

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Iva M. Perović Blagojević

**UTICAJ REDOKS DISBALANSA
I INFLAMACIJE NA AKTIVNOST ENZIMA
PARAOKSONAZE 1 I NJEGOVU
DISTRIBUCIJU NA LIPOPROTEINIMA
VISOKE GUSTINE U SINDROMU
POLICISTIČNIH JAJNIKA – EFEKAT NA
KARDIOVASKULARNI RIZIK**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Iva M. Perović Blagojević

**IMPACT OF REDOX IMBALANCE AND
INFLAMMATION ON ACTIVITY OF
PARAOXONASE 1 AND ITS
DISTRIBUTION IN HIGH DENSITY
LIPOPROTEIN IN POLYCYSTIC OVARY
SYNDROME – EFFECT ON
CARDIOVASCULAR RISK**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

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

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

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

Dr Jelena Vekić, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Mom dragom tati Momi

Izjave zahvalnosti

Najiskrenije se zahvaljujem mentoru prof. dr Svetlani Ignjatović na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći i savetima koje mi je davala u svim fazama izrade doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević na izuzetnoj pomoći, razumevanju, stručnim savetima i ohrabrenju koje mi je pružala. Zahvaljujem joj se i na pozitivnoj energiji i podršci da istrajem u svom radu kada mi je bilo najpotrebnije.

Prof. dr Đuri Macutu se zahvaljujem na podršci tokom prikupljanja biološkog materijala kao i na pruženoj pomoći, savetima i sugestijama koje su omogućile ostvarenje ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem i doc. dr Jeleni Vekić za podršku, savete i neizmerno razumevanje kada god mi je bilo potrebno.

Zahvaljujem se Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta posebno dipl. farm.-med.bioh. Milici Miljković na pomoći pri izradi dela eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se kolegama iz Službe za laboratorijsku dijagnostiku KBC „Dr Dragiša Mišović Dedinje“, a posebno onima koji su mi pružili razumevanje i podršku u odlučujućim trenucima.

Zahvaljujem se prof. dr Brani Brkić što me je uvela u svet laboratorijske endokrinologije, kao i u ispitivanje sindroma policističnih jajnika i omogućila da saradujem sa sjajnim ljudima i naučnicima.

Zahvaljujem se prof. dr Nadi Majkić-Singh koja mi je pružala neizmernu podršku još od osnovnih studija služeći mi kao inspiracija za dalje stručno usavršavanje.

Posebnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima i porodicima Perović i Brkić koji su me kroz moj celokupan život ohrabivali, podržavali i pomagali da uspem i ne posustanem bez obzira na sve poteškoće.

Najveću zahvalnost dugujem svom suprugu Srećku i deci, Vuku i Lani, koji su sve vreme bili uz mene pružajući mi beskrajnu ljubav i strpljenje što mi je dalo posebnu snagu da ovaj rad završim, a porodici Blagojević se zahvaljujem na bezrezervnoj podršci.

Uticaj redoks disbalansa i inflamacije na aktivnost enzima paraoksonaze 1 i njegovu distribuciju na lipoproteinima visoke gustine u sindromu policističnih jajnika – efekat na kardiovaskularni rizik

Sažetak

Sindrom policističnih jajnika (PCOS) je najčešći endokrinološki poremećaj kod žena u reproduktivnom periodu. Pored reproduktivnih poremećaja, ovaj sindrom karakterišu različite kardiometaboličke komplikacije kao što su gojaznost, insulinska rezistencija (IR), dislipidemija, oksidativni stres (OS), hronična inflamacija, subklinička ateroskleroza i u daljoj budućnosti razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB). Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD) povezana je sa IR i kardiovaskularnim rizikom, ali nije razjašnjeno da li PCOS i NAFLD deluju aditivno na kardiovaskularni rizik.

Gljučni faktori rizika koji kompleksnim mehanizmima deluju u PCOS su dislipidemija, OS i hronična niskostepena inflamacija. U cilju procene zajedničkih efekata ovih faktora rizika u PCOS, definisali smo zbirni skor skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora i skora inflamacije (DOI skor).

Žene sa PCOS imaju značajno izmenjen lipidni profil koji se odlikuje kvalitativnim promenama LDL (lipoprotein male gustine) i HDL (lipoprotein visoke gustine) čestica, u smislu promene njihove veličine, proteinskog i lipidnog sastava. Paraoksonaza 1 (PON1) je antioksidativni enzim, čija aktivnost i koncentracija mogu biti smanjene u stanjima OS, čime se dodatno povećava rizik za razvoj KVB.

Cilj ove studije je bio da se proceni rizik za razvoj KVB kod žena sa PCOS i ispita kombinovani uticaj različitih pojedinačnih faktora rizika koji su prisutni u ovom sindromu na nivo kardiovaskularnog rizika. Ispitivan je redoks status, prisustvo i vrsta dislipidemije, nivo inflamacije kao i cirkulišuća aktivnost enzima PON1 u PCOS, odnosno sposobnost DOI skora da razlikuje žene sa PCOS u odnosu na zdrave žene. Analizirana je distribucija LDL i HDL lipoproteinskih subfrakcija i prvi put u ovoj studiji aktivnost PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama kod žena sa PCOS i njihov doprinos proceni rizika za razvoj KVB.

U istraživanju je učestvovalo 168 žena sa PCOS i 96 zdravih žena (kontrolna grupa, KG). Istraživanje je sprovedeno u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji i obuhvatilo je dve studije.

U prvoj studiji ispitivan je uticaj gojaznosti na kardiovaskularni rizik kod žena sa PCOS. Određivani su antropometrijski parametri, parametri lipidnog statusa, markeri inflamacije, koncentracije glukoze, transaminaza, polnih, adenohipofiznih hormona,

globulina koji vezuje polne hormone (SHBG) i androgena. Računat je skor za procenu rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti (KQRS), indeksi koji se koriste za dijagnozu nealkoholne masne bolesti jetre (NAFLD) i indeks centralne gojaznosti (ICO). Uočene su značajno više vrednosti KQRS ($P<0,05$) kod gojaznih PCOS žena u odnosu na normalno uhranjenu KG i PCOS grupu. ICO ($P<0,001$) i svi NAFLD indeksi (HIS, $P<0,001$; APRI, $P<0,01$; LAP, $P<0,001$ redom) su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju sa KQRS, pri čemu se LAP indeks istakao kao pouzdaniji parametar za procenu većeg rizika za KVB u odnosu na indeks telesne mase (ITM).

U drugoj studiji su određivani parametri lipidnog statusa, OS (uznapredovali proizvodi oksidacije proteina (AOPP), totalni oksidativni status (TOS), prooksidativno-antioksidativni balans (PAB), malondialdehid (MDA), koncentracija ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH-grupe), totalni antioksidativni status (TAS) i aktivnosti enzima PON1 i superoksid dismutaze (SOD) i C reaktivni protein (CRP). Računat je i DOI skor. Žene sa PCOS su imale niže vrednosti HDL-H (koncentracija holesterola u lipoproteinima visoke gustine) u odnosu na KG ($P<0,01$), bez značajnih razlika u vrednostima ostalih lipidnih parametara, dok su nivoi CRP bili značajno viši kod žena sa PCOS u odnosu na KG ($P<0,001$). Utvrđeni su povišeni nivoi markera OS, odnosno proizvoda njihovog delovanja poput AOPP, TOS, MDA ($P<0,001$) i PAB ($P<0,05$) i snižene vrednosti parametara antioksidativne zaštite, koncentracije ukupnih SH-grupa i antioksidativne aktivnosti PON1 ($P<0,001$, $P<0,05$, redom) kod žena sa PCOS u poređenju sa KG. Svi pojedinačni skorovi: oksidativno-stresni skor ($P<0,001$), skorovi dislipidemije ($P<0,05$) i inflamacije ($P<0,001$) su imali značajno višu vrednost kod žena sa PCOS u odnosu na KG. Kao rezultat toga i DOI skor je bio značajno veći kod njih u odnosu na KG ($P<0,001$), što ukazuje na značaj ovog rezultata u proceni kardiometaboličkog rizika u PCOS. Prema rezultatima ROC analize, oksidativno-stresni skor i DOI skor imaju izuzetne diskriminativne sposobnosti da razlikuje žene sa PCOS od zdravih žena ($AUC>0,9$), iako je oksidativno-stresni skor pokazao bolju dijagnostičku tačnost u poređenju sa DOI skorom ($P<0,01$). Gojaznost je imala uticaj na vrednosti skorova rizika, posebno na DOI skor (vrednosti DOI skora su bile značajno više kod prekomerno teških i gojaznih pacijentkinja, $P<0,001$).

Zatim je ispitivana veličina i distribucija LDL i HDL subfrakcija u PCOS, raspodela PON1 na HDL subfrakcijama i procenjivan je njihov doprinos riziku za KVB. Normalno uhranjene i gojazne žene sa PCOS imale su značajno manju veličinu LDL čestica od normalno uhranjenih i gojaznih žena u KG ($P<0,001$), pri čemu su gojazne žene sa PCOS

imale najmanje LDL dijemetre. Raspodela udela LDL frakcija u obe PCOS grupe je pokazala manji udeo LDL I ($P<0,001$), odnosno veći udeo LDL II i III subfrakcija ($P<0,001$) u odnosu na normalno uhranjene i gojazne žene u KG. Kod žena sa PCOS abdominalna gojaznost, dislipidemija, povećan OS kao i prisustvo NAFLD su u vezi sa smanjenjem dijametra LDL čestica (negativna korelacija veličine LDL čestica sa odnosom struk/kuk, $P<0,01$; LDL-H (koncentracija holesterola u lipoproteinima niske gustine), $P<0,05$; AOPP, $P<0,05$; MDA, $P<0,05$; LAP, $P<0,05$; ICO, $P<0,05$, odnosno pozitivna korelacija sa HDL-H, $P<0,05$). Analiza veličine i raspodele HDL subfrakcija kod žena sa PCOS i žena u KG je pokazala da se dijometri HDL čestica nisu razlikovali, međutim normalno uhranjene žene sa PCOS imale su značajno veći udeo HDL 2 subfrakcija od normalno uhranjenih i gojaznih žena u KG ($P<0,05$). Analiza HDL čestica unutar PCOS grupe pokazala je da su gojazne žene sa PCOS imale značajno manje dijemetre HDL čestica ($P<0,05$) i viši udeo malih HDL 3 subfrakcija od normalno uhranjenih žena sa PCOS ($P<0,05$), što je u skladu sa dosadašnjim saznanjima koja su pokazala smanjenje veličine HDL čestica kod pacijenata sa višim rizikom za KVB. To je potvrdila i negativna korelacija između veličine HDL čestica i parametara koji ukazuju na gojaznost, odnosno abdominalnu gojaznost kod žena sa PCOS (ITM, $P<0,05$; odnos struk/kuk, $P<0,05$; LAP, $P<0,05$; HIS, $P<0,05$ i ICO, $P<0,05$). Veličina LDL čestica značajno se smanjuju sa porastom KQRS ($P<0,01$), skora dislipidemije, prooksidativnog i oksidativno-stresnog skora ($P<0,05$) kod žena sa PCOS. Dijometri HDL čestica i ukupni udeo HDL 2 subfrakcija značajno se smanjuju sa porastom KQRS ($P<0,01$; $P<0,05$ redom) i skora dislipidemije ($P<0,01$), dok se ukupni udeo HDL 3 subfrakcija povećava sa porastom KQRS ($P<0,05$), skora dislipidemije i DOI skora ($P<0,05$). Svi ovi rezultati ispitivanja veličine i raspodele LDL i HDL čestica pokazuju da žene sa PCOS imaju nepovoljniji kardiometabolički profil u odnosu na zdrave žene.

Analiza raspodele PON1 na HDL subfrakcijama nije pokazala značajne razlike u distribuciji PON1 na HDL subfrakcijama između žena sa PCOS i KG. Gojaznost nije imala uticaja na raspodelu PON1 na HDL subfrakcijama unutar PCOS grupe. Međutim, poređenjem žena sa PCOS u zavisnosti od veličine LDL čestica utvrdili smo da je kod žena sa malim LDL česticama ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama bio je značajno viši ($P<0,001$), a ukupan udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama bio značajno niži ($P<0,01$) nego kod žena koje imaju LDL čestice većeg dijametra. Korelaciona analiza između udela PON1 na HDL subfrakcijama i markera OS kod žena sa PCOS pokazala je da je aktivnost PON1

u serumu u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 2 subfrakcijama ($P < 0,01$), a u negativnoj korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 3 subfrakcijama ($P < 0,01$). Ukupni udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama se povećava, dok se ukupni udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama smanjuje sa porastom antioksidativnog skora kod žena sa PCOS ($P < 0,05$). Povećanje oksidativno-stresnog skora je praćeno povećanjem ukupnog udela PON1 na HDL 3 subfrakcijama ($P < 0,05$).

Rezultati studije govore u prilog tome da je gojaznost značajniji faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti od samog PCOS. Antropometrijski parametri, parametri lipidnog statusa, fibrinogen, NAFLD indeksi i ICO povećavaju kardiovaskularni rizik kod žena sa PCOS. Žene sa PCOS imaju izraženiji OS, dislipidemiju i hroničnu inflamaciju u poređenju sa zdravim ženama i mogu se od njih razdvojiti primenom oksidativno-stresnog i DOI skora. Dobijeni rezultati ukazuju da povećanje telesne težine može biti zajednički faktor odgovoran za nastanak i napredovanje dislipidemije, OS i inflamacije kod pacijentkinja sa PCOS. Raspodela udela LDL subfrakcija ukazuje da u PCOS postoji jaka tendencija ka razvoju aterogenog tipa dislipidemije, odnosno preraspodeli ka manjim, gušćim LDL česticama. Prisustvo OS deluje u istom smeru što je još jedan dokaz koji govori u prilog aterogenijem potencijalu i povećanom kardiovaskularnom riziku. Gojazne žene sa PCOS imaju značajno manje dijametre HDL čestica i viši udeo malih HDL 3 subfrakcija u poređenju sa normalno uhranjenim ženama sa PCOS što je povezano sa visokim rizikom za KVB. Na osnovu toga možemo pretpostaviti da sam PCOS ne utiče na profil HDL subfrakcija, već da se u osnovi uočenih promena zapravo nalazi gojaznost. Poređenje žena sa PCOS u zavisnosti od veličine LDL čestica pokazuje da je aktivnost PON1 na malim HDL 3 subfrakcijama značajno niža kod žena sa malim, gustim LDL česticama, što je znak da je antioksidativna sposobnost HDL 3 čestica smanjena u PCOS u uslovima povećanog rizika za KVB.

U cilju sveobuhvatnijeg razumevanja PCOS i stanja koja su povezana sa njim, potrebne su buduće prospektivne studije, sa većim brojem pacijenata, koje bi koristile odgovarajuće metodološke postupke. Takve mere bi osigurale isključivanje faktora koji bi mogli uticati na distribuciju i aktivnost PON1 na HDL subfrakcijama u PCOS populaciji. Pored toga, buduće studije će nam pomoći da objasnimo promene u profilu HDL subfrakcija u PCOS i kako ove promene utiču na razvoj KVB.

Ključne reči: sindrom policističnih jajnika, procena kardiovaskularnog rizika, nealkoholna masna bolest jetre, oksidativni stres, dislipidemija, inflamacija, paraoksonaza 1, LDL i HDL subfrakcije

Naučna oblast: Medicinska biohemija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 612.123:618.11:[616.1(043.3)]

Impact of redox imbalance and inflammation on activity of paraoxonase 1 and its distribution in high density lipoprotein in polycystic ovary syndrome - effect on cardiovascular risk.

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder in women of reproductive age. In addition to reproductive disturbance, the syndrome is characterised by various cardiometabolic complications such as obesity, insulin resistance (IR), dyslipidemia, oxidative stress (OS), chronic inflammation, subclinical atherosclerosis and future cardiovascular disease (CVD) development. Despite both IR and cardiovascular risk being associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), some uncertainty remains whether PCOS and NAFLD act additively on cardiovascular risk.

The key PCOS risk factors that act by complex mechanisms are dyslipidemia, OS and chronic low-grade inflammation. In order to assess their mutual effects in PCOS a summary score for dyslipidemia, OS and inflammation (the DOI score) has been proposed.

PCOS patients have a significantly modified lipid profile characterised by qualitative changes in LDL (low density lipoprotein) and HDL (high density lipoprotein) particles, in terms of their size, protein and lipid composition. Paraoxonase 1 (PON1), an antioxidant enzyme, whose activity and concentration is reduced in conditions of OS further increases the risk of developing CVD.

The aim of this study was to evaluate CVD risk in PCOS patients by determining the influence of various risk factors alone (oxidative stress status, presence and type of dyslipidemia, level of inflammation and the activity of PON1) or combined (the DOI score) to test their ability to discriminate patients from healthy controls. The distribution of LDL and HDL lipoprotein subfractions was analysed. For the first time, PON1 activity was measured in HDL 2 and HDL 3 subfractions in PCOS patients and its contribution to CVD risk was determined.

The research included 168 PCOS patients and 96 healthy women (control group) and was conducted respecting the principles set out in the Declaration of Helsinki. The research comprised two studies.

The first study commenced by examining the effect of obesity on CVD risk in patients. Anthropometric parameters, lipid status parameters, inflammatory markers, concentration of glucose, transaminases, sex and anterior pituitary hormones, sex hormone binding globulin (SHBG) and androgens were measured. The risk score for the development of

cardiovascular disease (CVRS), indices for NAFLD diagnosis and the index of central obesity (ICO) were calculated. Significantly higher CVRS ($P<0.05$) was observed in obese patients compared to both normal weight groups (patients and healthy controls). ICO ($P<0.001$) and all NAFLD-related parameters (HIS, $P<0.001$; APRI, $P<0.01$; LAP, $P<0.001$ respectively) positively correlated with CVRS. The LAP index was a more reliable parameter for assessing higher risk for CVD compared to body mass index (BMI).

In the second study, lipid status parameters, as well as oxidative stress status parameters (advanced oxidation protein products (AOPP), total oxidative status (TOS), prooxidant-antioxidant balance (PAB), malondialdehyde (MDA), total sulfhydryl groups (SH-groups), total antioxidative status (TAS), activity of superoxide dismutase, (SOD) and PON1 enzymes) and C-reactive protein (CRP) were measured. Furthermore, the DOI score was calculated. HDL-C (high-density lipoprotein cholesterol) was significantly lower in patients compared to healthy controls ($P<0.01$). In contrast PCOS patients had significantly higher CRP ($P<0.001$). More pronounced oxidative stress markers such as AOPP, TOS, MDA ($P<0.001$) and PAB ($P<0.05$) combined with a concomitant reduction in the concentration of total SH-groups and lower PON1 antioxidant activity ($P<0.001$, $P<0.05$, respectively) were found in patients compared to healthy controls. All individual scores: oxy-score ($P<0.001$), dyslipidemia ($P<0.05$) and inflammation ($P<0.001$) were significantly higher in patients compared to healthy controls. Consequently, the DOI score was significantly higher in comparison to healthy controls ($P<0.001$), highlighting the significance of this result for assessing cardiometabolic risk in patients. According to ROC analysis, oxy-score and DOI score possessed outstanding discriminative abilities to segregate patients from healthy controls ($AUC>0.9$). Interestingly, the oxy-score indicated better diagnostic accuracy compared to the DOI score ($P<0.01$). Obesity impacted on risk score values, particularly on the DOI score (and was significantly higher in overweight and obese patients, $P<0.001$).

Particle size and distribution of LDL and HDL subfractions, PON1 distribution within HDL subfractions and their contribution to CVD risk were assessed in patients. Normal weight and obese patients had significantly lower LDL particle size compared to normal weight and obese controls ($P<0.001$). The smallest LDL diameters were found in obese patients. Compared to normal weight and obese healthy females, less LDL I subfraction ($P<0.001$), but more LDL II and III subfractions ($P<0.001$) were found in both patient groups. Abdominal obesity, dyslipidemia, increased OS and NAFLD were associated with

decreased LDL particle size in patients (LDL particle size negatively correlated with waist-to-hip ratio, $P<0.01$; LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol), $P<0.05$; AOPP, $P<0.05$; MDA, $P<0.05$; LAP, $P<0.05$; ICO, $P<0.05$ but positively correlated with HDL-C, $P<0.05$). The analysis of HDL size and HDL subfractions (HDL 2 and HDL 3) distribution showed that HDL particle size did not differ between patients and healthy controls. However, normal weight patients had significantly higher HDL 2 subfraction than normal weight and obese controls ($P<0.05$). HDL particle size analysis within the PCOS group showed that obese patients had significantly smaller HDL diameters ($P<0.05$) and a greater HDL 3 subfraction than normal weight patients ($P<0.05$). This was consistent with previous findings that showed a decrease in HDL particle size in patients with higher CVD risk. This is also confirmed by negative correlation between HDL particle size and obesity parameters, specifically abdominal obesity in patients (BMI, $P<0.05$; waist-to-hip ratio, $P<0.05$; LAP, $P<0.05$; HIS, $P<0.05$ and ICO, $P<0.05$). LDL particle size significantly decreased with increased CVRS ($P<0.01$), dyslipidemia score, pro-oxidative and oxy-scores ($P<0.05$) in patients. Also, HDL diameters and total HDL 2 subfraction proportions were significantly decreased with increase in CVRS ($P<0.01$, $P<0.05$ respectively) and dyslipidemia score ($P<0.01$), while total HDL 3 subfraction proportions were increased with increase in CVRS ($P<0.05$), dyslipidemia and DOI scores ($P<0.05$). Together the results of particle size and distribution of LDL and HDL subfractions indicate that patients have unfavorable cardiometabolic profiles compared to healthy controls.

PON1 distribution within HDL subfractions did not differ between patients and healthy controls. Obesity had no influence on PON1 distribution within HDL subfractions in patients. However, in patients with small LDL particle size the total proportion of PON1 in HDL 2 subfractions was significantly higher ($P<0.001$) and the total proportion of PON1 in HDL 3 subfractions was significantly lower ($P<0.01$) than in patients with large LDL particle size. Analysis of the proportion of PON1 in HDL subfractions and OS markers in patients indicated positive correlation between serum PON1 activity and total proportion of PON1 in the HDL 2 subfractions ($P<0.01$), whilst a negative correlation was found between total proportion of PON1 in the HDL 3 subfractions ($P<0.01$). As patients had a higher antioxidant score, the total proportion of PON1 in the HDL 2 subfractions increased ($P<0.05$) while the total proportion of PON1 in the HDL 3 subfractions decreased ($P<0.05$). Increased oxy-score was accompanied by an increase in the total proportion of PON1 in the HDL 3 subfractions ($P<0.05$).

The results demonstrate that obesity is a greater risk factor for the development of CVD than PCOS. Anthropometric parameters, lipid status parameters, fibrinogen, NAFLD indices and ICO increase cardiovascular risk in patients. Patients have higher OS, dyslipidemia and chronic inflammation compared to healthy women and can be segregated by oxy-score and DOI score. This indicates that weight gain is a common factor responsible for the onset and progression of dyslipidemia, OS and inflammation in patients. LDL subfraction distribution indicate that there is a strong tendency towards the development of atherogenic dyslipidemia, and/or redistribution to smaller, denser LDL particles in PCOS patients. OS behaves similarly as further evidence supporting atherogenic potential and increased cardiovascular risk. Obese PCOS patients have significantly smaller HDL diameters and a higher proportion of small HDL 3 subfractions (associated with a high risk for CVD) compared to normal weight PCOS patients. Based on this, we can assume that obesity in PCOS affects the profile of HDL subfractions, while PCOS itself has no effect on the HDL subfraction profile. A comparison of PCOS women, according to the LDL particle size, indicated that PON1 activity in small HDL 3 subfractions was significantly lower in women with small, denser LDL particles, which is a sign that the antioxidant ability of HDL 3 subfractions is decreased in PCOS in conditions of increased risk for CVD.

For a more comprehensive understanding of PCOS and its related conditions future prospective studies will be required and performed using appropriate methodological procedures on a larger number of patients. Such measures would ensure elimination of factors that could influence the distribution and activity of PON1 in HDL subfractions in the PCOS population. In addition, the studies will also help us to delineate changes in HDL subfraction profiles in PCOS, and how these changes influence development of CVD.

Keywords: polycystic ovary syndrome, cardiovascular risk assessment, non-alcoholic fatty liver disease, oxidative stress, dyslipidemia, inflammation, paraoxonase 1, LDL and HDL subfractions

Scientific field: Medical Biochemistry

Scientific subfield: Medical Biochemistry

UDC number: 612.123:618.11:[616.1(043.3)]

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

- ABTS** – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (eng. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*)
- Ac-KoA** – acetil koenzim A (eng. *acetyl coenzyme A – Acetyl-CoA*)
- ADMA** – asimetrični dimetilarginin, (eng. *asymmetric dimethylarginine*)
- AES** – Društvo za višak androgena, (eng. *Androgen Excess Society*)
- AES-PCOSS** – Društvo za višak androgena i PCOS društvo (eng. *Androgen Excess Society and PCOS Society*)
- AHA** – Američko udruženje za srce (eng. *American Heart Association*)
- ALP** – aterogeni lipoproteinski fenotip - LDL B fenotip (eng. *atherogenic lipoprotein phenotype*)
- ALT** – alanin aminotransferaza (eng. *alanine aminotransferase*)
- ANCOVA** – analiza kovarijanse (eng. *analysis of covariance*)
- ANOVA** – analiza varijanse (eng. *analysis of variance*)
- AOPP** – uznapredovali proizvodi oksidacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products*)
- APRI** – AST/trombocitni odnos (eng. *aspartate aminotransferase to platelet ratio index*)
- ASRM** – Američko udruženje za reproduktivnu medicinu (eng. *American Society of Reproductive Medicine*)
- AST** – aspartat aminotransferaza (eng. *aspartate aminotransferase*)
- AUC** – površina ispod krive (eng. *area under the curve*)
- CETP** – holesterol-estar transferni protein (eng. *cholesteryl ester transfer protein*)
- CLIA** – hemiluminescentni imunoesej (eng. *chemiluminescent immunoassay*)
- CRP** – C reaktivni protein (eng. *C-reactive protein*)
- DHEA** – dehidroepiandrosteron (eng. *dehydroepiandrosterone*)
- DHEAS** – dehidroepiandrosteron-sulfat (eng. *dehydroepiandrosterone sulfate*)
- DKP** – dijastolni krvni pritisak
- DOI skor** – zbirni skor skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora i skora inflamacije
- DTNB** – 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (eng. *5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)*)
- EDTA** – etilendiaminotetrasirćetna kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- eNOS** – endotelna azot-monoksid sintaza (eng. *endothelial nitric oxide synthase*)
- ESHRE** – Evropsko udruženje za humanu reprodukciju i embriologiju (eng. *European Society for Human Reproduction and Embriology*)

E2 – estradiol

FAI – indeks slobodnih androgena (eng. *free androgen index*)

FG – Ferriman-Gallwey bodovni sistem (eng. *Ferriman-Gallwey score*)

FSH – folikulostimulirajući hormon (eng. *follicle-stimulating hormone*)

GH – hormon rasta (eng. *growth hormone*)

GH-MS – gasna hromatografija-masena spektrometrija

GLUT4 – glukoza transportera tip 4 (eng. *glucose transporter type 4*)

GnRH – gonadotropin oslobađajući hormon (eng. *gonadotropine releasing hormone*)

GOD – glukoza-oksidaza (eng. *glucose oxidase*)

GPx – glutation peroksidaza (eng. *glutathione peroxidase*)

GR – glutation reduktaza (eng. *glutathione reductase*)

HBI – hronična bubrežna insuficijencija

HC – obim kuka (eng. *hip circumference*)

HDL – lipoprotein visoke gustine (eng. *high density lipoprotein*)

HDL-H – koncentracija holesterola u lipoproteinima visoke gustine (eng. *high-density lipoprotein cholesterol – HDL-C*)

HIS – indeks hepatične steatoze (eng. *hepatic steatosis index*)

HKU – hidrogen-peroksid komplementarne jedinice

HTA – arterijska hipertenzija (lat. *hypertensio arterialis*)

H₂O₂ – vodonik-peroksid

ICO – indeks centralne gojaznosti (eng. *index of central obesity*)

IGT – poremećena tolerancija glukoze (eng. *impaired glucose tolerance*)

IL-6 – interleukin-6

IR – insulinska rezistencija (eng. *insulin resistance*)

IRS – supstrat za insulinski receptor (eng. *insulin receptor substrate*)

IRS-1 – insulinski receptor supstrat-1 (eng. *insulin receptor substrate 1*)

ITM – indeks telesne mase

KAB – koronarne arterijske bolesti

KAH – kongenitalna adrenalna hiperplazija (eng. *congenital adrenal hyperplasia – CAH*)

KG – kontrolna grupa

KVB – kardiovaskularna bolest (eng. *cardiovascular disease – CVD*)

KVRS – skor rizika za razvoj KVB (eng. *cardiovascular risk score – CVRS*)

LAP – lipidni akumulacijski proizvod (eng. *lipid accumulation product*)

LCAT – lecitin-holesterol aciltransferaza (eng. *lecithin-cholesterol acyltransferase*)

LDL – lipoprotein male gustine (eng. *low density lipoprotein*)

LDL-H – koncentracija holesterola u lipoproteinima niske gustine (eng. *low-density lipoprotein cholesterol – LDL-C*)

LH – luteinizirajući hormon (eng. *luteinizing hormone*)

LOOH – lipidni hidroperoksid (eng. *lipid hydroperoxides*)

MAP kinaza – mitogen aktivisana protein kinaza (eng. *mitogen-activated protein kinase – MAP kinase*)

MDA – malondialdehid (eng. *malondialdehyde*)

MLR – višestruka linearna regresiona analiza (eng. *multiple linear regression*)

NAFLD – nealkoholna masna bolest jetre (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*)

NCEP ATP III – eng. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*

NF-kB – nuklearni faktor-kapa B (eng. *nuclear factor kappa B*)

NIH – Američki Nacionalni institut za zdravlje (eng. *National Institutes of Health*)

NMR – nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (eng. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*)

NO – azot-monoksid

Non-HDL-H – non-HDL holesterol (eng. *non-HDL cholesterol – non-HDL-C*)

OH· – hidroksi radikal

ONOO⁻ – peroksinitrit

OS – oksidativni stres (eng. *oxidative stress*)

OxLDL – oksidovani LDL (eng. *oxidized LDL*)

O₂^{-·} – superoksid anjon radikal

PAB – prooksidativno – antioksidativni balans (eng. *prooxidant– antioxidant balance*)

PCOM – policistična morfologija jajnika (eng. *polycystic ovary morphology*)

PCOS – sindrom policističnih jajnika (eng. *polycystic ovary syndrome*)

PI3 kinaza – fosfatidilinozitol 3-kinaza (eng. *phosphatidylinositol-3-kinase*)

PON1 – paraoksonaza 1 (eng. *paraoxonase 1*)

RNS – reaktivna azotna jedinjenja (eng. *reactive nitrogen species*)

ROC – eng. receiver operating characteristic curve

ROS – reaktivna kiseonična jedinjenja (eng. *reactive oxygen species*)

R² – Modifikovan koeficijent determinacije R²

SD – standardna devijacija (eng. *standard deviation*)

sdLDL – male guste LDL čestice (eng. *small dense LDL particles*)

Se – selen

SH-grupa– sulfhidrilna grupa (eng. *sulfhydryl group*)

SHBG – globulin koji vezuje polne hormone (eng. *sex hormone-binding globulin*)

SKP – sistolni krvni pritisak

SMK – slobodne masne kiseline

SOD – superoksid dismutaza (eng. *superoxide dismutase*)

TAS – totalni antioksidantni status (eng. *total antioxidant status*)

TBARS – substances tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance (eng. *thiobarbituric acid reactive*)

TH-MS/MS – tečne hromatografije i tandem masene spektrometrije

TG – trigliceridi (eng. *triglyceride*)

TMB – 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin (eng. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*)

TNF- α – faktor nekroze tumora- α (eng. *tumor necrosis factor- α*)

TOS – totalni oksidativni status (eng. *total oxidant status*)

TT – telesna težina

TV – telesna visina

T2DM – dijabetes melitus tip 2 (eng. *type 2 diabetes mellitus*)

UAC – obim nadlaktice (eng. *upper arm circumference*)

VLDL – lipoprotein vrlo niske gustine (eng. *very-low-density lipoprotein*)

WC – obim struka (eng. *waist circumference*)

WHO – Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*)

WHR – odnos struk/kuk (eng. *waist-to-hip ratio*)

4-AAP – 4-aminoantipirin (eng. *4-aminoantipyrine*)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Sindrom policističnih jajnika.....	1
1.2. Etiopatogeneza PCOS	2
1.3. Kriterijumi za dijagnozu PCOS.....	5
1.4. Karakteristike PCOS	7
1.4.1. Hiperandrogenizam (klinički i biohemijski).....	7
1.4.2. Poremećaj funkcije jajnika	10
1.4.3. Policistični jajnici – ultrazvučne karakteristike.....	11
1.5. Faktori rizika za kardiovaskularne bolesti u PCOS.....	12
1.5.1. Gojaznost.....	13
1.5.2. Insulinska rezistencija.....	14
1.5.3. Dislipidemija	17
1.5.4. Oksidativni stres i inflamacija	18
1.5.5. Heterogenost LDL i HDL čestica.....	22
1.5.6. Aktivnost enzima PON1 na HDL česticama	24
1.5.7. Nealkoholna masna bolest jetre	25
1.5.8. Arterijska hipertenzija	26
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	27
3. MATERIJALI I METODE.....	28
3.1. Ispitanice	28
3.2. Biološki materijal	29
3.3. Određivanje antropometrijskih parametara	30
3.4. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara	30
3.4.1. Parametri inflamacije.....	30
3.4.2. Parametri lipidnog statusa	31
3.4.3. Parametri funkcije jetre i glukoza.....	31
3.4.4. Hormoni.....	31
3.5. Određivanje skora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti	31
3.6. Određivanje ICO i indeksa NAFLD.....	33
3.7. Određivanje parametara oksidativnog stresa.....	33
3.7.1. Određivanje AOPP	33
3.7.2. Određivanje TOS u serumu	34

3.7.3. Određivanje PAB.....	34
3.7.4. Određivanje koncentracije MDA.....	35
3.8. Određivanje parametara antioksidativne zaštite.....	35
3.8.1. Određivanje TAS u serumu	35
3.8.2. Određivanje koncentracije ukupnih SH-grupa	36
3.8.3. Određivanje aktivnosti enzima SOD u plazmi	36
3.8.4. Određivanje aktivnosti enzima PON1	37
3.9. Određivanje skora dislipidemije, oksidativno-stresnog, inflamatornog i DOI skora	38
3.10. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija	39
3.11. Određivanje aktivnosti enzima PON1 na HDL subfrakcijama	41
3.12. Statistička obrada podataka	42
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	43
4.1. I deo studije	43
4.1.1. Antropometrijski, biohemijski parametri i hormoni.....	44
4.1.2. Skor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti	48
4.1.3. Uticaj antropometrijskih i biohemijskih parametara koji ne ulaze u proračun skora rizika za kardiovaskularne bolesti na nivo rizika za kardiovaskularne bolesti	49
4.1.4. Uticaj hormonskog statusa na nivo rizika za kardiovaskularne bolesti.....	50
4.1.5. NAFLD i rizik za kardiovaskularne bolesti.....	52
4.1.5.1. Indeksi NAFLD i ICO	52
4.1.5.2. Ispitivanje korelacije indeksa NAFLD i ICO sa skorom rizika za kardiovaskularne bolesti	56
4.1.6. Procena dijagnostičke tačnosti indeksa NAFLD i ICO u predviđanju rizika za kardiovaskularne bolesti	58
4.1.7. Procena dijagnostičke tačnosti selektovanog modela u predviđanju rizika za kardiovaskularne bolesti	59
4.2. II deo studije.....	59
4.2.1. Socio-demografski, klinički i biohemijski parametri	61
4.2.2. Redoks status	62
4.2.3. Skorovi dislipidemije, oksidativnog stresa, inflamacije i DOI skor.....	66
4.2.4. Ispitivanje korelacije između različitih skorova.....	70

4.2.5. Uticaj gojaznosti, lipidnog statusa i parametara oksidativnog stresa na vrednosti skorova.....	70
4.2.6. Procena dijagnostičke tačnosti skorova u identifikaciji žena sa PCOS.....	72
4.2.7. Veza između gojaznosti i skorova rizika za kardiovaskularne bolesti	73
4.2.8. Distribucija LDL i HDL subfrakcija	75
4.2.8.1. Analiza LDL subfrakcija.....	76
4.2.8.2. Ispitivanje korelacija veličine i udela LDL subfrakcija sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima i parametrima oksidativnog stresa	79
4.2.8.3. Ispitivanje korelacija veličine LDL subfrakcija sa ICO i indeksima NAFLD	81
4.2.8.4. Ispitivanje korelacija veličine i udela LDL subfrakcija i skorova za procenu kardiovaskularnog rizika.....	82
4.2.8.5. Analiza HDL subfrakcija	83
4.2.8.6. Ispitivanje korelacija veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima i parametrima oksidativnog stresa	87
4.2.8.7. Ispitivanje korelacije veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija sa ICO i indeksima NAFLD.....	90
4.2.8.8. Ispitivanje korelacije veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija sa skorovima za procenu kardiovaskularnog rizika	91
4.2.8.9. Analiza raspodele aktivnosti enzima PON1 na HDL subfrakcijama.....	92
4.2.8.10. Ispitivanje korelacije raspodele udela enzima PON1 na HDL subfrakcijama sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima, indeksima NAFLD i kardiovaskularnim skorom rizika.....	96
4.2.8.11. Ispitivanje korelacije udela enzima PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima oksidativnog stresa.....	97
4.2.8.12. Ispitivanje korelacije raspodele udela enzima PON1 na HDL subfrakcijama sa izračunatim skorovima rizika.....	98

5. DISKUSIJA	99
5.1. Procena kardiovaskularnog rizika u PCOS	99
5.1.1.NAFLD i uticaj na kardiovaskularni rizik.....	103
5.2. Procena dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije i aktivnosti enzima PON1	105
5.2.1.Uticaj gojaznosti na skorove rizika	109
5.3. Heterogenost LDL i HDL čestica.....	110
5.3.1.Distribucija LDL lipoproteinskih subfrakcija.....	110
5.3.2.Distribucija HDL lipoproteinskih frakcija.....	114
5.3.3.Raspodela aktivnosti i udela enzima PON1 na HDL subfrakcijama.....	120
6. ZAKLJUČCI.....	126
7. LITERATURA.....	130
8. BIOGRAFIJA AUTORA	154

1. UVOD

1.1. Sindrom policističnih jajnika

Sindrom policističnih jajnika (eng. *polycystic ovary syndrome*, PCOS) je najčešći endokrinološki poremećaj kod žena u reproduktivnom periodu (1). Visoka prevalenca ovog sindroma je u poslednjih nekoliko decenija privukla značajnu pažnju javnosti što se odražava sa više od 1 500 000 internet sajtova koji su posvećeni PCOS. Zbog svoje heterogenosti, nejasnoća u vezi etiologije i teškoća u dijagnostikovanju, PCOS je kompleksno endokrinološko stanje. Stein i Leventhal su, 1935. godine, prvi objavili nalaze 7 gojaznih žena sa amenorejom, hirsutizmom i sa policističnim izgledom jajnika. To je bio jedan od prvih detaljnih opisa sindroma, koji se po njima dugo vremena nazivao i Stein-Leventhalov sindrom (2, 3). Međutim, još u V veku p.n.e. Hipokrat je dao prve opise karakteristika PCOS (2, 3). Godine 1765. Morgagni je opisao izrazito gojaznu ženu, staru 74. godine, sa znacima virilizacije (maskulinizacija, razvitak muških sekundarnih polnih karakteristika kod žena) što je ukazalo na povezanost hiperandrogenizma sa metaboličkim poremećajima. Chereau i Rokitansky, 1844. godine, opisuju policističan izgled jajnika. Nakon toga, Achard i Thiers, 1921. godine, opisuju postmenopauzalne žene sa šećernom bolešću (dijabetes melitusom) i kliničkim znacima viška androgena (2, 3). Jean Vague, 1947. godine je prvi ukazao da je abdominalno nakupljanje masti u značajnijoj korelaciji sa gojaznosti u odnosu na prekomernu debljinu. Na osnovu toga uveo je novi termin „androidna gojaznost“ i počeo da proučava povezanost ovog tipa gojaznosti sa razvojem dijabetes melitusa i kardiovaskularnih bolesti (4). Zatim, 1976. godine vezu hiperandrogenizma, insulinske rezistencije (eng. *insulin resistance*, IR) i mrko-crnih hiperkeratoznih promena na vratu i mestima prevoja (lat. *acantosis nigricans*) opisuju Kahn i saradnici (5). Od 1980. godine, PCOS se smatra važnim reproduktivnim i metaboličkim poremećajem (6). U objavljenim rezultatima svojih istraživanja, Kisselbach i saradnici su naglasili postojanje poremećene tolerancije glukoze (eng. *impaired glucose tolerance*, IGT), IR i hiperandrogenizma, kod žena sa abdominalnom gojaznošću (7). Danas se smatra da su osnovna obeležja ovog sindroma ovarijalna disfunkcija (oligomenoreja ili amenoreja), klinički i/ili biohemijski manifestovan hiperandrogenizam (hirsutizam/akne i/ili hiperandrogenemija) i policističan izgled jajnika, uz isključenje drugih uzroka ovih poremećaja (1-3).

Ove karakteristične osobine PCOS manifestuju se u različitom stepenu u svakom slučaju ponaosob, naglašavajući postojanje različitih fenotipova PCOS i, zapravo,

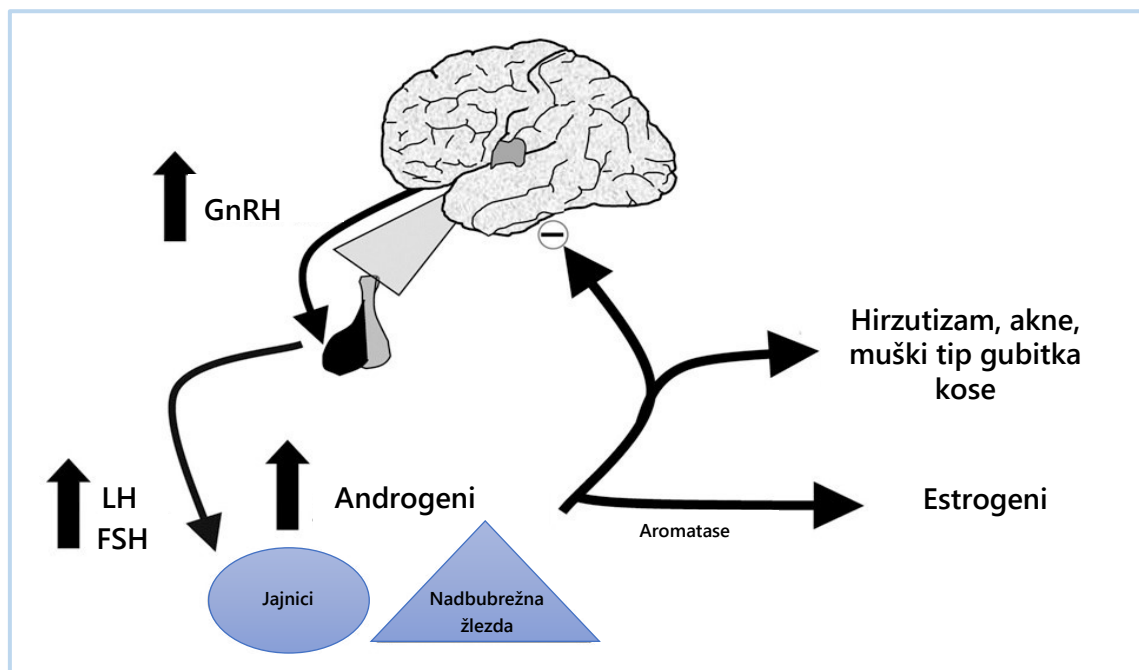
objašnjavaju zašto se ovaj endokrinološki poremećaj definiše kao sindrom, a ne kao bolest. Sindrom je skup simptoma koji se ne mogu objasniti delovanjem zajedničkog etiološkog faktora ili jedinstvenim patofiziološkim mehanizmom. Dalje, s obzirom da hormoni deluju na skoro sva tkiva, ali u različitom stepenu, što je uslovljeno funkcijom njihovih receptora i post-receptorskih signalnih puteva, kod hormonskih i metaboličkih poremećaja, u znatnoj meri, dolazi do razlika u kliničkom ispoljavanju njihovog dejstva. Ova situacija se dodatno komplikuje u PCOS gde je modifikovana sekrecija većeg broja hormona. Prisustvo hiperandrogenemije, hiperinsulinemije i promena na nivou osovine hipotalamus-hipofiza-jajnik, kao i poremećene sekrecije adipokina iz masnog tkiva, što utiče na različita tkiva (masno tkivo, jetru, mišiće i jajnike), dovodi do postojanja različitih fenotipova (8). U početku proučavanja PCOS, smatralo se da se jedina posledica ovog sindroma odnosi na reproduktivnu funkciju (1). Danas se zna da ovaj sindrom karakterišu i različite metaboličke, odnosno kardiometaboličke komplikacije kao što su gojaznost, IR i posledična hiperinsulinemija, dislipidemija, poremećena tolerancija glukoze, dijabetes melitus tip 2 (eng. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM), arterijska hipertenzija, oksidativni stres (eng. *oxidative stress*, OS), hronična inflamacija, subklinička ateroskleroza i u daljoj budućnosti razvoj kardiovaskularnih bolesti, KVB (eng. *cardiovascular disease – CVD*) (9-11). S obzirom na sve navedeno, kao i na činjenicu da su, najčešće, u pitanju mlade žene u reproduktivnom dobu, od ogromne važnosti je rano postavljanje dijagnoze PCOS, posebno kod onih koje imaju visok rizik za KVB. Na taj način bi se omogućila pravovremena prevencija kardiovaskularnog morbiditeta kod njih.

