli pacovi nakon oralne ekspozicije pokazuju povećanu produkciju LH, dok je vrednosti serumskog progesterona i estradiola bila snižena (162). S druge strane, u studijama prepubertalnih pacova nakon inhalatorne ekspozicije DEHP dolazi do skoka LH, ali i holesterola i estradiola u serumu, kao i povećane ekspresije aromataze u ovarijumu (163). Ovakve razlike u dobijenim rezultatima su najverovatnije posledica drugačijeg eksperimentalnog pristupa, dužine i doze ekspozicije. Diskrepanca u nivou steroidnih hormona po uticajem ftalata je definitivno zavisna i od puta unošenja u organizam. Pored načina unošenja, vreme takođe utiče na ishod njihovog delovanja. Time se objašnjava da prepubertalno izlaganje životinja ftalatima povećava nivo CYP19- aromataze, a *in utero* ekspozicija smanjuje.

Da doza ftalata utiče na ishod reproduktivnog poremećaja, pokazale su i druge studije. Grupa japanskih autora je u svom istraživanju na kulturama ovarijalnih folikula pacova koje je izlagala sa dve doze MEHP (10-30ug/ml i 100 ug/ml) pokazala bifazične efekte ovog ftalata na sintezu steroidnih hormona. Pri izloženosti od 10ug/ml MEHP, dolazi do supresije rasta i razvoja folikula, što je udruženo sa smanjenom izdržljivošću i apoptozom granulosa ćelija. Pri ovoj koncentraciji MEHP nivo progesterona raste, dok je sinteza androstendiona, testosterona i estradiola smanjena. S druge strane, pri izloženosti folikula sa 10-30ug/ml MEHP, nema supresije folikulogeneze i apoptoze ćelija, a nivo steroidnih hormona raste. Ovakav porast sinteze hormona je najverovatnije posledica aktivacije sintetičkog puta od holesterola do estradiola, uključujući de novo sintezu holesterola (164).

I španaski autori dolaze do sličnih zaključaka. U studiji na oocitima fetalnih miševa, nakon izlaganja višim dozama MEHP (70-140ug/ml) dolazi do selektivnog oštećenja lanca Krebsovog ciklusa u mitohondrijama germinativnih i somatskih ćelija ovarijuma, što ima za posledicu oštećenje ovih ćelija i menjanje ovulatornog ciklusa (164).

Pored *in vivo* i *in vitro* ispitivanja uticaja ftalata na životinjama, pokazan je i njihov efekat na steroidogenezu na humanim kulturama izolovanih ovarijalnih ćelija.

Ispitivanja na humanim granulosa-luteinskim ćelijama, nakon izlaganja MEHP, pokazuju da ovaj ftalat suprimira bazalnu, ali i FSH-, hCG – i 8Br-cAMP – stimulisanu produkciju estradiola, kao i da smanjuje aktivnost aromataze (166).

24 h ekspozicija ćelija žutog tela ftalatima- DEHP, DBP i BBP smanjuje bazalnu i gonadotropin stimulisanu sekreciju progesterona. Zajedno, DEHP, DBP i BBP smanjuju sekreciju prostaglandin E2, kao i prostaglandina E2 α , inhibišući na taj način oslobađanje vaskularnog faktora rasta od strane ćelija žutog tela. Na ovaj način dolazi do smanjenja izdržljivosti žutog tela (167).

Druge studije pokazuju efekte ftalata na humanim granulosa ćelijama. Izlaganjem BBP ovih ćelija, dolazi do povećanja mRNA i nivoa proteina aril hidrokarbon receptora, ARNT i citohroma P450 1B1, koji su uključeni u metabolizam estradiola, rezultujući smanjenjem izdržljivosti ćelije i produkcijom estradiola. Uopšteno gledano, ftalati kao endokrini disruptori dovodi do poremećaja u steroidogenezi humanih ovarijalnih ćelija smanjujući nivo steroidnih hormona i njihovih enzima, kao i u *in vitro* animalnim studijama (168).

Poznati su hormonski disbalansi koji postoje u sindromu policističnih jajnika, a kao njihova posledica poremećaj u rastu folikula, te odsustvo ovulacije. Hiperandrogenemija koja se javlja u ovom sindromu posledica je neadekvatne konverzije androstendiona i testosterona u estradiol, a tačan mehanizam ovog patofiziološkog poremećaja još uvek nije u potpunosti objašnjen.

Navedeni literaturni podaci o ED_C, mogu se dovesti u vezu sa patofiziologijom PCOS. Naime, veliki broj dosadašnjih studija na životinjama je dokumentovalo efekte, pre svega DEHP i MEHP na ovarijalnu steroidogenezu. Potvrđen je mogući uticaj ftalata na folikulogenezu u smislu inhibicije rasta folikula, a poznato je da nedovoljan rast folikula u PCOS, bez izdvajanja dominantnog, vodi anovulaciji. S druge strane, smanjivanje ekspresije aromataze (CYP19A1) dovodi do smanjenja konverzije testosterona u estradiol u granulosa ćelijama, što može biti uzrok povišenog testosterona kod bolesnica sa PCOS.

Anovulatorni ciklusi kod PCOS bolesnica, onemogućavaju stvaranje žutog tela koje luči inhibin, te je negativna povratna sprega ovarijum-hipofiza-hipotalamus (*hypothalamus-pituitary-ovary axis*- HPO) narušena. U narušavanju fiziologije HPO osovine, takođe mogu uticaj imati ftalati. U *in vitro* i *in vivo* istraživanjima, pokazano je da ftalati, pre svega DEHP, smanjuju sekreciju

estradiola, koji je jedan od glavnih inhibitora lučenja LH. Povišen nivo LH kod sindroma policističnih jajnika, može biti posledica ovakvog delovanja DEHP.

Pored inhibitornog efekta na sekreciju estradiola, pokazano je da pojedini ftalati imaju *estrogen-like* karakteristike, tj deluju kao analozi estrogena. Poznat je hormonski disbalans u sindromu policističnih jajnika. Naime, visoke vrednosti estrogena, dovode do stimulacije hipotalamusa i sekrecije GhRH, koji utiče na povećano oslobađanje LH. S druge strane, konstantan stimulus estrogena inhibiše oslobađanje FSH. Najčešće korišćeni, DEP, DBP i DEHP, imaju aromatičnu grupu u svojoj strukturi i pokazuju estrogen-like efekte. Na ovaj način se takođe može objasniti moguć uticaj ovih supstanci na mehanizam nastanka PCOS.

Da ftalati imaju *estrogen-like* karakteristike, ali i da mogu smanjiti produkciju estradiola pokazuju i naši rezultati.

Posmatrani ukupni ftalatni metaboliti, nisu pokazali značajnu korelacionu vezu sa gonadotropnim hormonima, iako je ona bila negativna. Ovakav rezultat može biti posledica antagonizujućeg međusobnog efekta ftalata, obzirom da je odnos gonadotropnih hormona u grupi ispitanica sa ftalatinim metabolitima u urinu bio značajno veći u odnosu na one bez ftalata. Takođe, pojedinačnom analizom ftalata, pokazali smo da ispitanice sa MEP imaju značajno više vrednosti FSH i LH, što se može objasniti dosadašnjim literaturnim podacima o mehanizmu dejstva MEP tj njegovim estrogen like karakteristikama.

Antralni folikuli su glavni u produkciji polnih steroidnih hormona. Dosadašnja *in vivo* i *in vitro* istraživanja su pokazala pojedinačni uticaj ftalata na produkciju ovih hormona od strane antralnog folikula i to pre svega uticaj MEHP preko PPAR receptora. Samo je jedna studija, objavljena 2017. godine od strane američkih autora (169) pokazala da kombinacija različitih ftalata smanjuje rast antralnog folikula, indukuje fragmentaciju oocite i ima negativan uticaj na steroidogenezu. Naime, kombinacija ftalata značajno redukuje ekspresiju estrogen 1 receptora, što vodi smanjenju proliferacije folikularnih ćelija. Pod uticajem ftalata takođe dolazi do redukcije ekspresije FSH receptora, što smanjuje proliferaciju granulosa ćelija, ali i produkciju polnih hormona. Ftalati zajedno, redukuju steroidogenezu i preko PPARs receptora.

Rezultati našeg istraživanja nam omogućavaju da indirektno potvrdimo rezultate *in vitro* studija i to da ftalati posmatrani ukupno, ali i pojedinačno imaju uticaj na steroidogenezu. Negativna, nešto jača korelacija, ali statistički nesignifikatna, utvrđena je i između ukupnih ftalata i estradiola, dok pojedinačnom analizom nismo utvrdili koji ftalat ima najveći uticaj na

sniženje ovog hormona. Ovakav nesignifikantan rezultat je najverovatnije posledica malog broja ispitanica. Ipak, možemo pretpostaviti da je sniženje estradiola posledica delovanja MEHP, obzirom na dosadašnje *in vivo* i *in vitro* studije koje su pokazale uticaj ovog ftalata na smanjenje ekspresije gena za aromatazu u granulosa ćelijama i direktan negativan uticaj na ovaj enzim.

Da ftalati mogu imati uticaj na sniženje estradiola, pokazano je i razlikom u korelacionim odnosima leptina i estradiola. Poznato je da estrogen indukuje produkciju leptina, dok je androgeni suprimuju. Literaturni podaci takođe ukazuju na direktan uticaj leptina na aktivnost 17- α hidrosilaze, koja ima ulogu i u ovarijalnoj i u adrenalnoj steroidogenezi (170). Takođe je utvrđeno prisustvo leptinskih receptora na granulosa i teka ćelijama ovarijuma, a *in vitro* stimulisanje ovih receptora leptinom dovelo je značajne redukcije steroidne produkcije i to sa povećanjem doze leptina dolazi do značajnog pada estradiola (171).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju različite odnose estradiola i leptina u PCOS grupama. U grupi bez ftalata ovaj odnos je bio pozitivan, dok su ispitanice sa ftaltnim metabolitima u urinu pokazale da sa povećanjem leptina dolazi do sniženja vrednosti estradiola. Analizom varijanse pojedinačnih ftalata utvrđeno je da ispitanice sa MMP imaju značajno više vrednosti leptina u odnosu na druge PCOS pozitivne. Do sada nije pokazana veza između MMP i reproduktivne disfunkcije i utvrđeno je da MMP nema estrogen like karakteristike (172). Ipak, poznato je da ovaj ftalat kao i drugi dovodi do oksidativnog stresa koji ima uticaj na disregulaciju adipokina i posledično povećanu produkciju leptina. Ako se oslonimo na istraživanje Spicera i saradnika koji su pokazali da velika doza leptina antagonizuje insulin stimulisanu steroidogenezu i smanjuje lučenje estradiola, a da ftalati mogu imati ulogu u povećanju nivoa leptina kod žena sa sindromom policističnih jajnika, možemo zaključiti da je ovo jedan od mogućih efekata ovih endokrinih disruptora.

Malo je studija na ljudima koje su pokušale da pronađu vezu između ftalata i sindroma policističnih jajnika.

Hart i saradnici su u svojoj studiji rađenoj 20 godina, pokušali da potvrde hipotezu da prenatalna ekspozicija ftalatima dovodi do ranije menarhe i povezana je sa nižom incidencom javljanja PCOS kod adolescenata. U istraživanje je uključeno 3000 trudnica (18 i 34 GN) čiji serum su zamrznuti na -80 C i čuvani 20 godina i 244 potomaka - adolescentkinja uzrasta 14-16 godina. Rezultati ove studije su utvrdili visoke vrednosti MEP, ali ne i drugih ftalata. Koncentracije MEP su negativno korelirale sa javljanjem PCOS u adolescenata, što može

ukazivati na protektivni efekat ftalata na razvoj ovog sindroma, ali su bile u pozitivnoj korelaciji sa ranijim javljanjem menarhe, procesom koji je strogo kontrolisan od strane polnih hormona (69). U drugoj studiji, koncentracija metabolita DEHP, MEHP i MEHOP, kod majki je bila u negativnoj vezi sa slobodnim testosteronom i odnosom estradiol/testosteron, kod ženske novorođenčadi (173). Slično ovim rezultatima, nivo metabolita nekoliko ftalata u urinu je bio udružen sa smanjenjem ukupnog testosterona u serumu kod žena 6-20 godina i 40-60 godina koje su učestvovala u *National Health and Nutrition Examination Survey*. U studiji pod nazivom *Study for Future Families*, koncentracije metabolita DEHP i DBP u urinu trudnica potvrđena je veza između ovih ftalata i smanjenja nivoa testosterona u serumu (174). Kontraverzno ovim rezultatima, u *Mexico City birth cohort* studiji, in utero ekspozicija MEP i MBzP dovodi do povećanja serumskog testosterona kod devojčica od 8-13 godina (175). Koncentracija MEHP i MbzP u urinu kod 8-godišnjih devojčica sa Tajvana u pozitivnoj je korelaciji sa povećanjem serumskog progesterona, dok MBzP i MBP su udruženi sa povećanjem FSH (176).