1.2. Etiopatogeneza PCOS

Proučavanju PCOS su posvećene brojne studije što govori o vremenu i uloženom naporu naučnika sa ciljem da se uoče i ispituju najvažnije karakteristike ovog sindroma, kao i pridruženi, ali ništa manje značajni metabolički poremećaji. I pored toga, još uvek nije poznat tačan patofiziološki mehanizam nastanka PCOS (12), ali različite teorije navode uticaj genetskih faktora ili faktora okoline na njegovo nastajanje. Od kombinacije genetskih i faktora okoline zavisi i fenotip PCOS koji se može otkriti u periodu do pojave puberteta (13). Na primer, gojaznost, jedan od najvažnijih faktora okoline, se u značajnoj meri nasleđuje i pogoršava fenotip PCOS kod osoba kod kojih je PCOS već genetski predisponiran (14). Zapažanja da biohemijski i metabolički poremećaji, karakteristični za

PCOS, postoje i kod muških srodnika pacijentkinja sa ovim sindromom sugerišu postojanje genetske predispozicije (15, 16). Bez obzira na prethodno navedeno, način nasleđivanja i odgovorni geni još uvek nisu poznati (17,18). Opšte je prihvaćeno da do nastanka sindroma dolazi tokom razvoja fetusa, tj. fetalnog programiranja metaboličko/endokrinih puteva (metabolizma ugljenih hidrata i sekrecije iz nadbubrežnih žlezda) bez obzira što se PCOS klinički manifestuje tek u periodu adolescencije (13, 19, 20). Kod devojčica rođenih sa manjom telesnom težinom, koje imaju IR pre adolescencije, uočena je veća prevalenca ovog sindroma (21). Stres u trudnoći, kao i pojačana aktivnost simpatikusa u majke mogu negativno da utiču na folikularni razvoj kod potomaka vodeći dugoročnom oštećenju funkcije jajnika (22).

U razvoju PCOS prepliću se različiti mehanizmi, poput hiperandrogenizma, IR, poremećaja hipotalamus-hipofiza-jajnik osovine (2) (Slika 1).



Slika 1. Patofiziologija u PCOS (2)

Još uvek nije razjašnjeno koji je od pomenutih mehanizama najznačajniji u patogenezi sindroma, ali svi zajedno čine tzv. „začarani krug“ (lat. *circulus vitiosus*) koji se ponavlja tokom čitavog života kod ovih žena. Hiperandrogenizam je osnovna karakteristika PCOS. Policistični jajnici imaju zadebljao sloj teka ćelija i ove ćelije sekretuju višak androgena pod bazalnim uslovima ili kao odgovor na stimulaciju luteinizirajućim hormonom (eng. *luteinizing hormone*, LH) (14), pre svega testosteron, androstenedion, dehidroepiandrosteron (eng. *dehydroepiandrosterone*, DHEA),

17-OH progesteron. Ovarijalna hiperandrogenemija nastaje kao posledica povećane aktivnosti različitih steroidogenih enzima u teka ćelijama jajnika (23). Zajedno, višak androgena iz jajnika i parakrina interakcija između teka i granulosa ćelija jajnika pojačava hiperandrogenemiju i hroničnu anovulaciju (androgeni iz teka ćelija inhibiraju apoptozu granulosa ćelija, a potenciraju rast malih folikula) (24, 25).

IR predstavlja prekretnicu u patogenezi i daljem razvoju PCOS. Većina žena sa PCOS, nezavisno od gojaznosti, ima IR (2). Dejstvo insulina na jajnik je jedinstveno i višestruko. Zapravo, jajnik istovremeno ispoljava i IR i osetljivost na dejstvo insulina. Tekuća ćelije jajnika kod žena sa PCOS su osetljive na insulin-zavisnu steroidogenezu, za razliku od granulosa ćelija koje su selektivno rezistentne na insulin-zavistan metabolizam glukoze (26, 27). Sa jedne strane insulin stimuliše sekreciju androgena iz jajnika (direktno i/ili indirektno – povećava LH-posredovanu sekreciju androgena) i doprinosi hiperandrogenemiji, a sa druge strane suprimira metabolizam glukoze i proizvodnju energije u folikulima čime usporava njihov rast i doprinosi anovulaciji. U PCOS IR i kompenzatorna hiperinsulinemija u perifernim tkivima (skeletni mišići i adipozno tkivo) nastaju usled defekta na nivou insulinskog signalnog puta (28). Za razliku od perifernih tkiva, osetljivost jajnika na dejstvo insulina ostaje normalna. Hiperandrogenemija, gojaznost i IR formiraju „začarani krug“ u kome hiperandrogenemija potencira razvoj gojaznosti (abdominalne), gojaznost pogoršava IR, a IR, odnosno sekundarna hiperinsulinemija, održava hiperandrogenemiju.

Izmenjeno pulsirajuće lučenje gonadotropina, nastalo delovanjem genetskih i faktora okoline, direktno deluje na jajnike. U slučaju ovulatornog menstrualnog ciklusa, u lutealnoj fazi dolazi do povećanja koncentracije progesterona, odnosno povećanja aktivnosti negativne povratne sprege kojom progesteron izaziva inhibiciju aktivnosti pulsne sekrecije gonadotropin oslobađajućeg hormona (eng. *gonadotropine releasing hormone*, GnRH). Hronična anovulacija uzrokuje izostanak pulsne sekrecije progesterona u lutealnoj fazi menstrualnog ciklusa usled čega je koncentracija progesterona smanjena. Kao posledica toga, smanjena je aktivnost negativne povratne sprege putem koje progesteron inhibira GnRH pulsnu sekreciju. Povećana sekrecija LH u odnosu na sekreciju folikulostimulirajućeg hormona (eng. *follicle-stimulating hormone*, FSH) je stimulisana povećanom frekvencom pulsne sekrecije GnRH. To na kraju dovodi do anovulacije (normalne ili snižene koncentracije FSH dovode do zastoja u rastu dominantnog folikula) i viška androgena (sintezu androgena u jajnicima stimulišu visoke

koncentracije LH) (24, 29). Koncentracije LH i FSH bi trebalo određivati u folikularnoj fazi, zbog njihove ciklične sekrecije tokom menstrualnog ciklusa, ili nasumice u slučaju amenoreje. Zbog poremećene sekrecije gonadotropina, u PCOS je odnos LH/FSH povećan. Normalno uhranjene žene sa PCOS imaju povećane vrednosti LH, pa samim tim i odnos LH/FSH. Za razliku od njih, gojazne žene sa PCOS imaju normalne vrednosti LH kao i LH/FSH odnos (30), što ne isključuje dijagnozu PCOS. Međutim, s obzirom da gojaznost utiče na visinu LH pulseva, ali ne i na frekvenciju (31), određivanje LH/FSH odnosa ne spada u dijagnostičke kriterijume za PCOS.

1.3. Kriterijumi za dijagnozu PCOS

Jasna i sveobuhvatna definicija PCOS je predmet stalne polemike stručne javnosti. Razne kombinacije simptoma i znakova ovog sindroma su tokom godina rezultirale postojanjem različitih dijagnostičkih kriterijuma uspostavljenih od strane brojnih ekspertskih grupa (8). Objavljene su četiri definicije PCOS, počevši od 1990.godine, koje i danas predstavljaju kriterijume za postavljanje dijagnoze ovog sindroma (Tabela 1).

Tabela 1. Definicije sindroma policističnih jajnika

Definicija/godina	Dijagnostički kriterijumi
NIH/1990	Zahteva prisustvo oba kriterijuma: 1. Hiperandrogenizam (klinički i/ili biohemijski) 2. Disfunkcija jajnika
Rotterdam (ESHRE/ASRM) /2003	Zahteva prisustvo najmanje dva kriterijuma: 1. Hiperandrogenizam (klinički i/ili biohemijski) 2. Hronična anovulacija 3. Policistična morfologija jajnika ultrazvučno verifikovana
AES/2006	Zahteva prisustvo hiperandrogenizma (klinički i/ili biohemijski) i bilo koji od sledećih kriterijuma: 1. Hronična anovulacija 2. Policistična morfologija jajnika ultrazvučno verifikovana
AES-PCOSS /2009	Zahteva istovremeno prisustvo: 1. Hiperandrogenizam (klinički i/ili biohemijski) 2. Disfunkcija jajnika (hronična anovulacija i/ili policistična morfologija jajnika ultrazvučno verifikovana)

NIH – National Institutes of Health; ESHRE – European Society for Human Reproduction and Embriology; ASRM – American Society for Reproductive Medicine; AES – Androgen Excess Society; AES-PCOSS – Androgen Excess Society and PCOS Society (8)

Američki Nacionalni institut za zdravlje (eng. *National Institutes of Health*, NIH) je na konferenciji održanoj 1990. godine postavio tzv. NIH definiciju PCOS. Prema ovoj,

najstarijoj, definiciji dijagnostički kriterijumi za PCOS obuhvataju istovremeno prisustvo hiperandrogenizma – klinički (hirzutizam/akne) i /ili biohemijski i hronične anovulacije bez obzira na morfologiju jajnika. Pri tome je potrebno isključiti druge uzroke navedenih poremećaja kao što su kongenitalna adrenalna hiperplazija, KAH (eng. *congenital adrenal hyperplasia – CAH*), tumori nadbubrežnih žlezda, hiperprolaktinemija i sl. Time je naglašeno da je PCOS metabolički i reproduktivni poremećaj (32). Međutim, s obzirom da je policistična morfologija jajnika (eng. *polycystic ovary morphology, PCOM*), potvrđena ultrazvukom, dokazana kod 20–30% žena sa ovulatornim ciklusima, bez hiperandrogenizma (33), veliki broj lekara (posebno evropskih) je smatrao da bi PCOM trebala biti jedan od kriterijuma za postavljanje dijagnoze PCOS (8).

U Roterdamu 2003. godine, Evropsko udruženje za humanu reprodukciju i embriologiju (eng. *European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE*) i Američko udruženje za reproduktivnu medicinu (eng. *American Society of Reproductive Medicine, ASRM*) konsenzusom su uspostavili nove kriterijume za definisanje i dijagnostiku PCOS prema kojima je neophodno prisustvo dva od sledeća tri simptoma: hiperandrogenizam (klinički i/ili biohemijski), hronična anovulacija i PCOM (34). Ipak, ni ova nova definicija, odnosno kriterijumi za dijagnozu PCOS nisu umanjili neslaganja između lekara različitih specijalnosti, što je jasno ilustrovano u studiji koja je sprovedena 2005. godine (35), u kojoj su učestvovali ginekolozi i endokrinolozi. Većina ginekologa je smatrala PCOM glavnim kriterijumom za dijagnozu PCOS, dok je stav endokrinologa bio da su najvažniji kriterijumi za dijagnozu PCOS hirzutizam i anovulacija (35). Roterdamski kriterijumi ne opisuju osnovne karakteristike PCOS, s obzirom da izjednačavaju PCOM sa prisustvom hronične anovulacije i hiperandrogenizmom prilikom postavljanja dijagnoze. Primenom ove definicije, bitno se povećao broj žena sa PCOS, kao i broj različitih fenotipova ovog sindroma, uključujući i žene sa ovulatornim ciklusima i hiperandrogenizmom, odnosno žene sa anovulatornim ciklusima bez hiperandrogenizma (36).

Zbog toga je međunarodna organizacija Društvo za višak androgena (eng. *Androgen Excess Society, AES*), 2006. godine, predložila kompromisno rešenje između dva seta dijagnostičkih kriterijuma. Njihova definicija PCOS zahteva obavezno prisustvo hiperandrogenizma (kliničkog i/ili biohemijskog) i prisustvo anovulacije i/ili PCOM (37). Društvo za višak androgena i PCOS društvo (eng. *Androgen Excess Society and PCOS Society, AES-PCOSS*) 2009. godine su zajednički definisali kriterijume gde je za

dijagnozu PCOS neophodno istovremeno prisustvo hiperandrogenizma (kliničkog i/ili biohemijskog) i ovarijalne disfunkcije i/ili policističnih jajnika (38).

Pri postavljanju dijagnoze sindroma korišćenjem Roterdamskih ili AES-PCOSS kriterijuma, takođe treba isključiti druge moguće uzroke hormonskih poremećaja koji daju sličnu kliničku sliku (KAH, disfunkcija tireoidne žlezde, hiperprolaktinemija, neoplastična sekrecija androgena, Kušingov sindrom, rezistencija na glukokortikoide kao i višak androgena koji je izazvan lekovima i mnogi drugi poremećaji).

U zavisnosti od primenjenih dijagnostičkih kriterijuma prevalenca PCOS je različita. Primenom NIH kriterijuma, prevalenca dijagnostikovanog PCOS iznosi 6–8%, primenom ESHRE/ASRM kriterijuma raste na 15–25%, dok se primenom AES-PCOSS kriterijuma kreće između 10–15%.

1.4. Karakteristike PCOS

1.4.1. Hiperandrogenizam (klinički i biohemijski)

Hirzutizam je prisutan kod 60–70% žena sa PCOS što ga čini najčešćom kliničkom manifestacijom hiperandrogenizma (2). Pored hirzutizma, klinički hiperandrogenizam se može manifestovati i u vidu akni i/ili muškim tipom gubitka kose (38). Za razliku od hirzutizma, akne i muški tip gubitka kose se javljaju u značajno manjem procentu kod žena sa PCOS (prevalenca akni je 15–25%) (38). Hirzutizam je pojava dlakavosti kod žena na tzv. androgen-osetljivim područjima tj. mestima gde se dlake kod žena normalno ne pojavljuju (muški tip distribucije dlake) (8). Iako je prevalenca hirzutizma u PCOS visoka, procena stepena hirzutizma je i dalje sporna. Naime, brojne metode za objektivnu procenu rasta dlake su skupe i dugotrajne, pa nisu pogodne za rutinsku kliničku praksu. Sa druge strane, za procenu hirzutizma, danas je opšte prihvaćen metod Ferriman-Gallwey bodovni sistem (eng. *Ferriman-Gallwey score*, FG) (39). Ovaj metod stepenuje rast terminalne dlake na skali od 0 do 4 na 11 anatomskih mesta i koristi zbir od 9 područja za ukupni skor hirzutizma. Vrednost FG skora ≥ 8 ili ≥ 5 se smatra potvrdom hirzutizma (8). Međutim, ovaj metod ima nekoliko nedostataka, pre svega veoma je subjektivan, izjednačava rast dlake na rukama i nogama i licu ili grudima, iako su ova područja različito osetljiva na dejstvo androgena. Dodatno, starost i etnička pripadnost utiču na stepen maljavosti zbog različitog stepena aktivnosti enzima 5α -reduktaze tako da se mogu

očekivati različite normalne vrednosti između različitih populacija i starosnih grupa iako one još uvek nisu definisane (40).

Biohemijski hiperandrogenizam (hiperandrogenemija) je, možda, najznačajnija karakteristika PCOS. Povišen nivo cirkulišućih androgena se zapaža kod značajnog procenta žena sa PCOS. Jajnici i nadbubrežne žlezde podjednako sintetizuju testosteron i androstenedion kod žena u reproduktivnom periodu (8), za razliku od dehidroepiandrosteron-sulfata (eng. *dehydroepiandrosterone sulfate*, DHEAS) koji isključivo sintetizuju nadbubrežne žlezde (41). Ova činjenica je klinički značajna pošto određivanje bazalnih koncentracija androgena može direktno da ukaže na poreklo hiperandrogenemije. Pored toga, na nivo androgena utiču i godine starosti, što je dokazano postepenim padom njihovih koncentracija tokom vremena (42). Osim toga, nemaju svi androgeni jednak efekat. Prekursor androstenediona, DHEA, ima najslabiju androgenu aktivnost, dok je testosteron najvažniji cirkulišući androgen kod žena.

Za procenu viška androgena kod žena preporučeno je određivanje koncentracije testosterona (43), pri čemu se njegova koncentracija može određivati u bilo kom periodu menstrualnog ciklusa (44). Međutim, postoji značajno preklapanje vrednosti testosterona između PCOS žena i zdrave kontrolne grupe (KG). Ovaj nedostatak osetljivosti je delom posledica razlika između testova različitih proizvođača kao i nedovoljne tačnosti određivanja niskih koncentracija testosterona koje postoje kod žena (45). Većina laboratorija u kojima se određuje testosteron koriste direktne imunotestove, bez prethodne ekstrakcije hormona iz biološkog materijala (45, 46). Zapravo, većina imunotestova meri više koncentracije testosterona u poređenju sa metodom gasna hromatografija-masena spektrometrija (GH-MS) ili tačne hromatografije i tandem masene spektrometrije (TH-MS/MS) koje predstavljaju zlatni standard u određivanju koncentracije steroidnih hormona (47, 48). Ipak, ove metode su jako skupe i koriste se u ograničenom broju laboratorija, tako da nisu pogodne u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Zbog toga se nameće pitanje, da li treba određivati koncentraciju ukupnog ili slobodnog testosterona? Najveći procenat testosterona u cirkulaciji je čvrsto vezan za globulin koji vezuje polne hormone (eng. *sex hormone-binding globulin*, SHBG) (65%) i slabije vezan za albumin (33%). Faktori koji snižavaju koncentraciju SHBG (hiperinsulinemija - insulin snižava sintezu SHBG u jetri, gojaznost, hormon rasta (eng. *growth hormone*, GH) i glukokortikoidi), odnosno faktori koji povećavaju koncentraciju SHBG (estrogen i tiroksin - T4) utiču na nivo ukupnog testosterona (8).

Niska koncentracija SHBG ima izuzetnu dijagnostičku tačnost za postavljanje dijagnoze PCOS u poređenju sa merenjem serumskih koncentracija androgena što su pokazale epidemiološke studije (49).

AES i Endokrinološko društvo (eng. *Endocrine Society*) su predložili kao najkorisnije za dokazivanje hiperandrogenemije u PCOS, određivanje koncentracije slobodnog testosterona primenom visoko osetljivih testova. Cirkulišući nivoi slobodnog testosterona odražavaju istovremeno stepen sinteze testosterona u jajnicima i nadbubrežnim žlezdama kao i udeo testosterona koji je vezan za SHBG. Dakle, u PCOS koncentracija slobodnog testosterona može biti povećana uz normalne nivoe ukupnog testosterona (50). Ipak, analitička tačnost testova koji se koriste za određivanje koncentracije slobodnog testosterona ne preporučuje njegovo određivanje za procenu hiperandrogenemije u PCOS (46).

Zbog prethodno navedenih razloga, definisan je indeks slobodnih androgena (eng. *free androgen index*, FAI). FAI se danas smatra najosetljivijim parametrom za procenu hiperandrogenemije u PCOS (38). Predstavlja odnos ukupnog testosterona i SHBG:

$$FAI = \frac{\text{Ukupni testosteron (nmol/L)}}{SHBG \text{ (nmol/L)}} * 100$$

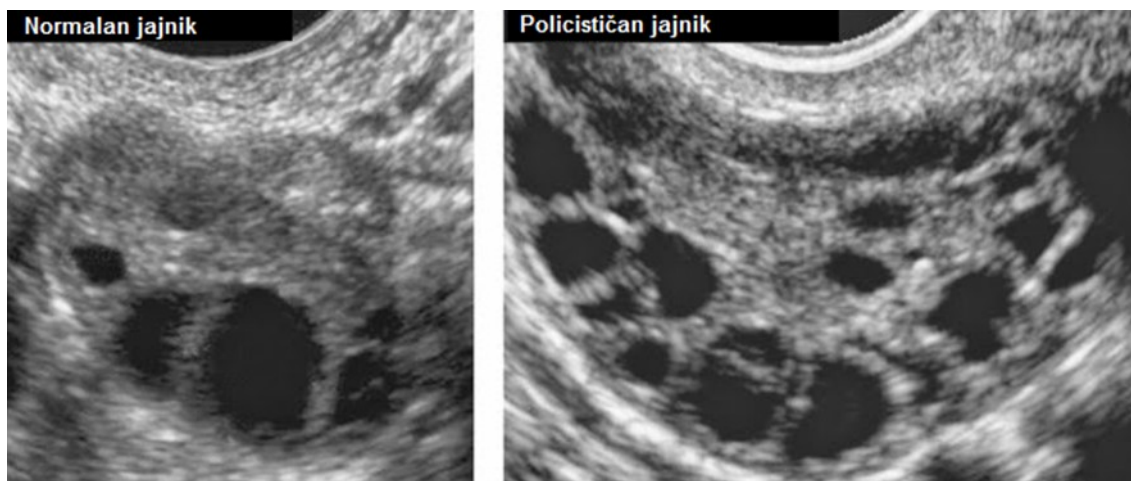
I dalje postoje različita mišljenja u pogledu vrste androgena koje treba određivati za procenu hiperandrogenemije u PCOS. Rezultati velikih studija pokazuju da oko 30% žena sa PCOS ima povećane koncentracije androstenediona (neposredni prekursor testosterona, koji nema afinitet za vezivanje za SHBG) i lošiji metabolički profil, odnosno ozbiljniji oblik PCOS (8). S obzirom na poreklo DHEAS (isključivo ga sintetisuje nadbubrežne žlezde) i što je povećan kod 10% žena sa PCOS, nije ga neophodno određivati rutinski u PCOS. DHEAS je dobar prediktor viška androgena jedino u slučaju suspektnih androgen sekretujućih tumora (51, 52).

1.4.2. Poremećaj funkcije jajnika

Anovulacija je, 1990. godine, istaknuta kao glavna manifestacija PCOS. Poremećaj menstrualnog ciklusa, kod žena sa PCOS, nastaje zbog anovulacije i obično se ispoljava u obliku oligomenoreje ili amenoreje. Oligomenoreja predstavlja menstrualne cikluse koji traju duže od 35 dana i obično ih ima manje od 6 do 8 godišnje, dok amenoreja predstavlja odsustvo menstrualnog krvarenja duže od tri meseca, bez prisustva trudnoće (53). Anovulatorne cikluse ima 20–50% žena sa PCOS, sa karakteristikama hiperandrogenizma i urednim menstrualnim ciklusima (2). Sa druge strane, čak oko 80% žena sa PCOS ima poremećene menstrualne cikluse (54, 55). Zbog činjenice da kod devojaka sa PCOS postoji poremećaj uspostavljanja regularnih menstrualnih ciklusa iako se menarha javlja pravovremeno (36) postavljanje dijagnoze u ovom uzrastu je otežano ali važno zbog činjenice da i devojke bez PCOS, u tom uzrastu, mogu da imaju neredovne cikluse i do 5 godina posle menarhe. Definicija hronične anovulacije u PCOS se zasniva na: a) isključenju drugih uzroka anovulacije (hiperprolaktinemija, hipotireoidizam, itd.) i b) izostankom pika progesterona u lutealnoj fazi menstrualnog ciklusa (8. do 12. dana pre ciklusa) i/ili odsustvom žutog tela (potvrđeno ultrazvučnim pregledom jajnika) tokom 3 uzastopna ciklusa (8). Serumska koncentracija progesterona >10 nmol/L potvrđuje skorov ovulaciju. Značajan broj studija je dijagnostikovao anovulaciju ukoliko su žene imale manje od 10 menstrualnih ciklusa godišnje. To je rezultiralo velikim brojem lažno pozitivnih rezultata (žene koje su imale 8 ciklusa, a koji su bili ovulatorni), odnosno lažno negativnih rezultata (žene koje su imale više od 10 ciklusa tokom godine, a koji su bili anovulatorni, posebno u slučaju učestalih krvarenja) u ispitivanim PCOS grupama. Opšte je poznato da zdrave žene, sa redovnim menstrualnim ciklusima, mogu imati 1–2 anovulatorna ciklusa godišnje. Štaviše, s obzirom da abdominalna gojaznost i IR snažno koreliraju sa anovulacijom, promena iz anovulacije u ovulaciju je dokazana kod žena sa PCOS koje su podvrgnute dijetetskom režimu ishrane koji vodi relativno brzom gubitku telesne težine. Stoga je moguće da smanjenje indeksa telesne mase, ITM (eng. *body mass index*, BMI) za 5–10% može ponovo dovesti do pojave ovulacije (56).

1.4.3. Policistični jajnici – ultrazvučne karakteristike

Primenom Roterdamskih kriterijuma iz 2003. godine, postojanje policističnih jajnika se potvrđuje prisustvom ≥ 12 folikula, prečnika 2–9 mm ili volumenom jajnika $>10 \text{ cm}^3$, u jednom ili oba jajnika (8) (Slika 2).



Slika 2. Normalan i policističan jajnik prikazan transvaginalnom ultrasonografijom tokom folikularne faze menstrualnog ciklusa

Budući da se PCOM dijagnostikuje metodom transvaginalne ultrasonografije, merenje zapremine jajnika, odnosno broja folikula i njihove veličine je krajnje subjektivno i zavisi od preciznosti, iskustva i pažnje lekara. Sa pojavom ultrasonografije visoke rezolucije, kod čak više od 50% mladih žena sa ovulatornim ciklusima potvrđeno je ≥ 12 folikula, prečnika 2–9 mm u jajniku (57). Pitanje broja folikula po jajniku kao kriterijuma za potvrdu njihove policistične morfologije, pa samim tim i dijagnoze PCOS, pokrenule su i dve skorašnje studije u kojima su poređene žene sa PCOS i zdrava KG (58, 59). U zaključku, obe studije predlažu podizanje dijagnostičkog praga na ≥ 19 , odnosno ≥ 26 folikula po jajniku za dijagnostikovanje PCOM. Volumen jajnika predstavlja dobar surogat marker PCOM, iako u poređenju sa brojem folikula po jajniku ima nižu osetljivost u razdvajanju žena sa PCOS u odnosu na KG. Stoga, primena ovog markera u potvrđivanju PCOM je preporučljiva u slučajevima kada nije moguće primeniti transvaginalnu ultrasonografiju, npr. u slučaju adolescentkinja (34). Prevalenca policističnih jajnika zavisi od starosti. Oko 20% žena u reproduktivnom dobu ima PCOM, bez znakova hiperandrogenizma i anovulacije, dok je procenat PCOM još i veći kod adolescentkinja što se, međutim, reguliše tokom godina. Na kraju, spontana ovulacija može potpuno da normalizuje PCOM, posebno broj folikula.

1.5. Faktori rizika za kardiovaskularne bolesti u PCOS

Najčešći uzrok smrtnosti u svetu su KVB. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) iz 2012. godine 17,5 miliona ljudi godišnje umire od KVB, što predstavlja 31% svih smrtnih slučajeva u svetu (60). Slična situacija je i u Srbiji, gde su tokom 2014. godine uzrok smrti kod 53,3% populacije bile KVB (61). Da bi se stopa smrtnosti smanjila treba primeniti strategiju koja se sastoji od nadzora i praćenja pacijenata, prevencije i smanjenja faktora rizika i poboljšanja zdravstvene nege kroz ranu detekciju i pravovremenu primenu odgovarajućeg tretmana.

Mnoge studije su pokazale da postoji međusobna povezanost faktora rizika za KVB, poput abdominalne gojaznosti, dislipidemije, IGT, T2DM, OS, inflamacije i hipertenzije, sa znacima PCOS (62). Međutim, prisustvo faktora rizika ne znači automatski i povećan rizik, pa je veza između PCOS i rizika za KVB još uvek nerazjašnjena i predmet aktuelnih istraživanja (63). Brojne velike kliničke studije još uvek nisu dale podatke o kardiovaskularnom morbiditetu i mortalitetu u PCOS, verovatno iz razloga što nisu obezbedile dugotrajno praćenje ovih žena. Još uvek nije definisan specifičan model za procenu rizika za razvoj KVB u kasnijem životnom dobu za žene mlađe od 40 godina sa dijagnozom PCOS. Neke studije su pokušale da rizik procene primenom Framingamskog skora rizika koji predstavlja verovatnoću za razvoj koronarne srčane bolesti u narednih 10 godina. Međutim, rizik nije bio povišen (<10% verovatnoće za pojavu koronarne srčane bolesti se smatra niskim rizikom) i nije se razlikovao između PCOS i KG (64). McMahan sa saradnicima je definisao proračun za procenu skora rizika za osobe mlađe od 40 godina, koji koristi tradicionalne faktore rizika: starost, hipertenzija, dijabetes, niska koncentracija holesterola u lipoproteinima visoke gustine, HDL-H (eng. *high-density lipoprotein cholesterol*, *HDL-C*), visok non-HDL-H (eng. *non-HDL cholesterol* – *non-HDL-C*), gojaznost i pušenje u cilju procene verovatnoće za prisustvo značajne aterosklerotske lezije na koronarnim arterijama i abdominalnoj aorti, čime se predviđa rizik za pojavu koronarne srčane bolesti kasnije u toku života (65).

1.5.1. Gojaznost

Odavno je ustanovljeno da gojaznost, posebno abdominalna/visceralna, ima presudnu ulogu u patofiziologiji PCOS i značajno doprinosi ozbiljnom KV riziku kod ovih žena. Prevalenca gojaznosti u PCOS se kreće između 30–75% prema podacima brojnih studija (66) i može se objasniti već pomenutim „začaranim krugom“ koji formiraju gojaznost, IR i hiperandrogenemija.

Abdominalna/visceralna (centralna) gojaznost predstavlja preteranu akumulaciju masnog tkiva u predelu stomaka i abdomena, a procenjuje se preko obima struka (eng. *waist circumference*, WC). Abdominalna gojaznost je koristan klinički prediktor metaboličkih poremećaja u PCOS, čak i pre njihove pojave (44), a u visokom stepenu korelira i sa endokrinim i reproduktivnim poremećajima (67). IR i hiperinsulinemija koje su ispoljenije u prisustvu gojaznosti, uzrokuju smanjenu sintezu SHBG u jetri što rezultira višim koncentracijama biološki aktivnih androgena (testosterona), odnosno hiperandrogenemijom u PCOS (68). Moguće je da od ranog uzrasta, višak androgena favorizuje razvoj abdominalne gojaznosti i time indirektno nastanak IR (13). Distribucija masnog tkiva u abdominalnu regiju (abdominalna gojaznost) ne može u potpunosti da objasni metaboličke poremećaje koji su prisutni u PCOS, ali se smatra da abdominalna gojaznost u velikoj meri određuje PCOS fenotip (69). Masno tkivo je dinamičan endokrini organ koji učestvuje u sintezi i sekreciji važnih hormona i citokina, kao i u regulaciji brojnih metaboličkih i inflamatornih procesa (70). Kod žena sa PCOS, dokazano je da masno tkivo ima izmenjenu morfologiju, kao i funkciju. Adipociti žena sa PCOS su hipertrofični, posebno u slučaju viška androgena (71). Ova hipertrofija adipocita je uključena u inicijaciju niskostepene inflamacije dovodeći do fenomena kompresije, hipoperfuzije (smanjene vaskularizacije) masnog tkiva i hipoksije i posledičnog oslobađanja brojnih medijatora inflamacije. Kao rezultat, lokalna inflamacija dovodi do poremećaja funkcije adipocita, nekroze ćelija i konačno do IR (72), a kasnije i do T2DM i drugih KV faktora rizika (73).

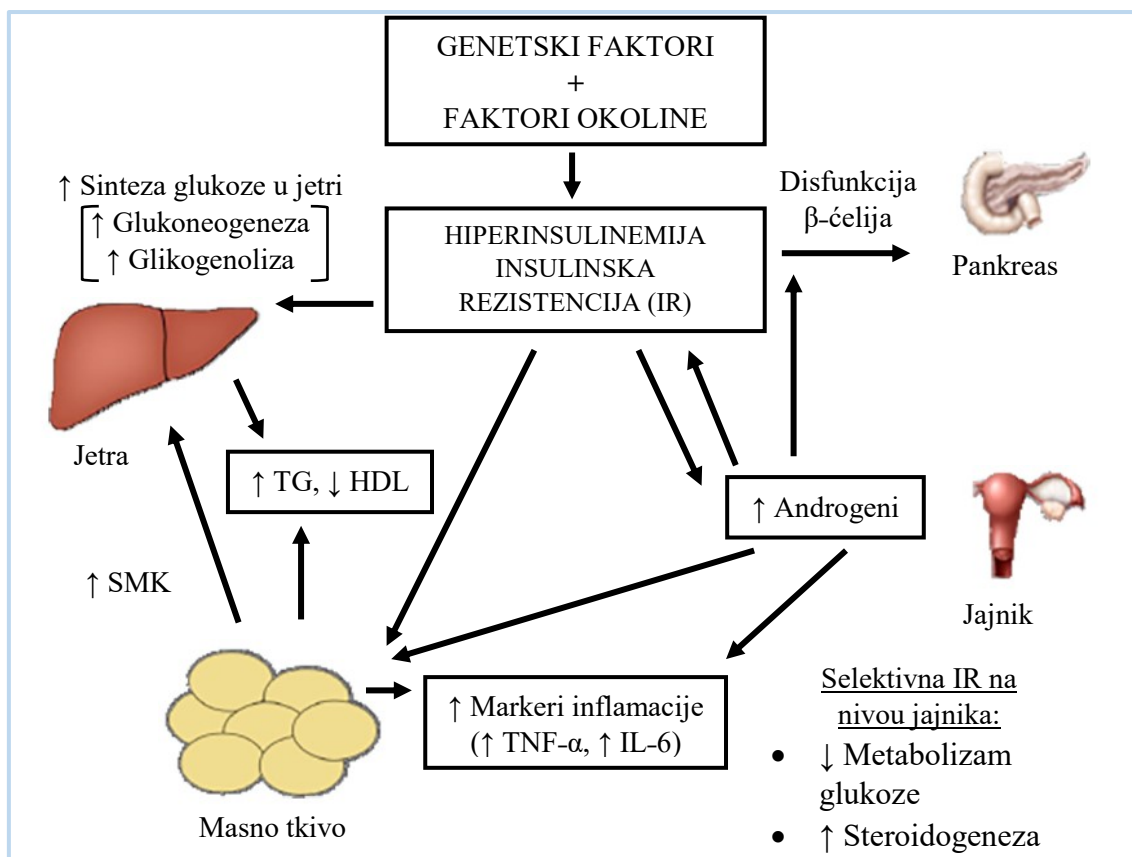
Uzrok abnormalne morfologije i funkcije masnog tkiva u PCOS je još uvek nerazjašnjen. Dostupni rezultati upućuju na indirektnu ulogu androgena. Androgeni stimulišu hipertrofiju adipocita, mehanizmima koji uključuju aktivaciju enzima i proteina koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata i lipida, u nastanku OS i diferencijaciji preadipocita u zrele adipocite. Dodatno, androgeni pojačavaju lipolizu što dovodi do povećanog oslobađanja slobodnih masnih kiselina (SMK) (74). Međutim, u bliskoj

budućnosti trebalo bi temeljnije proučiti unutrašnje defekte u proliferaciji i diferencijaciji adipocita.

1.5.2. Insulinska rezistencija

Insulinska rezistencija (IR) je stanje u kome ćelije organizma ne reaguju na prisutnu koncentraciju insulina tako da insulin ne može da ostvari svoje metaboličke aktivnosti. To ima za posledicu povećanje cirkulišuće koncentracije insulina u cilju realizacije njegovih metaboličkih efekata (75, 76). Insulin je jedini hipoglikemijski hormon u organizmu koji reguliše nivo glukoze u krvi putem stimulacije ulaska glukoze u ćelije insulin zavisnih tkiva (skeletalni mišići, srčani mišić i adipociti), supresije glukoneogeneze u jetri i lipolize u masnom tkivu. Smatra se da je IR jedan od osnovnih patofizioloških mehanizama u PCOS (34). Prevalenca IR je visoka i kreće se između 60–80% kod žena sa PCOS, odnosno 95% kod gojaznih PCOS žena (66).

Na Slici 3 prikazano je višestruko dejstvo insulina na različita tkiva i organe kod žena sa PCOS.

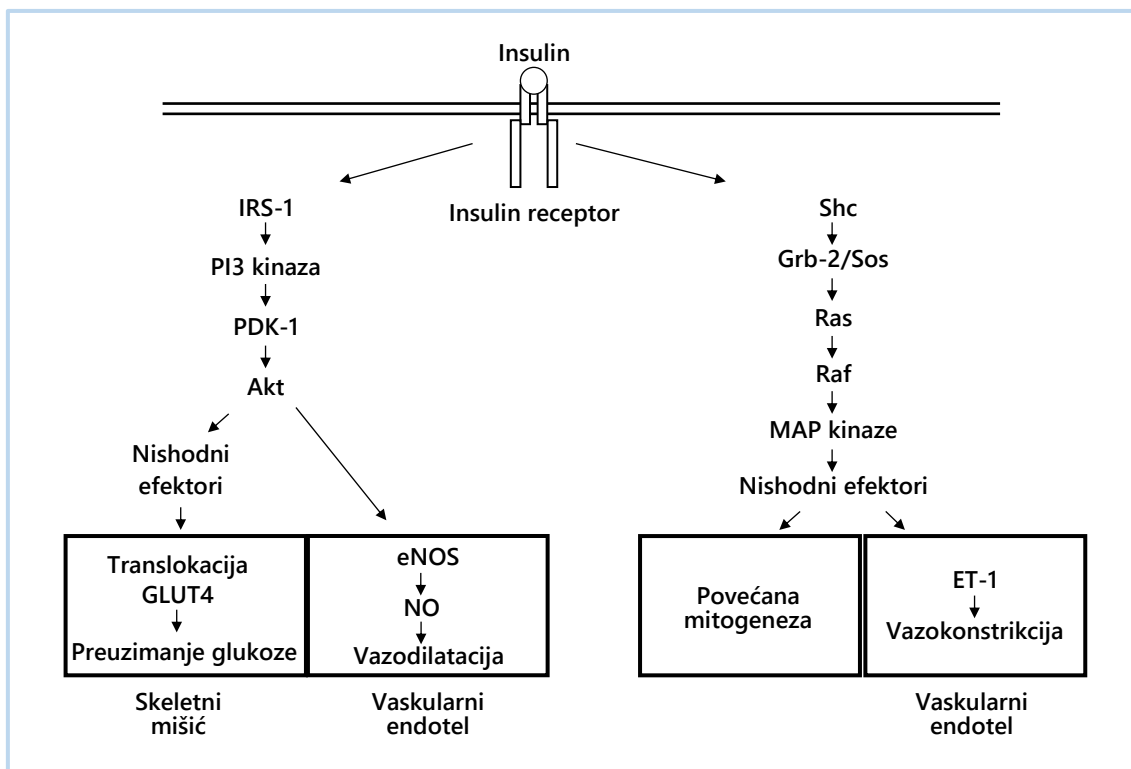


Slika 3. Višestruki efekti insulinske rezistencije u PCOS (77)

IR ne zavisi od gojaznosti, s obzirom da i normalno uhranjene i gojazne žene sa PCOS mogu biti insulin rezistentne u poređenju sa, po težini, odgovarajućom KG. Ipak, IR je izraženija kod gojaznih PCOS žena (3, 77). Kompromitovana sekrecija insulina podstiče povećanu sekreciju androgena iz jajnika i nadbubrežnih žlezda u PCOS i uz prisutnu gojaznost povećava prevalencu IGT. IR je glavni patogenetski mehanizam koji u PCOS dovodi do razvoja kardiometaboličkih poremećaja, poput IGT, T2DM, aterogene dislipidemije, OS, hronične inflamacije, endotelne disfunkcije i drugih. Osnovni mehanizam koji dovodi do IR u PCOS je defekt u post-receptorskom insulinom signalnom putu. Defekt je izražen kroz povećanu serin/treonin fosforilaciju supstrata za insulin receptora (eng. *insulin receptor substrate*, IRS), odnosno inhibiranu fosforilaciju tirozina u IRS i posledičnu proteinsku degradaciju IRS (78). Inhibicijom tirozin fosforilacije IRS, kao i njegovom delimičnom razgradnjom, smanjuje se kapacitet IRS da se veže za receptor za insulin, odnosno smanjena je insulinom posredovana nishodna aktivacija fosfatidilinozitol 3-kinaze (eng. *phosphatidylinositol-3-kinase*, PI3 kinase). Time je ometeno prenošenje signala ka ciljnoj ćeliji u insulinom signalnom putu što vodi defektu u dejstvu insulina i/ili poremećenoj sekreciji insulina, smanjenoj ekspresiji transportera tip 4 za glukozu (eng. *glucose transporter type 4*, GLUT4) i smanjenom transportu glukoze u ćeliju. Posledica svega je IR na nivou perifernih tkiva (skeletni mišići, masno tkivo) (2) (Slika 4). Dokazano je da IR, odnosno kompenzatorna hiperinsulinemija dovode direktno do hipertrofije endotelne i glatkih mišićnih ćelija u zidu krvnih sudova kod žena sa PCOS. Naime, IR smanjuje sintezu i sekreciju azot-monoksida (NO), odnosno pojačava njegovu inaktivaciju nakon oslobađanja iz endotelne ćelije. Hiperinsulinemija stimuliše sintezu vazokonstriktora, poput endotelina-1. Kao rezultat svega, dolazi do povećanja neelastičnosti krvnih sudova i smanjenog vazodilatatornog dejstva insulina (79) (Slika 4). U arterijama skeletnih mišića, insulin istovremeno stimuliše sintezu NO i endotelina-1 i neravnoteža između oslobađanja ova dva medijatora može predstavljati osnovni patofiziološki mehanizam kojim IR doprinosi razvoju endotelne disfunkcije, važnog faktora rizika za KVB. Naime, sinteza NO u endotelnim ćelijama je posredovana PI3 kinaza-zavisnim insulinom signalnim putem koji ima izrazite sličnosti sa metaboličkim putem u skeletnim mišićima putem koga insulin reguliše ulazak glukoze u ćelije. Endotelne ćelije sekretuju vazokonstriktor, endotelin-1, posredstvom posebnog nemetaboličkog MAP kinaza-

zavisnog insulinskog-signalnog puta (eng. *mitogen-activated protein kinase – MAP kinase*) (Slika 4).

U stanju metaboličke IR, u endotelu, dolazi do specifičnog oštećenja PI3 kinaza-zavisnog signalnog puta, dok je MAP kinaza-zavisni signalni put neoštećen što dovodi do neravnoteže između sinteze NO i sekrecije endotelina-1, odnosno do vazokonstrikcije, smanjenog protoka krvi i pogoršanja IR (66).



Slika 4. Opšte karakteristike insulinskih signalnih puteva; PI3-kinaze i MAP kinaze (80)

Dokazano je da žene sa PCOS imaju povišene nivoe endotelina-1 (81). Postoje i drugi mehanizmi koji povezuju IR i endotelnu disfunkciju, poput povećanog OS, dejstva različitih hormona i citokina iz masnog tkiva.

Poremećaji koji koegzistiraju u PCOS, poput hiperandrogenemije, disfunkcije masnog tkiva, niskostepene inflamacije, povećane sekrecije markera inflamacije, npr. faktora nekroze tumora- α (eng. *tumor necrosis factor- α* , TNF- α) i SMK mogu dodatno pogoršati IR (82).

1.5.3. Dislipidemija

Najčešća kardiometabolička komplikacija u PCOS je dislipidemija iako tip i obim poremećaja variraju. Prema podacima vodiča Nacionalnog programa o učenju o holesterolu, (eng. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*, NCEP ATP III) čak 70% žena sa PCOS ima granične ili povišene nivoe lipida (11). Dislipidemija obično uključuje niske koncentracije holesterola u lipoproteinima visoke gustine, HDL-H, hipertrigliceridemiju i visoke koncentracije holesterola u lipoproteinima niske gustine, LDL-H (eng. *low-density lipoprotein cholesterol – LDL-C*). Različiti tipovi dislipidemije u PCOS su rezultat međusobnog uticaja hiperandrogenizma, IR, faktora okoline (ishrana, fizička aktivnost) i genetskih faktora. Kod gojaznih žena sa PCOS najčešće je prisutna aterogena dislipidemija, koju karakterišu hipertrigliceridemija, niske koncentracije HDL-H i povišene koncentracije malih gustih LDL čestica (eng. *small dense LDL particles, sdLDL*), koje su posebno aterogena forma lipoproteina. Ovaj oblik aterogene dislipidemije, zajedno sa niskostepenom inflamacijom je u korelaciji sa IR (83, 84), a IR i hiperandrogenemija mogu doprineti povećanju malih, gustih LDL čestica (85). Prisustvo malih, gustih LDL čestica, uz normalne koncentracije LDL-H, je udruženo sa visokom incidencom koronarne arterijske bolesti (KAB) (11). Zbog međusobnog preklapanja patofizioloških mehanizama gojaznosti i IR, prevalenca aterogene dislipidemije je veća kod gojaznih žena (70% PCOS populacije u SAD-u ima ovaj tip dislipidemije). Međutim, u zemljama gde preovlađuje niži ITM u PCOS populaciji (npr. evropskim), ova prevalenca je daleko niža (86). Dislipidemija, koju karakteriše visoka koncentracija LDL-H, ima manju prevalencu u PCOS, na nju manje utiče gojaznost, ali je pod većim uticajem hiperandrogenemije. Pretpostavlja se da višak androgena može rano da modifikuje veličinu LDL čestica (eng. *low density lipoprotein, LDL*) kod žena sa PCOS (87), omogućavajući duži period za njihovu dalju oksidativnu modifikaciju što vodi ka aterogenijem potencijalu ovih čestica (88). Dodatno, povećane koncentracije oksidovanog LDL (eng. *oxidized LDL, OxLDL*), pouzdanog prediktora KAB, su potvrđene kod žena sa PCOS, što upućuje na postojanje veze između izmenjenog lipidnog metabolizma i OS u PCOS (88).

1.5.4. Oksidativni stres i inflamacija

Oksidativni stres se definiše kao neravnoteža između povećanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i ograničenog kapaciteta antioksidativne odbrane. Odlikuje ga ireverzibilno oštećenje skoro svih ćelijskih komponenti (proteina, lipida i DNK) što vodi poremećaju funkcije ćelija (82). Dakle, OS nastaje usled poremećaja ravnoteže između prooksidativnih i antioksidativnih činioaca, što vodi prekomernom stvaranju ROS, pa je kao takav uključen u patogenezu mnogih bolesti, poput dijabetes melitusa, ateroskleroze, gojaznosti, IR kao i procesa starenja (89, 90). Iako je OS važna karika u patogenezi PCOS (koja i dalje nije u potpunosti razjašnjena), još uvek nije utvrđeno da li su povećani nivoi OS u PCOS posledica samog sindroma ili su povezani sa njegovim potencijalnim komplikacijama. To je delimično posledica činjenice da karakteristike PCOS, poput viška androgena, IR, gojaznosti i abdominalne gojaznosti značajno doprinose razvoju OS (91).

U PCOS potencijalni izvori ROS su masno tkivo, oksidativno izmenjene masne kiseline, hiperglikemija, aktivacija različitih enzima: NADPH-oksidade-Nox enzimi, ksantin-oksidade-Xox, dekuplovane endotelne azot-monoksid sintaze (eng. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) i disfunkcija mitohondrija (82). ROS nastaju u ćelijama dejstvom molekula kiseonika i predstavljaju heterogenu grupu slobodnih i neslobodnih kiseoničnih radikala, poput superoksid anjona ($O_2^{\cdot-}$), hidroksi radikala (OH^{\cdot}) i vodonik-peroksida (H_2O_2). Najveće količine ROS nastaju u mitohondrijama, kao posledica „curenja“ elektrona iz elektronskog transportnog lanca uz učešće velikog broja enzima: Nox, superoksid dismutaze (eng. *superoxide dismutase*, SOD), katalaze i glutation peroksidaze (eng. *glutathione peroxidase*, GPx) (92).

Endotelne ćelije su drugi važan izvor ROS, kao i reaktivnih azotnih jedinjenja (eng. *reactive nitrogen species*, RNS) (93). RNS nastaju u reakciji NO i $O_2^{\cdot-}$. NO je važan regulator vaskularne homeostaze, koji reguliše tonus glatkih mišićnih ćelija u zidu krvnih sudova, krvni pritisak, aktivaciju trombocita i vaskularne signalne puteve (94). Sintetiše se iz prekursora L-arginina dejstvom enzima eNOS. U stanju OS i povećanog stvaranja ROS, NO reaguje sa ROS i nastaje peroksinitrit ($ONOO^-$) kao i druga RNS koja su jaki oksidansi. $ONOO^-$ je najpotentniji RNS, odgovoran za lipidnu peroksidaciju ćelijske membrane kao i niz drugih oksidativnih oštećenja u ćelijama. Stoga, NO je istovremeno i koristan i štetan molekul. Korisni efekti NO se ogledaju u uklanjanju ROS, sprečavanju lipidne peroksidacije, posreduje u otklanjanju posledica OS, dovodi do vazodilatacije

i time uspostavlja normalan protok krvi, ograničava stvaranje ROS pod dejstvom Nox, inhibira agregaciju trombocita, a takođe, može da smanji oksidaciju LDL čestica (11).

Već je pomenuto, da je sinteza NO posredovana PI3 kinaza-zavisnim insulinskim-signalnim putem u endotelnim ćelijama, ali u PCOS u stanju IR dolazi do oštećenja ovog signalnog puta što ima za posledicu poremećaj sekrecije NO (95). OS inicira sintezu ONOO⁻ koji oštećuje tirozinske ostatke u proteinima i izaziva lipidnu peroksidaciju čiji je krajnji proizvod malondialdehid (eng. *malondialdehyde*, MDA). Dalje, ONOO⁻ inhibira aktivnost enzima SOD kao i drugih antioksidativnih molekula čime stimuliše stvaranje ROS unutar ćelije i pojačava OS posredovano oštećenje (11).

Masno tkivo, odnosno oksidacija masnih kiselina kao i hiperglikemija, takođe predstavljaju potencijalne izvore ROS u PCOS.

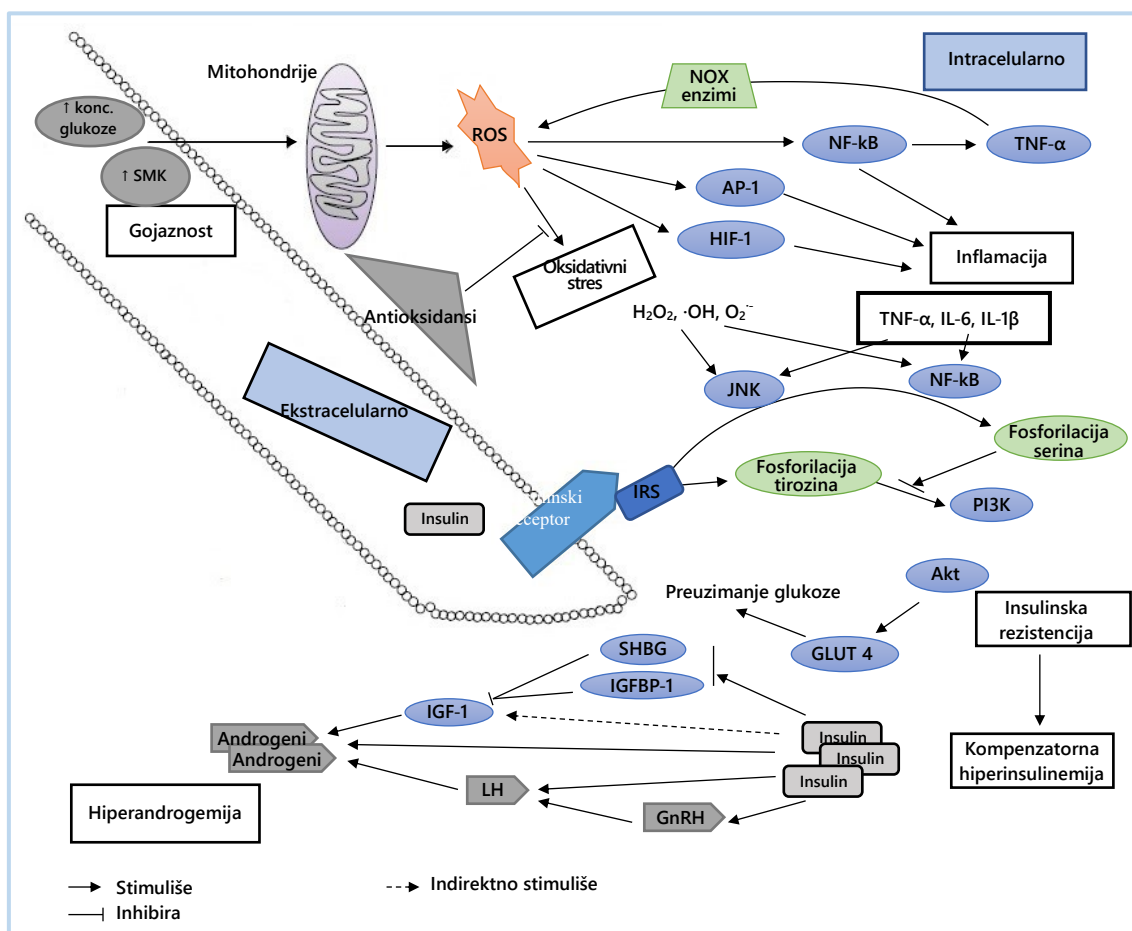
Antioksidansi su hemijska jedinjenja koja prekidaju oksidativne procese u ćelijama i uklanjaju slobodne radikale. Postoje 2 tipa antioksidanasa: enzimski i neenzimski. U enzimске antioksidanse spadaju ključni enzimi koji neutrališu višak ROS i RNS: SOD, katalaza, paraoksonaza-1 (eng. *paraoxonase 1*, PON1), GPx, glutation reduktaza (eng. *glutathione reductase*, GR). U neenzimске antioksidanse spadaju egzogeni i endogeni molekuli sa redukujućim osobinama, poput glutationa, vitamina C, A, selena (Se) čija je uloga da održavaju redoks balans (96).

Različite studije su pokazale da OS značajno korelira sa gojaznošću, IR, hiperandrogenijom i hroničnom inflamacijom (97, 98).

S obzirom da IR ne zavisi nužno od gojaznosti, iako je prevalenca IR veća kod gojaznih žena sa PCOS, IR se smatra osnovnim mehanizmom kojim gojaznost doprinosi razvoju OS. Abdominalno masno tkivo je lipolitički aktivnije (zbog povećanja adrenergičnih receptora) i istovremeno rezistentnije na antilipolitičko dejstvo insulina što dovodi do povećanog nivoa cirkulišućih SMK. IR podstiče OS zato što hiperglikemija i visoka koncentracija SMK dovode do produkcije ROS (99). Kada se višak glukoze ili SMK apsorbuje u ćeliju, sintetiše se velika količina redukujućih metabolita: piruvat i acetil koenzim A, Ac-KoA (eng. *acetyl coenzyme A*, *Acetyl-CoA*). Njihov povećan ulazak u mitohondrije radi dalje oksidacije, dovodi do pojačane aktivnosti elektronskog transportnog lanca i transfera 1 elektrona što na kraju vodi povećanoj sintezi ROS (72). Kod žena sa PCOS, nezavisno od abdominalne gojaznosti, a kao odgovor na hiperglikemiju, primećena je povećana produkcija ROS u mononuklearnim ćelijama putem stimulisane sekrecije inflamatornih markera TNF- α i nuklearnog faktora-kapa B

(eng. *nuclear factor kappa B*, NF- κ B) i aktivacije Nox (100). Pored mononuklearnih ćelija, različite izoforme ovog enzima iz endotela, fibroblasta, vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i srčanih mišićnih ćelija doprinose povećanom stvaranju ROS u PCOS i značajno su povezane sa aterosklerozom i hipertenzijom (101). Hiperglikemija istovremeno menja aktivnost enzimskih antioksidanasa čime otežava OS (98).

Hiperandrogenemija značajno doprinosi hiperglikemijom-posredovanom OS putem senzibilizacije leukocita na hiperglikemiju i ushodnom regulacijom ekspresije različitih markera inflamacije čak i kod mršavih (vitkih) PCOS žena (102) (Slika 5) .



Slika 5. Interakcija između oksidativnog stresa, inflamacije, insulinske rezistencije i hiperandrogenemije u patofiziologiji PCOS (103)

Ranije studije su takođe pokazale da OS igra važnu ulogu u razvoju IR u PCOS. ROS imaju kritičnu ulogu u procesu inflamacije, jer stimulišu oslobađanje TNF- α , poznatog medijatora IR i interleukina-6 (IL-6). Proinflamatorni medijatori, za uzvrat, dodatno pogoršavaju stepen IR. Naime, TNF- α inhibira fosforilaciju supstrata za insulinski receptor na tirozinskim ostacima, a to vodi smanjenoj ekspresiji GLUT4 i smanjenom transportu glukoze u ćeliju, a IL-6 povećava fosforilaciju serina na insulinski receptor

supstratu-1 (IRS-1) (104). Ova saznanja ukazuju na to da IR u PCOS može da prethodi nastanku T2DM, koji je dokazano faktor rizika za KVB.

OS je važna karika u nastanku endotelne disfunkcije u PCOS. Hiperglikemija, hronična inflamacija i IR stimulišu povećano stvaranje ROS u endotelnim ćelijama, koje prevazilazi kapacitet ćelijske antioksidativne odbrane, tj. enzimskih i neenzimskih antioksidanasa. ROS, nastali dejstvom različitih oksidaza, napadaju ključne regulatorne proteine u endotelnim ćelijama čime remete njihovu funkciju, odnosno podstiču razvoj vaskularne bolesti i ateroskleroze (105).

Hronična niskostepena inflamacija je važna karakteristika PCOS i dokazano je da učestvuje u njegovoj patogenezi i razvoju (106). Poznato je da inflamacija učestvuje u inicijaciji i progresiji ateroskleroze i da su hronična inflamacija i OS povezani u pomenutim patološkim procesima (107). Brojni dokazi idu u prilog konceptu formiranja povratnih sprega, gde inflamacija indukuje stvaranje ROS, dok OS pogoršava inflamaciju (108). Ovi mehanizmi su opisani u endotelu i adipoznom tkivu. Hronična inflamacija zajedno sa OS ushodno reguliše endotelnu disfunkciju i naposljetku aktivira formiranje aterosklerotskog plaka. C reaktivni protein (eng. *C-reactive protein*, CRP), inflamatorni marker čije su koncentracije povećane kod žena sa PCOS, nishodno reguliše aktivnost eNOS (inhibira je) čime smanjuje bioraspoloživost NO, a povećava nivoe endotelina-1 i različitih adhezivnih molekula i hemoatraktanata ukazujući na proinflamatorni i proaterosklerotski fenotip PCOS (109).

Za procenu OS u PCOS danas se koriste brojni cirkulišući markeri oksidativnog oštećenja, tzv. prooksidansi, odnosno proizvodi njihovog delovanja: homocistein – nezavisni faktor rizika za KVB, MDA – krajnji proizvod lipidne peroksidacije, koji odražava oksidativno oštećenje ćelije, asimetrični dimetilarginin (eng. *asymmetric dimethylarginine*, ADMA) – glavni endogeni inhibitor aktivnosti NOS i medijator endotelne disfunkcije i posledične ateroskleroze, uznapredovali proizvodi oksidacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products*, AOPP) – marker oksidacijom posredovanog oštećenja proteina i moćan medijator inflamacije, prooksidativno-antioksidativni balans (eng. *prooxidant-antioxidant balance*, PAB), parametar koji odražava istovremeno prisustvo prooksidanasa i antioksidanasa u živim sistemima, totalni oksidativni status (eng. *total oxidant status*, TOS) – agregativan (ukupni) indeks oksidativnog kapaciteta plazme, kao i antioksidansi: totalni antioksidativni status (eng. *total antioxidant status*, TAS) – agregativan (ukupni) indeks antioksidativnog

kapaciteta plazme, SOD – antioksidativni enzim koji konvertuje $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 i štiti ćelije od dejstva ROS, ukupne sulfhidrilne grupe (eng. *sulfhydryl group*, SH-grupe) – čistači slobodnih radikala i PON1 – antioksidativni enzim (62). Aktivnost i koncentracija PON1 mogu biti smanjene u stanjima OS, čime se dodatno povećava rizik za razvoj KVB. Ranije studije su pokazale da je smanjena aktivnost PON1 povezana sa IR (110). OS doprinosi smanjenju aktivnosti PON1 kroz promene redoks statusa slobodnih sulfhidrilnih grupa proteinskog molekula ovog enzima, posebno sulfhidrilne grupe aminokiseline cistein koja se nalazi u aktivnom centru enzima (111). Stoga, neophodno je standardizovati sve markere koji ukazuju na izražen OS, tj. smanjenu antioksidativnu zaštitu, te na taj način procenjivati nivo OS kod svakog pojedinca.

1.5.5. Heterogenost LDL i HDL čestica

Određeni broj studija se bavio ispitivanjem promena OS i antioksidativne zaštite na nivou lipoproteinskih subfrakcija (LDL, lipoprotein male gustine, eng. *low density lipoprotein* i HDL, lipoprotein visoke gustine, eng. *high density lipoprotein*) kod žena sa PCOS. LDL i HDL su prisutne u cirkulaciji u vidu heterogene populacije čestica (subfrakcija) koje se razlikuju u pogledu veličine, gustine i lipidnog sastava. Dugogodišnja proučavanja ovih lipoproteina uspela su da rasvetle molekularne mehanizme nastanka pojedinačnih subfrakcija, pri čemu je utvrđeno da su za različit stepen aterogenog, odnosno ateroprotektivnog delovanja subfrakcija odgovorne razlike u njihovim fizičko-hemijskim osobinama. Primenom metode vertikalne elektroforeze na poliakrilamidnom gradijent gelu, LDL čestice se mogu razdvojiti u četiri klase na osnovu razlika u veličini (dijametri), LDL I-IV (112). Najveći dijametar i najnižu gustinu ima LDL I subfrakcija, dok je najmanja i najgušća LDL IV subfrakcija. Heterogenost LDL čestica je posledica promene u količini njihovih prekursora ili aktivnosti enzima koji učestvuju u procesima metabolizma lipoproteina. Ispitivanje svojstava LDL subfrakcija je dovelo do otkrića da su male, guste LDL čestice (LDL III i LDL IV) posebno aterogena forma lipoproteina u poređenju sa velikim, plutajućim LDL česticama (LDL I i LDL II) (113). Mnoge žene sa PCOS imaju povećane vrednosti ovih aterogenih malih, gustih LDL čestica, odnosno neklasični aterogeni lipidni profil čija je prevalenca 47% (114). Prisustvo malih, gustih LDL čestica, čak i uz normalne koncentracije LDL-H je povezano sa 3 do 7 puta većom učestalošću koronarne srčane bolesti (115). Ove aterogene čestice su povezane sa progresijom ateroskleroze i ranim razvojem KVB. Veliki broj činjenica objašnjava

njihove aterogene karakteristike. Male, guste LDL čestice lakše ulaze u endotelne ćelije zida krvnog suda, podložnije su oksidaciji i imaju smanjenu antioksidativnu zaštitu. Utvrđeno je da prisustvo PCOS *per se* predstavlja najvažniji faktor koji utiče na nastanak aterogenog LDL profila (116). Međutim, IR i hiperandrogenemija mogu dovesti do povećanja udela malih, gustih LDL čestica i samim tim povećati rizik za razvoj KVB (117). IR inhibira antilipolitičko dejstvo insulina, odnosno menja aktivnost lipoproteinske lipaze i hepatične lipaze, te stimuliše lipolizu u masnom tkivu i jetri i dovodi do hipertrigliceridemije (118). U uslovima hipertrigliceridemije, posledično se povećava razmena triglicerida (eng. *triglyceride*, TG) i estara holesterola između različitih klasa lipoproteina. Dolazi do formiranja holesterol estrima bogatih lipoproteina vrlo niske gustine (eng. *very-low-density lipoprotein*, VLDL) koji se dalje transformišu u male, guste LDL čestice (86) koje se sporije uklanjaju iz cirkulacije (119). Korelacija između veličine LDL čestica i sniženih cirkulišućih koncentracija SHBG (marker viška androgena) može dovesti do zaključka da hiperandrogenemija može imati rani modifikujući efekat na veličinu LDL čestica kod žena sa PCOS, iako je smanjena sinteza SHBG, takođe i posledica IR (87).

HDL čestice su najmanji i najgušći lipoproteini plazme. HDL predstavlja heterogenu grupu lipoproteina koji se tehnikom vertikalne elektroforeze na poliakrilamidnom gradijent gelu mogu razdvojiti na HDL 2 (HDL 2b, HDL 2a) čestice, koje su veće i sadrže više holesterola i HDL 3 (HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c) čestice, koje su manje i sadrže manje holesterola, a bogatije su proteinima (120). Dobro je poznato da HDL čestice imaju antiaterogenu ulogu koja se uglavnom odnosi na njihovo učešće u reverznom transportu holesterola, odnosno procesu uklanjanja holesterola iz perifernih tkiva (121). U ovom procesu, nascentni HDL koji se sintetiše u jetri i tankom crevu apsorbuje slobodan holesterol iz perifernih tkiva (čak i iz makrofaga) i prevodi ga u holesterol-estar radi skladištenja unutar HDL u toku transporta. U procesu sazrevanja i remodelovanja HDL čestice, pod dejstvom enzima lecitin-holesterol aciltransferaze (eng. *lecithin-cholesterol acyltransferase*, LCAT), dolazi do konverzije nascentne, diskoidne čestice u HDL 3 formu, a zatim u sfernu HDL 2 česticu (122). Konverzija HDL 2 u male HDL 3 čestice dovodi do preuzimanja estara holesterola u jetru i steroidogene organe. HDL ima i anti-inflamatorne i vazoprotektivne efekte, a dodatno, svoj antiaterogeni potencijal ostvaruje i mehanizmima koji sprečavaju oksidaciju LDL čestica. HDL je glavni prenosilac lipidnih hidroperoksida i oksidovanih holesterol estara do jetre radi eliminacije.

U uslovima IR, tj. hipertrigliceridemije, menja se sastav HDL subfrakcija. Najpre se intenzivira proces recipročne razmene estara holesterola i TG između HDL 2 i VLDL čestica u prisustvu holesterol-estar transfernog proteina (eng. *cholesteryl ester transfer protein*, CETP). Ovako strukturno izmenjene HDL 2 čestice dalje se konvertuju pod dejstvom enzima hepatične lipaze u male, guste HDL 3 čestice koje su bogate TG. Tako nastale male HDL 3 čestice ne pokreću novi ciklus reverznog transporta holesterola, već se ubrzano katabolišu (123), što može imati uticaja na distribuciju PON1. Takođe, IR može dovesti do sniženja cirkulišućih nivoa HDL-H. Uprkos povećanoj sintezi HDL-H, nivoi HDL u plazmi su sniženi zbog toga što stepen degradacije odnosa apolipoprotein A-1/HDL-H prevazilazi njegovu povećanu sintezu (124). Uzročno-posledičnu vezu između promena u raspodeli HDL subfrakcija i rizika za razvoj KVB ispitivale su brojne studije tokom proteklih godina. Zaključak najvećeg broja studija je da je povećan rizik za razvoj KVB povezan sa smanjenom količinom HDL 2 subfrakcija (125, 126). Današnje shvatanje antiaterogenog delovanja HDL podrazumeva funkcionalnost, odnosno kvalitet, a ne samo relativni udeo HDL subfrakcija. Pokazano je da su male, guste HDL 3 čestice funkcionalnije, s obzirom da su bolji akceptori holesterola i snažniji inhibitori apoptoze endotelnih ćelija, odnosno da imaju veći anti-inflamatorni i antioksidativni potencijal od HDL 2 čestica (127). U prisustvu različitih faktora rizika, funkcionalnost HDL 3 čestica može biti smanjena što podrazumeva redukovani antiaterogeni potencijal, što je najčešće karakteristika HDL čestica u aterogenoj dislipidemiji, inflamaciji i pojačanom OS (128).

1.5.6. Aktivnost enzima PON1 na HDL česticama

Antioksidativna/anti-inflamatorna uloga HDL zavisi od prisustva antioksidativnih enzima. PON1 je cirkulišuća esteraza i laktonaza udružena sa apolipoproteinom A1 na HDL (129). Većina PON1 cirkuliše udružena sa HDL, međutim male količine ovog enzima se nalaze u VLDL (130) i hilomikronima (131). Deakin i sar. (130) su predložili da VLDL može služiti u prenosu PON1 na HDL. Antioksidativnu aktivnost PON1 na HDL česticama ostvaruje hidrolizom lipidnih peroksida u oksidovanim lipoproteinima, tj. sprečavanjem oksidativne modifikacije lipoproteina, pre svega LDL čestica (121, 132). Osim toga, PON1 stimuliše HDL-posredovanu eNOS zavisnu sintezu NO i olakšava preuzimanje holesterola iz makrofaga (129, 133). Nekoliko epidemioloških i kohortnih studija je dalo ubedljive dokaze za antiaterogenu aktivnost PON1 na HDL česticama kroz sprečavanje oksidacije lipida, odnosno smanjenje priliva oksidovanih lipida i holesterola

i stvaranje makrofagnih penastih ćelija, smanjenu sintezu holesterola u makrofagama i stimulaciju isticanja holesterola iz makrofaga. Na taj način se ograničava razvoj aterosklerotskih lezija (129, 133, 134). Neposredno nakon sinteze u jetri PON1 se vezuje za HDL 3 česticu koja se povećava i sa porastom sadržaja holesterola prelazi u veću HDL 2 česticu (135). Međutim različita patološka stanja dovode do promene u fiziološkom putu reverznog transporta holesterola, što utiče i na distribuciju PON1 između HDL 2 i HDL 3.

1.5.7. Nealkoholna masna bolest jetre

U PCOS mnogi faktori, uključujući metaboličke i endokrine, utiču na kardiovaskularni rizik (136). Nealkoholna masna bolest jetre (eng. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) i abdominalna gojaznost zajedno predstavljaju faktore rizika za razvoj KVB (137). Pored toga, prevalenca NAFLD je veća kod žena sa PCOS, dok abdominalna gojaznost povećava verovatnoću za razvoj PCOS (138). NAFLD je stanje, koje se karakteriše povećanim nakupljanjem masti odnosno triglicerida u jetri. Ključnu ulogu u razvoju NAFLD, pored abdominalne gojaznosti, ima IR. Između količine masnog tkiva u jetri i razvoja IR, postoji snažna veza, kako na nivou same jetre, tako i na nivou masnog tkiva i mišića, odnosno na nivou čitavog organizma (139). Zlatni standard na osnovu koga se sa sigurnošću postavlja dijagnoza NAFLD i na osnovu koga se utvrđuje histološki stadijum bolesti je histološki nalaz biopsije jetre (140). Međutim, cena, invazivnost, mogućnost uzimanja nedovoljnog i neadekvatnog uzorka tkiva, kao i komplikacije same metode ograničavaju njeno korišćenje u rutinskom skriningu radi ranog otkrivanja ovog oboljenja (141). Upravo zbog toga, razvijeni su scoring sistemi, tj. definisani su indeksi NAFLD koji koriste antropometrijske mere i neke biohemijske parametre za lakše postavljanje dijagnoze NAFLD: AST/trombocitni odnos (eng. *aspartate aminotransferase to platelet ratio index*, APRI), indeks hepatične steatoze (eng. *hepatic steatosis index*, HIS), lipidni akumulacijski proizvod (eng. *lipid accumulation product*, LAP), kao i antropometrijski indeks centralne gojaznosti (eng. *index of central obesity*, ICO) (142-145). Zna se da je NAFLD povezana sa IR i kardiovaskularnim rizikom, ali nije jasno da li PCOS i NAFLD deluju aditivno na kardiovaskularni rizik. U PCOS veza između procene kardiovaskularnog rizika i NAFLD i abdominalne gojaznosti može se ispitati pomoću ovih indeksa koji se koriste za dijagnozu NAFLD.

1.5.8. Arterijska hipertenzija

Arterijska hipertenzija (lat. *hypertensio arterialis*, HTA) je značajan faktor rizika za KVB. Međutim, HTA nije stalni pratilac PCOS, mada su neke studije potvrdile veću prevalencu HTA u PCOS u odnosu na opštu populaciju (146), koja se kreće između 10–40% (147). Značajan uticaj na vrednost krvnog pritiska u PCOS bi mogla imati gojaznost. Naime, gojaznost i PCOS zajednički doprinose razvoju HTA, što se može objasniti postojanjem IR koja je karakteristika oba poremećaja. IR dovodi do povećane retencije natrijuma na nivou bubrežnih tubula (postoji korelacija između IR i povišenih nivoa cirkulišućeg aldosterona) (148), pa samim tim sekundarno i do povećanja krvnog pritiska. Hiperandrogenemija, nezavisno od gojaznosti i hiperinsulinemije, može doprineti razvoju hipertenzije u PCOS, delujući na sistem renin-angiotenzin. I na kraju, povećana aktivnost simpatikusnog nervnog sistema, takođe doprinosi razvoju HTA u PCOS (66).

Sagledavajući povezanost HTA i zajedničkih karakteristika PCOS, možemo zaključiti da lečenjem metaboličkih poremećaja prisutnih u PCOS možemo istovremeno lečiti i HTA, odnosno smanjiti rizik za razvoj HTA i posledično KVB u daljoj budućnosti.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Proceniti rizik za razvoj KVB kod žena sa PCOS primenom skora rizika za KVB kod osoba mlađih od 40 godina i ispitati kombinovani uticaj različitih faktora rizika koji postoje u ovom sindromu na nivo kardiovaskularnog rizika i pojavu KVB kasnije u toku života.
- Odrediti prisustvo i vrstu dislipidemije u krvi žena sa PCOS u poređenju sa zdravim ženama.
- Odrediti nivo inflamacije u krvi žena sa PCOS u poređenju sa zdravim ženama.
- Utvrditi da li postoji razlika u parametrima OS i antioksidativne zaštite u krvi žena sa PCOS u poređenju sa zdravim ženama.
- Odrediti aktivnost enzima PON1 u krvi žena sa PCOS i uporediti aktivnost ovog enzima kod žena sa PCOS i zdravih žena.
- Odrediti distribuciju LDL i HDL lipoproteinskih subfrakcija u krvi žena sa PCOS u poređenju sa zdravim ženama.
- Odrediti aktivnost PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama kod žena sa PCOS i uporediti ih sa raspodelom PON1 kod zdravih žena.
- Proceniti sposobnost skorova rizika (skor dislipidemije, oksidativno-stresni skor, skor inflamacije i njihovog zbirnog skora – DOI skora), aktivnosti PON1, zastupljenosti pojedinih LDL i HDL subklasa i raspodeli PON1 na HDL subfrakcijama u PCOS da doprinesu proceni rizika za razvoj KVB.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanice

Ova studija je sprovedena u dva dela. U prvom delu studije smo procenjivali rizik za razvoj KVB kod žena sa PCOS na osnovu prisustva/odsustva gojaznosti. Takođe, ispitivali smo kombinovani uticaj različitih faktora rizika koji postoje u ovom sindromu (antropometrijski i lipidni parametri, parametri inflamacije, NAFLD indeksi i ICO) na nivo kardiovaskularnog rizika i pojavu KVB kasnije u toku života. U drugom delu ove studije prikupljen je novi uzorak za ispitivanje uticaja dislipidemije, inflamacije, OS, aktivnosti PON1 (preko računanja pojedinačnih skorova rizika i DOI skora), odnosno zastupljenosti pojedinih LDL i HDL subfrakcija i raspodeli PON1 na HDL subfrakcijama u PCOS i proceni njihovog doprinosa riziku za KVB. Dislipidemija je definisana na osnovu kriterijuma NCEP ATP III ($TG \geq 1,7$ mmol/L; $HDL-H < 1,29$ mmol/L; $LDL-H \geq 3,4$ mmol/L) (149).

U prvom delu studije, učestvovalo je 100 ispitanica (54 žene sa PCOS i 46 zdravih žena) starosne dobi između 18 i 35 godina koje su ispitivane u periodu od januara 2007. godine do decembra 2007. godine u Dnevnoj bolnici Klinike za internu medicinu KBC "Dr Dragiša Mišović – Dedinje" u Beogradu. U drugom delu studije učestvovala su 164 ispitanice (114 žena sa PCOS i 50 zdravih žena) starosti između 20 i 39 godina, koje su ispitivane u periodu od oktobra 2015. godine do juna 2017. godine na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije. Sve žene uključene u oba dela ove studije bile su upućene kod endokrinologa zbog poremećaja menstrualnog ciklusa ili hirzutizma. Dijagnoza PCOS postavljena je na osnovu Roterdamskih konsenzus kriterijuma iz 2003. godine (8) koji podrazumevaju prisustvo bilo koja 2 od sledeća 3 kriterijuma: hiperandrogenizam (klinički i/ili biohemijski), hronična anovulacija (oligomenoreja ili amenoreja) i prisustvo PCOM potvrđeno transvaginalnim ultrazvukom, uz isključenje drugih uzroka hiperandrogenizma, poremećaja menstruacije i infertiliteta. Nijedna pacijentkinja nije uzimala oralnu kontraceptivnu terapiju, antiandrogene ili lekove koji mogu da utiču na regulaciju krvnog pritiska, nivo lipida ili metabolizam ugljenih hidrata u prethodnih šest meseci. Biohemijski hiperandrogenizam je definisan kao koncentracija ukupnog testosterona $> 2,0$ nmol/L i/ili $FAI > 6$. Već je ranije pomenuto da je oligomenoreja definisana menstrualnim ciklusima koji traju duže od 35 dana i obično ih ima manje od 8 godišnje, dok amenoreja predstavlja odsustvo menstrualnog krvarenja duže od tri meseca, bez prisustva trudnoće (53).

PCOM podrazumeva prisustvo ≥ 12 folikula, prečnika 2–9 mm ili volumen jajnika >10 cm³, u jednom ili oba jajnika.

KG su činile reproduktivno zdrave žene, koje nisu uzimale kontraceptivna sredstva, glukokortikoide ili antiandrogene u prethodna 3 meseca, nisu imale poremećaj metabolizma glukoze (odn. povišenu glikemiju našte, intoleranciju glukoze ili dijabetes), nisu pušile niti konzumirale alkohol. Primenom odgovarajućih laboratorijskih testova kod zdravih žena iz KG je isključeno postojanje hiperprolaktinemije, hipotireoidizma, nekласičnog oblika KAH, Kušingovog sindroma i androgen sekretujućih tumora.

Studija je planirana i odobrena od strane Etičkih komiteta KBC “Dr Dragiša Mišović – Dedinje“ i Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije, kao i Etičkih komiteta za klinička ispitivanja Medicinskog i Farmaceutskog fakulteta i sprovedena uz poštovanje principa datih u najnovijem amandmanu Helsinške deklaracije (Edinburgh, 2000). Sve ispitanice su detaljno upoznate sa ciljevima studije i uključene u istraživanje nakon dobijanja informisanog pisanog pristanka.

Koncentracije biohemijskih parametara su određene u biohemijsko-hematološkoj laboratoriji KBC “Dr Dragiša Mišović – Dedinje“. Parametri OS i antioksidativne zaštite kao i subfrakcije LDL i HDL čestica, odnosno distribucija PON1 na HDL česticama su određene u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

3.2. Biološki materijal

Uzorci krvi iz prednje kubitalne vene su uzimani u jutarnjim časovima, posle dvanaestočasovnog noćnog gladovanja, tokom folikularne faze menstrualnog ciklusa (2. ili 3. dana menstrualnog ciklusa) ženama sa PCOS i ženama iz KG ili nasumično u slučaju teške oligomenoreje ili amenoreje ženama sa PCOS. Venepunkcija je izvođena u ležećem položaju, a krv uzorkovana u vakutejnere sa gel separatorom, vakutejnere sa EDTA (etilendiaminotetrasirćetna kiselina, eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*) i citratom kao antikoagulansima. Serum i plazma su izdvajani od krvnih ćelija u roku od jednog sata, centrifugiranjem 15 minuta na 3000 obrtaja i čuvani u zamrzivaču (-80°C) do izvođenja analiza.

3.3. Određivanje antropometrijskih parametara

Merenje telesne težine (TT, kg) i telesne visine (TV, m) obavljeno je ujutru, našte, u laganoj odeći, bez cipela. Na osnovu telesne težine i telesne visine izračunat je ITM prema *Quetelet*-ovoj formuli:

$$ITM \left(\frac{kg}{m^2} \right) = \frac{TT(kg)}{TV(m^2)}$$

WHO je predložila uvođenje ITM (ITM-*Quetelet*-ov indeks) kao najpovoljnijeg indikatora za procenu stanja uhranjenosti, definisanja i klasifikovanja gojaznosti (150). Prema izveštaju WHO, ITM za stanje normalne uhranjenosti je 18,5–24,9 kg/m², za prekomernu telesnu težinu-predgojaznost je 25,0–29,9 kg/m², a za gojaznost je ≥30,0 kg/m². Obim struka izmeren je fleksibilnim metrom, preko najizbočenijeg dela trbuha ili na sredini između rebarnih lukova i gornje ivice karlične kosti. Merenje je vršeno na kraju ekspiracije. Referentne vrednosti za obim struka su za muškarce ispod 94 cm i za žene ispod 80 cm. Obim kuka (eng. *hip circumference*, HC) izmeren je na najširem delu zadnjice ili kuka. Odnos struk/kuk (eng. *waist-to-hip ratio*, WHR) je izračunat korišćenjem vrednosti ova dva obima. Obim nadlaktice (eng. *upper arm circumference*, UAC) je obim leve nadlaktice izmeren na srednjoj tački između vrha ramena i vrha lakta.

Arterijski krvni pritisak je, kod svake ispitanice uključene u istraživanje, meren sfingomanometrom prema preporukama datim u Nacionalnom vodiču dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje arterijske hipertenzije (151). Arterijska hipertenzija se definiše kao stanje u kome je sistolni i/ili dijastolni krvni pritisak povišen (≥140 mmHg i/ili ≥90 mmHg).

3.4. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara

3.4.1. Parametri inflamacije

Brzina sedimentacije eritrocita je određena standardnom Westergren metodom korišćenjem Becton Dickinson Seditainer vakutejnera (BD, Plymouth, UK). Koncentracija fibrinogena je određena u citratnoj plazmi Clauss-ovom metodom na BFT II analizatoru (Siemens Healthcare GmbH, Germany). Serumske koncentracije CRP-a određene su komercijalno dostupnim turbidimetrijskim metodama na biohemijskim autoanalizatorima Abbott Spectrum (Abbott Diagnostics, Illinois, USA) i Dimension RxL Max (Siemens Healthcare GmbH, Germany).

3.4.2. Parametri lipidnog statusa

Koncentracije ukupnog holesterola, HDL-H i TG određene su komercijalno dostupnim enzimskim metodama na biohemijskim autoanalizatorima Abbott Spectrum (Abbott Diagnostics, Illinois, USA) i Dimension RxL Max (Siemens Healthcare GmbH, Germany). Koncentracija LDL-H je određena računskim putem, korišćenjem Friedewald-ove formule (152). Non-HDL-H je izračunat kao razlika ukupnog holesterola i HDL-H, a aterogeni indeks je izračunat kao odnos TG/HDL-H.

3.4.3. Parametri funkcije jetre i glukoza

Koncentracije katalitičke aktivnosti enzima aspartat aminotransferaze (eng. *aspartate aminotransferase*, AST) i alanin aminotransferaze (eng. *alanine aminotransferase*, ALT) su određene adaptiranim metodama po IFCC-u na biohemijskim autoanalizatorima Abbott Spectrum (Abbott Diagnostics, Illinois, USA) i Dimension RxL Max (Siemens Healthcare GmbH, Germany). Koncentracija glukoze je određena enzimskom metodom sa glukoza-oksidadom (eng. *glucose oxidase*, GOD) na Beckman glukoza analizatoru (Beckman Coulter Inc., Brea, USA).

3.4.4. Hormoni

Testosteron, SHBG, FSH, LH, estradiol (E2), androstenedion i DHEAS su određeni u serumu hemiluminescentnim imunoesejom (eng. *chemiluminescent immunoassay*, CLIA) na imunoanalizatoru Immulite 1000 (Siemens Healthcare GmbH, Germany). Računskim putem određen je LH/FSH indeks. FAI je izračunat korišćenjem formule:

$$FAI = \frac{Ukupni\ testosteron\ (nmol/L)}{SHBG\ (nmol/L)} * 100$$

3.5. Određivanje skora rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti

Skor rizika za razvoj KVB, KQRS (eng. *cardiovascular risk score – CVRS*) kod mladih ljudi (ispod 40 godina) kasnije u toku života računat je prema McMahan-u i sar. (65), dodavanjem poena za svaki tradicionalni faktor rizika (npr. ITM, niske koncentracije HDL-H, visoke koncentracije non-HDL-H, pušenje, visok krvni pritisak i glikemija našte, kao i godine starosti ispitanica) (Tabela 2). Ovo je prvo istraživanje u kome je primenjen KQRS kod žena sa PCOS.

Tabela 2. Bodovanje u izračunavanju skora rizika za kardiovaskularne bolesti

Faktori	Poeni
Pol, ženski	-1
Pušenje, pušač	1
Hiperglikemija, (glukoza >7,0 mmol/L)	5
non-HDL, mmol/L	
<3,37	0
3,37–4,12	2
4,14–4,90	4
4,92–5,67	6
>5,70	8
HDL, mmol/L	
<1,036	1
1,036–1,530	0
>1,550	-1
Krvni pritisak	
Normalan	0
Visok	4
Starost, godine	
15–19	0
20–24	5
25–29	10
30–34	15

Maksimalni zbir poena za žene prema ovom proračunu iznosio je 33 poena. Prema studiji McMahan i sar. (65) skor veći od 17 poena odgovara 20% verovatnoće za razvoj klinički značajnih lezija na koronarnim arterijama.

3.6. Određivanje ICO i indeksa NAFLD

S obzirom da zajednički mehanizmi podstiču razvoj kardiometaboličkih komplikacija u PCOS i NAFLD treba ispitati da li PCOS i NAFLD deluju aditivno na kardiovaskularni rizik. U skladu sa tim, ispitana je povezanost ICO i NAFLD indeksa i kardiovaskularnog rizika kod žena sa PCOS. ICO i NAFLD indeksi (APRI, LAP i HIS) su računati preko formula datih u Tabeli 3 gde su predstavljene i granične vrednosti za dijagnozu ICO, odnosno NAFLD (APRI, LAP, HIS).

Tabela 3. Izračunavanje ICO i NAFLD indeksa

Indeksi	Formule za izračunavanje	Cut-off
ICO	$\frac{\text{Obim struka [cm]}}{\text{Telesna visina [cm]}}$	>0,53
APRI	$\frac{\text{AST [IU/L]}}{\text{Gornja granica ref. int. za AST [IU/L]} \times \text{br. tromb. [10}^9\text{/L]} \times 100}$	>1,50
LAP	$(\text{Obim struka [cm]} - 58) \times \text{Trigliceridi [mmol/L]}$	>54,2
HIS	$8 \times \frac{\text{ALT [IU/L]}}{\text{AST [IU/L]}} + \text{ITM (+2 poena za žene, +2 poena za DM status)}$	>36,0

ref. int. – referentni interval

br. tromb. – broj trombocita

3.7. Određivanje parametara oksidativnog stresa

Prisustvo i nivo OS smo ispitivali određivanjem sledećih parametara: AOPP, TOS, PAB, i MDA.

3.7.1. Određivanje AOPP

Za određivanje AOPP kao markera OS korišćena je metoda koju su postavili Witko-Sarsat i saradnici (153). Spektralnom analizom razblaženog uzorka plazme ili seruma fosfatnim puferom pH=7,4 u opsegu talasnih dužina 200–400 nm uočava se karakterističan pik oko 340 nm. Dodavanjem sirćetne kiseline u razblažen serum i rastvora kalijum-jodida 1,16 mol/L dolazi do promene apsorbancije koja se meri na 340 nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenata hloramina T koji se koristi za

izrada standardne krive u koncentracijama 10–100 $\mu\text{mol/L}$, pri čemu njegova apsorbanacija linearno raste sa porastom koncentracije.