Studija Xu i saradnika, koji su ispitivali efekte i vezu DEP, DBP i DEHP sa polnim hormonima u PCOS, pokazala je znatno veće koncentracije DEP i DBP u grupi ispitanica sa PCOS u odnosu na kontrolu grupu. Ipak, direktna korelaciona veza između ispitivanih ftalata i estradiola, FSH, LH i testosterona nije pronađena (170). Za razliku od ovog autora, ispitivanje Huang i saradnika je pronašlo pozitivnu korelacionu vezu između DBP i estrogena, kao i negativnu između DEP i testosterona (144).

Iako nismo određivali nivo slobodnog testosterona, rezultati naše studije pokazuju jaku korelacionu vezu između ukupnih ftalatih metabolita i ukupnog testosterona. Pokazali smo da sa povećanjem količine ftalata dolazi do značajnog porasta nivoa testosterona, što možemo pripisati efektu MMP obzirom na njegovu pozitivnu korelaciju sa ovim hormonom. Ipak, ne možemo isključiti i efekat drugih ftalata (zbog malog broja ispitanica nismo mogli raditi korelacionu analizu). Do sada je pokazan direktni/indirektni negativni efekat MEHP na aromatazu, što ima za posledicu povećano oslobađanje testosterona. Posmatrano pojedinačno, ispitanice sa prisutnim MEHP su imale najviše vrednosti testosterona, te se ne može isključiti efekat ovog ftalalnog metabolita na povišene vrednosti testosterona kod naših ispitanica.

Pored navedenih receptora koji su jedno od ključnih mesta za delovanje ftalata, sve više se govori i uticaju AhR, koji je ligand aktivirani nuklearni transkriptor prisutan u ovarijalnom tkivu,

uključujući oocitu, granulosa i teka ćelije. On igra jednu od ključnih uloga u regulaciji rasta folikula i steroidogenezi. U studijama rađenim na PCOS ispitanicama, potvrđen je negativan uticaj organskih zagađivača i njihov mogući mehanizam u patofiziologiji razvoja ovog sindroma. Ograničenje ovih studija se ogleda u nemogućnosti isključenja drugih spoljašnjih faktora, a obzirom da je AhR receptor jedno od mesta delovanja ftalata, ne može se u potpunosti ovakav patofiziološki poremećaj pripisati samo organiskim zagađivačima (178).

6. ZAKLJUČCI

1. U urinu 51% ispitanica sa sindromom policističnih jajnika utvrđen je jedan ili više ftalatnih metabolita, što potvrđuje da su žene u reproduktivnom periodu, u našoj sredini, izložene ftalatima.
2. Najčešći ftalati metaboliti verifikovani u urinu naših ispitanica su bili MEHP i MMP, MEP, MPP i MOP.
3. Ispitanice sa PCOS su imale najveće koncentracije MEHP i MEP, čime je potvrđeno da je naša populacija najviše izložena ftalatima DEHP i DEP.
4. Kod ispitanica sa PCOS pokazana je značajna pozitivna korelacija ukupnih ftalatnih metabolita sa BMI i obimom struka. Takođe je pokazano da su gojazne ispitanice imale prisutne ftalatne metabolite male molekularne mase (MEP i MMP) u urinu, dok je kod normalno uhranjenih bio prisutan MEHP (ftalat velike molekularne mase). Potvrđena je direktna značajna povezanost MMP sa obimom struka.
5. Kod ispitanica sa PCOS pokazana je značajna pozitivna korelacija ukupnih ftalatnih metabolita sa sa glikemijom, insulinemijom naše i HOMA-IRI. Takođe je utvrđena statistički značajna pozitivna korelacija između MMP i parametara glukoznog metabolizma.
6. Potvrđena je značajna pozitivna korelacija između ukupnih detektovanih ftalatnih metabolita i leptina. Kod ispitanica sa MMP utvrđene su najviše vrednosti leptinemije, ali pozitivna korelacija MMP i leptina nije bila statistički značajna.
7. Povrđena je značajna pozitivna korelacija između ukupnih detektovanih ftalatnih metabolita sa ukupnim holesterolom, LDL holesterolom i trigliceridima. Direktna, značajna pozitivna korelacija je pokazana između MMP i ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida.
8. Statistički značajna pozitivna korelacija pokazana je između ukupnih detektovanih ftalatnih metabolita i indeksa kardiometaboličkog rizika (LAP i VAI). Ftalat koji najviše doprinosi povećanju kardiometaboličkog rizika je MMP, što je pokazano značajnom pozitivnom korelacijom ovog ftalatnog metabolita i LAP i VAI indeksa, ali se ne može isključiti efekat drugih ftalatnih metabolita.

9. Iako nije pokazana korelacija između ukupnih ftalatnih metabolita i gonadotropnih hormona FSH i LH, utvrđeno je da ispitanice sa MEP u urinu imaju najviše vrednosti gonadotropina kao i najveću razliku odnosa ovih hormona.
10. Nije utvrđen direktan uticaj ukupnih i pojedinačnih ftalatnih metabolita na estradiol.
11. Potvrđena je značajna pozitivna korelacija između ukupnih detektovanih ftalatnih metabolita i testosterona. Između MMP i testosterona je takođe postojala statistički značajna povezanost.