3.7.2. Određivanje TOS u serumu

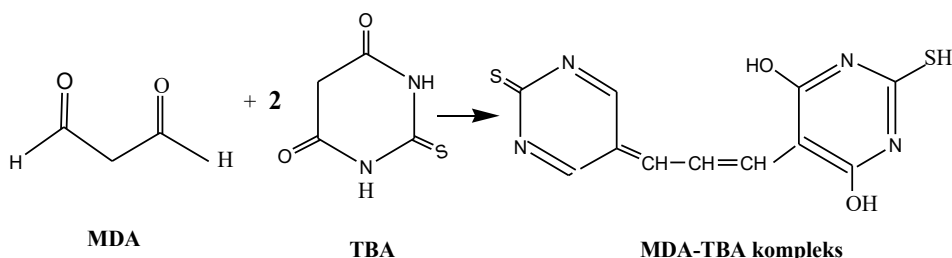
Za određivanje TOS korišćena je metoda Erel-a (154). TOS predstavlja ukupan oksidativni efekat svih oksidujućih supstanci u serumu/plazmi. Kao glavne komponente TOS u serumu su prisutni H_2O_2 i lipidni hidroperoksidi. Ukupni oksidansi prisutni u uzorku oksiduju fero jon-orto-dianizidin kompleks u feri jon. Reakciju oksidacije olakšavaju molekuli glicerola koji su u značajnoj količini prisutni u reakcionom medijumu. Nastali feri jon zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseljoj sredini. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski na 560 nm i proporcionalan je ukupnom sadržaju oksidacionih molekula u uzorku. Kao standard se koristi vodeni rastvor H_2O_2 opsega koncentracije 10–200 $\mu\text{mol/L}$, što odgovara linearnosti metode i očekivanim koncentracijama u biološkom materijalu. Rezultati se izražavaju kao $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekvivalent/L.

3.7.3. Određivanje PAB

Za određivanje PAB korišćena je metoda Alamdarija i saradnika (155). PAB testom se određuje koncentracija H_2O_2 u antioksidativnom okruženju. Hromogen 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (eng. *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*, TMB) reaguje i sa H_2O_2 i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) u isto vreme, obzirom da se nalaze u istoj sredini. Reakcija H_2O_2 i hromogena je enzimski katalizovana enzimom peroksidazom, pri čemu oksidovanjem TMB-a nastaje intenzivno plavo obojeni proizvod. Za razliku od toga reakcija mokraćne kiseline i hromogena je nekatalizovana, hemijska reakcija u kojoj se TMB katjon redukuje do bezbojnog proizvoda. Intenziteti obojenja standardnih rastvora su srazmerni odnosu dodatih količina H_2O_2 i mokraćne kiseline. Za pravljenje standardne krive se koriste rastvori H_2O_2 i mokraćne kiseline u različitim odnosima, tako da na početku dominira mokraćna kiselina, a na kraju H_2O_2 . Ove dve komponente su izabrane za predstavnike prooksidanasa i antioksidanasa jer ne reaguju jedna sa drugom i ne ometaju aktivnost jedna drugoj prema hromogenu. Vrednosti PAB se izražavaju u arbitrarnim jedinicama-HKU (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice) koje predstavljaju procenat H_2O_2 u standardnom rastvoru.

3.7.4. Određivanje koncentracije MDA

Koncentracija MDA se određuje kao tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) spektrofotometrijskim testom koji se zasniva na apsorpcionom maksimumu kompleksa malondialdehida i ostalih TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom na 535 nm, čiji je molarni ekstinkcioni koeficijent $1,56 \times 10^5$ L/mol/cm (156). (Slika 6)



Slika 6. Mehanizam reakcije TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom (157)

3.8. Određivanje parametara antioksidativne zaštite

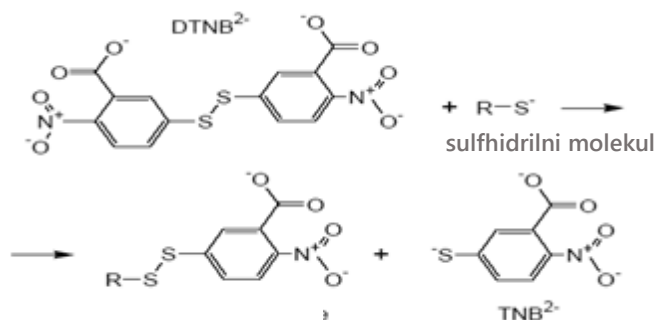
Nivo antioksidativne zaštite smo ispitivali određivanjem sledećih parametara: TAS, sadržaja ukupnih SH-grupa, aktivnosti enzima SOD i aktivnosti enzima PON1.

3.8.1. Određivanje TAS u serumu

Za određivanje TAS korišćena je metoda Erel-a, uz određene modifikacije (158). TAS je određen spektrofotometrijskom metodom uz upotrebu 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), (eng. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*, ABTS) kao hromogena. ABTS je bezbojan i pomoću H_2O_2 , u kiselom medijumu (acetatni pufer; pH=3,6), dolazi do oksidacije redukovanog ABTS do $ABTS^+$ katjona, pri čemu rastvor dobija karakterističnu smaragdnu boju. Dodavanjem supstance sa redukcionom sposobnošću, pri čemu se sama oksiduje (antioksidans), obojenom $ABTS^+$ katjonu, dolazi do redukcije katjona do bezbojnog ABTS, što se manifestuje obezbojavanjem ispitivanog rastvora. Koncentracija ukupnih antioksidanasa u uzorku je proporcionalna intenzitetu obezbojavanja. Koncentracija prisutnih antioksidanasa u uzorku određuje se upotrebom standardne krive. Najčešće upotrebljavani standard za određivanje TAS je Trolox, hidrosolubilni ekvivalent vitamina E. Dobijeni rezultati izražavaju se u mmol/L Trolox ekvivalenta/L.

3.8.2. Određivanje koncentracije ukupnih SH-grupa

Koncentracija ukupnih SH-grupa u plazmi određuje se spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na reakciji 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiseline), (eng. 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini (pH=9,0) pri čemu dolazi do stvaranja p-nitrofenol anjona, jarko žute boje, čija se apsorbanacija meri na 412 nm (159). (Slika 7)



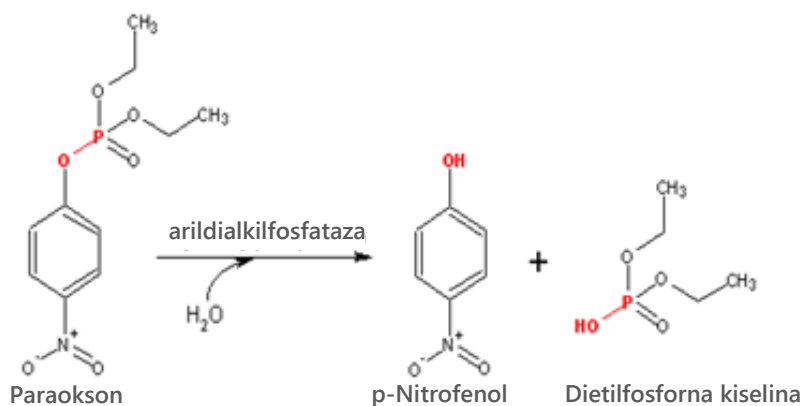
Slika 7. Redukcija Ellman-ovog reagensa slobodnim sulfhidrilnim grupama (160)

3.8.3. Određivanje aktivnosti enzima SOD u plazmi

Određivanje aktivnosti ovog enzima u plazmi se izvodi po originalnoj metodi koju su dali Misra i Fridovich (161), uz određene modifikacije. Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini na pH=10,2. Adrenalin je prilično stabilan u kiseljoj sredini. Autooksidacija adrenalina je inicirana tragovima teških metala prisutnih kao nečistoće u reagensima. Aktivnost ovog enzima se izražava u relativnim jedinicama, koje se dobijaju merenjem apsorbanacije nastalog crvenog proizvoda oksidacije adrenalina na 480 nm, bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (analiza). Aktivnost SOD u uzorku se izračunava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina.

3.8.4. Određivanje aktivnosti enzima PON1

Aktivnost PON1 je određivana po metodi Richter-a i Furlong-a (162). Određivanje paraoksonazne aktivnosti se zasniva na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstrat paraokson, pri čemu dolazi do konverzije paraoksona do p-nitrofenola. Brzina te promene se prati kinetički na 405 nm, što je karakteristični apsorpcioni maksimum za p-nitrofenol koji se u baznoj sredini nalazi u obliku p-nitrofenoksidnog anjona (Slika 8).



Slika 8. Reakcija koju katalizuje PON1 sa paraoksonom kao supstratom (163)

Svi parametri OS i antioksidativne zaštite određeni su na automatskom analizatoru Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Milan Italy) u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. TOS, TAS, koncentracija ukupnih SH-grupa, aktivnosti enzima SOD i PON1 su određeni nakon optimizacije originalnih metoda.

3.9. Određivanje skora dislipidemije, oksidativno-stresnog, inflamatornog i DOI skora

Dislipidemija, OS i hronična niskostepena inflamacija ubrajaju se u glavne metaboličke karakteristike PCOS i predstavljaju važne faktore rizika za razvoj KVB. S tim u vezi, izračunali smo pojedinačne skorove za dislipidemiju, OS i inflamaciju, kao i njihov zbirni DOI skor. Da bi odredili skor dislipidemije izračunali smo Z skor za svaki od parametara dislipidemije: LDL-H, TG i HDL-H koristeći populacionu srednju vrednost i standardnu devijaciju (SD) dobijene na zdravoj KG. Posle toga, skor dislipidemije je izračunat iz jednačine: od srednje vrednosti zbira Z skorova za LDL-H i TG (lipidni skor rizika) se oduzme Z skor HDL-H (lipidni protektivni skor).

$$SKOR\ DISLIPIDEMIJE = \frac{(Zskor\ LDL-H + Zskor\ TG)}{2} - Zskor\ HDL-H$$
$$LIPIDNI\ SKOR\ RIZIKA = \frac{(Zskor\ LDL-H + Zskor\ TG)}{2}$$
$$LIPIDNI\ PROTEKTIVNI\ SKOR = Zskor\ HDL-H$$

Oksidativno-stresni skor je izračunat kao razlika prooksidativnog skora (skora oštećenja) i antioksidativnog skora (zaštitnog skora) koji su definisali Veglia i saradnici (164). Antioksidativni skor predstavlja srednju vrednost zbira Z skorova antioksidanasa (TAS, SH-grupa, aktivnost SOD i PON1), a prooksidativni skor predstavlja srednju vrednost zbira Z skorova prooksidanasa (AOPP, TOS, PAB i MDA).

$$OKSIDATIVNO-STRESNI\ SKOR = PROOKSIDATIVNI\ SKOR - ANTIOKSIDATIVNI\ SKOR$$
$$PROOKSIDATIVNI\ SKOR = \frac{(Zskor\ AOPP + Zskor\ TOS + Zskor\ PAB + Zskor\ MDA)}{4}$$
$$ANTIOKSIDATIVNI\ SKOR = \frac{(Zskor\ TAS + Zskor\ SH-grupa + Zskor\ SOD + Zskor\ PON1)}{4}$$

S obzirom na to da smo od inflamatornih markera određivali samo CRP, skor inflamacije je Z skor za CRP.

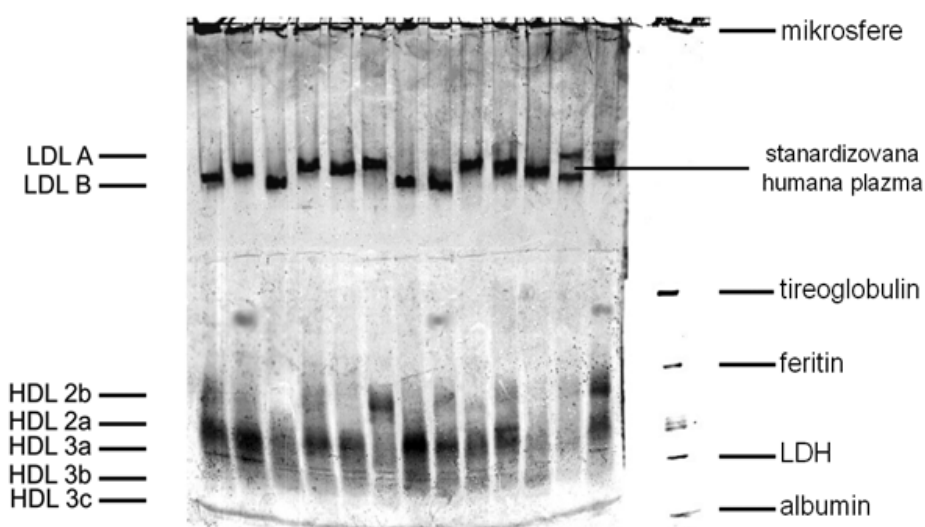
$$SKOR\ INFLAMACIJE = Zskor\ CRP$$

Na kraju, DOI skor je izračunat kao zbir ovih pojedinačnih skorova.

$$DOI\ SKOR = SKOR\ DISLIPIDEMIJE + OKSIDATIVNO-STRESNI\ SKOR + SKOR\ INFLAMACIJE$$

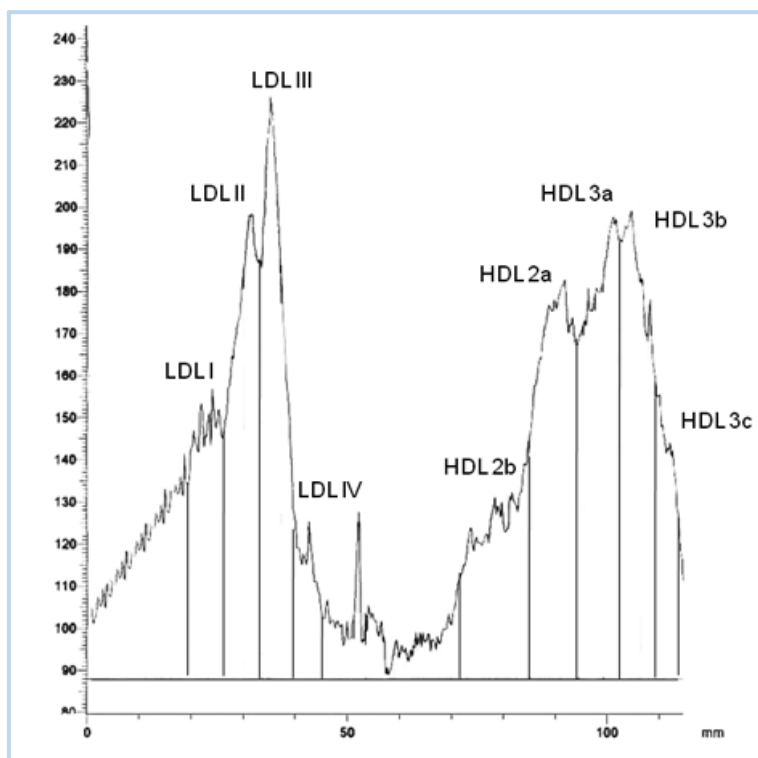
3.10. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija

LDL i HDL subfrakcije su razdvojene metodom vertikalne elektroforeze na nadenaturišućem gradijentu (3–31%) poliakrilamidnog gela, zasnovanoj na originalnoj metodi Rainwater-a i saradnika (165) koja je optimizovana u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Postupak elektroforeze podrazumeva da se pre nanošenja uzoraka gelovi aktiviraju na 290 V u toku 50 minuta, a uzorci EDTA plazme (30 μ L) pomešaju sa 10 μ L 0,1% rastvora bromfenol-plavog u 40% rastvoru saharoze. Elektroforeza se izvodi pri konstantnom naponu, po određenom protokolu. Paralelno sa uzorcima, u posebne trake na gelu, postavljaju se proteinski standardi koji služe za kalibraciju gela, na osnovu kojih se vrši analiza veličine i relativnih udela LDL i HDL subfrakcija. Po završetku elektroforeze, gelovi se skidaju sa vertikalnog nosača u kadi, a zatim se traka sa proteinskim standardima odseca sa gela. Gelovi se fiksiraju sat vremena u 10% rastvoru trihlorsirćetne kiseline, a zatim sat vremena ispiraju u 45% rastvoru etanola, pa se boje u rastvoru Sudan black B (Merck, Darmstadt, Germany), preko noći, a zatim odbojavaju u 45% etanolu. Odvojena traka sa proteinskim standardima se takođe fiksira sat vremena u istom rastvoru kao i gelovi, a zatim boji rastvorom Coomassie brilliant blue G-250 bojom (Sigma, St. Louis, MO, USA). Odbojavanje se vrši pomoću smeše etanola, sirćetne kiseline i vode. Nakon toga gelovi stoje preko noći u TRIS puferu, pH=8,35 da bi uspostavili prvobitni oblik i veličinu, a zatim se skeniraju (166). Skener *Image Scanner III* (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) je korišćen za denzitometrijsko skeniranje gelova (Slika 9).



Slika 9. Izgled gela sa razdvojenim LDL i HDL subfrakcijama (166)

LDL čestice se razdvajaju u delu gela koji ima manju koncentraciju poliakrilamida, odnosno bliže katodi, dok HDL čestice duže migriraju u električnom polju i razdvajaju se u delu gela koji ima veću koncentraciju poliakrilamida, tj. bliže anodi. Na osnovu denzitometrijskog prikaza određeni su dominantni LDL i HDL dijametri, koji predstavljaju veličine čestica koje odgovaraju najvišim pikovima u LDL i HDL regionu, a na osnovu površina ispod pikova određeni su relativni udeli (%) svake pojedinačne subfrakcije u ukupnom LDL i HDL profilu ispitanica (Slika 10).

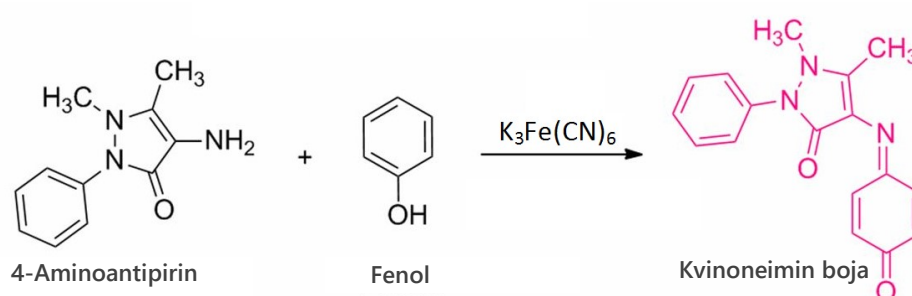


Slika 10. Denzitometrijski profil LDL i HDL subfrakcija (166)

Identifikacija regiona na gelu koji odgovaraju pojedinačnim LDL i HDL subfrakcijama vrši se na osnovu poznatih raspona dijametara LDL čestica: LDL I (27,2–28,5 nm), LDL II (25,5–27,2 nm), LDL III (24,2–25,5 nm) i LDL IV (22,0–24,2 nm) odnosno poznatih raspona dijametara HDL čestica: HDL 2b (9,7–12,0 nm), HDL 2a (8,8–9,7 nm), HDL 3a (8,2–8,8 nm), HDL 3b (7,8–8,2 nm) i HDL 3c (7,2–7,8 nm). Relativni udeo malih, gustih LDL čestica predstavlja zbir udela LDL III i IV subfrakcija, a relativni udeo HDL 3 čestica predstavlja zbir udela HDL 3a, 3b i 3c subfrakcija (166).

3.11. Određivanje aktivnosti enzima PON1 na HDL subfrakcijama

Za određivanje enzimске aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama korišćena je metoda koju su formulisali Gugliucci i saradnici (135). Originalna metoda je optimizovana u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Određivanje aktivnosti PON1 na gelu zasniva se na principu da PON1, zahvaljujući svojoj arilesteraznoj aktivnosti, razlaže fenilacetat do fenola koji se zatim određuje Trinderovom reakcijom u kojoj fenol reaguje sa 4-aminoantipirinom (eng. *4-aminoantipyrine*, 4-AAP) u prisustvu $K_3Fe(CN)_6$, pri čemu nastaje kompleksno jedinjenje – kvinoneimin, ružičaste boje. Nastalo obojenje je proporcionalno aktivnosti PON1 (Slika 11).



Slika 11. Trinderova reakcija (167)

Nakon razdvajanja lipoproteina metodom vertikalne gradijent gel elektroforeze, koja je prethodno opisana, gelovi se aktiviraju u 0,1 mol/L Tris puferu pH=8,3 uz dodatak 2 mmol/L $CaCl_2$. Nakon aktivacije, gelovi se inkubiraju u svežem rastvoru za razvijanje boje koji se sastoji od: 4-AAP i $K_3Fe(CN)_6$. Inkubacija traje 15 minuta, na sobnoj temperaturi (25°C), uz blago mešanje, zaštićeno od svetlosti. Enzimska reakcija počinje uklanjanjem rastvora za razvijanje boje i dodavanjem supstrata, fenilacetata. Nakon dodavanja fenilacetata i mešanja, ponovo se dodaje rastvor za razvijanje boje i gelovi se inkubiraju 20 minuta, na sobnoj temperaturi (25°C), uz blago mešanje. U toku ovog vremenskog perioda, na gelovima se pojavljuju ružičaste linije koje potiču od aktivnosti PON1 na određenim HDL subfrakcijama. Nakon 20 minuta, na kraju inkubacionog perioda, reakcija se zaustavlja tako što se gelovi ispiraju u hladnom puferu 0,1 mol/L Tris, 5 mmol/l EDTA, pH=8,3 koji će vezati Ca^{2+} i sprečiti dalju aktivnost PON1. Neposredno nakon ispiranja gelovi se skeniraju, a zatim se određuje relativni udeo aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama, na način koji je prethodno opisan.

3.12. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvedena je korišćenjem programa SPSS (IBM, verzija 18.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Normalnost distribucije podataka proveravana je primenom Kolmogorov-Smirnov testa. Kontinuirane promenljive su prikazane kao srednja vrednost i standardna devijacija ($\bar{x} \pm SD$) za parametre čija distribucija nije odstupala od normalne, Gaussove distribucije, odnosno kao medijane i interkvartilni rasponi za parametre koji nisu sledili normalnu raspodelu. Normalno distribuirane kontinuirane promenljive su upoređivane Student t-testom ili jednofaktorskom analizom varijanse (eng. *analysis of variance*, ANOVA) sa Tukey-Snedecor *post hoc* testom. Promenljive koje ne prate normalnu raspodelu poređene su Kruskal-Wallis testom sa Mann-Whitney testom kao *post hoc* analizom. Razlike između grupa nakon korekcije za godine starosti ispitivane su analizom kovarijanse (eng. *analysis of covariance*, ANCOVA).

Za ispitivanje korelacije između različitih parametara koji su određivani u studiji korišćene su Spearmanova neparametarska korelaciona analiza i Pearsonov koeficijent korelacije. Istovremeni uticaj dve ili više nezavisno promenljivih na jednu zavisno promenljivu testiran je primenom višestruke linearne regresione analize (eng. *multiple linear regression*, MLR).

ROC analiza (eng. *receiver operating characteristic curve*, ROC) je korišćena da testira dijagnostičku tačnost pojedinačnih parametara (NAFLD indeksi i ICO) i izabranog modela u predviđanju pripadnosti žena sa PCOS jednoj od dve podgrupe prema cut-off vrednostima KQRS. Diskriminativne sposobnosti pojedinačnih parametara i selektovanog modela su klasifikovane na osnovu vrednosti površine ispod ROC krive (eng. *area under the curve*, AUC). ROC analiza je korišćena i da se ispitaju diskriminativne sposobnosti pojedinačnih skorova (oksidativno-stresnog, inflamatornog skora i skora dislipidemije) i DOI skora za identifikaciju žena sa PCOS na osnovu vrednosti AUC. Diskriminativna sposobnost parametra (dijagnostička tačnost) na osnovu vrednosti AUC može biti kategorisana kao slaba ($0,5 \leq AUC < 0,7$), zadovoljavajuća ($0,7 \leq AUC < 0,8$), odlična ($0,8 \leq AUC < 0,9$) i izvanredna ($AUC \geq 0,9$).

Kao minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike smatrana je verovatnoća $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. I deo studije

U prvom delu studije učestvovalo je 100 ispitanica starosne dobi između 18 i 35 godina koje su ispitivane u Dnevnoj bolnici Klinike za internu medicinu KBC “Dr Dragiša Mišović – Dedinje“ u Beogradu. Ispitanice su podeljene u dve osnovne grupe, grupu žena sa dokazanim PCOS (n=54) i KG zdravih žena (n=46). Svaka grupa je, na osnovu prisustva/odsustva gojaznosti prema ITM, podeljena na dve podgrupe: podgrupu normalno uhranjenih ($ITM \leq 24,9 \text{ kg/m}^2$) i podgrupu s prekomernom telesnom težinom ili gojaznošću ($ITM \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$). U Tabeli 4 predstavljeno je poređenje ispitanica PCOS, KG normalno uhranjenih i gojaznih, redom. Takođe, predstavljeno je i poređenje PCOS i KG u okviru iste grupe po ITM kategorijama.

Tabela 4. Podela ispitanica (PCOS i KG) po podgrupama prema ITM

Grupe	Broj ispitanica po podgrupama prema ITM		P
	$ITM \leq 24,9 \text{ kg/m}^2$	$ITM \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$	
PCOS	29,7±4,64 (n=32)	29,4±4,08 (n=22)	ns
KG	29,2±5,23 (n=29)	29,2±5,42 (n=17)	ns
P	ns	ns	/

Rezultati su prikazani kao $\bar{x} \pm SD$. P iz ANOVA testa, praćenog post-hoc Tuckey-Snedecor testom.

ns – nesignifikantno – bez statistički značajne razlike

4.1.1. Antropometrijski, biohemijski parametri i hormoni

Antropometrijski, biohemijski parametri i hormoni koji su određivani kod žena sa PCOS i KG žena prikazani su u Tabelama 5–7.

Tabela 5. Antropometrijski parametri kod žena sa PCOS i KG žena podjeljenih prema statusu uhranjenosti

Parametar	PCOS normalno uhranjene (ITM≤24,9 kg/m ²)(n=32)	PCOS gojazne (ITM≥25,0 kg/m ²)(n=22)	KG normalno uhranjene (ITM≤24,9 kg/m ²)(n=29)	KG gojazne (ITM≥25,0 kg/m ²)(n=17)	P
ITM, kg/m ²	19,9±1,83	34,5±5,48 ^{aaa}	20,9±1,93 ^{bbb}	30,9±4,68 ^{aaa,b,ccc}	<0,001
Obim nadlaktice, cm	23,6±2,08	33,7±4,07 ^{aaa}	25,8±2,53 ^{a,bbb}	32,9±3,37 ^{aaa,ccc}	<0,001
Obim struka, cm	71,0±5,17	105,0±15,40 ^{aaa}	74,8±7,66 ^{bbb}	97,5±10,49 ^{aaa,ccc}	<0,001
Obim kuka, cm	85,4±6,19	121,4±11,45 ^{aaa}	98,1±7,52 ^{bbb}	117,9±8,90 ^{aaa,bbb,ccc}	<0,001
Odnos struk/kuk	0,831±0,038	0,861±0,079	0,763±0,059 ^{aaa,bbb}	0,828±0,074 ^{ccc}	<0,001

Rezultati su prikazani kao $\bar{x} \pm SD$. P iz ANOVA testa, praćenog post-hoc Tuckey-Snedecor testom.

a,aaa – značajna razlika bilo koje grupe od prve grupe (normalno uhranjene žene sa PCOS)

b,bbb – značajna razlika treće i/ili četvrte grupe od druge grupe (gojazne žene sa PCOS)

ccc – značajna razlika četvrte od treće grupe (KG normalno uhranjenih žena)

P<0,05, P<0,001

U Tabeli 5 prikazane su vrednosti antropometrijskih parametara kod svih ispitanica. Nakon post-hoc analize uočavaju se sledeći rezultati: normalno uhranjene žene sa PCOS su imale, očekivano, značajno niži ITM, obim struka i obim kuka u poređenju sa gojaznim ženama sa PCOS. Međutim, njihov odnos struk/kuk nije bio značajno različit, ali je bio značajno viši od vrednosti odnosa struk/kuk KG normalno uhranjenih žena iako obim struka i ITM između normalno uhranjenih žena sa PCOS i KG žena nisu bili statistički značajno različiti.

Tabela 6. Opšti biohemijski parametri i parametri lipidnog statusa kod žena sa PCOS i KG žena podjeljenih prema statusu uhranjenosti

Parametar	PCOS normalno uhranjene (ITM≤24,9 kg/m ²)(n=32)	PCOS gojazne (ITM≥25,0 kg/m ²)(n=22)	KG normalno uhranjene (ITM≤24,9 kg/m ²)(n=29)	KG gojazne (ITM≥25,0 kg/m ²)(n=17)	P
SE, mm/h	8,91±3,541	16,60±9,160 ^{aa}	9,24±4,830 ^{bb}	15,90±10,690 ^{aa,c}	<0,001
Glukoza, mmol/L	4,48±0,453	4,60±0,530	4,76±0,368	5,13±0,396 ^{aaa,bb,c}	<0,001
ALT, IU/L	18,1±8,81	25,8±12,78 ^a	16,3±8,53 ^{bb}	19,9±5,92	<0,01
AST, IU/L	25,4±8,68	29,6±8,62	24,6±6,27	28,2±5,76	ns
Fibrinogen, g/L	2,89±0,561	3,69±0,645 ^{aaa}	2,96±0,556 ^{bbb}	3,45±0,701 ^{aa}	<0,001
LDL-H, mmol/L	2,89±0,699	3,61±0,882 ^{aa}	3,11±0,666	3,23±0,940	<0,05
HDL-H, mmol/L	1,53±0,333	1,19±0,245 ^{aaa}	1,42±0,235 ^{bb}	1,18±0,198 ^{aaa,c}	<0,001
TG, mmol/L	0,931±0,402	1,810±0,896 ^{aa}	0,797±0,322 ^{bbb}	1,270±0,684 ^{b,c}	<0,001
Non-HDL-H, mmol/L	3,33±0,772	4,34±1,172 ^{aa}	3,52±0,684 ^b	3,82±1,087	<0,01
TG/HDL-H	0,646±0,348	1,640±0,993 ^{aa}	0,580±0,266 ^{bbb}	1,120±0,640 ^{a,b,c}	<0,001
Dislipidemija ne/da, %	68,2/31,8	9,4/90,6	93,1/6,9	35,3/64,7	$\chi^2=10,3$; <0,05

Rezultati su prikazani kao $\bar{x}\pm SD$. P iz ANOVA testa, praćenog post-hoc Tuckey-Snedecor testom.

ns – nesigifikantno – bez statistički značajne razlike

a,aa,aaa – značajna razlika bilo koje grupe od prve grupe (normalno uhranjene žene sa PCOS)

b,bb,bbb – značajna razlika treće i/ili četvrte grupe od druge grupe (gojazne žene sa PCOS)

c – značajna razlika četvrte od treće grupe (KG normalno uhranjenih žena)

P<0,05, P<0,01, P<0,001

U Tabeli 6 su prikazane vrednosti biohemijskih parametara kod svih ispitanica koje su učestvovala u ovom istraživanju. Uočeni su sledeći rezultati: gojazne ispitanice obe podgrupe (PCOS i KG) imale su više vrednosti parametara inflamacije u odnosu na normalno uhranjene ispitanice (brzina sedimentacije eritrocita i fibrinogen). Iako su koncentracije fibrinogena bile u granicama dozvoljenih vrednosti kod svih ispitanica, više vrednosti kod gojaznih žena sa PCOS i žena iz KG potvrđuju povezanost gojaznosti i niskostepene inflamacije. Koncentracije glukoze u obe podgrupe žena sa PCOS i u KG

grupi normalno uhranjenih žena se nisu razlikovale i bile su značajno niže od koncentracija glukoze gojaznih žena iz KG. Osim toga, gojazne žene sa PCOS imale su više vrednosti ALT u odnosu na ispitanice iz ostalih podgrupa, dok se vrednosti AST nisu statistički značajno razlikovale između podgrupa.

Takođe, gojazne ispitanice obe podgrupe imale su snižene koncentracije HDL-H i povišene koncentracije TG u odnosu na normalno uhranjene ispitanice, dok je koncentracija non-HDL-H bila najviša kod gojaznih PCOS žena. U skladu sa tim, gojazne ispitanice su imale i više vrednosti aterogenog indeksa (TG/HDL-H). Hipertrigliceridemija ($TG \geq 1,7$ mmol/L) i niske koncentracije HDL-H ($HDL-H < 1,29$ mmol/L) su osnovne karakteristike aterogene dislipidemije (149) koja se najčešće javlja kod gojaznih žena sa PCOS. Ovaj oblik dislipidemije postoji i ima veću prevalencu kod gojaznih žena sa PCOS u odnosu na normalno uhranjene žene (90,6% vs. 31,8%).

U cilju ispitivanja hormonskog statusa i potvrde dijagnoze PCOS, kod svih ispitanica smo odredili koncentracije reproduktivnih hormona, SHBG, androstenediona, DHEAS i izračunali FAI (Tabela 7).

Tabela 7. Hormonski status žena sa PCOS i KG žena podjeljenih prema statusu uhranjenosti

Parametar	PCOS normalno uhranjene (ITM \leq 24,9 kg/m 2)(n=32)	PCOS gojazne (ITM \geq 25,0 kg/m 2)(n=22)	KG normalno uhranjene (ITM \leq 24,9 kg/m 2)(n=29)	KG gojazne (ITM \geq 25,0 kg/m 2)(n=17)	P
Testosteron, nmol/L	2,09 \pm 0,714	2,35 \pm 0,797	1,53 \pm 0,578 ^{a,bb}	1,66 \pm 0,919 ^b	<0,001
SHBG, nmol/L	35,2 \pm 10,86	38,1 \pm 29,58	67,3 \pm 25,47 ^{aaa,bbb}	73,1 \pm 9,10 ^{aaa,bbb,cc}	<0,001
FSH, U/L	6,65 \pm 1,844	6,79 \pm 2,957	7,56 \pm 4,996	6,06 \pm 2,829	ns
LH, U/L	9,21 \pm 2,867	9,51 \pm 3,827	5,97 \pm 3,386 ^{aaa,bb}	2,85 \pm 1,161 ^{aaa,bbb,cc}	<0,001
LH/FSH	1,39 \pm 0,373	1,40 \pm 0,493	0,79 \pm 0,331 ^{a,bb}	0,47 \pm 0,229 ^b	<0,001
Estradiol, pmol/L	93,5 \pm 65,17	90,1 \pm 44,19	169,7 \pm 95,26 ^{aaa,bb}	124,8 \pm 66,17	<0,001
Androstenedion, ng/mL	3,36 \pm 0,985	3,54 \pm 1,380	2,01 \pm 0,798 ^{aaa,bbb}	2,09 \pm 0,793 ^{aaa,bbb}	<0,001
DHEAS, ng/mL	1697 \pm 681	1863 \pm 841	1426 \pm 793	1341 \pm 776	ns
FAI	6,5 \pm 2,82	8,3 \pm 5,18	2,3 \pm 1,93 ^{aaa,bbb}	2,3 \pm 1,18 ^{aa,bbb}	<0,001

Rezultati su prikazani kao $\bar{x}\pm SD$. P iz ANOVA testa, praćenog post-hoc Tuckey-Snedecor testom.

ns – nesignifikantno – bez statistički značajne razlike

a,aa,aaa – značajna razlika bilo koje grupe od prve grupe (normalno uhranjene žene sa PCOS)

b,bb,bbb – značajna razlika treće i/ili četvrte grupe od druge grupe (gojazne žene sa PCOS)

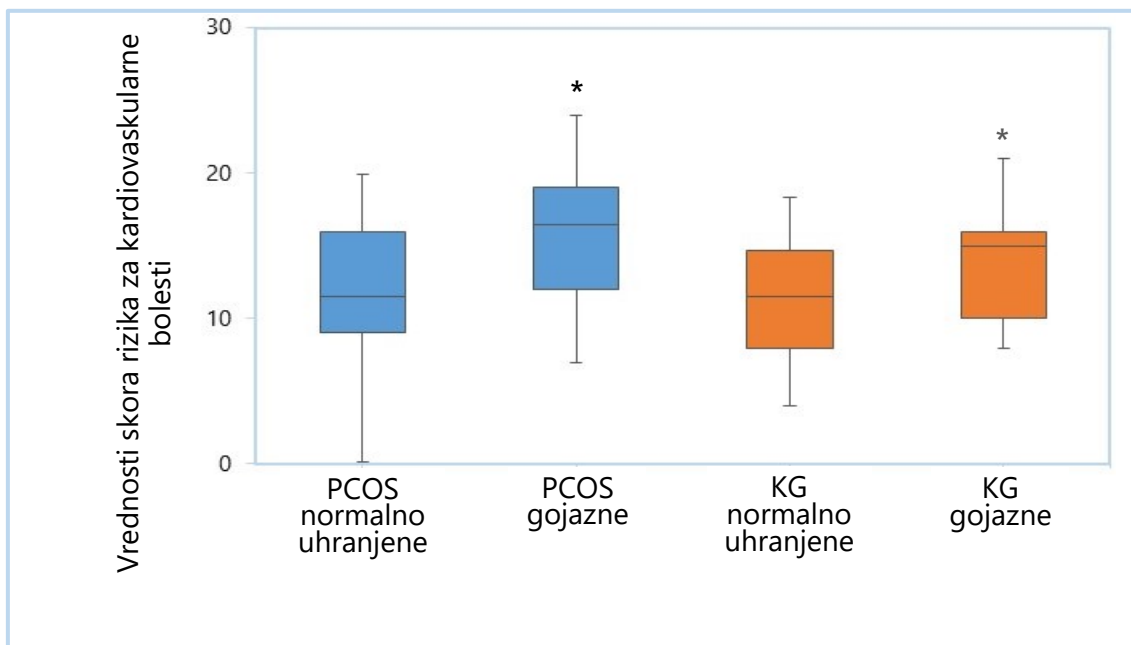
cc – značajna razlika četvrte od treće grupe (KG normalno uhranjenih žena)

P<0,05, P<0,01, P<0,001

Dobijeni rezultati su pokazali da su nivoi testosterona, androstenediona, LH i LH/FSH odnosa bili značajno viši kod PCOS žena u odnosu na KG, dok su nivoi SHBG i estradiola bili značajno sniženi. Vrednosti testosterona >2,0 nmol/L i/ili FAI > 6 su potvrdile postojanje biohemijskog hiperandrogenizma. Koncentracije FSH i DHEAS se nisu značajno razlikovale između ispitivanih podgrupa.

4.1.2. Skor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti

Kako bi se procenio rizik za razvoj KVB kasnije u toku života kod žena sa PCOS, koristili smo KQRS proračun koji su definisali McMahan i saradnici (65). Rezultati su prikazani na Slici 12.



Slika 12. Vrednosti KQRS po podgrupama PCOS i zdravih žena podeljenih po gojaznosti
* $P < 0,05$ u odnosu na PCOS normalno uhranjene žene, prema Mann-Whitney U testu

Korišćenjem Kruskal-Wallis analize sa Mann-Whitney *post hoc* testom poredili smo KQRS četiri podgrupe ispitanica i našli smo značajno veće KQRS vrednosti kod gojaznih PCOS žena u poređenju sa obe normalno uhranjene grupe (PCOS i KG, $P < 0,05$).

4.1.3. Uticaj antropometrijskih i biohemijskih parametara koji ne ulaze u proračun skora rizika za kardiovaskularne bolesti na nivo rizika za kardiovaskularne bolesti

Na osnovu vrednosti izračunatog KQRS, a uzimajući u obzir da je maksimalan broj poena kod naših ispitanica iznosio 24, ispitanice su podeljene po KQRS tercilima u tri grupe: sa niskim (0–11 poena), srednjim (12–17 poena) i visokim rizikom (18–24 poena) za razvoj KVB. Zatim smo uporedili druge određivane parametre koji nisu ulazili u proračun KQRS da bismo zaključili da li je vrednost KQRS povezana sa vrednostima tih parametara. Rezultati su prikazani u Tabeli 8.

Tabela 8. Antropometrijski i biohemijski parametri prema KQRS tercilima

Parametar	Opseg KQRS, poeni			P
	Tercili KQRS			
	Nizak (n=37) 0–11	Srednji (n=39) 12–17	Visok (n=24) 18–24	
Obim struaka, cm	78,0±13,35	83,6±17,82	94,3±17,92 ^{aa,b}	<0,01
Obim nadlaktice, cm	25,9±4,18	28,3±5,61	30,8±4,89 ^{aa}	<0,01
Odnos struk/kuk	0,80±0,065	0,81±0,067	0,85±0,076 ^{aa}	<0,01
AST, IU/L	24,6±4,96	25,4±5,54	31,5±11,61 ^{aa,bb}	<0,01
TG, mmol/L	0,831±0,308	1,160±0,733	1,600±0,804 ^{aaa,b}	<0,001
TG/HDL-H	0,592±0,270	0,924±0,663	1,450±0,954 ^{aaa,bb}	<0,001
Fibrinogen, g/L	2,88±0,628	3,29±0,706 ^a	3,46±0,553 ^{aa}	<0,01
Dislipidemija ne/da, %	100/0	87,2/12,8	45,8/54,2	$\chi^2=30,1$; P<0,001

Rezultati su prikazani kao $x \pm SD$. P iz ANOVA testa, praćenog post-hoc Tuckey testom.

a,aa,aaa – značajna razlika bilo koje grupe od prve grupe (nizak kardiovaskularni rizik)

b,bb, – značajna razlika treće od druge grupe (srednji kardiovaskularni rizik)

P<0,05, P<0,01, P<0,001

Kod ispitanica sa niskim KQRS (prvi tercil) uočene su značajno niže koncentracije fibrinogena u poređenju sa ispitanicama sa srednjim KQRS (drugi tercil). Antropometrijski parametri (izuzev obima nadlaktice i odnosa struk/kuk), lipidni

parametri i fibrinogen, koji nisu korišćeni u proračunu KQRS, su pokazali značajno više vrednosti kod ispitanica sa visokim KQRS (treći tercil) u poređenju sa ispitanicama sa niskim, odnosno srednjim rizikom čime je utvrđena potencijalna veza ovih parametara sa rizikom za razvoj KVB. Dodatno, ispitanice sa visokim KQRS se nisu razlikovale od ispitanica sa srednjim rizikom samo u vrednostima obima nadlaktice, odnosa struk/kuk i fibrinogena.

4.1.4. Uticaj hormonskog statusa na nivo rizika za kardiovaskularne bolesti

Da bi se utvrdio mogući uticaj hormonskog statusa kod PCOS gojaznih i normalno uhranjenih žena na nivo KQRS sprovedena je višestruka linearna regresiona analiza. Početni model se sastojao od svih određivanih hormona i korišćena je selekcija unazad (eng. *backward selection*). Ova analiza je omogućila izbor modela (grupe parametara) koji sa najvišim procentom određuju varijabilnost u zavisno promenljivoj, tj. KQRS (Tabela 9).

Tabela 9. Višestruka linearna regresiona analiza sa KVRS kao zavisnom promenljivom i vrednostima hormona kao nezavisnim prediktorima

PCOS cela grupa		PCOS normalno uhranjene		PCOS gojazne	
SHBG	0,025 (0,0008–0,0492)*	E2	-0,00933(-0,01721– -0,00145)*	FSH	0,391 (0,022–0,761)*
FSH	0,419 (0,168–0,671)**	DHEAS	0,000887 (0,0000144–0,001759)*		
Androstendion	0,800 (0,238–1,364)**				
DHEAS	-0,001 (-0,002– -0,0002)*				
Modifikovan R²	0,398		0,460		0,319

Podaci pokazuju B (IP); B – nestandardizovan beta koeficijent ; IP – interval pouzdanosti; R² – modifikovan koeficijent determinacije R²
 *P<0,05, **P<0,01 po MLR analizi

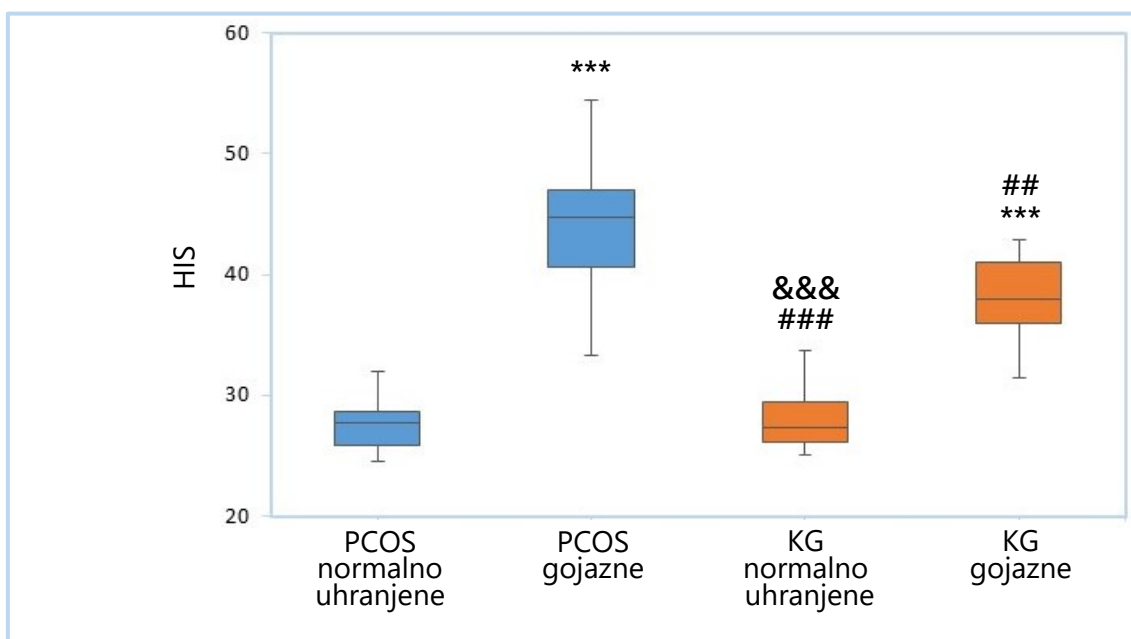
Najvažniji prediktori vrednosti KVRS za celu PCOS grupu su bili: SHBG, FSH i androstenedion (pozitivna korelacija) i DHEAS (negativna korelacija). Modifikovan koeficijent determinacije, R^2 je bio 0,398 što znači da je skoro 40% varijabilnosti u vrednosti KVRS u vezi sa izabranim modelom parametara. S druge strane, kod normalno uhranjenih žena sa PCOS najznačajniji prediktori su bili estradiol (negativna korelacija) i DHEAS (pozitivna korelacija) sa približno 46% uticaja na varijabilnost KVRS. Kod gojaznih žena sa PCOS najveći uticaj na kardiovaskularni rizik pokazao je FSH (pozitivna korelacija) sa oko 30% varijacije uslovljene ovim hormonom.

4.1.5. NAFLD i rizik za kardiovaskularne bolesti

4.1.5.1. Indeksi NAFLD i ICO

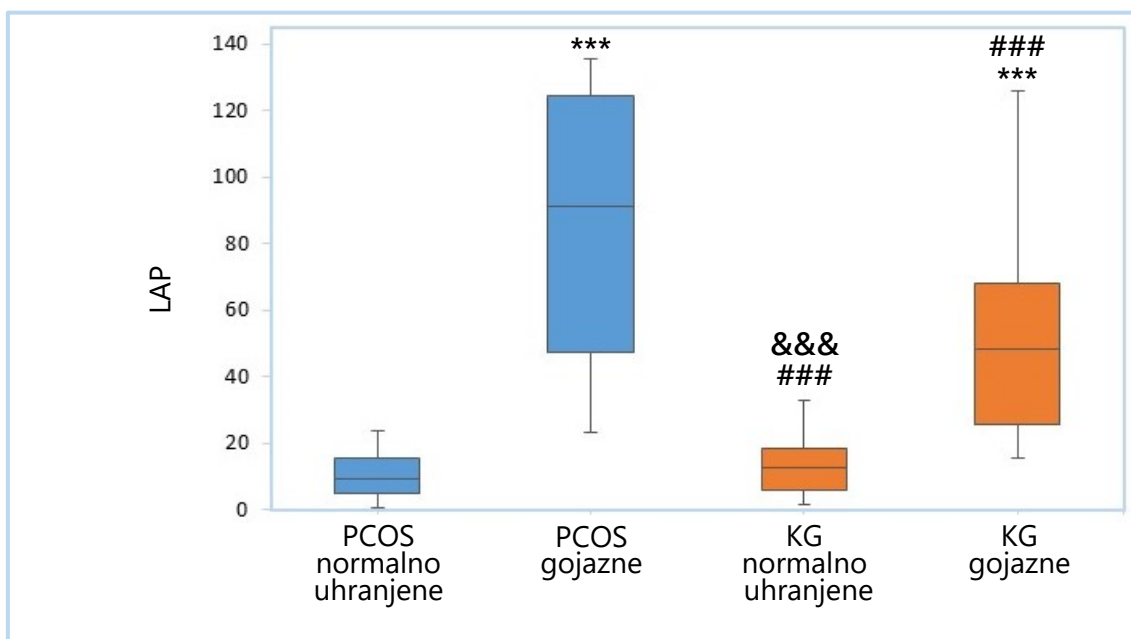
NAFLD je česta kod žena sa PCOS što predstavlja dodatan rizik za razvoj KVB. U cilju procene dodatnog kardiovaskularnog rizika koji potiče od prisustva NAFLD u ovom sindromu, izračunali smo nekoliko NAFLD indeksa: APRI, LAP i HIS uključujući i antropometrijski parametar –ICO i uporedili njihove vrednosti u ispitivanim podgrupama primenom Mann-Whitney U testa.

HIS i LAP indeksi i ICO pokazali su značajno više vrednosti kod gojaznih žena sa PCOS u poređenju sa drugim podgrupama, međutim njihove vrednosti se nisu razlikovale kod normalno uhranjenih žena sa PCOS i žena iz KG (Slike 13–15).



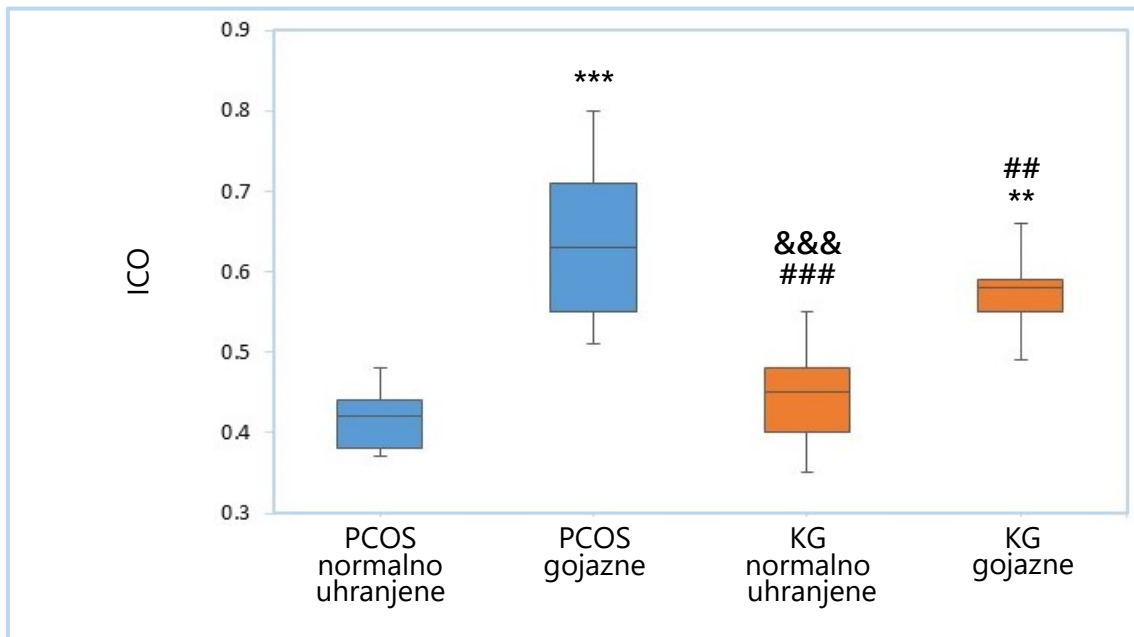
Slika 13. Vrednosti HIS indeksa u ispitivanim podgrupama

*** $P < 0,001$ u odnosu na normalno uhranjene žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu
 ### $P < 0,01$,### $P < 0,001$ u odnosu na gojazne žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu
 &&& $P < 0,001$ u odnosu na gojaznu KG žena, prema Mann-Whitney U testu



Slika 14. Vrednosti LAP indeksa u ispitivanim podgrupama

*** $P < 0,001$ u odnosu na normalno uhranjene žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu
 ### $P < 0,001$ u odnosu na gojazne žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu
 &&& $P < 0,001$ u odnosu na gojaznu KG žena, prema Mann-Whitney U testu



Slika 15. Vrednosti ICO u ispitivanim podgrupama

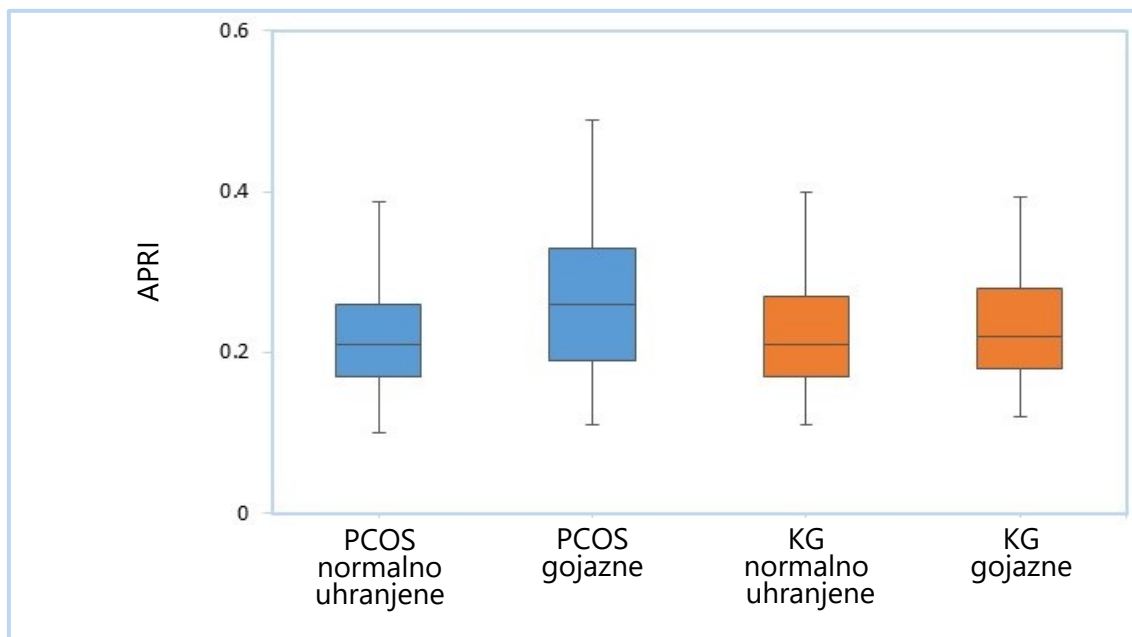
****** $P < 0,01$, ******* $P < 0,001$ u odnosu na normalno uhranjene žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu

$P < 0,01$, **###** $P < 0,001$ u odnosu na gojazne žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu

&&& $P < 0,001$ u odnosu na gojaznu KG žena, prema Mann-Whitney U testu

Visoke vrednosti HIS i LAP indeksa, kao i antropometrijskog parametra ICO su očekivane kod gojaznih žena sa ovim sindromom zato što ovi indeksi ukazuju na prisustvo gojaznosti, naročito abdominalne gojaznosti i preteranu akumulaciju lipida u predelu stomaka i abdomena, pa samim tim i u jetri (formule za njihovo izračunavanje koriste parametre ALT, AST, ITM, obim struka, TG). Njihove vrednosti ukazuju na postojanje metaboličkih poremećaja u PCOS, a time i na rizik za razvoj KVB i dokazuju povezanost NAFLD i PCOS.

Međutim, podgrupe se nisu razlikovale po vrednostima APRI indeksa (Slika 16)

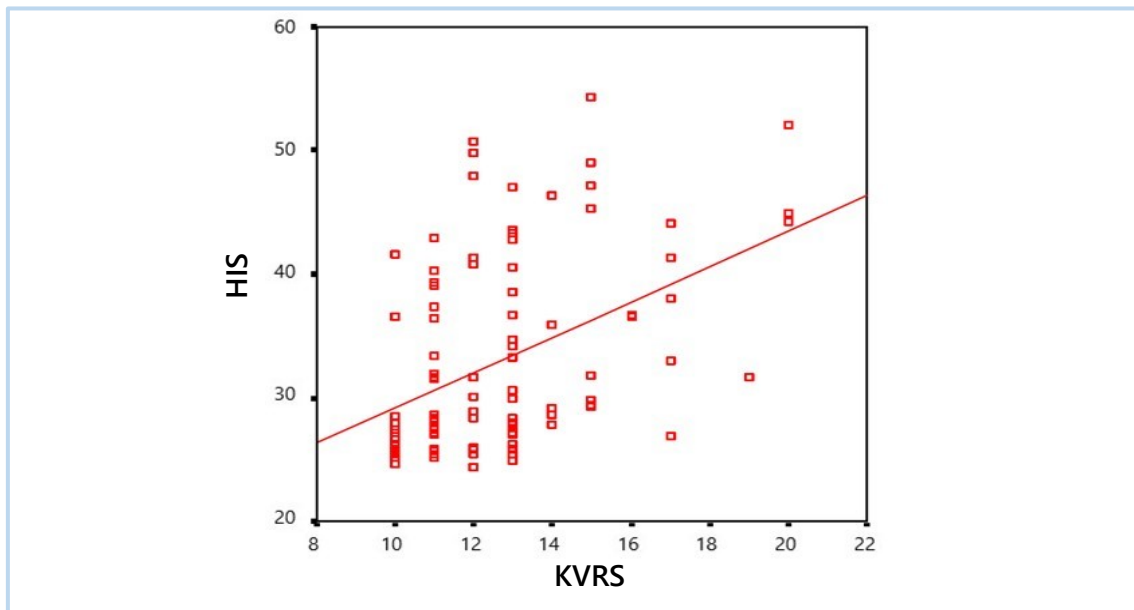


Slika 16. Vrednosti APRI indeksa u ispitivanim podgrupama

4.1.5.2. Ispitivanje korelacije indeksa NAFLD i ICO sa skorom rizika za kardiovaskularne bolesti

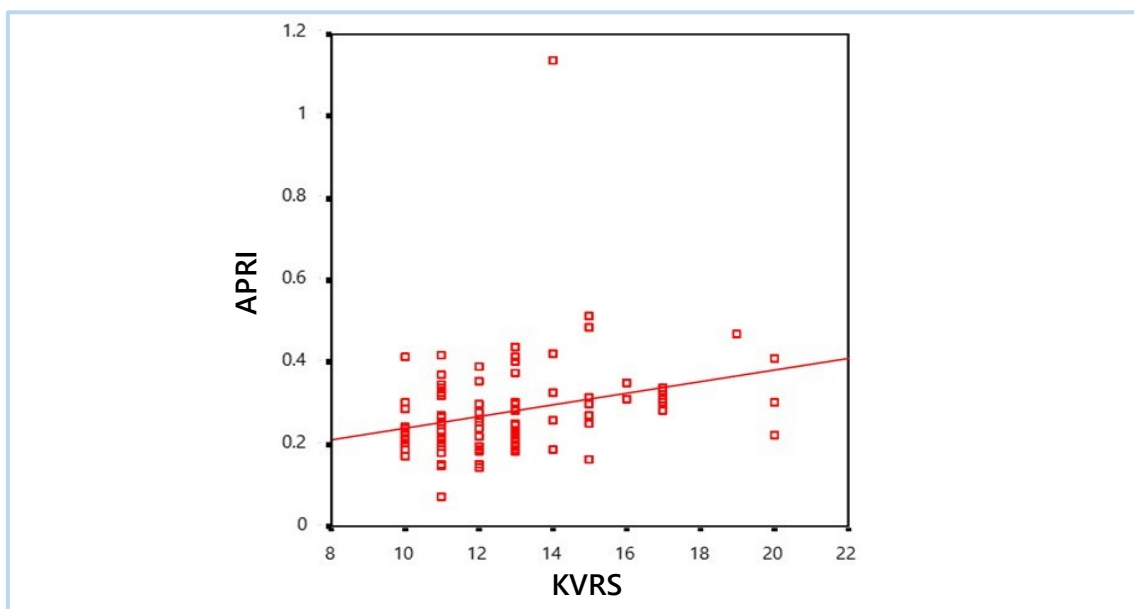
Međusobni odnos između KVRS i NAFLD indeksa i ICO je procenjen pomoću Spearmanove neparametarske korelacije.

Svi NAFLD indeksi kao i ICO su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju sa KVRS (Slike 17–19).



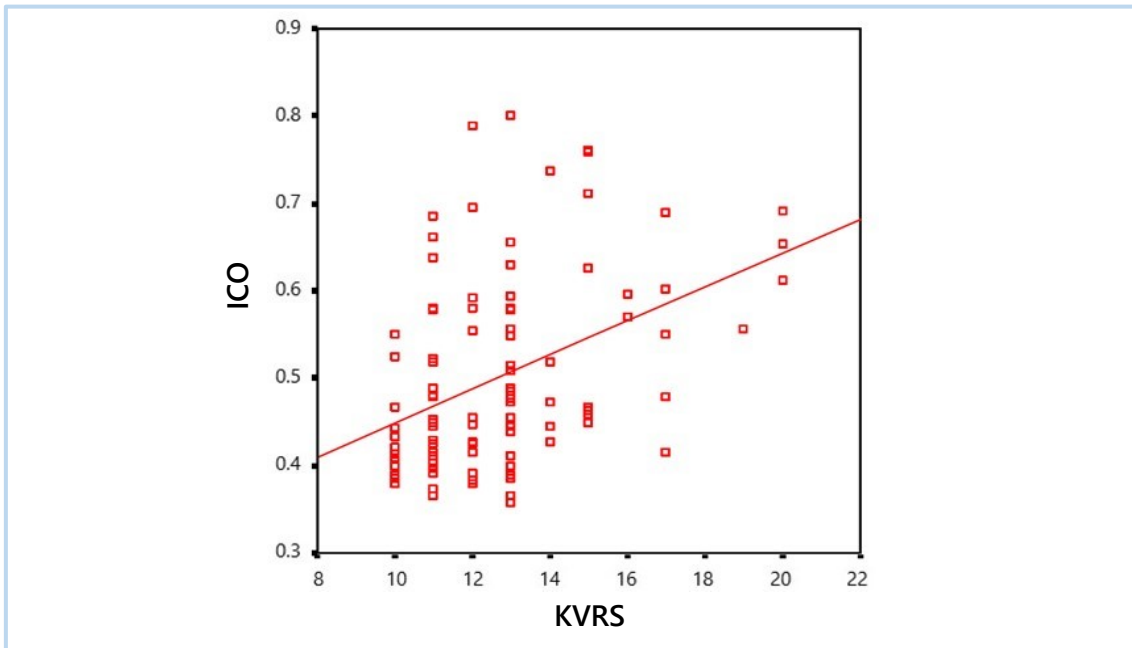
Slika 17. Korelacija između HIS indeksa i KVRS u PCOS grupi

Spearmanov neparametarski koeficijent korelacije $\rho = 0,427$, ($P < 0,001$)



Slika 18. Korelacija između APRI indeksa i KVRS u PCOS grupi

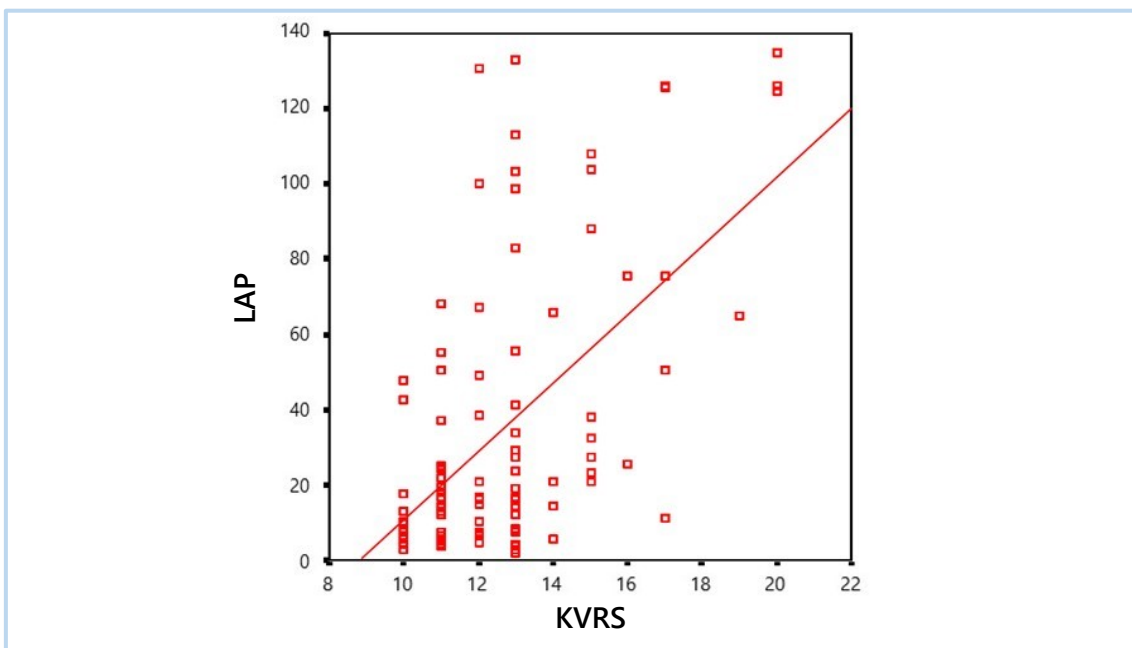
Spearmanov neparametarski koeficijent korelacije $\rho = 0,278$ ($P < 0,01$)



Slika 19. Korelacija između ICO i KVRS u PCOS grupi

Spearmanov neparametarski koeficijent korelacije $\rho = 0,417$ ($P < 0,001$)

Najjaču pozitivnu korelaciju sa KVRS je pokazao LAP indeks (Slika 20).

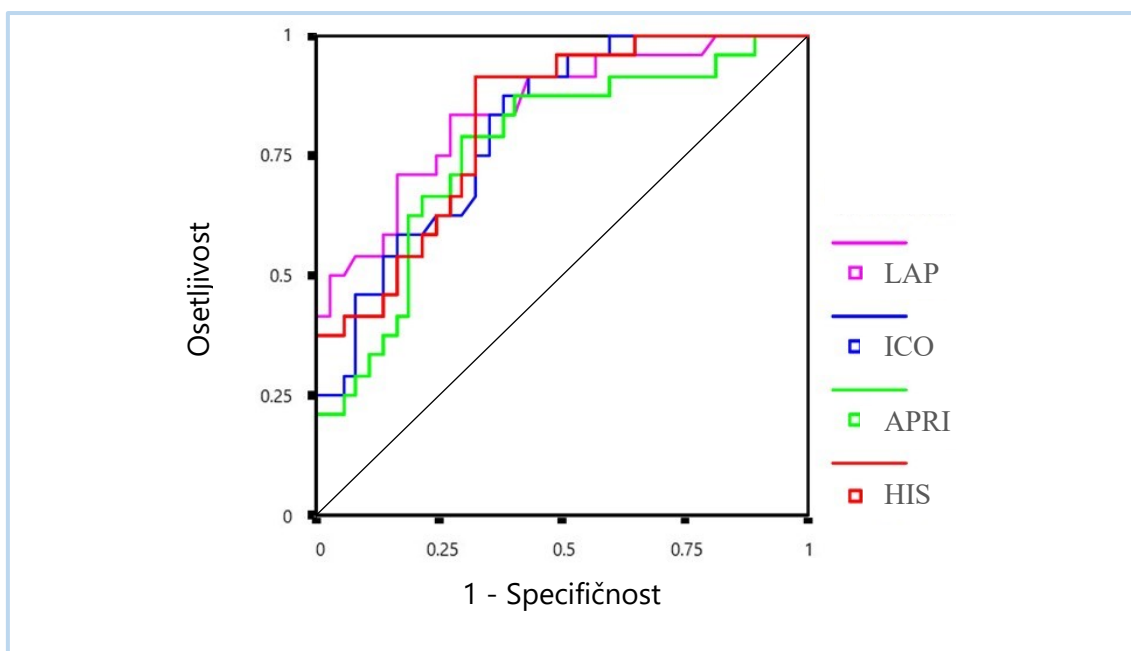


Slika 20. Korelacija između LAP indeksa i KVRS u PCOS grupi

Spearmanov neparametarski koeficijent korelacije $\rho = 0,566$ ($P < 0,001$)

4.1.6. Procena dijagnostičke tačnosti indeksa NAFLD i ICO u predviđanju rizika za kardiovaskularne bolesti

ROC kriva, konstruisana da bi se uporedile sposobnosti NAFLD indeksa i ICO da predvide visok KVRS u PCOS (od 18–24 poena, Tabela 8), prikazana je na Slici 21. Poređenje je vršeno korišćenjem AUC za svaki parametar (Tabela 10).



Slika 21. Grafički prikaz ROC krive pojedinačnih NAFLD indeksa i ICO

Tabela 10. Površina ispod krive za pojedinačne NAFLD indekse i ICO

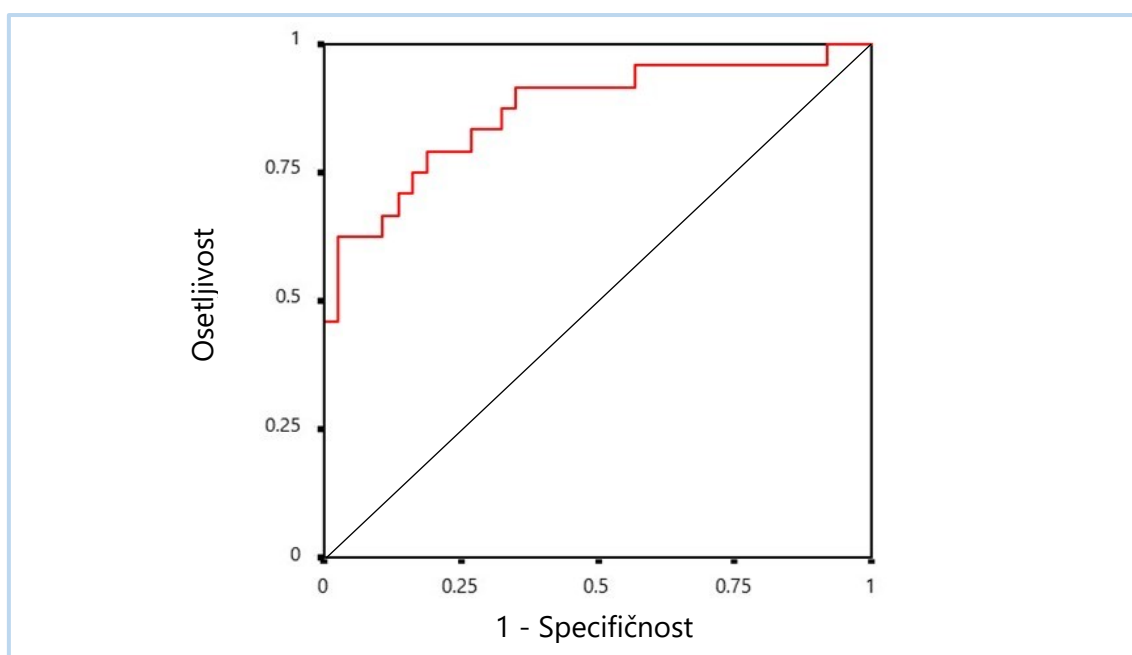
Testirane varijable	AUC (SE)	95% Interval pouzdanosti	P
ICO	0,751 (0,052)	0,648–0,853	<0,001
LAP	0,776 (0,053)	0,673–0,879	<0,001
HIS	0,757 (0,051)	0,657–0,858	<0,001
APRI	0,757 (0,057)	0,644–0,869	<0,001

AUC – površina ispod krive; SE – standardna greška

Na osnovu vrednosti AUC, svi parametri imaju dobru dijagnostičku tačnost u predviđanju visokog kardiovaskularnog rizika kod žena sa PCOS. Razlika između pojedinih AUC nije bila statistički značajna.

4.1.7. Procena dijagnostičke tačnosti selektovanog modela u predviđanju rizika za kardiovaskularne bolesti

Konstruisali smo model koga su činila tri NAFLD indeksa (LAP, HIS i APRI) i antropometrijski parametar – ICO koristeći prediktivne verovatnoće dobijene logističkom regresionom analizom (Slika 22, Tabela 11).



Slika 22. Grafički prikaz ROC krive modela integrisanih parametara NAFLD i ICO

Tabela 11. Površina ispod krive za model integrisanih parametara (ICO, LAP, APRI i HIS indeksa)

Testirane varijable	AUC (SE)	95% Interval pouzdanosti	P
Model	0,815 (0,056)	0,705–0,925	<0,001

AUC – površina ispod krive; SE – standardna greška

Izabrani model, sastavljen od NAFLD indeksa i ICO, je pokazao odličnu dijagnostičku tačnost u izdvajanju PCOS pacijenata sa visokim rizikom za razvoj KVB (AUC>0,8 predstavlja odličnu dijagnostičku tačnost).

4.2. II deo studije

Drugi deo studije se bavio ispitivanjem redoks statusa, dislipidemije i inflamacije kod žena sa PCOS. Njihov uticaj u sindromu procenjen je izračunavanjem pojedinačnih

skorova rizika i DOI skora. Takođe, ispitivana je distribucija LDL i HDL subfrakcija u PCOS, raspodela PON1 na HDL subfrakcijama i procenjivan je njihov doprinos riziku za KVB. Do danas je publikovan značajan broj studija koje se bave proučavanjem redoks statusa u PCOS (91, 168-170) . Sa druge strane, manji je broj studija koje govore u prilog određivanju lipoproteinskih subfrakcija u sindromu (171, 172), a distribucija enzima PON1 na HDL subfrakcijama još uvek nije ispitivana u ovoj populaciji pacijenata. U drugom delu ove studije učestvovala su 164 ispitanice (114 žena sa PCOS i 50 zdravih žena) starosti između 20 i 39 godina, koje su ispitivane na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Srbije. U ovom novom uzorku prvo smo redoks status žena sa PCOS poredili sa statusom zdravih žena iz KG. Određivanje redoks statusa podrazumeva određivanje parametara OS – prooksidanasa ili proizvoda njihovog delovanja kao i parametara antioksidativnog statusa – elemenata enzimske i neenzimske antioksidativne zaštite. S tim ciljem, ispitanice su podeljene u dve osnovne grupe, grupu žena sa dokazanim PCOS (n=114) i KG zdravih žena (n=50) poštujući prethodno definisane kriterijume za učešće u studiji.

4.2.1. Socio-demografski, klinički i biohemijski parametri

U Tabeli 12 prikazane su vrednosti socio-demografskih i biohemijskih parametara u PCOS i KG.

Tabela 12. Osnovni socio-demografski i biohemijski parametri kod pacijentkinja sa PCOS i KG žena

Parametar	PCOS (n=114)	KG (n=50)	P
ITM, kg/m ²	24,2 (21,2–29,7)	22,1 (20,7–23,5)	<0,01
Starost, godine	25,5 (22,0–29,2)	28,0 (23,7–30,0)	0,177
SKP, mmHg	120 (110–125)	110 (103–120)	<0,01
DKP, mmHg	75,0 (70,0–80,0)	74,5 (65,7–80,0)	0,371
Ukupni holesterol, mmol/L	4,76 (4,14–5,31)	4,98 (4,38–5,50)	0,232
LDL-H, mmol/L	2,84 (2,19–3,28)	2,81 (2,53–3,12)	0,789
HDL-H, mmol/L	1,40 (1,10–1,80)	1,60 (1,32–1,95)	<0,01
TG, mmol/L	0,840 (0,657–1,420)	0,930 (0,712–1,370)	0,745
Non-HDL-H, mmol/L	3,24 (2,57–3,93)	3,39 (2,87–3,76)	0,653
TG/HDL-H	0,644 (0,387–1,200)	0,503 (0,401–0,876)	0,173
CRP, mg/L	1,90 (0,70–3,70)	0,55 (0,40–1,00)	<0,001

Rezultati su prikazani kao medijane i interkvartilni raspon (25–75 percentila). Parametri su poređeni korišćenjem Mann-Whitney U testa.

SKP – sistolni krvni pritisak; DKP – dijastolni krvni pritisak

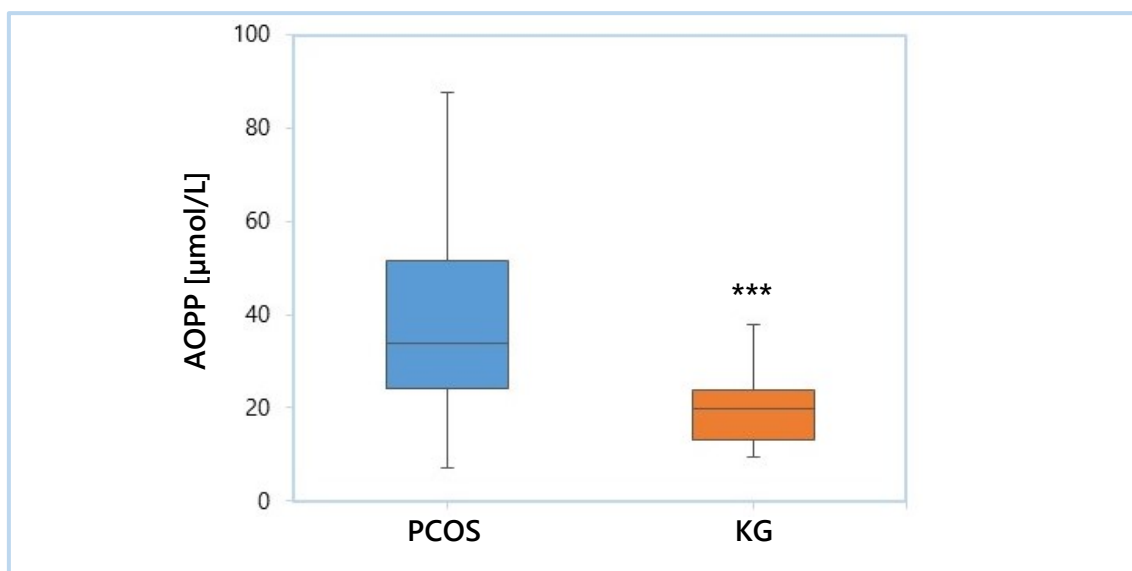
S obzirom da je raspodela podataka odstupala od normalne, poređenje medijane parametara u grupama izvršeno je primenom Mann-Whitney U testa i uočeni su sledeći rezultati: žene sa PCOS su imale značajno niže vrednosti HDL-H u poređenju sa KG žena, ali su te vrednosti ipak bile u granicama preporučenih vrednosti (vrednosti HDL-H bile su >1,29 mmol/L što predstavlja granično rizičnu vrednost za KVB prema NCEP ATP III) (149). Niže vrednosti HDL-H kod žena sa PCOS mogu ukazati na početni poremećaj metabolizma lipida koji još uvek ne predstavlja rizik za KVB. Za razliku od HDL-H, vrednosti holesterola, non-HDL-H, LDL-H i TG se nisu razlikovale između grupa. Nije postojala značajna razlika ni u vrednostima aterogenog indeksa (TG/HDL-H) između

ispitivanih grupa, iako je vrednost medijane bila viša kod PCOS žena. Koncentracija CRP je bila značajno viša kod žena sa PCOS u poređenju sa KG. Iako su u pitanju generalno niske koncentracije CRP, uočava se trend ka povećanju koncentracije ovog inflamatornog markera kod žena sa PCOS.

4.2.2. Redoks status

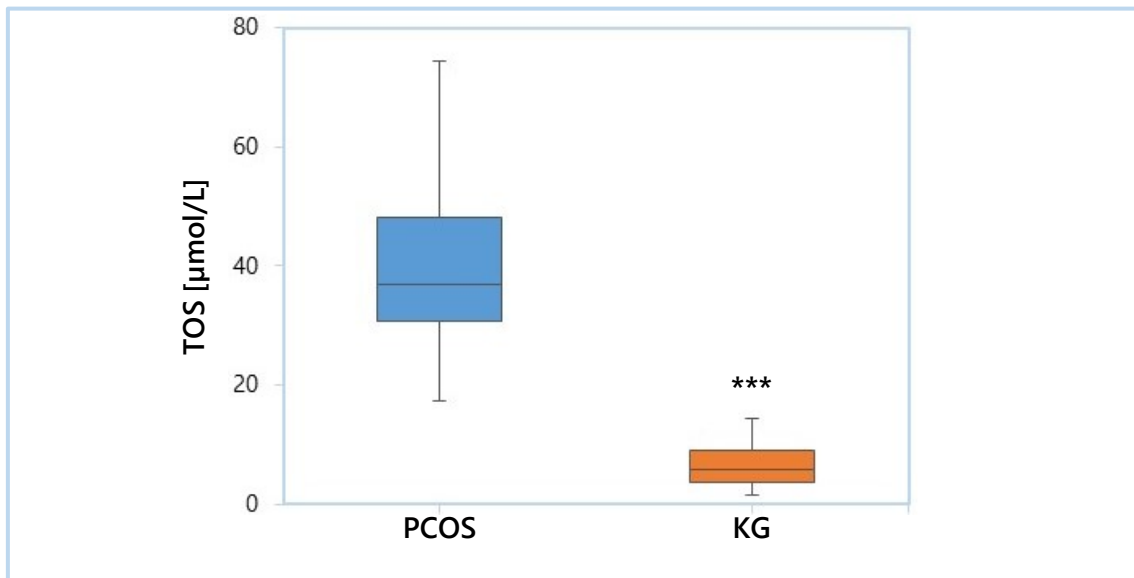
Parametri OS – prooksidansi, odnosno proizvodi njihovog delovanja (AOPP, TOS, PAB i MDA) i antioksidansi (PON1, SH-grupe, TAS i SOD) kod žena sa PCOS i žena iz KG su prikazani na Slikama 23–30.

Prooksidansi (AOPP, TOS, PAB i MDA) su bili statistički značajno viši kod žena sa PCOS u odnosu na žene iz KG (Slike 23–26).



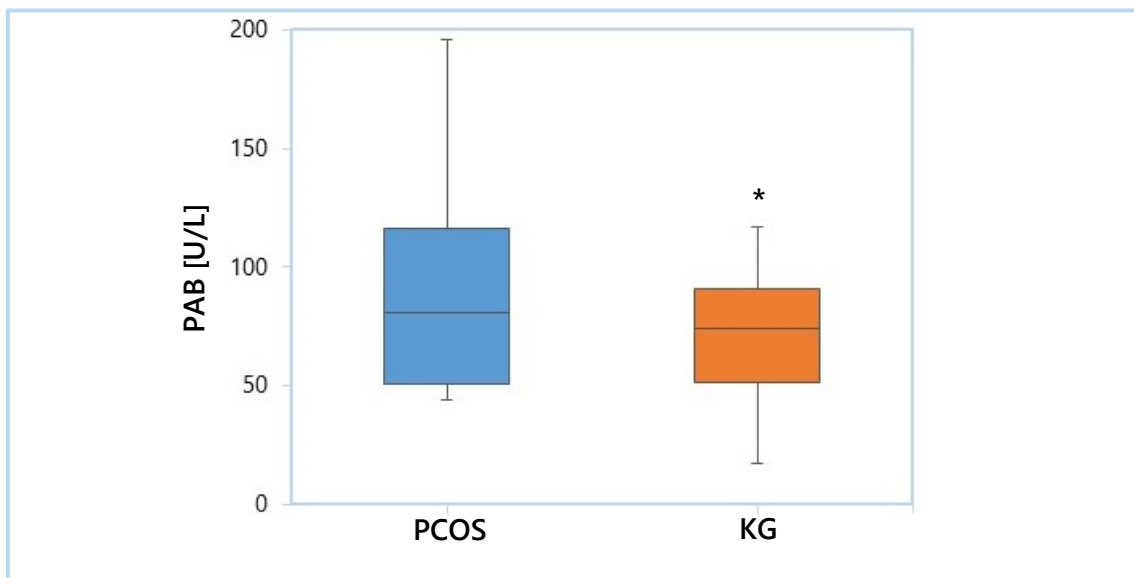
Slika 23. Koncentracije AOPP kod žena sa PCOS i KG

*** $P < 0,001$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu



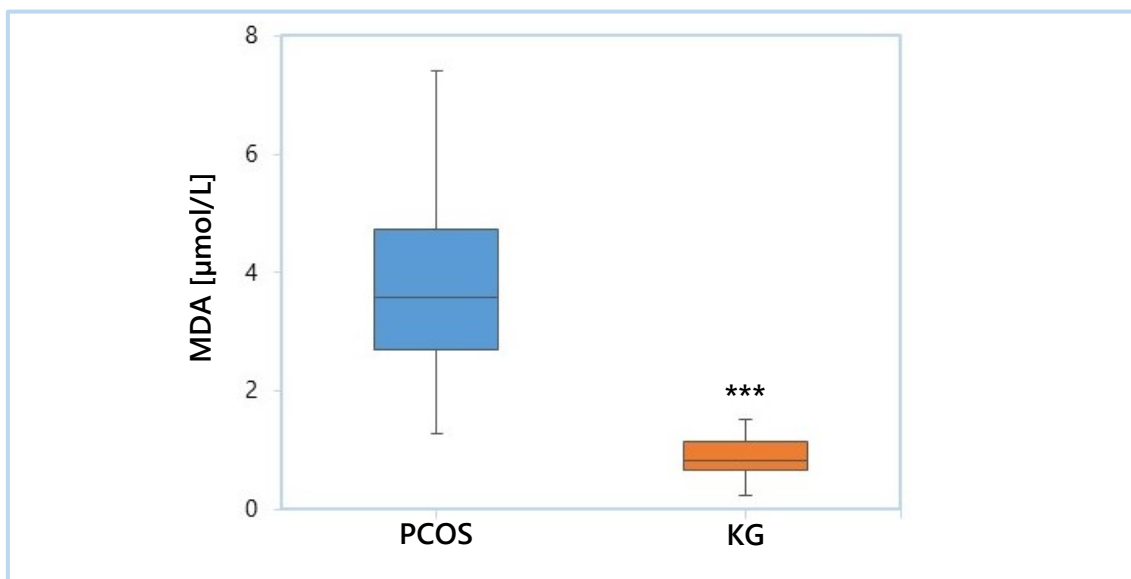
Slika 24. Koncentracija TOS kod žena sa PCOS i KG

*** $P < 0,001$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu



Slika 25. Koncentracija PAB kod žena sa PCOS i KG

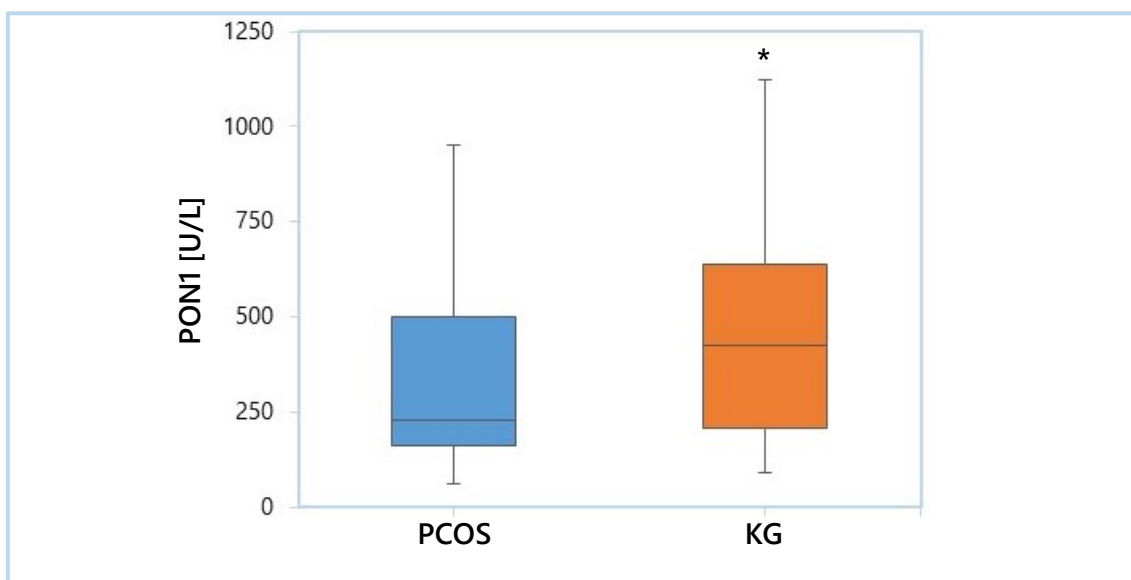
* $P < 0,05$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu



Slika 26. Koncentracija MDA kod žena sa PCOS i KG

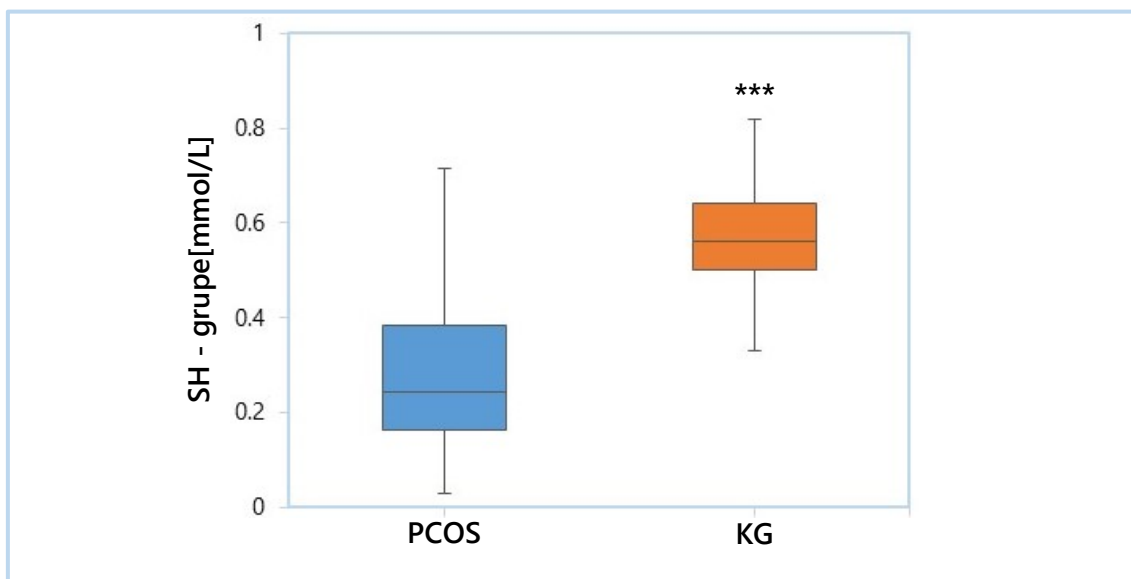
*** $P < 0,001$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu

Pored toga, žene sa PCOS su imale značajno nižu aktivnost PON1 i smanjene koncentracije ukupnih SH-grupa, parametara antioksidativne zaštite, u poređenju sa KG (Slike 27 i 28).