7. SKRAĆENICE

FSH- folikulostimulišući hormon (*Follicule stimulating hormone*)

LH - lutenizujućeg hormona (*Luteinizing hormone*)

GnRH - gonadotropin oslobađajućeg hormona (*Gonadotropin-releasing hormone*)

PCOS - Sindrom policističnih ovarijuma (*Polycystic ovarian syndrome*)

SHBG - seksualni steroid vezujućiglobulin (*Sex hormone-binding globulin*)

DHEAS - dihiroepiandroestendion sulfat (*Dehydroepiandrosterone*)

IGT - poremećena tolerancija glukoze (*Impaired glucose tolerance*)

OGTT –test oralne tolerancije glukoze (*oral glucose tolerance test*)

LAP - *Lipid accumulation product* index

BMI - indeks telesne uhranjenosti (*body mass index*)

VAI - *Visceral adiposity index*

OS - Obim struka

EDc - endokrini disruptori

Ers – estrogen receptor

PCBs - polychlorinated biphenyls

PBBs - polybrominated biphenyls

BPA - bisphenol A

DDT -dichlorodiphenyltrichloroethane

DES - diethylstilbestrol

DEHP - *di 2-ethylhexyl phthalate* /dietilheksil ftalat

DiNP- *di-iso-nonyl phthalate*/ di-izo-nonil ftalat

DiDP - *di-iso-decyl phthalate*/ di –izo-dektil ftalat

DPHP - (*di 2-propylheptyl phthalate*) / di 2-propilheptil ftalat

DMP - *dimethyl phthalate* / dimetil ftalat

DEP- *diethyl phthalate* / dietil ftalat

BBZP - *butyl benzyl phthalate* /butyl benzyl ftalat

DnBP - *di-n-butyl phthalate* / di-n-butil ftalat

DiBP - *di-iso-butyl phthalate* /di-izo-butil ftalat

MMP - *monomethyl phthalate* / monometil ftalat

MEP - *monoethyl phthalate* /monoetil ftalat

MBP - *monobutyl phthalate* /monobutil ftalat

MEHP - *mono (2-ethylhexyl) phthalate* / mono(2-etilheksil) ftalat

MEHHP - *mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate* / mono(2-etil-5- hidroksiheksil) ftalat

MEOHP - *mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate* / mono(2-etil-5-oksoheksil) ftalat

PPARs - peroksizmalni proliferator-aktivisani receptor (*peroxisome proliferator-activated receptors*)

AhR - Aril hidrokarbon receptor (*aryl hydrocarbon receptor*)

ARNT - *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*

HOMA- IRI - Indeks insulinske rezistencije

TV - telesna visina

TM - telesna masa

IRI - insulinemija

IR - insulinska rezistencija

TG- trigliceridi

HDL- lipoproteini velike gustine

LDL- lipoproteini male gustine

LPL - lipoprotein lipaza

MTP - mikrozomalni protein triglicerida (*microsomal triglyceride transfer protein*)

AR- androgen receptor

LDLR- LDL receptor

HL-hepatička lipaza

HPO - *hypothalamus–pituitary–ovary axis*

8. LITERATURA

1. Ellis H, Mahadevan V. Clinical anatomy: applied anatomy for students and junior doctors. 13th ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2013.
2. Aurora M. Female reproductive organ anatomy [homepage on the Internet]. New York: Medscape [cited 2018 Mar 17]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/1898919-overview>
3. Anđelković Z, Somer Lj, Matavulj M, Lačković V, Lalošević D, Nikolić I, et al. Čelija i tkiva. Niš: Bonafides; 2002.
4. Anđelković Z, Somer Lj, Perović M, Avramović V, Milenkova L, Kostovska N, et al. Histološka građa organa. Niš: Bonafides; 2001.
5. Guyton A, Hall J. Textbook of medical physiology. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2000.
6. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jamenson J. Harrison's principles of internal medicine. 19th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2016.
7. Hall J. The female reproductive system, infertility and contraception. In: Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jamenson J, editors. Harrison's principles of internal medicine. 18th ed. New York: McGraw-Hill Professional; 2011. p. 3028-39.
8. Norman RJ, Dewally D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. Lancet. 2007;370(9588):685-9.
9. Barrett E, Sobolewski M. Polycystic ovary syndrome: do endocrine-disrupting chemicals play a role? Semin Reprod Med. 2014;32(3):166-76.
10. Robert N, Didier D, Richard L, Theresa H. Polycystic ovary syndrome. Lancet. 2007;370(9588):685-97.
11. Sam S, Dunaif A. Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? Trends Endocrinol Metab. 2003;14(8):365-70.
12. Pasquali R, Stener-Victorin E, Yildiz B, Duleba A, Hoeger K, Mason H, et al. PCOS Forum: research

- in polycystic ovary syndrome today and tomorrow. *Clin Endocrinol*. 2011;74(4):424-33.
13. McCartney C, Marshall J. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2016;375(1):54-64.
 14. Legro R, Arslanian S, Ehrmann D, Hoeger K, Murad H, Pasquali R, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):4565-92.
 15. Welt C, Arason G, Gudmundsson J, Adams J, Palsdóttir H, Gudlaugsdóttir G, et al. Defining constant versus variable phenotypic features of women with polycystic ovary syndrome using different ethnic groups and populations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4361-8.
 16. Wiltgen D, Benedetto I, Mastella L, Spritzer P. Lipid accumulation product index: a reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2009;24(7):1726-31.
 17. Oh J, Sung Y, Lee H. The visceral adiposity index as a predictor of insulin resistance in young women with polycystic ovary syndrome. *Obesity*. 2013;21(8):1690-4.
 18. Chakrabarti J. Serum leptin level in women with polycystic ovary syndrome: correlation with adiposity, insulin, and circulating testosterone. *Ann Med Health Sci Res*. 2013;3(2):191-6.
 19. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009;30(4):293-342.
 20. Barker D. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004;23(6 Suppl):S588-95.
 21. Crews D, Putz O, Thomas P, Hayes P, Howdeshell K. Wildlife as models for the study of the effects of mixtures, low doses, and the embryonic environment on the action of endocrine disrupting chemicals. *Pure Appl Chem*. 2003;75(11-12):2305-20.
 22. Sheehan D, Willingham E, Bergeron J, Osborn C, Crews D. No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? *Environ Health Perspect*. 1999;107(2):155-9.
 23. vom Saal F, Akingbemi B, Belcher S, Birnbaum L, Crain D, Eriksen M, et al. Chapel Hill Bisphenol A Expert Panel Consensus Statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*. 2007;24(2):131-8.
 24. Anway M, Skinner M. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*.

2006;147(6 Suppl):S43-9.