Slika 27. Aktivnost PON1 kod žena sa PCOS i KG

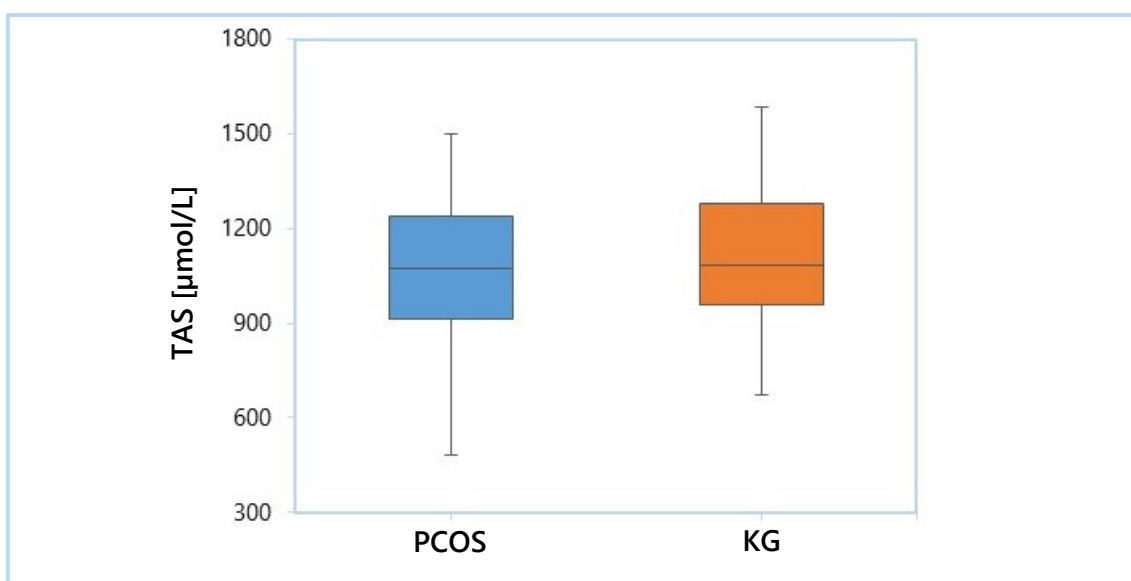
* $P < 0,05$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu



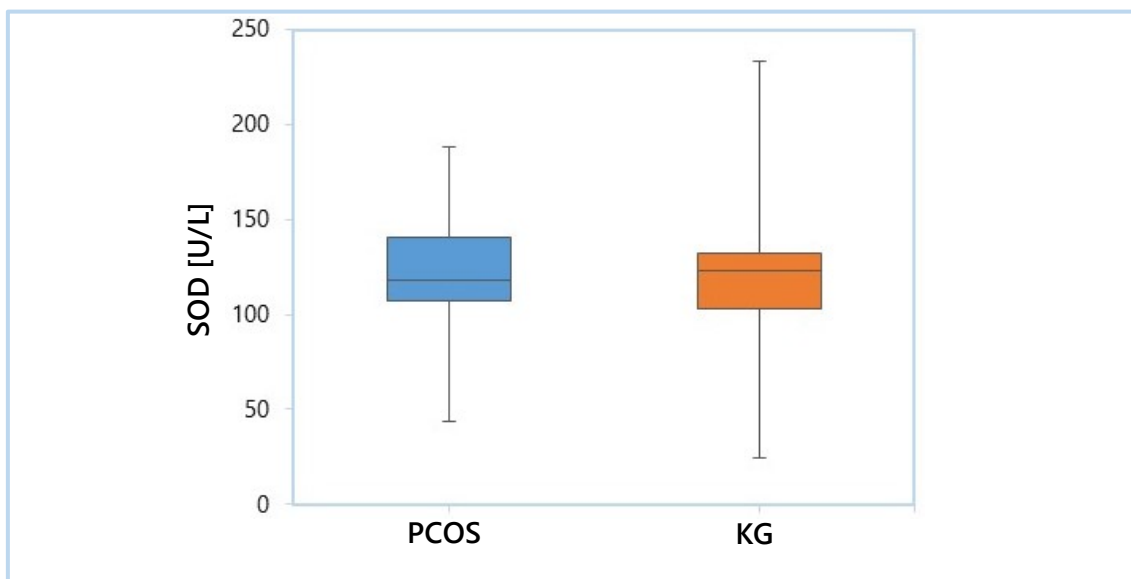
Slika 28. Koncentracija ukupnih SH-grupa kod žena sa PCOS i KG

*** $P < 0,001$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu

Antioksidansi (TAS i SOD) nisu pokazali statističku razliku između žena sa PCOS i žena iz KG (Slike 29 i 30).



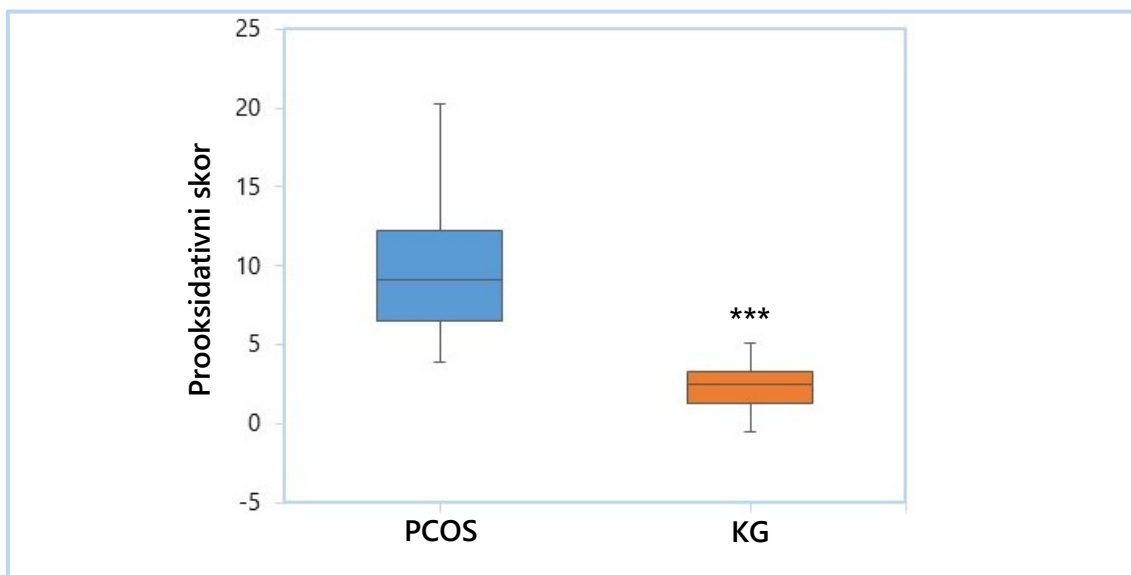
Slika 29. Koncentracija TAS kod žena sa PCOS i KG



Slika 30. Aktivnost SOD kod žena sa PCOS i KG

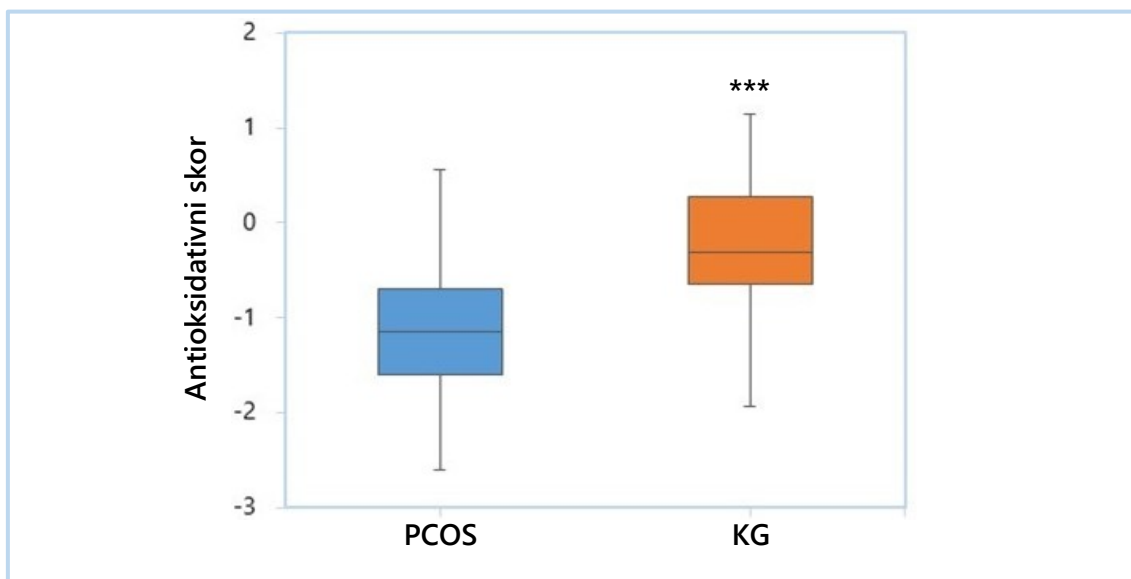
4.2.3. Skorovi dislipidemije, oksidativnog stresa, inflamacije i DOI skor

Kako bi procenili uticaj i stepen oksidativnog stresa, dislipidemije i inflamacije kao sinteze nekoliko različitih elemenata izračunali smo oksidativno-stresni skor, skor dislipidemije i skor inflamacije. Da bismo procenili zbirni efekat sva tri prethodno pomenuta skora izračunali smo njihov zbir i predstavili ga u vidu DOI skora. Vrednosti svih skorova su prikazane na Slikama 31–36.



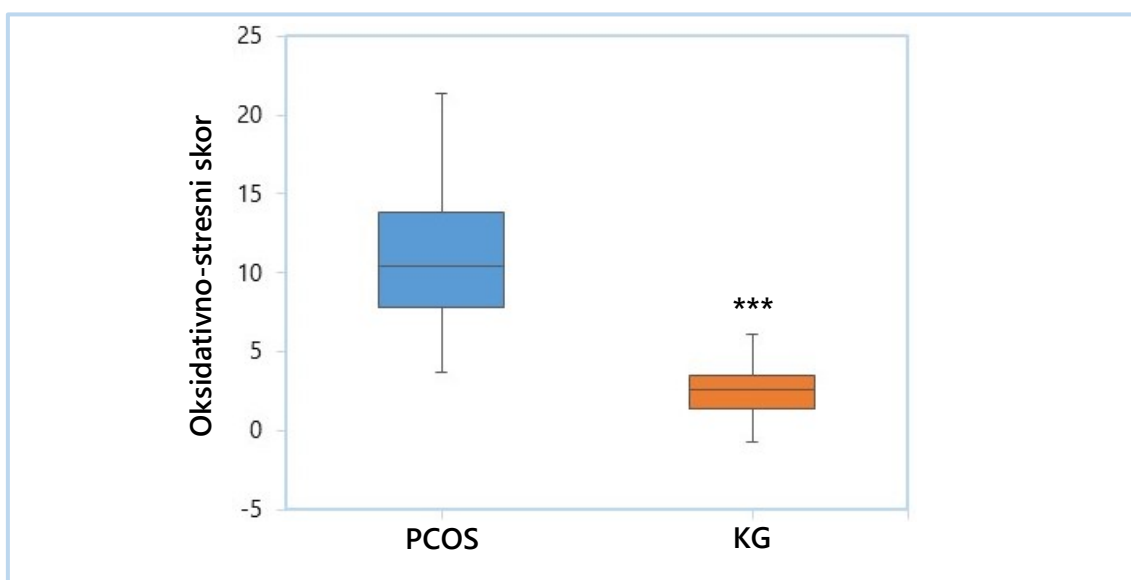
Slika 31. Prooksidativni skor kod žena sa PCOS i KG

**** $P < 0,001$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu*



Slika 32. Antioksidativni skor kod žena sa PCOS i KG

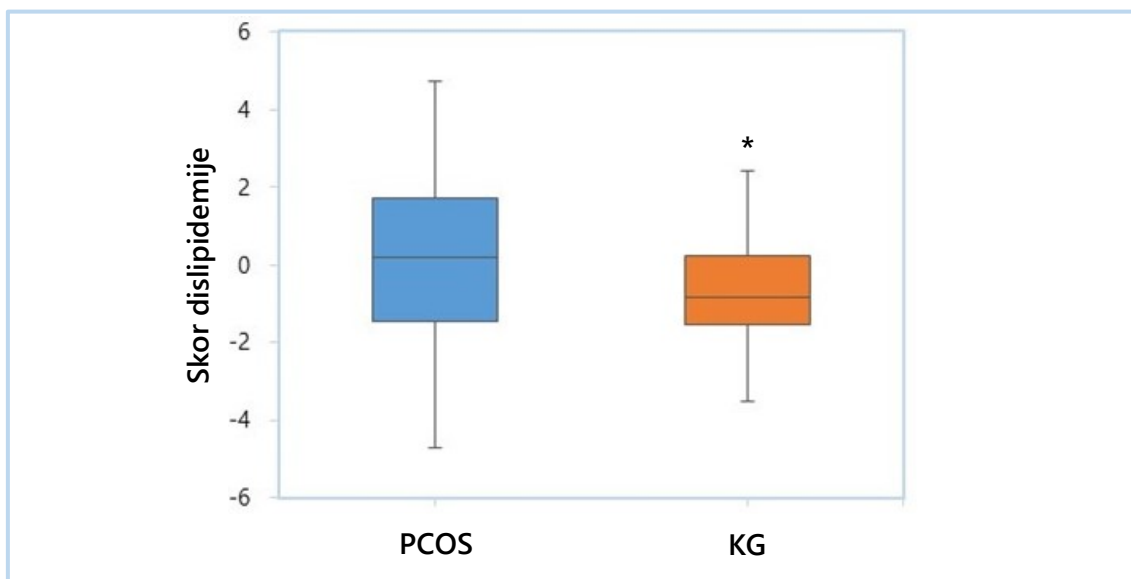
*** $P < 0,001$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu



Slika 33. Oksidativno-stresni skor kod žena sa PCOS i KG

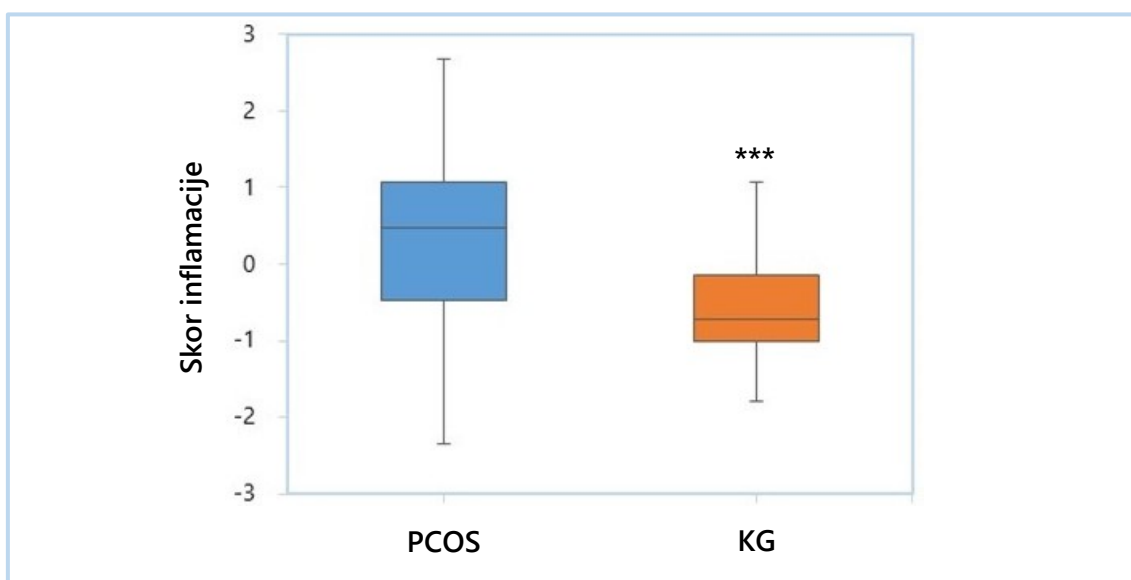
*** $P < 0,001$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu

Oksidativno-stresni skor je izračunat kao razlika dva skora – prooksidativnog i antioksidativnog skora. Žene sa PCOS su imale značajno više vrednosti oksidativno-stresnog skora u poređenju sa ženama iz KG (prooksidativni skor je bio viši, dok je antioksidativni skor bio niži kod PCOS žena) (Slike 31–33).



Slika 34. Skor dislipidemije kod žena sa PCOS i KG

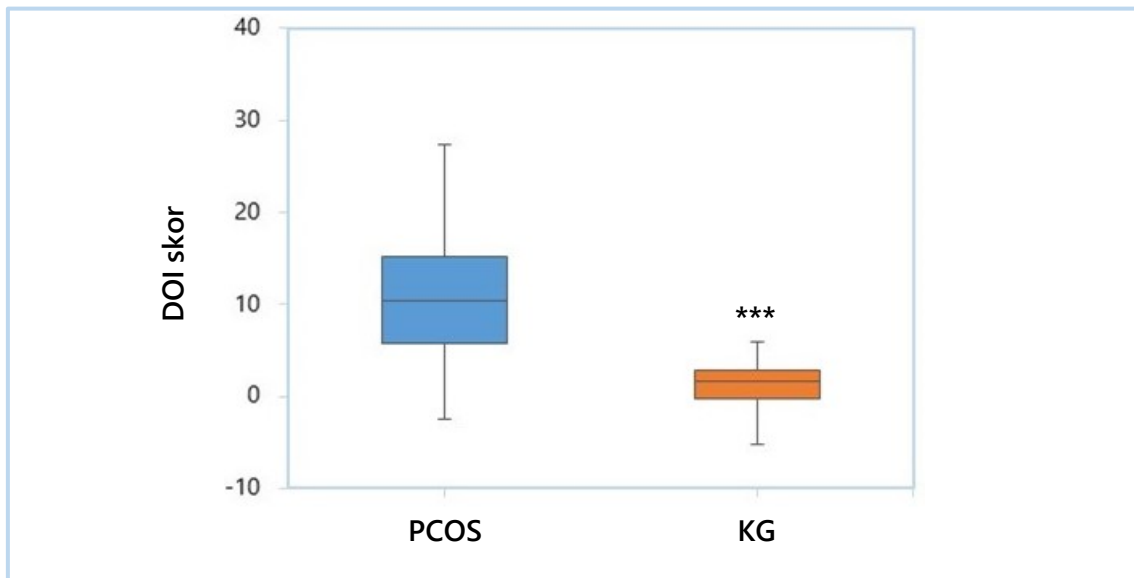
* $P < 0,05$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu



Slika 35. Skor inflamacije kod žena sa PCOS i KG

*** $P < 0,001$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu

Takođe, vrednosti skora dislipidemije i skora inflamacije su bile više kod žena sa PCOS u poređenju sa KG (Slike 34 i 35).



Slika 36. DOI skor kod žena sa PCOS i KG

*** $P < 0,001$ u odnosu na žene sa PCOS, prema Mann-Whitney U testu

U skladu sa prethodnim rezultatima pojedinačnih skorova i DOI skor je pokazao statistički značajno više vrednosti kod žena sa PCOS u odnosu na KG žena (Slika 36). Praćenjem nivoa statistički značajnih razlika izračunatih skorova uočava se da preovlađuje uticaj oksidativnog stresa i inflamacije u odnosu na dislipidemiju u PCOS grupi.

4.2.4. Ispitivanje korelacije između različitih skorova

S obzirom na to da se pojedinačni skorovi koje smo koristili za procenu tri različita kardiovaskularna faktora rizika računaju iz potpuno raznorodnih parametara smatrali smo da bi od značaja bilo da testiramo njihovu povezanost primenom Spearmanove korelacione analize i rezultati su prikazani u Tabeli 13.

Tabela 13. Korelacija između oksidativno-stresnog, skora dislipidemije i inflamatornog skora

Skorovi	Skor dislipidemije	Skor inflamacije
Oksidativno-stresni skor	0,397***	0,252**
Skor dislipidemije	/	0,365***

ρ – Spearmanov neparametarski koeficijent korelacije
** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Interesantno je da su svi pojedinačni skorovi koji odlikavaju veličinu dislipidemije, inflamacije i OS, računati od potpuno različitih i nesrodnih parametara, bili međusobno u korelaciji i da je ta korelacija bila pozitivna. Nominalne vrednosti pojedinačnih koeficijenata korelacije nisu visoke, jer se radi o potpuno raznorodnim parametrima izvedenim iz parametara koji su određivani u živim sistemima (ljudskom organizmu), ali statistički test je pokazao značajne korelacije. Oksidativno-stresni skor pokazao je najjaču i najznačajniju pozitivnu korelaciju sa skorom dislipidemije ($P < 0,001$), kao i značajnu pozitivnu korelaciju sa skorom inflamacije ($P < 0,01$). Takođe, jaka pozitivna korelacija je postojala između skora dislipidemije i skora inflamacije ($P < 0,001$).

4.2.5. Uticaj gojaznosti, lipidnog statusa i parametara oksidativnog stresa na vrednosti skorova

Višestruka linearna regresiona analiza je primenjena sa ciljem da se proceni uticaj više različitih parametara na varijabilnost svakog od skorova. Kombinacije parametara su birane tako da ulaze samo oni parametri iz kojih određeni skor nije računat. Korišćena je selekcija unazad i prikazani su parametri koji ulaze u najbolji model (Tabela 14).

Tabela 14. Višestruka linearna regresiona analiza prediktora oksidativno-stresnog skora, skorova inflamacije i dislipidemije

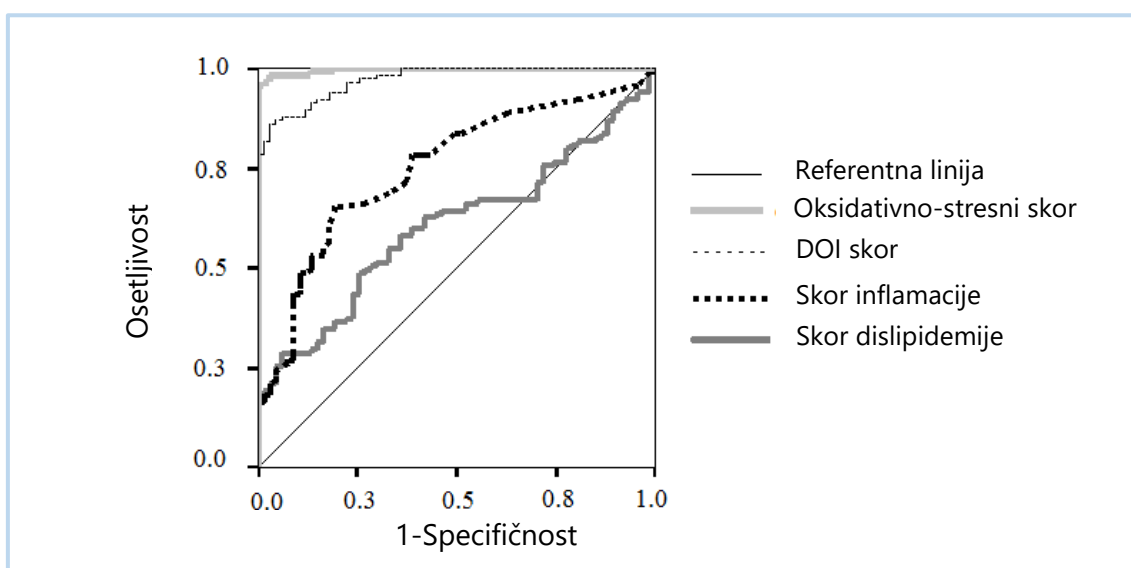
Parametar	Oksidativno-stresni skor		Skor inflamacije		Skor dislipidemije	
	B (SE)	95% IP	B (SE)	95% IP	B (SE)	95% IP
ITM, kg/m ²	ns		0,080(0,013)	(0,055–0,105)***	0,144 (0,022)	(0,100–0,188)***
Ukupni holesterol, mmol/L	1,843(0,394)	(1,062–2,623)***	ns		ns	
HDL-H, mmol/L	-2,911(0,806)	(-4,509– -1,313)***	ns		ns	
AOPP, μmol/L	ns		ns		0,049 (0,007)	(0,035–0,062)***
TOS, μmol/L	ns		ns		-0,018(0,007)	(-0,032– -0,005)**
MDA, μmol/L	ns		0,123 (0,057)	(0,009–0,236)*	0,271(0,108)	(0,0058–0,4840)*
Modifikovan R ²	0,228		0,270		0,539	

B – nestandardizovan beta koeficijent; *SE* – standardna greška; *95% IP* – Interval pouzdanosti; *R*² – modifikovan koeficijent determinacije *R*²;
ns – nesigifikantno – bez statistički značajne razlike
 P*<0,05, *P*<0,01, ****P*<0,001 po MLR analizi

Glavni prediktori vrednosti oksidativno-stresnog skora kod žena sa PCOS su bili holesterol (pozitivna korelacija) i HDL-H (negativna korelacija). Modifikovan koeficijent determinacije R^2 je iznosio 0,228 što znači da je približno 23% varijabilnosti u vrednosti oksidativno-stresnog skora u vezi sa izabranim modelom parametara. Najvažniji prediktori skora inflamacije su bili ITM i MDA (oba sa pozitivnom korelacijom) sa 27% varijacije uslovljene ovim parametrima. Najveći uticaj na skor dislipidemije su imali ITM, AOPP, MDA (pozitivna korelacija) i TOS (negativna korelacija). Ovaj model parametara objašnjava 54% uticaja na varijabilnost u vrednosti skora.

4.2.6. Procena dijagnostičke tačnosti skorova u identifikaciji žena sa PCOS

U cilju procene sposobnosti svih skorova da razdvoje žene sa PCOS od zdravih žena, primenili smo ROC analizu (Slika 37), a dijagnostičku tačnost skorova smo upoređivali koristeći njihove vrednosti AUC (Tabela 15).



Slika 37. ROC kriva izračunatih skorova kao markera PCOS

Tabela 15. Površina ispod krive za izračunate skorove nakon konstrukcije ROC krive

Testirane varijable	AUC (SE)	95% Interval pouzdanosti	P
Oksidativno-stresni skor	0,996 (0,002)	0,992–1,001	<0,001
DOI skor	0,972 (0,009) ^{aa}	0,953–0,990	<0,001
Skor inflamacije	0,751 (0,037) ^{aaa,bbb}	0,679–0,823	<0,001
Skor dislipidemije	0,603 (0,041) ^{aaa,bbb}	0,522–0,685	<0,05

*AUC – površina ispod krive; SE – standardna greška; P iz ROC analize – značajnost specifične krive
aa,aaa – značajna razlika od oksidativno-stresnog skora
bbb – značajna razlika od DOI skora
P<0,01, P<0,001*

Oba skora, oksidativno-stresni i DOI skor su imali veće AUC (AUC>0,9) u poređenju sa skorovima inflamacije i dislipidemije, što znači da ova dva skora pokazuju izuzetnu diskriminativnu sposobnost, odnosno dijagnostičku tačnost u razdvajanju žena sa PCOS. Ovo je podržano visokom osetljivošću (97%) i specifičnošću (97%) oksidativno-stresnog skora kao i visokom osetljivošću (88%) i specifičnošću (88%) DOI skora na nivou granične vrednosti. Interesantno, oksidativno-stresni skor je pokazao bolju dijagnostičku tačnost u razdvajanju PCOS žena (P<0,01) u odnosu na DOI skor.

4.2.7. Veza između gojaznosti i skorova rizika za kardiovaskularne bolesti

S obzirom da je višestruka linearna regresiona analiza pokazala da je ITM važan prediktor skora inflamacije i skora dislipidemije, ispitali smo kako gojaznost utiče na sve skorove rizika kod žena sa PCOS. Stoga, podelili smo grupu žena sa PCOS na tri podgrupe prema vrednostima ITM. Prva podgrupa se sastojala od žena sa normalnom telesnom težinom (ITM<24,9 kg/m²). Drugu podgrupu su činile žene sa prekomernom telesnom težinom – predgojazne (ITM=25,0–30,0 kg/m²), a treću gojazne žene (ITM>30,0 kg/m²) (Tabela 16).

Tabela 16. Vrednosti skorova rizika u PCOS podgrupama povezanim sa gojaznošću

Parametar	PCOS, ITM<24,9 kg/m ² (n=55)	PCOS, ITM=25,0–30,0 kg/m ² (n=24)	PCOS, ITM>30,0 kg/m ² (n=35)	P
Skor dislipidemije	-1,29 (-2,34– -0,09)	1,13 (0,19–2,71) ^{aaa}	1,74 (0,39–2,81) ^{aaa}	<0,001
Skor inflamacije	-0,23 (-0,80–0,93)	0,79 (-0,04–1,13) ^a	1,25 (0,75–1,67) ^{aaa,b}	<0,001
Oksidativno-stresni skor	9,37 (7,17–13,40)	12,31 (9,88–15,91) ^{aa}	10,88 (7,79–14,17)	<0,001
DOI skor	7,92 (5,05–12,48)	14,30 (11,54–19,77) ^{aaa}	14,56 (9,31–18,01) ^{aa}	<0,001

a,aa,aaa – značajna razlika od prve grupe (PCOS žene sa normalnom telesnom težinom)

b – značajna razlika od druge grupe (PCOS žene sa prekomernom telesnom težinom)

P<0,05, P<0,01, P<0,001

PCOS žene normalne telesne težine su imale značajno niže vrednosti skorova dislipidemije i inflamacije, kao i DOI skora u odnosu na prekomerno teške i gojazne žene sa PCOS, dok se oksidativno-stresni skor nije razlikovao u odnosu na gojazne žene (žene normalne telesne težine i gojazne žene su imale slične vrednosti), već samo u odnosu na žene sa prekomernom telesnom težinom. Vrednosti skorova rizika između žena sa prekomernom telesnom težinom i gojaznih žena nisu se razlikovali, izuzev inflamatornog skora koji je bio značajno viši kod gojaznih žena sa PCOS.

4.2.8. Distribucija LDL i HDL subfrakcija

Jedan od postavljenih ciljeva ove disertacije bio je i odrediti distribuciju LDL i HDL subfrakcija kod žena sa PCOS u odnosu na zdrave žene iz KG.

Zbog kompleksnosti analiza koristili smo mlađe žene iz postojeće KG (n=23) na kojima je primenjena standardizovana metoda za razdvajanje LDL i HDL subfrakcija u cilju poređenja sa ženama sa PCOS. Pošto su žene u PCOS grupi bile mlađe od žena u KG (PCOS: 26,3±5,1 godina vs. KG: 35,7±4,8 godina; P<0,001), sva dalja poređenja su izvršena nakon korekcije za razliku u godinama (ANCOVA test). Kako je raspodela parametara koji se tiču LDL i HDL subklasa odgovarala normalnoj raspodeli korišćene su parametarske statističke metode.

4.2.8.1. Analiza LDL subfrakcija

Veličina i relativni udeli LDL subfrakcija kod žena sa PCOS i u KG prikazani su u Tabeli 17.

Tabela 17. Veličina i raspodela LDL subfrakcija u PCOS i KG

Parametar	PCOS (n=114)	KG (n=23)	P
LDL dijametar, nm	26,83±1,32	28,38±0,65	<0,001
LDL I, %	21,4±3,2	33,5±6,8	<0,001
LDL II, %	25,5±4,3	15,0±7,9	<0,001
LDL III, %	20,8±2,9	16,0±3,1	<0,001
LDL IV, %	32,3±5,5	35,6±9,7	0,137
Male, guste LDL, %	53,2±6,0	51,5±9,1	0,410

Rezultati su prikazani kao $\bar{x}\pm SD$. Parametri su poređeni korišćenjem Student t-testa.

Žene sa PCOS su imale značajno manje dijametre LDL čestica od žena u KG. Iako se ukupan udeo malih gustih LDL čestica nije značajno razlikovao između posmatranih grupa, analizom raspodele pojedinačnih LDL subfrakcija utvrdili smo karakterističnu preraspodelu ka manjim LDL česticama u grupi sa PCOS. Konkretno, kod žena sa PCOS relativni udeo LDL I subfrakcija je bio značajno manji, dok je istovremeno udeo LDL II i malih LDL III subfrakcija bio značajno veći nego u KG.

Inicijalna analiza je zatim ponovljena uzimajući u obzir stepen uhranjenosti (ITM) žena sa PCOS (Tabela 18).

Tabela 18. Veličina i raspodela LDL subfrakcija kod gojaznih i normalno uhranjenih žena sa PCOS i KG

Parametar	PCOS		KG (n=23)	P
	Normalno uhranjene (ITM≤24,9 kg/m ²) (n=55)	Gojazne (ITM≥25,0 kg/m ²) (n=59)		
LDL dijametar, nm	27,00±1,34 ^{aaa}	26,63±1,28 ^{aaa}	28,38±0,65	<0,001
LDL I, %	21,2±3,1 ^{aaa}	21,6±3,3 ^{aaa}	33,5±6,8	<0,001
LDL II, %	25,2±4,2 ^{aaa}	25,8±4,4 ^{aaa}	15,0±7,9	<0,001
LDL III, %	21,1±2,7 ^{aaa}	20,5±3,0 ^{aaa}	16,0±3,1	<0,001
LDL IV, %	32,5±5,1	32,1±5,9	35,6±9,7	0,088
Male, guste LDL, %	53,6±5,5	52,7±6,6	51,5±9,1	0,406

Rezultati su prikazani kao $\bar{x}\pm SD$. Parametri su poređeni ANOVA testom, praćenog post-hoc Tuckey-Snedecor testom.

aaa – značajna razlika bilo koje grupe od KG
P<0,001

Rezultati su pokazali da najmanje LDL dijemetre imaju gojazne žene sa PCOS (ITM>25,0 kg/m²). Obe grupe PCOS žena imale su značajno manje udele LDL I, a veće udele LDL II i LDL III subfrakcija nego žene u KG.

Nakon što smo uzeli u obzir i stepen uhranjenosti žena u KG, utvrdili smo da i normalno uhranjene i gojazne žene sa PCOS imaju statistički značajno manju veličinu LDL čestica od normalno uhranjenih i gojaznih žena u KG. Kod obe grupe žena sa PCOS utvrđen je značajno manji udeo LDL I, a veći udeo LDL II i LDL III subfrakcija u odnosu na gojazne i normalno uhranjene žene u KG (Tabela 19).

Tabela 19. Veličina i raspodela LDL subfrakcija kod normalno uhranjenih i gojaznih žena u PCOS i KG

Parametar	PCOS		KG		P
	Normalno uhranjene (ITM≤24,9 kg/m ²) (n=55)	Gojazne (ITM≥25,0 kg/m ²) (n=59)	Normalno uhranjene (ITM≤24,9 kg/m ²) (n=19)	Gojazne (ITM≥25,0 kg/m ²) (n=4)	
LDL dijametar, nm	27,00±1,34 ^{aa,b}	26,63±1,28 ^{aaa,bb}	28,31±0,67	28,68±0,55	<0,001
LDL I, %	21,2±3,1 ^{aaa,bbb}	21,6±3,3 ^{aaa,bb}	34,3±7,3	29,7±1,5	<0,001
LDL II, %	25,2±4,2 ^{aaa,bb}	25,8±4,4 ^{aaa,bbb}	15,0±7,9	14,9±8,9	<0,001
LDL III, %	21,1±2,7 ^{aaa,bb}	20,5±3,0 ^{aaa,b}	16,0±3,3	15,8±2,1	<0,001
LDL IV, %	32,5±5,1	32,1±5,9	34,7±9,9	39,6±9,2	0,081
Male guste LDL, %	53,6±5,5	52,7±6,6	50,7±9,4	55,4±7,4	0,328

Rezultati su prikazani kao $\bar{x} \pm SD$. Parametri su poređeni ANOVA testom, praćenog post-hoc Tuckey-Snedecor testom.

aa,aaa – značajna razlika bilo koje grupe od KG normalno uhranjene

b,bb,bbb – značajna razlika bilo koje grupe od KG gojazne

$P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$

4.2.8.2. Ispitivanje korelacija veličine i udela LDL subfrakcija sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima i parametrima oksidativnog stresa

U nastavku je ispitivana korelacija veličine LDL čestica sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima u PCOS grupi (Tabela 20). Veličina LDL čestica bila je u negativnoj korelaciji sa odnosom struk/kuk. Koncentracija HDL-H je bila u pozitivnoj, a koncentracija LDL-H u negativnoj korelaciji sa dijametrima LDL čestica.

Tabela 20. Korelacije veličine LDL čestica sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima u grupi sa PCOS

Parametar	LDL dijametar, nm
ITM, kg/m ²	-0,127
Odnos struk/kuk	-0,242**
HDL-H, mmol/L	0,198*
LDL-H, mmol/L	-0,193*
CRP, mg/L	-0,030

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

U Tabeli 21 su prikazani rezultati korelacione analize između veličine i relativnih udela LDL subfrakcija sa parametrima OS i antioksidativne zaštite u PCOS.

Tabela 21. Korelacije veličine i LDL subfrakcijama sa parametrima oksidativnog stresa u grupi sa PCOS

Parametar	LDL dijametar, nm	LDL I, %	LDL II, %	LDL III, %	LDL IV, %
PON1, U/L	-0,024	-0,039	0,030	0,092	-0,001
SOD, U/L	-0,125	-0,048	-0,063	0,068	0,055
SH-grupe, mmol/L	-0,069	-0,179 *	0,004	0,217*	-0,015
TAS, mmol/L	0,121	0,235*	0,158	-0,090	-0,228*
PAB, U/L	-0,109	-0,287**	-0,154	0,175	0,258**
TOS, μ mol/L	-0,055	0,060	-0,019	-0,068	0,042
AOPP, μ mol/L	-0,214*	0,062	-0,037	0,002	0,012
MDA, μ mol/L	-0,179*	-0,084	-0,073	-0,072	0,183*

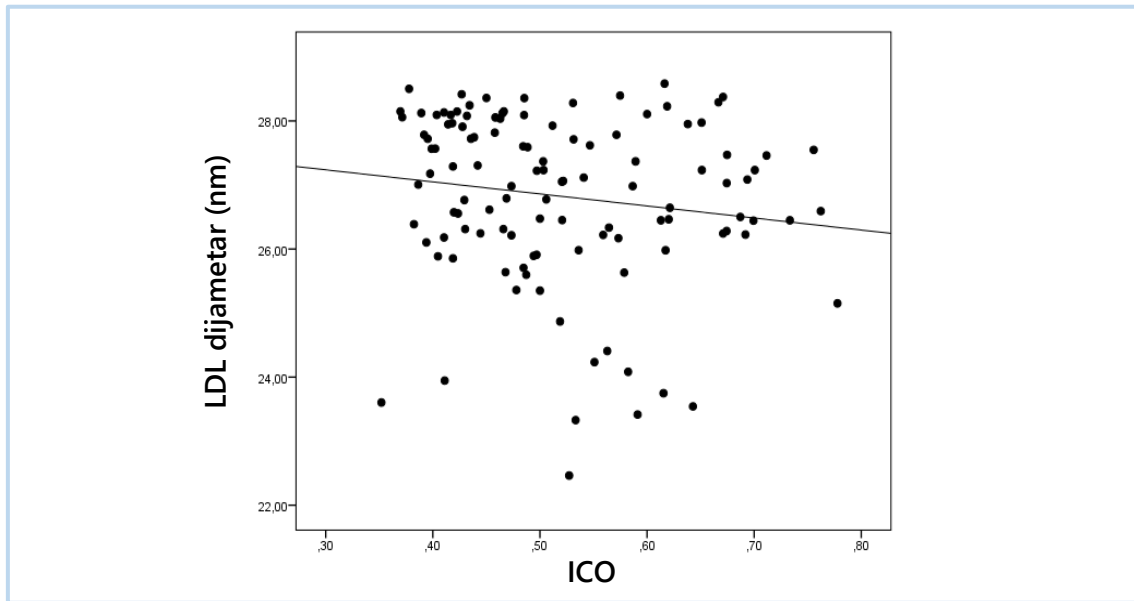
Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

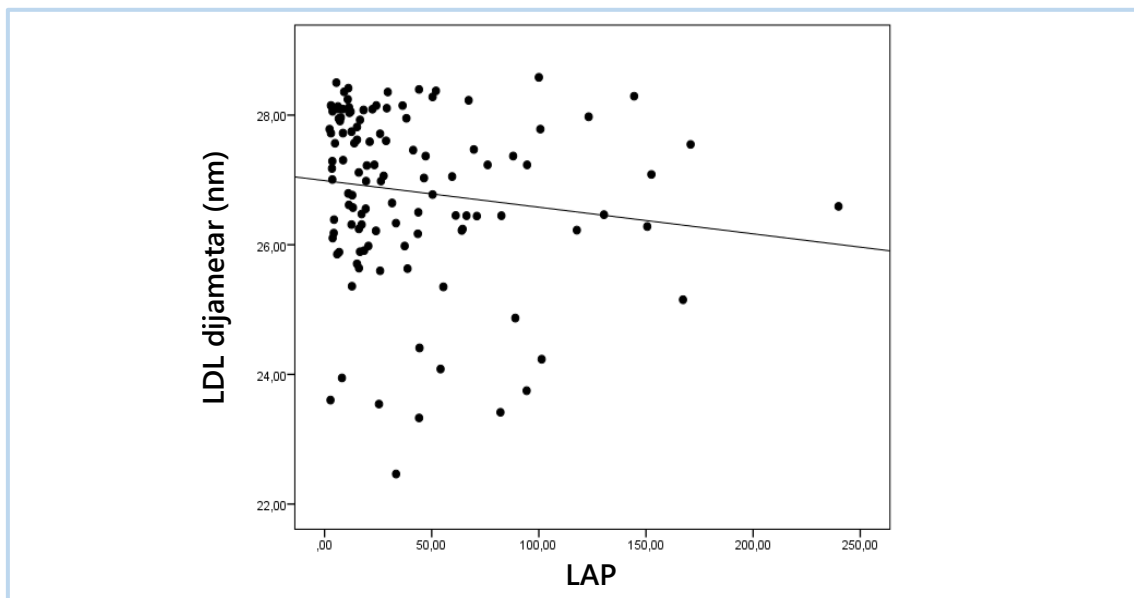
Ova analiza je pokazala da su kod žena sa PCOS manji dijametri LDL čestica u korelaciji sa višim vrednostima AOPP i MDA. Relativni udeo LDL I subfrakcija je bio u pozitivnoj korelaciji sa TAS, a u negativnoj korelaciji sa PAB. Koncentracija ukupnih SH-grupa je negativno korelirala sa udelom LDL I, a pozitivno sa udelom LDL III subfrakcija. Relativni udeo malih LDL IV subfrakcija je bio u pozitivnoj korelaciji sa PAB, a u negativnoj korelaciji sa TAS. Sem toga, veći udeo LDL IV subfrakcija je bio u korelaciji sa višim koncentracijama MDA.