25. Latini G. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chim Acta*. 2005;361(1-2):20-9.
26. Wittassek M, Koch H, Angerer J, Brüning T. Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(1):7-31.
27. Bergé A, Cladière M, Gasperi J, Coursimault A, Tassin BMR. Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2013;20(11):8057-76.
28. Martine B, Marie-Jeanne T, Cendrine D, Fabrice A, Marc C. Assessment of adult human exposure to phthalate esters in the urban centre of Paris (France). *Bull Environ Contam Toxicol*. 2013;90(1):91-6.
29. Mackintosh C, Maldonado J, Hongwu J, Hoover N, Chong A, Ikonomou M, et al. Distribution of phthalate esters in a marine aquatic food web: comparison to polychlorinated biphenyls. *Environ Sci Technol*. 2004;38(7):2011-20.
30. Clark K, Cousins I, MacKay D. *The handbook of environmental chemistry*. New York: Springer; 2003.
31. Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal*. 2006;26(3):803-24.
32. Peterson JH, Breindahl T. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit Contam*. 2000;17(2):133-41.
33. Main KM, Mortensen G, Kaleva M, Boisen K, Damgaard IN, Chellakooty M, et al. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect*. 2006;114(2):270-6.
34. Latini G, Wittassek M, Del Vecchio A, Presta G, De Felice C, Angerer J. Lactational exposure to phthalates in Southern Italy. *Environ Int*. 2009;35(2):236-9.
35. Kolarik B, Bornehag C, Naydenov K, Sundell J, Stavova P, Nielsen O. The concentration of phthalates in settled dust in Bulgarian homes in relation to building characteristic and cleaning habits in the family. *Atmospheric Environment*. 2008;42(37):8553-9.
36. Erythropel H, Maric M, Nicell J, Leask R, Yargeau V. Leaching of the plasticizer di(2ethylhexyl) phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. *Appl Microbiol*

Biotechnol. 2014;98(24):9967-81.

37. Sathyanarayana S. Phthalates and children's health. *Curr Probl Adolesc Health Care*. 2008;38(2):34-9.
38. Lyche J, Gutleb A, Bergman A, Eriksen G, Murk A, Ropstad E, et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2009;12(4):225-49.
39. Hernández-Díaz S, Mitchell A, Kelley K, Calafat A, Hauser R. Medications as a potential source of exposure to phthalates in the U.S. population. *Environ Health Perspect*. 2009;117(2):185-9.
40. Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;210(5):623-34.
41. European Commission. Scientific Committee on Health and Environmental Risks [homepage on the Internet]. Opinion on phthalates in school supplies [cited 2018 Sep 28]. Available from: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_106.pdf
42. National Research Council (US) Committee on the Health Risks of Phthalates. *Phthalates and Cumulative Risk Assessment: The Tasks Ahead*. Washington, DC: The National Academies Press; 2008.
43. Wikipedia [homepage on the Internet]. Phthalate [cited 2018 Mar 18]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phthalate>.
44. Calafat A, Ye X, Silva MJ, Kuklennyik Z, Needham LL. Human exposure assessment to environmental chemicals using biomonitoring. *Int J Androl*. 2006;29(1):166-71.
45. Rusyn I, Peters J, Cunningham ML. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol*. 2006;36(5):459-79.
46. Heindel J, Powell C. Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: Effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992;115(1):116-23.
47. Kim S, Park M. Phthalate exposure and childhood obesity. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2014;19(2):69-75.
48. Frederiksen H, Skakkebaek N, Andersson A. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(7):899-911.

49. Albro P, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect.* 1982;45:19-25.
50. Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): Human metabolism and internal exposure – an update and latest results. *Int J Androl.* 2006;29:155-65.
51. NIH. U.S. National Library of Medicine [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology (US) [cited 2018 Oct 28]. Dimethyl Phthalate; Compound Summary for CID 8554. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8554#section=Top>
52. U.S. National Library of Medicine [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology (US) [cited 2018 Oct 28]. Dibutyl Phthalate; Compound Summary for CID 3026. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3026>
53. U.S. National Library of Medicine [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology (US) [cited 2018 Oct 28]. Diisobutyl Phthalate; Compound Summary for CID 6782. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6782#section=Top>
54. NIH. U.S. National Library of Medicine [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology (US) [cited 2018 Oct 28]. Bis(2-ethylhexyl)phthalate; Compound Summary for CID 8343. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dehp#section=Top>
55. U.S. National Library of Medicine [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology (US) [cited 2018 Oct 28]. Diethyl Phthalate; Compound Summary for CID 6781. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6781>
56. U.S. National Library of Medicine [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology (US) [cited 2018 Oct 28]. DI-N-Octyl phthalate; Compound Summary for CID 8346. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8346#section=Top>
57. U.S. National Library of Medicine [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology (US) [cited 2018 Oct 28]. Benzyl Butyl Phthalate; Compound Summary for CID 2347.

Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2347>

58. Silva M, Samandar E, Preau J, Needham Lea. Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology*. 2006;219(1-3):22-32.
59. Meeker J, Sathyanarayana S, Swan S. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1526):2097-113.
60. Hannon P, Flaws J. The effects of phthalates on the ovary. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:8.
61. Craig Z, Wang W, Flaws J. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction*. 2011;142(5):633-46.
62. Dumesic D, Abbott D, Padmanabhan V. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8(2):127-41.
- 56/63. Abbott D, Barnett D, Bruns C, Dumesic D. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental etiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update*. 2005;11(4):357-74.
64. West C, Foster D, Evans N, Robinson J, Padmanabhan V. Intra-follicular activin availability is altered in prenatally- androgenized lambs. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;185(1-2):51-9.
65. Lind P, Roos VRM, Johansson L, Ahlström H, Kullberg J, Lind L. Serum concentrations of phthalate metabolites are related to abdominal fat distribution two years later in elderly women. *Environ Health*. 2012;11:21.
66. Alonso-Magdalena P, Ropero A, Carrera M, Cederroth C, Baquié M, Gauthier B, et al. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One*. 2008;3(4):e2069.
67. Sato S, Shirakawa H, Tomita S, Ohsaki Y, Haketa K, Tooi O, et al. Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;229(1):10-9.
68. Swedenborg E, Rüegg J, Mäkelä S, Pongratz I. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action

and involvement in metabolic disorders. *J Mol Endocrinol*. 2009;43(1):1-10.

69. Hart R, Doherty D, Frederiksen H, Keelan J, Hickey M, Sloboda D, et al. The influence of antenatal exposure to phthalates on subsequent female reproductive development in adolescence: a pilot study. *Reproduction*. 2014;147(4):379-90.
70. Barrett ES SM. Polycystic ovary syndrome: do endocrine-disrupting chemicals play a role? *Semin Reprod Med*. 2014;32(3):166-76.
71. Wan H, Leung P, Zhao Y, Wei X, Wong M, Wong C. Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations. *J Hazard Mater*. 2013;261:763-9.
72. Balen A, Conway G, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning P, West C, et al. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod*. 1995;10(8):2107–11.
73. Taponen S, Martikainen H, Jarvelin M, Sovio U, Laitinen J, Pouta A, et al. Metabolic cardiovascular disease risk factors in women with self-reported symptoms of oligomenorrhea and/or hirsutism: Northern Finland Birth Cohort 1966 Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2114-8.
74. Hahn S, Tan S, Elsenbruch S, Quadbeck B, Herrmann B, Mann K, et al. Clinical and biochemical characterization of women with polycystic ovary syndrome in North Rhine-Westphalia. *Horm Metab Res*. 2005;37(7):438-44.
75. Carmina E, Chu M, Longo R, Rini G, Lobo R. Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2545-9.
76. Yildiz BO, Knochenhauer E, Azziz R. Impact of obesity on the risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(1):162-8.
77. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale H, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009;91(2):456-88.
78. Kyrkou G, Trakakis E, Attilakos A, Panagopoulos P, Chrelias C, Papadimitriou A, et al. Metabolic syndrome in Greek women with polycystic ovary syndrome prevalence characteristics and associations with body mass index. A prospective controlled study. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(4):915-23.

79. Sharma S, Majumdar A. Prevalence of metabolic syndrome in relation to body mass index and polycystic ovarian syndrome in Indian women. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8(4):202-8.
80. Dou P, Ju H, Shang J, Li X, Xue Q, Xu Y, et al. Application of receiver operating characteristic curve in the assessment of the value of body mass index waist circumference and percentage of body fat in the diagnosis of polycystic ovary syndrome in childbearing women. *J Ovarian Res.* 2016;9(1):51.
81. Apridonidze T, Essah P, Iuorno M, Nestler J. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):1929-35.
82. Carmina E, Chu M, Longo R, Rini G, Lobo R. Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):2545-9.
83. Legro RS, Kunesman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med.* 2001;111(8):607-13.
84. Pehlivanov B, Mitkov M. Serum leptin levels correlate with clinical and biochemical indices of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2009;14(2):153-9.
85. Chakrabarti J. Serum leptin level in women with polycystic ovary syndrome: correlation with adiposity, insulin, and circulating testosterone. *Ann Med Health Sci Res.* 2013;3(2):191-6.
86. Rouru J, Anttila L, Koskinen P, Penttilä T, Irjala K, Huupponen R, et al. Serum leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(6):1697-700.
87. Laughlin G, Morales A, Yen S. Serum leptin levels in women with polycystic ovary syndrome: the role of insulin resistance/hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(6):1692-6.
88. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* 2002;287(3):356-9.
89. Conn JJ, Jacobs HS, Conway GS. The prevalence of polycystic ovaries in women with type 2 diabetes mellitus. *Clinic Endocrinol.* 2000;52(1):81-6.
90. Peppard H, Marfori J, Iuorno M, Nestler J. Prevalence of polycystic ovary syndrome among

premenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24(6):1050-2.

91. Escobar-Morreale H, Roldan B, Barrio R, Alonso M, Sancho J, de la Calle H, et al. High prevalence of the polycystic ovary syndrome and hirsutism in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):4182-7.
92. Pierpoint T, McKeigue P, Isaacs A, Wild S, Jacobs H. Mortality of women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up. *J Clin Epidemiol*. 1998;51(7):581-6.
93. Schmidt J, Brännström M, Landin-Wilhelmsen K, Dahlgren E. Reproductive hormone levels and anthropometry in postmenopausal women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a 21-year follow-up study of women diagnosed with PCOS around 50 years ago and their age-matched controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):2178-85.
94. Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs H. Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clin Endocrinol*. 2000;52(5):595-600.
95. de Groot P, Dekkers O, Romijn J, Dieben S, Helmerhorst F. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011;17(4):495-500.
96. Mani H, Levy MJ, Davies MJ, Morris DH, Gray LJ, Bankart J, et al. Diabetes and cardiovascular events in women with polycystic ovary syndrome: a 20-year retrospective cohort study. *Clin Endocrinol*. 2013;78(6):926-34.
97. Božić-Antić I, Ilić D, Bjekić-Macut J, Bogavac T, Vojnović-Milutinović D, Kastratovic-Kotlica B, et al. Lipid accumulation product as a marker of cardiometabolic susceptibility in women with different phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(6):551-60.
98. Macut D, Božić Antić I, Bjekić-Macut J, Panidis D, Tziomalos K, Vojnović Milutinović D, et al. Lipid accumulation product is associated with metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Hormones*. 2016;15(1):35-44.
99. Wehr E, Gruber H, Giulian iA, Möller R, Pieber T, Obermayer-Pietsch B. The lipid accumulation product is associated with impaired glucose tolerance in PCOS women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(6):E986-90.

100. Blount B, Silva M, Caudill S, Needham L, Pirkle J, Sampson E, et al. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect.* 2000;108(10):979-82.
101. Silva M, Barr D, Reidy J, Malek N, Hodge C, Caudill S, et al. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect.* 2004;112(3):331-8.
102. Wittassek M, Wiesmüller G, Koch H, Eckard R, Dobler L, Müller J, et al. Internal phthalate exposure over the last two decades--a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health.* 2007;210(3-4):319-33.
103. Göen T, Dobler L, Koschorreck J, Müller J, Wiesmüller G, Drexler H, et al. Trends of the internal phthalate exposure of young adults in Germany--follow-up of a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health.* 2011;215(1):36-45.
104. Berman T, Hochner-Celnikier D, Calafat A, Needham L, Amitai Y, Wormser U, et al. Phthalate exposure among pregnant women in Jerusalem, Israel: results of a pilot study. *Environ Int.* 2009;35(2):353-7.
105. Högberg J, Hanberg A, Berglund M, Skerfving S, Remberger M, Calafat A, et al. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Perspect.* 2008;116(3):334-9.
106. Wan H, Leung P, Zhao Y, Wei X, Wong M, Wong C. Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations. *J Hazard Mater.* 2013;261:763-9.
107. Koch H, Rossbach B, Drexler H, Angerer J. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates - determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res.* 2003;93(2):177-85.
108. Parks L, Ostby J, Lambright C, Abbott B, Klinefelter G, Barlow N, et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rats. *Toxicol Sci.* 2000;58(2):339-49.
109. Joensen U, Frederiksen H, Jensen M, Lauritsen M, Olesen I, Lassen T, et al. Phthalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy Danish men. *Environ Health Perspect.*

2012;120(10):1397-403.