4.2.8.3. Ispitivanje korelacija veličine LDL subfrakcija sa ICO i indeksima NAFLD

U nastavku smo analizirali korelaciju veličine LDL subfrakcija sa ICO i NAFLD indeksima. Utvrdili smo da je veličina LDL čestica u značajnoj negativnoj korelaciji sa ICO ($r = -0,195$; $P < 0,05$) i sa LAP indeksom ($r = -0,195$; $P < 0,05$). Rezultati su prikazani na Slikama 38 i 39.



Slika 38. Korelacija veličine LDL čestica sa ICO u PCOS grupi ($r = -0,195$; $P < 0,05$)



Slika 39. Korelacija veličine LDL čestica sa LAP indeksom u PCOS grupi ($r = -0,195$; $P < 0,05$)

4.2.8.4. Ispitivanje korelacija veličine i udela LDL subfrakcija i skorova za procenu kardiovaskularnog rizika

Analizirali smo korelaciju između ispitivanih karakteristika LDL čestica i KVRS u grupi sa PCOS. Najpre smo utvrdili da jedino veličina LDL čestica korelira sa KVRS. Analiza je pokazala da postoji značajna korelacija između viših vrednosti KVRS i manjih dijametara LDL čestica ($r = -0,249$; $P < 0,01$).

Tabela 22. Korelacije veličine i LDL subfrakcijama sa izračunatim skorovima rizika u grupi sa PCOS

Parametar	LDL dijametar, nm	LDL I, %	LDL II, %	LDL III, %	LDL IV, %
Skor dislipidemije	-0,224*	0,048	0,219*	-0,004	0,178*
Prooksidativni skor	-0,240*	0,013	-0,041	0,019	0,051
Antioksidativni skor	-0,012	0,130	0,182*	0,087	-0,250**
Oksidativno-stresni skor	-0,212*	-0,023	-0,117	0,018	0,122
Skor inflamacije	-0,030	0,242*	0,070	0,106	-0,222*
DOI skor	-0,131	0,015	-0,008	0,047	-0,016

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

U Tabeli 22 su dati rezultati ispitivanja korelacije između karakteristika LDL čestica i izračunatih skorova rizika (skorova dislipidemije, inflamacije, prooksidativnog, antioksidativnog i oksidativno-stresnog skora i DOI skora). Manja veličina LDL čestica je bila u korelaciji sa višim skorom dislipidemije, kao i sa višim vrednostima prooksidativnog i oksidativno-stresnog skora. Relativni udeo LDL I subfrakcija je pozitivno korelirao sa skorom inflamacije, dok je udeo LDL II subfrakcija pozitivno korelirao sa skorom dislipidemije i sa antioksidativnim skorom. Udeo LDL IV subfrakcija je bio u pozitivnoj korelaciji sa skorom dislipidemije, a u negativnoj korelaciji sa antioksidativnim skorom i skorom inflamacije. DOI skor nije korelirao ni sa jednom od ispitivanih karakteristika LDL čestica.

4.2.8.5. Analiza HDL subfrakcija

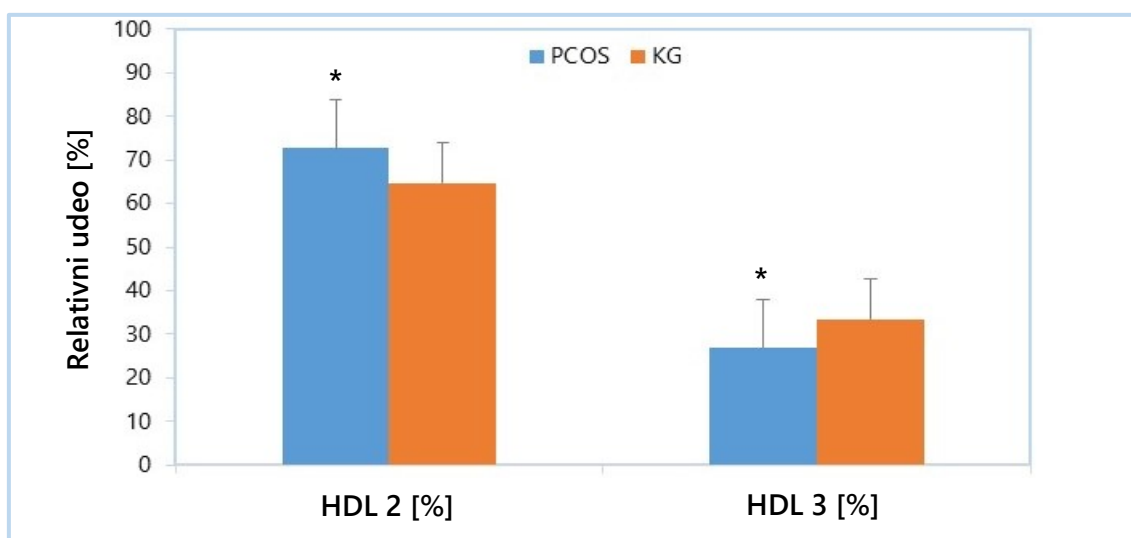
U Tabeli 23 dat je uporedni prikaz veličine i raspodele HDL subfrakcija kod žena sa PCOS i u KG. U poređenju sa KG, žene sa PCOS su imale značajno viši relativni udeo HDL 2b i HDL 2a subfrakcija, a niži udeo HDL 3b i HDL 3c subfrakcija. Dijametri HDL čestica se nisu razlikovali.

Tabela 23. Veličina i raspodela HDL subfrakcija u PCOS i KG

Parametar	PCOS (n=114)	KG (n=23)	P
HDL dijametar, nm	10,44±0,87	10,24±0,99	0,381
HDL 2b, %	51,6±10,0	46,7±11,1	<0,05
HDL 2a, %	21,1±6,2	18,0±3,3	<0,01
HDL 3a, %	12,2±3,8	13,5±3,6	0,127
HDL 3b, %	6,4±3,2	9,1±3,6	<0,001
HDL 3c, %	8,5±4,1	11,0±4,4	<0,05

Rezultati su prikazani kao $\bar{x}\pm SD$. Parametri su poređeni korišćenjem Student t-testa.

Ukupan udeo HDL 2 subfrakcija kod žena sa PCOS je bio značajno veći, a udeo HDL 3 subfrakcija manji, nego kod žena u KG (Slika 40).



Slika 40. Relativni udeli HDL 2 i HDL 3 subfrakcija u PCOS i KG.

* $P < 0,01$ u odnosu na KG

Nakon što smo uradili analizu u odnosu na stepen uhranjenosti žena sa PCOS i korekciju za razlike u godinama starosti između PCOS i KG, razlika u relativnim udelima HDL 2a subfrakcija nije više bila značajna (Tabela 24). Ova analiza je još pokazala da normalno uhranjene žene sa PCOS imaju viši udeo HDL 2b subfrakcija od žena u KG, a da razlika između gojaznih žena i žena u KG nije statistički značajna. Obe grupe žena sa PCOS imale su značajno niži udeo HDL 3b i HDL 3c subfrakcija od žena u KG.

Kada su veličina i relativni udeli HDL subfrakcija analizirani unutar PCOS grupe, Student t-testom utvrđena je značajna razlika između gojaznih i normalno uhranjenih žena sa PCOS. Naime, gojazne žene sa PCOS su imale značajno manje dijemetre HDL čestica ($P < 0,05$) i viši udeo HDL 3b subfrakcija od normalno uhranjenih žena sa PCOS ($P < 0,05$).

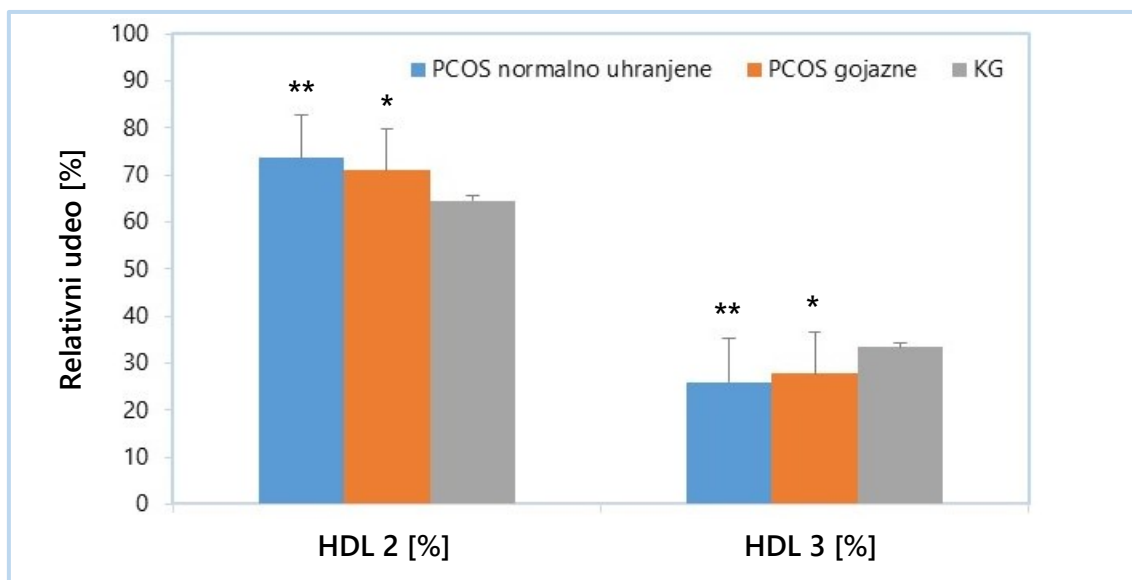
Tabela 24. Veličina i raspodela HDL subfrakcija kod gojaznih i normalno uhranjenih žena sa PCOS i KG

Parametar	PCOS		KG (n=23)	P
	Normalno uhranjene (ITM ≤ 24,9 kg/m ²) (n=55)	Gojazne (ITM ≥ 25,0 kg/m ²) (n=59)		
HDL dijametar, nm	10,62 ± 0,79	10,24 ± 0,91	10,24 ± 0,99	0,05
HDL 2b, %	52,8 ± 10,6 ^a	50,3 ± 9,3	46,7 ± 11,1	<0,05
HDL 2a, %	20,9 ± 7,6	21,4 ± 4,3	18,0 ± 3,3	0,069
HDL 3a, %	11,5 ± 3,3	13,1 ± 4,2	13,5 ± 3,6	<0,05
HDL 3b, %	6,3 ± 3,2 ^{aa}	6,5 ± 3,2 ^{aa}	9,1 ± 3,6	<0,01
HDL 3c, %	8,5 ± 4,6 ^a	8,5 ± 3,6 ^a	11,0 ± 4,4	<0,05

Rezultati su prikazani kao $\bar{x} \pm SD$. Parametri su poređeni ANOVA testom, praćenog post-hoc Tuckey-Snedecor testom.

a,aa – značajna razlika bilo koje grupe od KG
 $P < 0,05$, $P < 0,01$

Na Slici 41 prikazan je ukupan udeo HDL 2 i HDL 3 čestica kod žena sa PCOS u odnosu na stepena uhranjenosti i kod žena u KG. Relativni udeli HDL subfrakcija su se značajno razlikovali između posmatranih grupa. Najviši udeo HDL 2, a najmanji udeo HDL 3 subfrakcija imale su normalno uhranjene žene sa PCOS.



Slika 41. Relativni udeli HDL 2 i HDL 3 subfrakcija kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS i žena u KG

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ u odnosu na KG

Uzeli smo u obzir i stepen uhranjenosti žena u KG i uporedili veličinu i raspodelu HDL subfrakcija (Tabela 25), kao i ukupne udele HDL 2 i HDL 3 čestica između posmatranih grupa (Slika 42). Utvrdili smo da obe grupe žena sa PCOS imaju statistički značajno manji udeo HDL 3b subfrakcija od gojaznih žena u KG (Tabela 25). Iako je ANCOVA test ukazao da postoji razlika u HDL dijametrima i relativnim udelima HDL 3c subfrakcija između grupa, u *post hoc* analizi nisu utvrđene značajne razlike.

Poređenje ukupnih udela HDL 2 i HDL 3 čestica pokazalo je da normalno uhranjene žene sa PCOS imaju značajno veći udeo HDL 2 subfrakcija od normalno uhranjenih i gojaznih žena u KG. Takođe, relativni udeli HDL 3 subfrakcija kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS bili su značajno niži nego kod gojaznih žena u KG.

Tabela 25. Koncentracija i raspodela HDL subfrakcija i vrednosti HDL-H kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS i KG

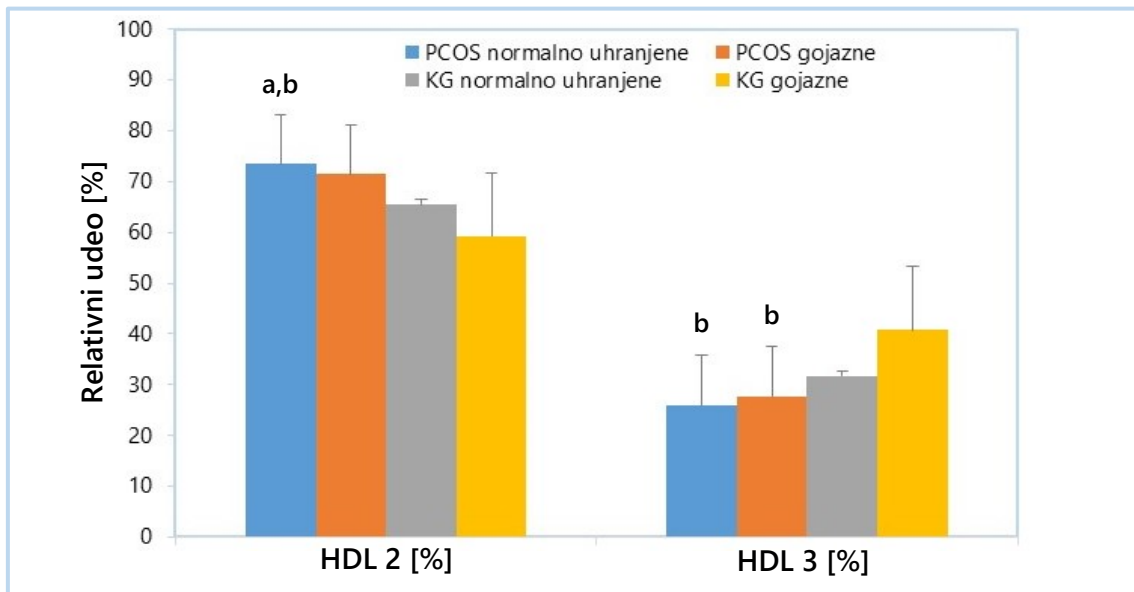
Parametar	PCOS		KG		P
	Normalno uhranjene (ITM≤24,9 kg/m ²) (n=55)	Gojazne (ITM≥25,0 kg/m ²) (n=59)	Normalno uhranjene (ITM≤24,9 kg/m ²) (n=19)	Gojazne (ITM≥25,0 kg/m ²) (n=4)	
HDL-H, mmol/L	1,71±0,47 ^{bbb}	1,24±0,32	1,67±0,35 ^{bbb}	1,42±0,22	<0,001
HDL dijametar, nm	10,62±0,79	10,24±0,91	10,03±0,90	11,37±0,61	<0,01
HDL 2b, %	52,8±10,6	50,3±9,3	47,7±10,8	41,7±13,2	0,066
HDL 2a, %	20,9±7,6	21,4±4,3	18,1±3,4	17,6±2,5	0,124
HDL 3a, %	11,5±3,3	13,1±4,2	13,3±3,2	14,6±5,8	0,058
HDL 3b, %	6,3±3,2 ^{aa}	6,5±3,2 ^{aa}	8,4±3,3	12,6±3,4	<0,001
HDL 3c, %	8,5±4,6	8,5±3,6	10,5±4,3	13,6±4,8	<0,05

Rezultati su prikazani kao $\bar{x} \pm SD$. Parametri su poređeni ANOVA testom, praćenog post-hoc Tuckey-Snedecor testom.

aa – značajna razlika bilo koje grupe sa grupom KG gojazne

bbb – značajna razlika bilo koje grupe sa grupom PCOS gojazne

P<0,01, P<0,001



Slika 42. Relativni udeli HDL 2 i HDL 3 subfrakcija kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS i u KG.

a – razlika sa KG normalno uhranjene; *b* – razlika sa KG gojazne.
 $P < 0,05$

4.2.8.6. Ispitivanje korelacija veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima i parametrima oksidativnog stresa

Vrednosti Pearsonovih koeficijenata korelacije između veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima u PCOS grupi prikazane su u Tabelama 26 i 27. Veličina HDL čestica bila je u negativnoj korelaciji sa ITM i odnosom struk/kuk. Veći dijametri HDL čestica bili su u korelaciji sa višom koncentracijom HDL-H (Tabela 26).

Tabela 26. Korelacije veličine HDL čestica sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima u grupi sa PCOS

Parametar	HDL dijametar, nm
ITM, kg/m ²	-0,201*
Odnos struk/kuk	-0,234*
HDL-H, mmol/L	0,206*

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

* $P < 0,05$

Koncentracija HDL-H je bila u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 2b, a u negativnoj korelaciji sa udelima HDL 3a i HDL 3b subfrakcija. Relativni udeo HDL 3a čestica je pozitivno korelirao sa koncentracijom TG. Udeo HDL 2a subfrakcija bio je u pozitivnoj korelaciji sa ITM (Tabela 27).

Tabela 27. Korelacije HDL subfrakcija sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima u grupi sa PCOS

Parametar	HDL 2b, %	HDL 2a, %	HDL 3a, %	HDL 3b, %	HDL 3c, %
ITM, kg/m ²	-0,175	0,187*	0,179	0,097	0,066
HDL-H, mmol/L	0,303**	-0,147	-0,381***	-0,213*	-0,106
TG, mmol/L	-0,133	0,082	0,208*	0,093	0,021

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Rezultati korelacione analize između relativnih udela HDL subfrakcija sa parametrima OS i antioksidativne zaštite u PCOS su prikazani u Tabeli 28. Utvrdili smo da je PAB u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom HDL 2b, a u negativnoj korelaciji sa udelom HDL 2a subfrakcija. Aktivnost SOD je pozitivno korelirala sa udelom HDL 3b čestica, a koncentracija MDA sa relativnim udelom HDL 3a subfrakcija.

Tabela 28. Korelacije HDL subfrakcijama sa parametrima oksidativnog stresa u grupi sa PCOS

Parametar	HDL 2b, %	HDL 2a, %	HDL 3a, %	HDL 3b, %	HDL 3c, %
SOD, U/L	-0,090	-0,160	0,055	0,187*	0,166
PAB, U/L	0,201*	-0,369***	-0,169	0,026	-0,006
MDA, μ mol/L	-0,087	-0,160	0,225*	0,023	0,074

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$

4.2.8.7. Ispitivanje korelacije veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija sa ICO i indeksima NAFLD

Dijametri HDL čestica su bili u značajnoj negativnoj korelaciji sa LAP i HIS indeksima NAFLD kao i ICO (Tabela 29). Pored toga, utvrdili smo i značajnu pozitivnu korelaciju između relativnog udela HDL 3a subfrakcija i ICO ($r = 0,184$; $P < 0,05$), odnosno LAP indeksa ($r = 0,228$; $P < 0,05$).

Tabela 29. Korelacije veličine HDL čestica sa indeksima NAFLD i ICO u PCOS grupi

Parametar	HDL dijametar, nm
ICO	-0,210*
LAP	-0,212*
HIS	-0,210*

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

** $P < 0,05$*

4.2.8.8. Ispitivanje korelacije veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija sa skorovima za procenu kardiovaskularnog rizika

Zatim smo ispitivali da li veličina i relativni udeli HDL subfrakcija kod žena sa PCOS koreliraju sa skorovima za procenu kardiovaskularnog rizika. Najpre smo analizirali povezanost sa KVRS i utvrdili da su dijametri HDL čestica i relativni udeli HDL 2b subfrakcija u negativnoj, a da je udeo HDL 3a čestica u pozitivnoj korelaciji sa KVRS (Tabela 30).

Tabela 30. Korelacije veličine i relativnih udela HDL subfrakcija i KVRS u grupi sa PCOS

Parametar	KVRS
HDL dijametar, nm	-0,248**
HDL 2b, %	-0,190*
HDL 2a, %	0,162
HDL 3a, %	0,190*
HDL 3b, %	0,100
HDL 3c, %	0,076

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

Ispitivane karakteristike HDL čestica bile su značajno povezane sa vrednostima skora dislipidemije. Naime, HDL dijametri ($r = -0,201$; $P < 0,05$) i relativni udeli HDL 2b ($r = -0,265$; $P < 0,01$) subfrakcija su bili u negativnoj, a udeli HDL 3a ($r = 0,344$; $P < 0,001$) i HDL 3b ($r = 0,193$; $P < 0,05$) subfrakcija u pozitivnoj korelaciji sa skorom dislipidemije. Veličina i relativni udeli HDL subfrakcija nisu korelirali sa prooksidativnim, antioksidativnim, niti sa oksidativno-stresnim skorom. Takođe, nisu dokazane značajne korelacije između karakteristika HDL čestica sa skorom inflamacije. Relativni udeo HDL 3a subfrakcija je pozitivno korelirao sa DOI skorom ($r = 0,228$; $P < 0,05$).

4.2.8.9. Analiza raspodele aktivnosti enzima PON1 na HDL subfrakcijama

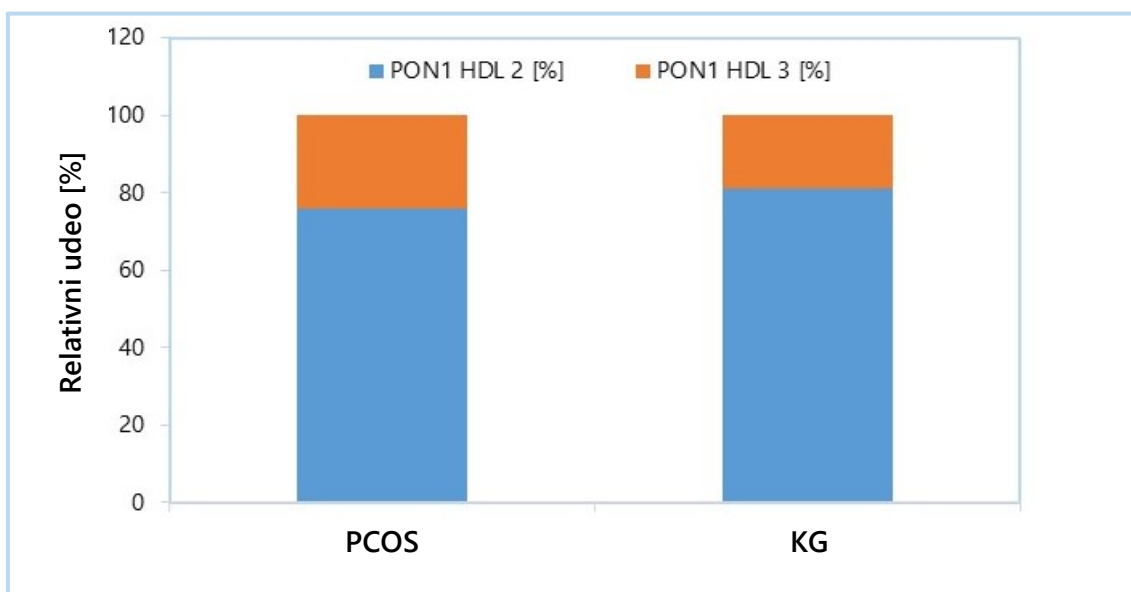
Jedan od ciljeva ove disertacije bio je i ispitivanje raspodele aktivnosti enzima PON1 na HDL subfrakcijama u PCOS. S obzirom na specifičnost primenjene metodologije, kao i osetljivost enzima PON1 na uslove u kojima se reakcija odvijala, uspešnu detekciju PON1 na gelu postigli smo u 106 uzoraka (101 uzorak žena sa PCOS i 5 uzoraka žena u KG).

Uporedna analiza distribucije PON1 na HDL subfrakcijama kod žena sa PCOS i u KG je prikazana u Tabeli 31. Iako se može uočiti tendencija da žene u KG imaju veći udeo PON1 na HDL 2b i HDL 2a česticama, razlike nisu bile statistički značajne, što je najverovatnije posledica malog broja zdravih žena u KG. Ovaj trend se još bolje uočava poređenjem ukupne zastupljenost PON1 na većim (HDL 2) i manjim (HDL 3) subfrakcijama između ispitivanih grupa, mada bez statistički značajne razlike (Slika 43). Ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama u grupi sa PCOS iznosio je $75,8 \pm 10,7\%$, dok je udeo u KG bio $80,6 \pm 5,6\%$. U skladu sa tim, ukupan udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama kod žena sa PCOS bio je $24,2 \pm 10,7\%$, a kod žena u KG $19,4 \pm 5,6\%$ ($P=0,324$).

Tabela 31. Raspodela PON 1 na HDL subfrakcijama u PCOS i KG

Parametar	PCOS	KG	P
n	101	5	/
PON1 HDL 2b, %	$51,6 \pm 10,7$	$54,0 \pm 7,0$	0,625
PON1 HDL 2a, %	$24,1 \pm 5,7$	$26,6 \pm 2,8$	0,348
PON1 HDL 3a, %	$11,8 \pm 5,1$	$10,3 \pm 1,6$	0,518
PON1 HDL 3b, %	$6,4 \pm 3,2$	$4,9 \pm 1,7$	0,324
PON1 HDL 3c, %	$6,1 \pm 5,0$	$4,2 \pm 2,5$	0,412

Rezultati su prikazani kao $\bar{x} \pm SD$. Parametri su poređeni korišćenjem Student t-testa.



Slika 43. Relativni udeli aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama u PCOS i u KG. Na slici su prikazane srednje vrednosti u obe grupe.

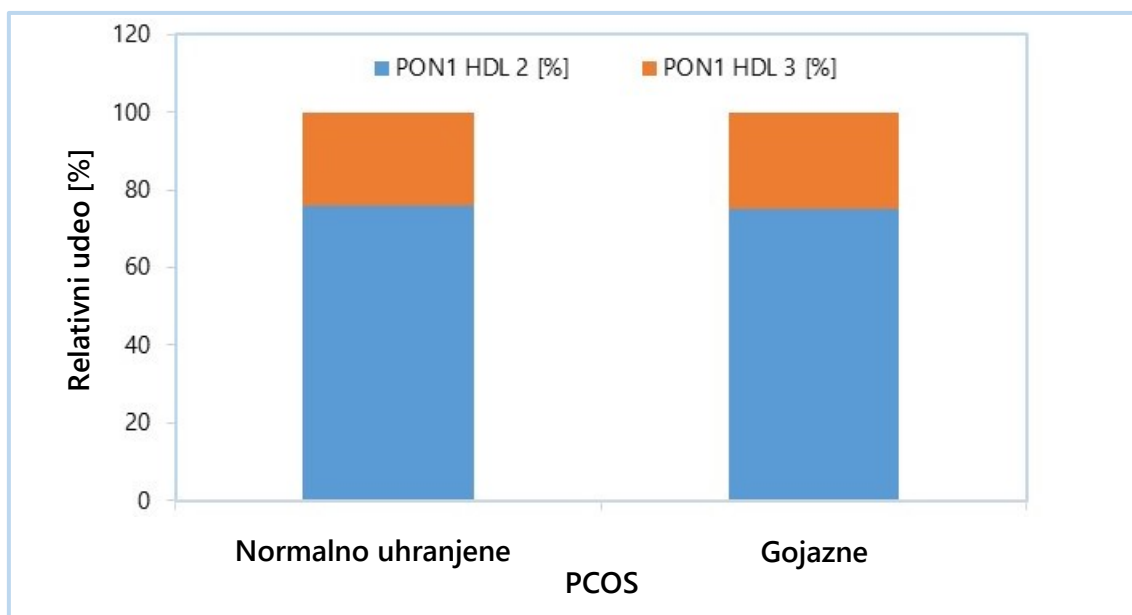
U PCOS grupi nije bilo značajnih razlika u ukupnoj aktivnosti i distribuciji PON1 na HDL subfrakcijama između normalno uhranjenih i gojaznih žena (Tabela 32).

Tabela 32. Aktivnost i raspodela PON1 na HDL subfrakcijama kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS

Parametar	PCOS		P
	Normalno uhranjene (ITM ≤ 24,9 kg/m ²) (n=53)	Gojazne (ITM ≥ 25,0 kg/m ²) (n=48)	
PON1, U/L	231 (145–527)	231 (176–472)	0,923
PON1 HDL 2b,%	51,8±11,4	51,4±10,0	0,837
PON1 HDL 2a,%	24,0±5,0	24,3±6,4	0,844
PON1 HDL 3a,%	11,8±5,8	11,8±4,3	0,949
PON1 HDL 3b,%	6,1±3,4	6,7±3,0	0,361
PON1 HDL 3c,%	6,2±4,9	5,9±5,1	0,765

Rezultati su prikazani kao $\bar{x} \pm SD$. Parametri su poređeni korišćenjem Student t-testa. Aktivnost PON1 prikazana je kao medijana i interkvartilni raspon (25–75 percentila) i poređena korišćenjem Mann-Whitney U testa.

Na Slici 44 prikazani su prosečni udeli aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS. Nismo utvrdili značajne razlike u udelu PON1 na HDL 2 (normalno uhranjene žene: 75,9±11,4% vs. gojazne žene: 75,6±10,1%), te tako ni u udelu PON1 na HDL 3 subfrakcijama (normalno uhranjene žene: 24,1±11,3% vs. gojazne žene: 24,4±10,1%; P=0,920) između posmatranih grupa.



Slika 44. Relativni udeli aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS. Na slici su prikazane srednje vrednosti u obe grupe

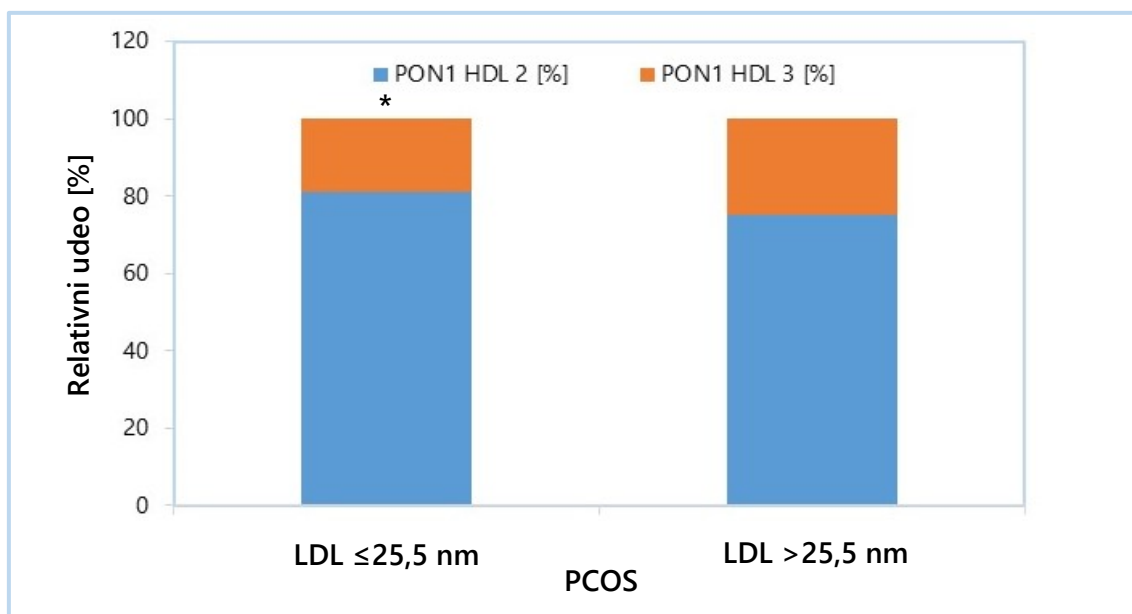
Imajući u vidu da PON1 štiti LDL čestice od oksidacije, kao i činjenicu da su LDL čestice manjeg dijametra podložnije oksidativnoj modifikaciji, u nastavku smo uporedili ukupnu aktivnost i distribuciju PON1 na HDL subfrakcijama kod žena sa PCOS, u zavisnosti od toga da li imaju dominantno male (LDL dijametar $\leq 25,5$ nm), odnosno velike LDL čestice (LDL dijametar $> 25,5$ nm). Rezultati su prikazani u Tabeli 33.

Tabela 33. Raspodela aktivnosti i udela PON1 na HDL subfrakcijama kod žena sa PCOS u zavisnosti od veličine LDL čestica

Parametar	PCOS		P
	LDL dijametar ≤25,5 nm (n=86)	LDL dijametar >25,5 nm (n=15)	
PON1, U/L	313 (216–586)	233 (165–527)	0,279
PON1 HDL 2b,%	56,2±11,4	50,9±2,4	<0,001
PON1 HDL 2a,%	24,9±4,3	24,0±5,9	0,565
PON1 HDL 3a,%	10,6±2,9	12,0±5,4	0,357
PON1 HDL 3b,%	4,6±2,8	6,6±3,2	<0,05
PON1 HDL 3c,%	3,7±2,5	6,5±5,2	<0,01

Rezultati su prikazani kao $\bar{x}\pm SD$. Parametri su poređeni korišćenjem Student t-testa. Aktivnost PON1 prikazana je kao medijana i interkvartilni raspon (25–75 percentila) i poređena korišćenjem Mann-Whitney U testa

Utvdili smo da je aktivnost PON1 na HDL 2b subfrakcijama značajno viša kod žena sa PCOS koje imaju LDL čestice manjeg dijametra. Takođe, aktivnost PON1 na HDL 3b i HDL 3c subfrakcijama je bila značajno niža kod žena sa malim gustim LDL česticama, nego kod žena čije su LDL čestice većeg dijametra. Ukupna aktivnost PON1 se nije statistički razlikovala kod žena sa PCOS u zavisnosti od veličine LDL čestica (Tabela 33).



Slika 45. Relativni udeli aktivnosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama kod žena sa PCOS, u zavisnosti od veličine LDL čestica. Na slici su prikazane srednje vrednosti u obe grupe.

* $P < 0,05$

Ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama kod žena sa PCOS i malim LDL česticama ($81,1 \pm 5,8\%$) bio je značajno viši nego kod žena sa većim LDL česticama ($74,9 \pm 11,1\%$; $P < 0,05$). Sledstveno, ukupan udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama kod žena sa PCOS i malim LDL česticama ($18,9 \pm 5,8\%$) bio je značajno niži nego kod žena koje imaju LDL čestice većeg dijametra ($25,1 \pm 11,1\%$). Rezultati su prikazani na Slici 45.

4.2.8.10. Ispitivanje korelacije raspodele udela enzima PON1 na HDL subfrakcijama sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima, indeksima NAFLD i kardiovaskularnim skorom rizika

U ispitivanoj PCOS grupi relativni udeli PON1 na HDL subfrakcijama nisu korelirali ni sa jednim antropometrijskim ili biohemijskim parametrom, niti sa NAFLD indeksima i ICO. U skladu sa prethodnim nalazima, nismo utvrdili značajnu povezanost distribucije PON1 na HDL subfrakcijama sa KVRŠ.

4.2.8.11. Ispitivanje korelacije udela enzima PON1 na HDL subfrakcijama sa parametrima oksidativnog stresa

Rezultati korelacione analize između udela PON1 na HDL subfrakcijama i markera OS kod žena sa PCOS su prikazani u Tabeli 34. Aktivnost PON1 u serumu bila je u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelima PON1 na HDL 2b i HDL 2a česticama, a u negativnoj korelaciji sa relativnim udelima na HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c subfrakcijama. Relativni udeo PON1 na HDL 2a česticama bio je u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom ukupnih SH-grupa, dok je udeo PON1 na HDL 3b česticama pozitivno korelirao sa TAS i TOS, a negativno sa PAB. Udeo PON1 na HDL 3c subfrakcijama bio je u pozitivnoj korelaciji sa TOS.

Tabela 34. Korelacije između PON1 na HDL subfrakcijama i parametra OS u PCOS grupi

Parametar	PON1				
	HDL 2b, %	HDL 2a, %	HDL 3a, %	HDL 3b, %	HDL 3c, %
PON1, U/L	0,204*	0,335**	-0,312**	-0,332**	-0,194
SH-grupe, mmol/L	-0,024	0,233*	0,083	-0,103	0,012
TAS, mmol/L	-0,035	0,033	-0,032	0,226*	-0,107
PAB, U/L	0,077	-0,032	-0,007	-0,296**	0,112
TOS, μ mol/L	-0,141	-0,107	0,070	0,207*	0,207*

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

4.2.8.12. Ispitivanje korelacije raspodele udela enzima PON1 na HDL subfrakcijama sa izračunatim skorovima rizika

Na kraju smo analizirali povezanost distribucije PON1 na HDL subfrakcijama sa izračunatim skorovima rizika kod žena sa PCOS (Tabela 35). Ova analiza je pokazala da je antioksidativni skor u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom PON1 na HDL 2a česticama, a u negativnoj korelaciji sa udelom PON1 na HDL 3c česticama. Pored toga, utvrdili smo da su vrednosti oksidativno-stresnog skora u pozitivnoj korelaciji sa udelom PON1 na HDL 3c subfrakcijama.

Tabela 35. Korelacije PON1 na HDL subfrakcijama sa izračunatim skorovima rizika u PCOS grupi

Parametar	PON1				
	HDL 2b, %	HDL 2a, %	HDL 3a, %	HDL 3b, %	HDL 3c, %
Skor dislipidemije	-0,116	0,060	0,148	0,055	0,010
Prooksidativni skor	-0,126	-0,022	0,107	0,022	0,183
Antioksidativni skor	0,067	0,325 **	-0,140	-0,115	-0,179*
Oksidativno-stresni skor	-0,113	-0,083	0,088	0,023	0,191*
Skor inflamacije	-0,012	0,047	0,003	0,009	0,003
DOI skor	-0,138	-0,023	0,068	0,023	0,132

Prikazani su rezultati Pearsonove korelacione analize.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

Ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama je bio u pozitivnoj korelaciji ($r = 0,228$; $P < 0,05$), odnosno ukupna zastupljenost PON1 na HDL 3 subfrakcijama je bila u negativnoj korelaciji sa antioksidativnim skorom ($r = -0,228$; $P < 0,05$).

5. DISKUSIJA

U ovom istraživanju analiziran je uticaj OS i inflamacije na aktivnost enzima PON1 i njegovu distribuciju na lipoproteinima visoke gustine kod žena sa PCOS, odnosno njihov efekat na kardiovaskularni rizik. Takođe, u ovom istraživanju procenjivan je rizik za razvoj KVB kod žena sa PCOS primenom skora rizika za KVB kod osoba mlađih od 40 godina i ispitan je kombinovani uticaj različitih faktora rizika koji postoje u ovom sindromu na nivo kardiovaskularnog rizika i pojavu KVB kasnije u toku života.

5.1. Procena kardiovaskularnog rizika u PCOS

Kardiovaskularne bolesti su najčešći uzrok smrtnosti u svetu na šta ukazuju alarmantni podaci WHO iz 2012. godine po kojima je 31% smrtnih slučajeva u svetu posledica ovih bolesti (60). U Srbiji je taj procenat i veći prema podacima iz 2014. godine i iznosi 53,3% (61). Međusobna povezanost faktora rizika za KVB, poput abdominalne gojaznosti, dislipidemije, IGT, T2DM, OS, inflamacije i hipertenzije, sa znacima PCOS je dokazana u brojnim studijama (62). Još uvek nije definisan specifičan model za procenu rizika za razvoj KVB u kasnijem životnom dobu za žene mlađe od 40 godina sa dijagnozom PCOS. Neke studije su pokušale da rizik procene primenom Framingamskog skora rizika, ali rizik nije bio povišen (<10% verovatnoće za pojavu koronarne srčane bolesti se smatra niskim rizikom) i nije se razlikovao između PCOS i KG (64). McMahan sa saradnicima je definisao proračun za procenu skora rizika za osobe mlađe od 40 godina, KQRS, koji koristi tradicionalne faktore rizika (starost, hipertenzija, dijabetes, nizak HDL-H, visok non-HDL-H, gojaznost, pušenje) u cilju procene verovatnoće za prisustvo značajne aterosklerotske lezije na koronarnim arterijama, čime se predviđa rizik za pojavu koronarne srčane bolesti kasnije u toku života (65).

Da bismo procenili rizik za razvoj KVB kod žena sa PCOS, prvo smo uporedili vrednosti određivanih parametara kako bismo uočili one sa značajnom razlikom između ispitivanih podgrupa. Naši rezultati su pokazali da gojazne žene imaju više vrednosti antropometrijskih parametara i markera inflamacije (fibrinogen, brzina sedimentacije eritrocita). U Tabeli 6 se vidi da je koncentracija fibrinogena i brzina sedimentacije eritrocita najviša kod gojaznih žena sa PCOS, ali se te više vrednosti uočavaju i kod gojaznih žena iz KG. Iako su koncentracije fibrinogena bile u granicama dozvoljenih vrednosti kod svih ispitanica, postojanje trenda viših vrednosti kod ispitanica sa većim ITM potvrđuje da je gojaznosti praćena niskostepenom inflamacijom. Fibrinogen je

pozitivan reaktant akutne faze i predstavlja nezavisan faktor rizika za KVB (173). Studija Ji i sar. (174) je pokazala da se fibrinogen može koristiti kao dijagnostički biomarker za ranu fazu PCOS, naročito kod mlađih žena sa viškom kilograma. Međutim, druge studije nisu uočile razliku u koncentracijama fibrinogena između normalno uhranjenih žena sa PCOS i normalno uhranjene KG žena iste starosti (175). Naši rezultati su takođe pokazali da se vrednosti parametara inflamacije statistički ne razlikuju između grupa slične telesne težine. Parametri lipidnog statusa su pokazali značajne razlike između gojaznih i normalno uhranjenih ispitanica obe podgrupe, tj. gojazne ispitanice imale su snižene koncentracije HDL-H i povišene koncentracije triglicerida u odnosu na normalno uhranjene ispitanice. U skladu sa tim, gojazne ispitanice su imale i više vrednosti aterogenog indeks (TG/HDL-H). Koncentracija non-HDL-H bila je najviša kod gojaznih žena sa PCOS. Hipertrigliceridemija i niske koncentracije HDL-H su osnovne karakteristike aterogene dislipidemije koja se najčešće javlja kod gojaznih žena sa PCOS (11) što smo potvrdili većom prevalencom dislipidemije kod žena iz ove podgrupe u odnosu na normalno uhranjene žene sa PCOS (90,6% vs. 31,8%).

Osim toga, uočili smo da postoji značajna razlika u nivoima hormona između zdravih žena i žena sa PCOS. Kao što je očekivano, žene sa PCOS su imale značajno više koncentracije androgena (testosteron, androstenedion) i FAI, i značajno niže koncentracije SHBG u odnosu na KG (176). Takođe, vrednosti LH i LH/FSH odnosa su bile značajno više u obe PCOS podgrupe u poređenju sa kontrolnim podgrupama (Tabela 7). U PCOS, sekrecija LH je favorizovana u odnosu na sekreciju FSH što je posledica konstantno povećane frekvence pulsne sekrecije GnRH, i ovaj poremećaj sekrecije gonadotropina, odnosno inverzni odnos FSH i LH, se može videti kod 75% žena sa ovim sindromom (38).

Za procenu rizika za razvoj KVB koristili smo modifikovan KQRS (Tabela 2) (65) zato što je klasična procena rizika za koronarnu srčanu bolest uobičajena praksa kod ciljane, odrasle populacije, a dokazi za uspešnu primenu klasičnih skorova rizika kod mladih osoba nisu dostupni, osim za one sa familijarnom hiperholesterolemijom (177). Maksimalni mogući zbir poena za žene prema ovom proračunu iznosio je 33 poena, dok je maksimalan broj poena kod naših ispitanica iznosio 24. Vrednosti KQRS veće od 17 poena ukazuju da postoji 20% verovatnoće za nastanak klinički značajnih lezija na levoj prednjoj silaznoj arteriji i desnoj koronarnoj arteriji. Klinički značajne lezije na levoj koronarnoj arteriji su lezije četvrtog i petog stepena prema kriterijumima Američkog

udruženja za srce (eng. *American Heart Association*, AHA) (65, 178). Nakon računanja KQRS i utvrđivanja činjenice da nema značajne razlike u skorima rizika između obe podgrupe gojaznih ispitanica (PCOS i KG), dok je značajna razlika bila prisutna između gojazne PCOS podgrupe i normalno uhranjenih podgrupa ispitanica (PCOS i KG) (Slika 12), postavlja se pitanje koliki uticaj na kardiovaskularni rizik ima sam PCOS, a koliki uticaj zapravo potiče samo od gojaznosti. Ciljne lezije na desnoj koronarnoj arteriji su one koje pokrivaju 9% ili više intime zida krvnog suda (65). Orio i sar. (179) su primetili da mlade žene sa PCOS imaju povećanu masu leve komore i dijastolnu disfunkciju što nije povezano sa telesnom težinom, i na osnovu toga ukazali da su žene sa PCOS kandidati za rani razvoj KVB. Kada se kao kriterijumi za procenu kardiovaskularnog rizika kod žena sa PCOS koriste bilo koji biohemijski parametri kojima se procenjuje rizik od aterotromboze ili vaskularne inflamacije, u poređenju sa, po težini i godinama odgovarajućom KG, studija Bickerton i sar. (180) nije pronašla značajne razlike. Elting i sar. su pokazali da je viša prevalenca hipertenzije povezana sa gojaznošću (181), dok su Chen i sar. pokazali da je hiperandrogenemija čak i kod mladih žena sa PCOS udružena sa hipertenzijom nezavisno od IR, ITM i dislipidemije (182). Uzimajući u obzir rezultate prethodno objavljenih studija, u ovom delu naše studije smo ispitali uticaj pojedinačnih faktora (antropometrijskih i biohemijskih koji nisu ulazili u proračun KQRS) na vrednost KQRS u obe podgrupe žena sa PCOS, kao i raspodelu faktora po tercilima KQRS, odnosno njihov uticaj na povećanje rizika za KVB (Tabela 8).