110. Frederiksen H, Sorensen K, Mouritsen A, Aksglaede L, Hagen C, Petersen J, et al. High urinary phthalate concentration associated with delayed pubarche in girls. *Int J Androl.* 2012;35(3):216-26.
111. Medic Stojanoska M, Milankov A, Vukovic B, Vukcevic D, Sudji J, Bajkin I, et al. Do diethyl phthalate (DEP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) influence the metabolic syndrome parameters? Pilot study. *Environ Monit Assess.* 2015;187(8):526.
112. Vagi S, Azziz-Baumgartner E, Sjödin A, Calafat A, Dumesic D, Gonzalez L, et al. Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol A in polycystic ovary syndrome: a case-control study. *BMC Endocr Disord.* 2014;14:86.
113. Grun F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology.* 2006;147(6 Suppl):S50-5.
114. Hurst C, Waxman D. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci.* 2003;74(2):297-308.
115. Lovejoy J, Sainsbury A. Sex differences in obesity and the regulation of energy homeostasis. *Obes Rev.* 2009;10(2):154-67.
116. Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, et al. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect.* 2006;114(2):270-6.
117. Pan G, Hanaoka T, Yoshimura M, Zhang S, Wang P, Tsukino H, et al. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ Health Perspect.* 2006;114(11):1643-8.
118. Wolff M, Anderson H, Britton J, Rothman N. Pharmacokinetic variability and modern epidemiology - the example of dichlorodiphenyltrichloroethane, body mass index, and birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(10):1925-30.
119. Hatch E, Nelson J, Stahlhut R, Webster T. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int J Androl.* 2010;33(2):324-32.

120. Hatch E, Nelson J, Qureshi M, Weinberg J, Moore L, Singer M, et al. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. *Environ Health*. 2008;7:27.
121. Deierlein A, Wolff M, Pajak A, Pinney S, Windham G, Galvez M, et al. Longitudinal associations of phthalate exposures during childhood and body size measurements in young girls. *Epidemiology*. 2016;27(4):492-9.
122. Buser M, Murray H, Scinicariello F. Age and sex differences in childhood and adulthood obesity association with phthalates: analyses of NHANES 2007-2010. *Int J Hyg Environ Health*. 2014;2017(6):687-94.
123. Majeed KA, Ur Rehman H, Yousaf MS, Zaneb H, Rabbani I, Tahir SK, et al. Sub-chronic exposure to low concentration of dibutyl phthalate affects anthropometric parameters and markers of obesity in rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(32):25462-7.
124. Naville D, Pinteur C, Vega N, Menade Y, Vigier M, Le Bourdais A, et al. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *FASEB J*. 2013;27(9):3860-70.
125. Dong X, Qiu X, Meng S, Xu H, Wu X, Yang M. Proteomic profile and toxicity pathway analysis in zebrafish embryos exposed to bisphenol A and di-n-butyl phthalate at environmentally relevant levels. *Chemosphere*. 2018;193:313-20.
126. Adibi JJ, Zhao Y, Zhan LV, Kapidzic M, Larocque N, Koistinen H, et al. An investigation of the single and combined phthalate metabolite effects on human chorionic gonadotropin expression in placental cells. *Environ Health Perspect*. 2017;125(10):107010.
127. Lin Y, Wei J, Li Y, Chen J, Zhou Z, Song L, et al. Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;301(3):527-38.
128. Güven C, Dal F, Aydoğan Ahabab M, Taskin E, Ahabab S, Adin Çinar S, et al. Low dose monoethyl phthalate (MEP) exposure triggers proliferation by activating PDX-1 at 1.1B4 human pancreatic beta cells. *Food Chem Toxicol*. 2016;93:41-50.

129. She Y, Jiang L, Zheng L, Zuo H, Chen M, Sun X, et al. The role of oxidative stress in DNA damage in pancreatic β cells induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Chem Biol Interact.* 2017;265:8-15.
130. Sun X, Lin Y, Huang Q, Shi J, Qiu L, Kang M, et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection. *J Cell Mol Med.* 2015;19(3):581-94.
131. Lind P, Zethelius B, Lind L. Circulating levels of phthalate metabolites are associated with prevalent diabetes in the elderly. *Diabetes Care.* 2012;35(7):1519-24.
132. Chapman I, Wittert G, Norman R. Circulating leptin concentrations in polycystic ovary syndrome: relation to anthropometric and metabolic parameters. *Clin Endocrinol.* 1997;46(2):175-81.
133. Pehlivanov B, Mitkov M. Serum leptin levels correlate with clinical and biochemical indices of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2009;14(2):153-9.
134. Romualdi D, Campagna G, Selvaggi LJ, Cento R, Proto C, Lanzone A, et al. Metformin treatment does not affect total leptin levels and free leptin index in obese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2008;89(5):1273-6.
135. Sepilian V, Crochet J, Nagamani M. Serum soluble leptin receptor levels and free leptin index in women with polycystic ovary syndrome: relationship to insulin resistance and androgens. *Fertil Steril.* 2006;85(5):1441-7.
136. Boberg J, Metzdorff S, Wortziger R, Axelstad M, Brokken L, Vinggaard A, et al. Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology.* 2008;250(2-3):75-81.
137. Törüner F, Akbay E, Cakir N, Sancak B, Elbeg S, Taneri F, et al. Effects of PPAR γ and PPAR α agonists on serum leptin levels in diet-induced obese rats. *Horm Metab Res.* 2004;36(4):226-30.
138. Mapuskar K, Pereira C, Rao C. Dose-dependent sub-chronic toxicity of diethyl phthalate in female Swiss mice. *Pestic Biochem Physiol.* 2007;87(2):156-63.
139. Pereira C, Mapuskar K, Rao C. Chronic toxicity of diethyl phthalate in male Wistar rats - a dose-

response study. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006;45(2):169-77.

140. Howarth J, Price S, Dobrota M, Kentish P, Hinton R. Effects on male rats of di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. *Toxicol Lett.* 2001;121(1):35-43.
141. Mocchiutti N, Bernal C. Effects of chronic di(2-ethylhexyl) phthalate intake on the secretion and removal rate of triglyceride-rich lipoproteins in rats. *Food Chem Toxicol.* 1997;35(10-11):1017-21.
142. Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou A, Kandarakis S, Chrousos G. Pathophysiology and types of dyslipidemia in PCOS. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(7):280-5.
143. Anderson LA, McTernan PG, Harte AL, Barnett AH, Kumar S. The regulation of HSL and LPL expression by DHT and flutamide in human subcutaneous adipose tissue. *Diabetes Obes Metab.* 2002;4(3):209-13.
144. Huang XQ, Liu HH, Wang H. Analysis of content of phthalic acid esters in human serum. *China Trop Med.* 2007;8(7):1443-5.
145. Wetterau JR, Lin MC, Jamil H. Microsomal triglyceride transfer protein. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1345(2):136-50.
146. Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, et al. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *J Biol Chem.* 2000;275(12):8416-25.
147. Jia Y, Liu T, Zhou L, Zhu J, Wu J, Sun D, et al. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on lipid metabolism by the JAK/STAT pathway in rats. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(11):E1085.
148. Croston GE, Milan LB, Marschke KB, Reichman M, Briggs MR. Androgen receptor-mediated antagonism of estrogen-dependent low density lipoprotein receptor transcription in cultured hepatocytes. *Endocrinology.* 1997;138(9):3779-86.
149. Olsén L, Lind L, Lind P. Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate metabolites and coronary risk in the elderly. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012;80:179-83.
150. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol fed LDL receptor-deficient

mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(3):721-7.

151. Langer C, Gansz B, Goepfert C, Engel T, Uehara Y, von Dehn G, et al. Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296(5):1051-7.
152. Milošević N, Milić N, Živanović Bosić D, Bajkin I, Perčić I, Abenavoli L, et al. Potential influence of the phthalates on normal liver function and cardiometabolic risk in males. *Environ Monit Assess.* 2017;190(1):17.
153. Abenavoli L, Milic N, Milosevic N, Luzza F, Medic Stojanoska M. Relationship between phthalates exposure, insulin resistance and liver damage. *Dig Liver Dis.* 2017;49(2):e116.
154. Xu C, Chen J, Qiu Z, Zhao Q, Luo J, Yang L, et al. Ovotoxicity and PPAR-mediated aromatase downregulation in female Sprague-Dawley rats following combined oral exposure to benzo[a]pyrene and di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Lett.* 2010;199(3):323-32.
155. Gupta R, Singh J, Leslie T, Meachum S, Flaws J, Yao H. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;242(2):224-30.
156. Lenie S, Smitz J. Steroidogenesis-disrupting compounds can be effectively studied for major fertility-related endpoints using in vitro cultured mouse follicles. *Toxicol Lett.* 2009;185(3):143-52.
157. Davis B, Weaver R, Gaines L, Heindel J. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;128(2):224-8.
158. Takai R, Hayashi S, Kiyokawa J, Iwata Y, Matsuo S, Suzuki M, et al. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in female rats. *J Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 1:S111-9.
159. Wang W, Craig Z, Basavarajappa M, Gupta R, Flaws J. Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;258(2):288-95.
160. Mlynarcíková A, Nagyová E, Ficková M, Scsuková S. Effects of selected endocrine disruptors on

meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol In Vitro*. 2009;23(3):371-7.

161. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner M. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One*. 2013;8(1):e55387.
162. Svechnikova I, Svechnikov K, Söder O. The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J Endocrinol*. 2007;194(3):603-9.
163. Ma M, Kondo T, Ban S, Umemura T, Kurahashi N, Takeda M, et al. Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl)phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. *Toxicol Sci*. 2006;93(1):164-71.
164. Inada H, Chihara K, Yamashita A, Miyawaki I, Fukuda C, Tateishi Y, et al. Evaluation of ovarian toxicity of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) using cultured rat ovarian follicles. *J Toxicol Sci*. 2012;37(3):483-90.
165. Bonilla E, del Mazo J. Deregulation of the Sod1 and Nd1 genes in mouse fetal oocytes exposed to mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). *Reprod Toxicol*. 2010;30(3):387-92.
166. Reinsberg J, Wegener-Topper P, van der Ven K, van der Ven H, Klingmueller D. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;239(1):116-23.
167. Romani F, Tropea A, Scarinci E, Federico A, Dello Russo C, Lisi L, et al. Endocrine disruptors and human reproductive failure: the in vitro effect of phthalates on human luteal cells. *Fertil Steril*. 2014;102(3):831-7.
168. Chen H, Chiang P, Wang Y, Kao M, Shieh T, Tsai C, et al. Benzyl butyl phthalate induces necrosis by AhR mediation of CYP1B1 expression in human granulosa cells. *Reprod Toxicol*. 2012;33(1):67-75.
169. Zhou C, Flaws J. Effects of an environmentally relevant phthalate mixture on cultured mouse antral follicles. *Toxicol Sci*. 2017;156(1):217-29.
170. Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG*. 2006;113(10):1148-59.

171. Spicer L, Francisco C. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology*. 1997;138(8):3374-9.
172. Chen C, Chou Y, Wu Y, Lin C, Lin S, Lee C. Phthalates may promote female puberty by increasing kisspeptin activity. *Hum Reprod*. 2013;28(10):2765-73.
173. Meeker J, Ferguson K. Urinary phthalate metabolites are associated with decreased serum testosterone in men, women, and children from NHANES 2011-2012. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):4346-52.
174. Sathyanarayana S, Barrett E, Butts S, Wang C, Swan SH. Phthalate exposure and reproductive hormone concentrations in pregnancy. *Reproduction*. 2014;147(4):401-9.
175. Watkins D, Téllez-Rojo M, Ferguson K, Lee J, Solano-Gonzalez M, Blank-Goldenberg C, et al. In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in relation to female sexual maturation. *Environ Res*. 2014;134:233-41.
176. Su PH, Chen JY, Lin CY, Chen HY, Liao PC, Ying TH, et al. Sex steroid hormone levels and reproductive development of eight-year-old children following in utero and environmental exposure to phthalates. *PLoS One*. 2014;9(9):e102788.
177. Xu C, Lin H, Zhao Y, Zhang Y. Determination of serum levels of three phthalate esters in patients with polycystic ovary syndrome. *Sci Res Essays*. 2011;6(5):1057-62.
178. Yang Q, Zhao Y, Qiu X, Zhang C, Li R, Qiao J. Association of serum levels of typical organic pollutants with polycystic ovary syndrome (PCOS): a case-control study. *Hum Reprod*. 2015;30(8):1964-73.