Utvrđili smo da su žene sa PCOS sa visokim vrednostima KQRS (treći tercil) imale najviše vrednosti obima struka, obima leve nadlaktice i odnosa struk/kuk što predstavlja najviši rizik za KVB povezan sa gojaznošću. Prema najnovijim smernicama, povećan kardiovaskularni rizik postoji kod žena sa PCOS koje imaju bilo koji od sledećih faktora rizika: gojaznost, dislipidemiju, pušenje, hipertenziju, IGT i porodičnu istoriju ranih KVB (183). Dodatno, utvrđili smo da je kod žena sa PCOS sa visokim KQRS dislipidemija, dijagnostikovana prema kriterijumima NCEP ATP III ($TG \geq 1,7$ mmol/L; $HDL-H < 1,29$ mmol/L; $LDL-H \geq 3,4$ mmol/L) (149), prisutna u najvećem procentu. Dislipidemija je najčešća kardiometabolička komplikacija u PCOS. Javlja se kod oko 70% PCOS žena koje imaju granične ili povišene vrednosti lipida, a najčešće se manifestuje u formi aterogene dislipidemije (hipetrigliceridemija i niska koncentracija HDL-H) (9, 11).

Radi utvrđivanja mogućeg uticaja hormonskog statusa u PCOS na nivo KQRS kod svih žena sa PCOS, gojaznih ili normalno uhranjenih, sprovedena je višestruka linearna

regresiona analiza (Tabela 9). Negativna korelacija estradiola ($p < 0,05$) sa KVRS kod normalno uhranjenih žena sa PCOS potvrdila je da i u ovoj PCOS podgrupi estrogen verovatno ispoljava protektivan efekat na kardiovaskularni sistem (184, 185). FSH je pokazao pozitivnu korelaciju sa KVRS kod svih žena sa PCOS, kao i kod gojaznih žena kada se izdvojeno posmatraju. Kod premenopauzalnih žena, povećanje koncentracije FSH iznad 7 IU/L je povezano sa značajnim povećanjem nivoa ukupnog holesterola i LDL-H i time povećanim kardiovaskularnim rizikom (186). Hiperandrogenemija je prisutna kod žena sa PCOS, ali je povezanost DHEAS i kardiovaskularnog rizika u PCOS diskutabilna. Goodarzi i sar. (187) su zaključili da povišeni nivoi DHEAS izgleda imaju protektivni uticaj na kardiovaskularni sistem, odnosno smanjuju kardiovaskularni rizik kod žena sa PCOS, iako je uloga DHEAS u moduliranju ovog rizika i dalje nepoznata. Dodatno, Carmina i Lobo su utvrdili da su žene sa PCOS sa povišenim vrednostima DHEAS uglavnom imale povoljnije metaboličke i kardiovaskularne parametre (188). U ovom delu studije potvrdili smo postojanje negativne korelacije između KVRS i DHEAS kod svih žena sa PCOS, dok je kod normalno uhranjenih žena sa PCOS ipak postojala pozitivna korelacija DHEAS i KVRS. Sa druge strane, Schaffrath i sar. (189), iako se primarno nisu bavili PCOS, nisu dokazali povezanost koncentracije polnih hormona

i kardiovaskularnih bolesti koristeći multivarijantnu analizu. U istoj studiji se, takođe navodi da se, u studijama koje su se bavile PCOS kao primarnim problemom, SHBG i DHEAS izdvajaju, jer su inverzno povezani sa subkličičkim KVB, ali su ta istraživanja bila ograničena primenom studije poprečnog preseka ili samo malim brojem žena koje su bile uključene u studiju (189). Nasuprot tome, naša studija je pokazala pozitivnu korelaciju koncentracije SHBG i KVRS kod svih žena sa PCOS, što se ne može objasniti pretragom dostupne literature.

5.1.1. NAFLD i uticaj na kardiovaskularni rizik

NAFLD i abdominalna gojaznost zajedno predstavljaju faktore rizika za razvoj KVB (137). U patogenezi NAFLD učestvuju različiti faktori, ali izgleda da gojaznost i IR predstavljaju ključne faktore koji doprinose njenom nastanku (190). Delimično zahvaljujući tome, pacijenti sa NAFLD imaju visok rizik za razvoj i T2DM i KVB (191). S obzirom na zajedničke mehanizme koji podstiču razvoj kardiometaboličkih komplikacija i u PCOS i kod žena sa NAFLD, kao i veću prevalencu NAFLD kod žena sa PCOS, razjašnjenje njihovog odnosa je klinički veoma važno jer su oba poremećaja česta i njihova koegzistencija može povećati rizik i za T2DM i za KVB (192). Zbog toga smo u ovom delu studije pokušali da procenimo dodatni kardiovaskularni rizik koji potiče od prisustva NAFLD u ovom sindromu korišćenjem nekoliko NAFLD indeksa kao i ICO (Tabela 3).

Uključivanjem NAFLD indeksa u studiju i njihovim povezivanjem sa KQRS, uočili smo izdvajanje LAP indeksa kao pouzdanijeg parametra za procenu većeg rizika za KVB. Ovaj zaključak nije iznenađujući, s obzirom na to da se LAP indeks pokazao boljim od ITM za identifikaciju rizika za razvoj KVB (193). LAP indeks se bazira na određivanju obima struka, markera abdominalne gojaznosti i serumske koncentracije TG, markera sadržaja cirkulišućih lipoproteina te odražava povećanu akumulaciju lipida oko unutrašnjih organa kod odraslih osoba. Stoga, LAP indeks odražava kontinuirani metabolički i kardiovaskularni rizik. Gojazne žene sa PCOS imale su više vrednosti LAP indeksa u odnosu na gojazne žene u KG (Slika 14). Značajno povećanje vrednosti LAP indeksa kod žena sa PCOS ukazuje na postojanje metaboličkih poremećaja u ovom sindromu (194). Štaviše, mnoge studije su potvrdile da više vrednosti LAP ukazuju na prisustvo IR, metaboličkog sindroma i IGT kod žena sa PCOS (194-196). Stoga, LAP predstavlja jednostavan, integrisani marker kardiovaskularnog i metaboličkog rizika u PCOS.

Antropometrijski parametar – ICO, kojim se utvrđuje prisustvo abdominalne gojaznosti, je bio značajno viši kod gojaznih žena sa PCOS u odnosu na sve ostale studijske podgrupe (Slika 15). Takođe, odnos struk/kuk kod normalno uhranjenih žena sa PCOS je bio značajno viši u odnosu na normalno uhranjenu kontrolnu podgrupu žena iako se njihovi ITM nisu značajno razlikovali (Tabela 5). Carmina i sar. u svom radu su istakli da žene sa PCOS imaju više abdominalnog masnog tkiva iako pokazuju slične količine ukupne masti kada se porede sa KG nakon podešavanja telesne težine (197).

Masno tkivo u zidu abdomena i visceralno masno tkivo su metabolički aktivna tkiva, osetljivija na dejstvo kateholamina u poređenju sa insulinom. Abdominalna gojaznost je povezana sa IR, netolerancijom na glukozu, dijabetesom, povećanom produkcijom androgena i smanjenom sintezom SHBG. Pokazano je da, u globalu, postoji korelacija povećanog sadržaja abdominalnog/visceralnog masnog tkiva sa kardiometaboličkim faktorima rizika poput IR, dislipidemije, hipertenzije i metaboličkog sindroma (197). Ovu vezu sa rizikom za KVB potvrdila je pozitivna korelacija ICO i KVRS (Slika 19). Štaviše, ICO i NAFLD indeksi su pokazali dobru dijagnostičku tačnost u izdvajanju žena sa PCOS sa povećanim kardiovaskularnim rizikom (Slika 21, Tabela 10). Abdominalna gojaznost je specifičniji kardiovaskularni faktor rizika za PCOS od gojaznosti koja nije tog tipa. S obzirom na to da je jasna veza između ICO i KVRS, može se zaključiti da ICO povezuje PCOS i kardiovaskularni rizik.

Indeksi APRI i HIS su se pokazali kao dobri prediktori opšteg kardiovaskularnog rizika, naročito u kombinaciji sa LAP indeksom i ICO (Slike 21 i 22, Tabele 10 i 11). Za izračunavanje ovih indeksa koristili smo vrednosti aminotransferaza, sa najvišom aktivnošću ALT kod gojaznih žena sa PCOS (Tabela 6), odnosno najvišom aktivnošću AST u trećem tercilu skora kardiovaskularnog rizika (Tabela 8). APRI indeks je direktno proporcionalan koncentraciji AST što ukazuje da je i AST posredno povezan sa rizikom za KVB. Nekoliko studija se bavilo procenjivanjem sposobnosti aminotransferaza da predvide kardiovaskularni rizik. Monami i sar. su pokazali da postoji korelacija povišenih koncentracija AST sa povišenim rizikom za KVB (198). Ovo ukazuje da pomenute parametre treba pratiti, jer je PCOS kompleksan poremećaj sa značajnim metaboličkim promenama koje mogu voditi daljem oštećenju kardiovaskularnog sistema koje nije primarno uzrokovano samim sindromom.

Prvi deo studije, čiji je predmet bila veza PCOS i kardiovaskularnog rizika, nije pokazao da prisustvo samog PCOS doprinosi većem riziku za razvoj KVB od gojaznosti, ali jeste dokazao uticaj određenih faktora (antropometrijski parametri – obim struka, odnos struk/kuk, ICO, lipidni parametri, NAFLD indeksi) na povećanje kardiovaskularnog rizika kod žena sa PCOS. Štaviše, za procenu kardiovaskularnog rizika u PCOS predložena je kombinacija određivanja NAFLD indeksa i ICO.

5.2. Procena dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije i aktivnosti enzima PON1

Dislipidemija, povećan OS i hronična inflamacija su ključni kardiometabolički faktori rizika u PCOS koji, putem složenih mehanizama pomenutih u uvodu, mogu dovesti do oštećenja u regulaciji funkcije teka ćelija jajnika i endotelne disfunkcije što dovodi do hiperandrogenizma, anovulacije i rane ateroskleroze (11). U ovom drugom delu studije, korišćenjem specifičnih biohemijskih indeksa, prvo smo ispitivali sposobnost dislipidemije, OS, odnosno aktivnosti PON1, i inflamacije, izražene kao DOI skor da razlikuje žene sa PCOS sklone razvoju kardiometaboličkih komplikacija od zdravih žena.

Kao što je već pomenuto, dislipidemija udružena sa IR je najčešći metabolički poremećaj kod žena sa PCOS, iako se stepen i vrsta dislipidemije razlikuju među njima (11). Odlikuju je znatno snižene koncentracije HDL-H, lipoproteina koji je izdvojen kao najjači metabolički prediktor koronarne srčane bolesti (199) i hipertrigliceridemija, koja je prisutna i u mlađoj i u starijoj starosnoj grupi (200, 201). Međutim, pojedini istraživači nisu potvrdili postojanje razlike u nivoima cirkulišućih lipida kod žena sa PCOS u poređenju sa, po težini, odgovarajućom KG (202).

U našem istraživanju, žene sa PCOS su imale niže vrednosti koncentracije HDL-H u odnosu na KG, ali su te vrednosti ipak bile u granicama preporučenih vrednosti prema NCEP ATP III (149), bez značajnih razlika u vrednostima koncentracije TG, non-HDL-H i vrednosti aterogenog indeksa (TG/HDL-H) (Tabela 12). Osim toga, koncentracije ukupnog holesterola i LDL-H nisu bile povišene kod žena sa PCOS (Tabela 12). Postoje velike razlike između studija u pogledu koncentracija LDL-H kod žena sa PCOS. Nekoliko studija je pokazalo da žene sa PCOS imaju povišene koncentracije LDL-H i promene u kvalitetu LDL čestica (86, 116, 203). Kao što je napomenuto u uvodnom delu, LDL čestice su prisutne u cirkulaciji u vidu različitih subfrakcija koje se razlikuju po veličini, gustini i aterogenosti. Male, guste LDL čestice su aterogenije u odnosu na velike, plutajuće LDL čestice i kod žena sa PCOS postoji kontinuirano povećanje aterogenosti LDL čestica praćeno smanjenjem njihove veličine (11, 203). Međutim, sve gore pomenute studije uključivale su pre svega prekomerno teške i gojazne žene sa PCOS. Korejska studija (204) je otkrila da nema značajnih kvantitativnih ili kvalitativnih promena LDL profila kod normalno uhranjenih žena sa PCOS. Rezultati meta analize (205) su pokazali da su koncentracije LDL-H bile značajno povišene kod žena sa PCOS,

ali i da na te koncentracije utiču mnogi faktori, uključujući etničko poreklo, kompleksnost sindroma (anovulatorni vs. ovulatorni), način ishrane i ITM. Ipak, nakon izračunavanja skora dislipidemije, uočili smo značajno višu vrednost skora kod žena sa PCOS u odnosu na KG žena, mada je samo koncentracija HDL-H bila značajno niža kod žena sa PCOS, dok se vrednosti drugih lipidnih parametara nisu razlikovale između ispitivanih grupa (Slika 34). HDL čestice sprečavaju oksidaciju LDL čestica i imaju antiaterogena i anti-inflamatorna svojstva. Pokazano je da žene sa PCOS imaju ne samo snižene koncentracije HDL-H, već i izmenjen kvalitet HDL čestica (206). Sniženi udeo HDL 2 subfrakcije (HDL subfrakcija sa najizraženijim antiaterogenim svojstvima) je zapažen kod žena sa PCOS (199). Možemo pretpostaviti da snižena koncentracija HDL-H i izmenjen sastav HDL čestica predstavljaju početni korak u razvoju dislipidemije u ovom sindromu. Štaviše, to bi moglo, takođe, uticati i na produblјivanje OS i inflamacije kao posledice sniženog antioksidativnog i anti-inflamatornog kapaciteta HDL čestica, odnosno niskih koncentracija HDL-H.

Dokazano je da je inflamacija uključena u inicijaciju i progresiju ateroskleroze i da između hronične inflamacije i OS postoji bliska veza u patogenezi samog procesa (107). Mehanizam formiranja povratnih sprega, gde inflamacija indukuje stvaranje ROS, dok OS pogoršava inflamaciju opisan je u endotelu i adipoznom tkivu (108). Gojaznost utiče na kardiovaskularni rizik kod žena sa PCOS na taj način što dovodi do hronične niskostepene inflamacije praćene povećanjem inflamatornih markera u cirkulaciji (CRP, TNF- α i IL-6) (207). Vrednosti ovih inflamatornih markera i ITM su u direktnoj korelaciji kod žena sa PCOS, s obzirom da prekomerno teške i gojazne žene sa PCOS imaju značajno više koncentracije ovih markera u poređenju sa, po težini, odgovarajućim kontrolama (208). Koncentracija CRP, inflamatornog biomarkera i snažnog nezavisnog prediktora budućih KVB, povišena je kod žena sa PCOS (209) što su i naši rezultati pokazali (Tabela 12). Nivoi CRP su bili značajno viši kod žena sa PCOS u odnosu na KG, ali su te vrednosti bile ispod 3,5 mg/L što ukazuje na niskostepenu inflamaciju i trenutno mali rizik za KVB. Dodatno, povišena koncentracija serumskog CRP povezana je sa endotelnom disfunkcijom, koja je kritična spona između hronične niskostepene inflamacije i KVB (ateroskleroze) (109). U skladu sa tim, skor inflamacije, izračunat u našem istraživanju, bio je značajno viši u PCOS grupi u poređenju sa KG (Slika 35).

Oksidativni stres je prepoznat kao nepoželjan faktor prisutan u različitim patološkim stanjima uključujući PCOS. Serumske koncentracije prooksidanasa i antioksidanasa su

izmenjene kod žena sa PCOS što uzrokuje redoks disbalans i produbljivanje OS. Žene sa PCOS imaju povišene nivoe markera OS poput MDA, krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije, koji odražava oksidativno oštećenje lipidnog sadržaja ćelije. AOPP, marker oksidacijom posredovanog oštećenja proteina i snažan medijator inflamacije, TOS, agregativan indeks prooksidativnog kapaciteta plazme i PAB, parametar koji odražava istovremeno prisustvo prooksidanasa i antioksidanasa u živim sistemima, imaju takođe povišene vrednosti u PCOS (62, 169, 210). Rezultati ovog dela naše studije su bili u skladu sa navedenim podacima (Slike 23–26). Žene sa PCOS imaju snižene vrednosti parametara antioksidativne zaštite, kao što su PON1 (antioksidativni enzim) i koncentracija ukupnih SH-grupa (čistači slobodnih radikala) (62, 211). Prva studija koja je ukazala na smanjenu aktivnost PON1 kod žena sa PCOS je bila studija Dursun i sar. (212). Autori su naveli da sniženje serumske aktivnosti PON1 može povećati podložnost ka IR i aterosklerotskoj bolesti srca kod žena sa PCOS. Još jedna studija je, takođe, pokazala da je antioksidativna aktivnost PON1 smanjena kod žena sa PCOS i navela da je naglašen OS kod njih možda povezan sa razvojem ateroskleroze kasnije u toku života (213). Naše žene sa PCOS su imale sniženu antioksidantnu aktivnost PON1 kao i sniženu koncentraciju ukupnih SH-grupa u odnosu na zdrave žene (Slike 27 i 28). Tačan mehanizam koji dovodi do sniženja aktivnosti PON1 u PCOS nije poznat. Snižena aktivnost PON1 može doprineti OS zbog toga što je PON1 antioksidativni enzim koji sprečava oksidaciju lipoproteina hidrolizujući aterogene proizvode nastale oksidativnom modifikacijom lipida (62). S druge strane i OS doprinosi smanjenju aktivnosti PON1 kroz promene redoks statusa slobodnih sulfhidrilnih grupa proteinskog molekula ovog enzima, posebno sulfhidrilne grupe aminokiseline cistein koja se nalazi u aktivnom centru enzima (111). Da bi procenili OS koristili smo oksidativno-stresni skor, sveobuhvatni indeks OS dobijen proračunom u kome su korišćene koncentracije parametara redoks statusa koji su direktno određivani u ovoj studiji (164).

S obzirom da je PCOS multifaktorsko oboljenje, kombinovanjem tri faktora koji su zajednički za PCOS i za KVB, dislipidemije, OS i inflamacije, izračunali smo DOI skor (zbir skora dislipidemije, oksidativno-stresnog skora i skora inflamacije). Kao što smo očekivali, svi pojedinačni skorovi su bili povećani kod žena sa PCOS u odnosu na KG (Slike 33–35). S obzirom na to da su vrednosti sva tri skora kod žena sa PCOS bile povećane, DOI skor je bio značajno veći kod njih u odnosu na KG, ukazujući na značaj ovog rezultata u proceni kardiometaboličkog rizika kod žena sa PCOS.

Pokazano je da postoji pozitivna korelacija gojaznosti sa IR i OS kod žena sa PCOS (214). OS je uključen u patogenezu gojaznosti uglavnom podsticanjem hronične inflamacije i disfunkcije masnog tkiva (215). Štaviše, izgleda da zajedno disfunkcija masnog tkiva i gojaznost podstiču dislipidemiju, hroničnu inflamaciju i OS. Masno tkivo ima izmenjenu morfologiju, kao i funkciju kod žena sa PCOS. Izmenjena morfologija i funkcija masnog tkiva uzrokuju njegovu smanjenu vaskularizaciju i posledičnu hipoksiju koja podstiče lokalnu niskostepenu inflamaciju (216) koja dovodi do razvoja lokalne i sistemske IR. IR se smatra osnovnim mehanizmom kojim gojaznost doprinosi razvoju OS. Abdominalno masno tkivo je lipolitički aktivnije (zbog povećanja adrenergičnih receptora) i istovremeno rezistentnije na antilipolitičko dejstvo insulina što dovodi do povećanog nivoa cirkulišućih SMK. IR podstiče OS zato što hiperglikemija i visoka koncentracija SMK dovode do produkcije ROS (99).

S obzirom na povezanost dislipidemije, OS i inflamacije, njihov međusobni odnos smo ispitali Spearmanovom korelacionom analizom (Tabela 13). Rezultati su jasno pokazali da postoji jaka pozitivna korelacija oksidativno-stresnog skora i skora dislipidemije i značajna pozitivna korelacija oksidativno-stresnog skora i skora inflamacije. Dodatno, zapažena je i jaka pozitivna korelacija skora dislipidemije i skora inflamacije. Da bi se ispitaio međusobni uticaj gojaznosti, lipidnih i parametara OS na vrednosti skorova kod žena sa PCOS, primenili smo višestruku linearnu regresionu analizu. Kao glavni prediktori oksidativno-stresnog skora kod žena sa PCOS izdvojili su se ukupni holesterol (pozitivna korelacija) i HDL-H (negativna korelacija) što je u skladu sa eksperimentalnim istraživanjima koja sugerišu da su povećane koncentracije ukupnog holesterola i snižene koncentracije HDL-H u serumu povezane sa povećanom produkcijom ROS, odnosno OS i ranim razvojem ateroskleroze (107). Najvažniji prediktori skora inflamacije u PCOS grupi su bili ITM i MDA (oba sa pozitivnom korelacijom) što se slaže sa rezultatima studije Artimani i sar. (211) koji pokazuju postojanje značajne korelacije MDA i inflamatornih citokina (TNF- α i IL-6). Nezavisni faktori skora dislipidemije bili su ITM, AOPP i MDA (pozitivna korelacija) i TOS (negativna korelacija) (Tabela 14). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima studije Wu i sar. (217) koji nalaze značajno više vrednosti AOPP i MDA kod pacijenata sa dislipidemijom, dok veza TOS sa dislipidemijom ne može da se objasni.

Primenjena ROC analiza (Slika 37) je pokazala da oksidativno-stresni skor i DOI skor imaju izuzetne diskriminativne sposobnosti, odnosno dijagnostičku tačnost da razdvoje žene sa PCOS od zdravih žena (Tabela 15).

5.2.1. Uticaj gojaznosti na skorove rizika

Uticaj gojaznosti na vrednosti parametara OS, inflamacije i dislipidemije je ispitivan u velikom broju studija (218). U našoj studiji, ITM se pokazao kao nezavisni prediktor skorova dislipidemije i inflamacije, nasuprot oksidativno-stresnom skor u čiji su nezavisni prediktori bili ukupni holesterol i HDL-H. Iz tog razloga, ispitali smo kako gojaznost utiče na vrednosti svih skorova rizika kod žena sa PCOS. Rezultati našeg istraživanja očekivano su pokazali da su prekomerno teške i gojazne žene sa PCOS imale značajno više vrednosti skorova dislipidemije i inflamacije, kao i DOI skora u odnosu na normalno uhranjene žene (Tabela 16).

Kao što je ranije rečeno, masno tkivo je dinamičan endokrini organ koji učestvuje u sintezi i sekreciji važnih hormona i citokina, kao i u regulaciji brojnih metaboličkih i inflamatornih procesa (70). Već je spomenuto da su funkcionalne abnormalnosti adipocita primećene kod žena sa PCOS. Ove abnormalnosti mogu doprineti blagoj inflamaciji i OS usled hipertrofije adipocita nastale izlaganjem višku androgena (82). Hipertrofični adipociti su identifikovani kao izvor proinflamatornih citokina koji su snažni stimulatori sinteze ROS i razvoja niskostepene inflamacije (11).

Sveukupno, naši rezultati ukazuju na to da bi povećanje telesne težine moglo predstavljati zajednički faktor odgovoran za nastanak i produbljivanje dislipidemije, OS i inflamacije u PCOS.

5.3. Heterogenost LDL i HDL čestica

5.3.1. Distribucija LDL lipoproteinskih subfrakcija

Žene sa PCOS imaju povećan kardiovaskularni rizik što je dosledno potvrđeno u različitim geografskim područjima i među različitim etničkim grupama (219). U poređenju sa zdravim ženama, one imaju povećanu prevalencu kardiovaskularnih faktora rizika poput IR, hiperinsulinemije, abdominalne gojaznosti, dislipidemije, hipertenzije (183) i dodatno izmenjene markere kliničke i subkliničke ateroskleroze, uključujući serumske markere (poput CRP-a, LDL-H, HDL-H i drugih), debljinu intime medije karotidnih arterija, koronarni arterijski skor kalcijuma (136).

Skorašnja proučavanja su pokazala da žene sa PCOS imaju značajno izmenjen lipidni profil koji se odlikuje kvalitativnim promenama LDL-a u vidu povećanih vrednosti aterogenih malih, gustih LDL čestica, odnosno povećanim koncentracijama TG i sniženim koncentracijama HDL-H. Ovakav lipidni profil je poznat kao lipidna trijada, „aterogeni lipoproteinski fenotip“ (eng. *atherogenic lipoprotein phenotype*, ALP) ili LDL B fenotip i predstavlja tip dislipidemije koji doprinosi povećanom riziku za KVB (220). Kao što je ranije već pomenuto, LDL se sastoji od više različitih subfrakcija koje se razlikuju po veličini, gustini, lipidnom sastavu, metaboličkim funkcijama i aterogenosti: velike LDL I, srednje LDL II, male LDL III i veoma male LDL IV subfrakcije (113). Različite studije su pokazale da žene sa PCOS mogu imati smanjenu veličinu LDL čestica zbog povećane vrednosti malih, gustih LDL čestica (114, 117, 221).

Heterogenost lipoproteinskih subfrakcija (LDL i HDL) analizirana je kod 114 žena sa PCOS i 23 zdrave žene koje su činile KG.

Iako rezultati naše studije nisu pokazali značajnu razliku u koncentraciji TG između žena sa PCOS i KG žena, žene sa PCOS su imale značajno manje dijemetre LDL čestica od žena u KG. Međutim, ukupan udeo malih gustih LDL čestica nije se značajno razlikovao između posmatranih grupa, ali analizom raspodele pojedinačnih LDL subfrakcija utvrdili smo karakterističnu preraspodelu ka manjim, aterogenijim LDL česticama u grupi sa PCOS. Kod žena sa PCOS relativni udeo velikih LDL I subfrakcija je bio značajno manji, dok je istovremeno udeo srednjih LDL II i malih LDL III subfrakcija bio značajno veći nego u KG (Tabela 17). Manji dijometri LDL čestica su posledica značajnog smanjenje udela velikih LDL I subfrakcija uz istovremeno povećanje udela srednjih LDL II i malih LDL III subfrakcija u PCOS grupi što je u skladu sa rezultatima drugih studija (87, 114, 117). Utvrđene razlike u distribuciji LDL subfrakcija

u našoj studiji mogle bi se pripisati uticaju i drugih faktora rizika, poput načina ishrane, stepena gojaznosti i distribucije masnog tkiva.

Inicijalnu analizu veličine i udela LDL subfrakcija u obe ispitivane grupe smo ponovili uzimajući u obzir, prvo, stepen uhranjenosti samo žena sa PCOS (Tabela 18), a zatim i stepen uhranjenosti žena iz KG (Tabela 19). Normalno uhranjene i gojazne žene sa PCOS su imale značajno manju veličinu LDL čestica od normalno uhranjenih i gojaznih žena u KG (Tabela 19), pri čemu su gojazne žene sa PCOS imale najmanje LDL dijametre (Tabele 18 i 19). Raspodela udela LDL frakcija u obe PCOS grupe je pokazala manji udeo većih (LDL I), odnosno veći udeo LDL II i LDL III subfrakcija u odnosu na normalno uhranjene i gojazne žene u KG (Tabela 19). Naši rezultati ukazuju da su zajedno PCOS i ITM, kao marker ukupne gojaznosti, povezani sa smanjenjem veličine LDL čestica i njihovom preraspodelom ka manjim aterogenijim česticama, što je u saglasnosti sa studijom Phelan-a i sar. (116) koja je pokazala da gojazne žene sa PCOS imaju 5,5 puta veću verovatnoću da imaju aterogeni LDL B fenotip, odnosno da je PCOS jedina nezavisna determinanta ovog modela aterogene dislipidemije. Štaviše, patofiziološki mehanizmi gojaznosti i IR se preklapaju, što je razlog veće prevalence aterogene dislipidemije kod gojaznih žena.

U nastavku istraživanja ispitivana je korelacija veličine LDL čestica sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima u PCOS grupi (Tabela 20). Naši rezultati su zabeležili statistički značajnu negativnu korelaciju veličine LDL čestica sa odnosom struk/kuk i koncentracijom LDL-H, a pozitivnu korelaciju sa koncentracijom HDL-H. Odnos struk/kuk, marker abdominalne gojaznosti, je nezavisno udružen sa povećanjem malih, gustih LDL čestica (222). Naime, abdominalna gojaznost se karakteriše viškom androgena, a smanjenim efektima insulina (posledica IR). Usled smanjene sposobnosti insulina da suprimira lipolizu, u masnom tkivu se povećava aktivnost lipoproteinske lipaze, što je praćeno oslobađanjem velike količine SMK u cirkulaciju. Pojačano preuzimanje masnih kiselina u jetru rezultuje povećanom sintezom TG. Prisustvo hipertrigliceridemije, posredstvom aktivnosti CETP, uzrokuje povećanu razmenu TG i estara holesterola između različitih klasa lipoproteina usled čega dolazi do formiranja holesterol estrima bogatih VLDL čestica koje se dalje pod dejstvom hepatične lipaze transformišu u male, guste LDL čestice (86). Višak androgena povećava aktivnost hepatične lipaze (86). U PCOS povećanje malih, gustih LDL subfrakcija uz značajno smanjenje udela velikih LDL subfrakcija uslovljava manje dijametre LDL čestica (117).

Najklasičniji tip dislipidemije koji određuje kardiovaskularni rizik i udružen je sa IR, podrazumeva povećanje koncentracije LDL-H. Međutim, ovaj vid dislipidemije nije uobičajen u svim populacijama žena sa PCOS (83, 223). Najčešće su koncentracije LDL-H unutar normalnih granica kod većine žena sa PCOS prema kriterijumima definisanim u NCEP ATP III (149). Štaviše, vrednosti LDL-H se često ne razlikuju između PCOS i KG, ali žene sa ovim sindromom imaju povećane male, guste LDL čestice, odnosno smanjenu veličinu LDL čestica. Postojanje pozitivne korelacije veličine LDL čestica sa koncentracijom HDL-H je u skladu sa karakteristikama lipoproteinskih poremećaja udruženih sa PCOS i IR (hipertrigliceridemija, snižena koncentracija HDL-H i manji dijametri LDL čestica) (84, 224).

Takođe, ispitivana je korelacija veličine i relativnih udela LDL subfrakcija sa parametrima OS i antioksidativne zaštite u PCOS (Tabela 21). Ova analiza je pokazala da prisustvo OS kod žena sa PCOS dovodi do smanjenja dijametra LDL čestica. Vrednosti parametara OS-prooksidanasa: AOPP i MDA su negativno korelirale sa veličinom LDL čestica. Takođe, vrednosti PAB su negativno korelirale sa relativnim udelom velikih LDL I subfrakcija, dok je veći udeo malih, gustih LDL IV čestica bio u korelaciji sa višim koncentracijama i PAB i MDA. Sa druge strane, parametar antioksidativne zaštite TAS je pozitivno korelirao sa velikim LDL I česticama, odnosno negativno sa malim LDL IV česticama što pokazuje da antioksidansi imaju ulogu da uspore aterogenu lipidnu modifikaciju u PCOS. Povišene vrednosti cirkulišućih markera oksidativnog oštećenja kod žena sa PCOS udružene su sa manjim, gušćim LDL česticama, što je još jedan dokaz koji govori u prilog njihovom aterogenijem potencijalu. Male, guste LDL čestice su podložnije oksidativnoj modifikaciji. Naime, u uslovima izraženog OS one se lakše transformišu u oksidovane LDL čestice čije su povećane koncentracije prisutne kod žena sa PCOS i predstavljaju pouzdani prediktor KAB što je potvrđeno i u studiji Macuta i sar. (88). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Vekić i sar. (121) koji nalaze da osobe sa većim udelom malih LDL čestica pokazuju povišen OS izražen povećanim koncentracijama MDA (nastaje tokom lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u LDL česticama).

Već smo ranije pomenuli da, zajedno abdominalna gojaznost i NAFLD predstavljaju faktore rizika za KVB (137) i da je povećana prevalenca NAFLD kod žena sa PCOS (192). Važna činjenica je i da su KVB vodeći uzrok smrtnosti pacijenata sa NAFLD (225). NAFLD je manifestacija IR, ali i abdominalna gojaznost doprinosi nastanku

NAFLD (190). Štaviše, IR kroz potenciranje hiperandrogenemije, održava abdominalnu gojaznost u PCOS. Aterogena dislipidemija je obično ispoljena u NAFLD (225). Pored povišenih cirkulišućih koncentracija TG u VLDL česticama i snižene koncentracije HDL-H, u uslovima IR, lipidne promene uključuju i povećane udele aterogenih malih, gustih LDL čestica, ali ne i nužno povećane koncentracije LDL-H (226). Ovakav lipidni profil u NAFLD je jasno potvrđen u MESA studiji (eng. Nonalcoholic fatty liver disease and serum lipoproteins; the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) (227). U skladu sa ovim činjenicama, ispitivana je korelacija veličine LDL čestica sa NAFLD indeksima i ICO kod žena sa PCOS. LAP indeks je pokazao značajnu negativnu korelaciju sa veličinom LDL čestica, kao i ICO kod žena sa PCOS (Slike 38 i 39). LAP indeks se bazira na određivanju obima struka, markera abdominalne gojaznosti i serumske koncentracije TG, markera sadržaja cirkulišućih lipoproteina. Stoga, LAP indeks izražava kontinuirani metabolički i kardiovaskularni rizik udružen sa povećanom akumulacijom lipida kod odraslih (193). Povišene vrednosti ovog indeksa kod naših žena sa PCOS su ukazale na aterogeni lipidni profil koji je okarakterisan prisustvom manjih dijametara LDL čestica. Pored toga, utvrdili smo značajnu korelaciju između povišenih vrednosti ICO i manje veličine LDL čestica. ICO je antropometrijski parametar kojim se utvrđuje prisustvo abdominalne gojaznosti. Abdominalna gojaznost, predstavlja jedan od zajedničkih mehanizama koji podstiču razvoj kardiometaboličkih komplikacija i u PCOS i kod žena sa NAFLD. Ona dovodi, mehanizmima koje smo već opisali, do izmene lipoproteinskog metabolizma, koji se, između ostalog odlikuje kvalitativnim promenama LDL-a u vidu manje veličine LDL čestica. Koliko je poznato, naše istraživanje prvi put opisuje izmene u metabolizmu LDL čestica u vidu promena dijametara LDL čestica u NAFLD kod žena sa PCOS. Međutim, naši rezultati jesu u skladu sa rezultatima nekoliko studija u kojima su ispitivane LDL subfrakcije u NAFLD (227, 228).

U ovom istraživanju je prvi put ispitivan odnos između veličine i raspodele LDL subfrakcija i KQRS, odnosno drugih skorova rizika za KVB poput skora dislipidemije, inflamacije, oksidativno-stresnog skora i DOI skora. Utvrdili smo da se veličina dominantnih LDL čestica značajno smanjuje sa porastom KQRS. Naše žene sa PCOS, iako se nisu razlikovale od žena iz KG u pogledu koncentracije TG, imale su snižen HDL-H, a analiza raspodele pojedinačnih LDL subfrakcija pokazala je karakterističnu preraspodelu ka manjim, aterogenijim LDL česticama u grupi sa PCOS. Ove promene lipoproteinskog metabolizma mogu dalje progredirati u ALP ili LDL B fenotip, koji

predstavlja tip dislipidemije koja doprinosi povećanom riziku za KVB (220), a PCOS je jedina nezavisna determinanta ovog modela aterogene dislipidemije (116). Iako je KVRS proračun definisan za procenu kardiovaskularnog rizika kod mlađih osoba (ispod 40 godina), slični rezultati su dobijeni u studiji Vekić i sar. (166) gde je korišćen Framingamski skor rizika, a koji su takođe pokazali da su više vrednosti Framingamskog skora rizika u korelaciji sa manjim dijametrima LDL čestica i većim udelom malih, gustih LDL III subfrakcija. Značajno smanjenje veličine LDL čestica i veći udeo malih, aterogenijih LDL čestica ukazuje na viši rizik za razvoj koronarne srčane bolesti, u odnosu na rizik koji je procenjen na osnovu Framingamskog skora. U slučaju žena sa PCOS, utvrđena veza između KVRS i veličine LDL čestica pokazuje da u PCOS postoji povećan rizik za ranu progresiju značajne aterosklerotske lezije na koronarnim arterijama, odnosno pojavu koronarne srčane bolesti kasnije u toku života.

Povišene vrednosti skora dislipidemije, prooksidativnog i oksidativno-stresnog skora kod žena sa PCOS bile su u korelaciji sa manjom veličinom LDL čestica (Tabela 22). Utvrdili smo i da se udeli LDL II i LDL IV subfrakcija povećavaju sa porastom skora dislipidemije. Ovi rezultati pokazuju da u PCOS postoji jaka tendencija ka razvoju aterogenog tipa dislipidemije, odnosno preraspodeli ka manjim, gušćim LDL česticama. Sa druge strane i prisustvo OS deluje u istom smeru, što je i očekivano s obzirom na prethodno analizirane korelacije pojedinačnih parametara OS-prooksidanasa sa kvalitativnim i kvantitativnim karakteristikama LDL čestica (Tabela 21). Antioksidativni skor je pozitivno korelirao sa udelom LDL II subfrakcija, a negativno sa udelom LDL IV subfrakcija čime je potvrđeno da antioksidansi imaju ulogu da uspore aterogenu lipidnu modifikaciju u PCOS (Tabela 22).

5.3.2. Distribucija HDL lipoproteinskih frakcija

Snižene cirkulišuće koncentracije HDL-H, pored povišenih koncentracija LDL-H, tradicionalno služe kao faktori rizika za KVB. Složenost HDL čestica, koje imaju višestruke fiziološke funkcije i sastoje se od više subfrakcija, dovela je do pitanja da li se, zapravo treba više fokusirati na istraživanje HDL subfrakcija i njihove funkcije, a ne na koncentracije HDL-H (229). Mali broj studija se bavio ispitivanjem HDL lipoproteinskih subfrakcija u PCOS koje bi mogle pružiti dodatni uvid u individualni rizik od KVB žena sa ovim sindromom (206, 230). HDL lipoproteinska frakcija predstavlja heterogenu smešu čestica različite veličine i sastava. U novije vreme, pored tehnike vertikalne

elektroforeze na poliakrilamidnom gradijentu gelu (koja je korišćena u ovom istraživanju), subfrakcije HDL se najčešće razdvajaju i tehnikom ultracentrifugiranja ili nuklearnom magnetnom rezonantnom spektroskopijom (eng. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR). Već je ranije pomenuto da na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika možemo razlikovati HDL 2 čestice (HDL 2b, HDL 2a) koje su veće i sadrže više holesterola, a manje proteina i HDL 3 čestice (HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c) koje su manje i sadrže manje holesterola, a bogatije su proteinima (120). Za razliku od LDL čestica, kod kojih je veličina obrnuto proporcionalna aterogenom potencijalu, u slučaju HDL čestica još uvek nije sa sigurnošću utvrđeno u kakvom su odnosu veličina i ateroprotektivna svojstva (231). Zna se da HDL čestice imaju antiaterogeno dejstvo koje ostvaruju kroz metaboličku ulogu u procesu reverznog transporta holesterola. Takođe, poseduju antioksidativna i anti-inflamatorna svojstva što zajedno čini spektar njihovih protektivnih uloga (231). Bitne informacije o povezanosti strukture i funkcije HDL, koje čine suštinu ateroprotektivnog delovanja ovih čestica pružila je analiza HDL proteoma i lipidoma. Shodno tome, pretpostavlja se da svako narušavanje strukture utiče na funkcionalnost HDL čestica, do te mere da one neočekivano mogu ispoljiti i proaterogene osobine. Aterogena dislipidemija, inflamacija i OS koji predstavljaju važne kardiometaboličke poremećaje u PCOS, predstavljaju najvažnije činioce koji utiču na stvaranje disfunkcionalnih HDL čestica (123)

Analiza veličine i raspodele HDL subfrakcija kod žena sa PCOS (n=114) i u KG (n=23) je pokazala da se u ove dve grupe dijometri HDL čestica nisu razlikovali, ali da su žene sa PCOS imale značajno viši relativni udeo HDL 2b i HDL 2a subfrakcija, a niži udeo HDL 3b i HDL 3c subfrakcija (Tabela 23). S tim u vezi, ukupan udeo HDL 2 subfrakcija kod žena sa PCOS je bio značajno veći, a udeo HDL 3 subfrakcija manji, nego kod žena u KG (Slika 40). Kao što možemo videti u Tabeli 12, žene sa PCOS su imale značajno niže koncentracije HDL-H u poređenju sa KG. Ipak, vrednosti HDL-H u obe grupe su bile u opsegu poželjnih vrednosti, odnosno veće su od 1,29 mmol/L, što predstavlja vrednost HDL-H koja je definisana kao granični faktor rizika za KVB kod žena (149). Na osnovu toga možemo zaključiti da žene sa PCOS (iz ove ispitivane grupe) nemaju dramatično izražene promene u HDL-H u odnosu na žene iz KG. Vrednosti HDL-H kod žena sa PCOS, čije su snižene koncentracije važan prediktor KVB, se razlikuju od rezultata dobijenih u drugim studijama koje su ispitivale uticaj i povezanost HDL-H sa drugim kardiovaskularnim i metaboličkim faktorima rizika (121, 126). Sa druge strane,

nekonzistentnost u koncentracijama HDL-H kao faktora rizika za KVB postoji i u studijama koje su se bavile PCOS. Neke studije su pokazale da su, u poređenju sa KG, vrednosti HDL-H kod žena sa PCOS bile niže od vrednosti koje su definisane od strane NCEP ATP III (87, 114, 117, 149), dok su druge studije pokazale vrednosti koje su slične vrednostima dobijenim u našoj studiji (10, 196, 204). Kada smo obe grupe (PCOS i KG) podelili prema stepenu uhranjenosti (Tabela 25) videli smo da normalno uhranjene žene sa PCOS imaju prosečan HDL-H 1,71 mmol/L, a normalno uhranjene žene u KG 1,67 mmol/L i međusobno se nisu razlikovale. Takođe, statistički značajna razlika u koncentracijama HDL-H nije postojala ni između gojaznih žena sa PCOS (1,24 mmol/L) i gojaznih žena iz KG (1,42 mmol/L), mada su gojazne žene sa PCOS imale najniže vrednosti HDL-H u poređenju sa ostalim podgrupama. Moguće objašnjenje ovakvih rezultata je da su žene sa PCOS (iz ove ispitivane grupe) mlade žene kod kojih postoji neznatno sniženje koncentracije HDL-H, dok sastav HDL čestica još uvek nije značajnije izmenjen da bi uslovio njihovu disfunkcionalnost. Ipak, te male promene mogle bi predstavljati početni korak u razvoju dislipidemije u ovom sindromu. To bi kasnije moglo dovesti do pogoršanja OS i inflamacije kao posledice daljeg snižavanja koncentracija HDL-H, odnosno antioksidativnog i anti-inflamatornog kapaciteta HDL čestica. Rezultat svega ovoga na kraju bi bilo povećanje kardiovaskularnog rizika.

Kao kod analize LDL subfrakcija, i ovde smo ponovili inicijalnu analizu veličine i raspodele HDL subfrakcija u obe ispitivane grupe, uzimajući u obzir stepen uhranjenosti žena sa PCOS (Tabela 24) i izvršili smo korekciju za razlike u godinama starosti između PCOS i KG. Normalno uhranjene žene sa PCOS i dalje su imale viši udeo HDL 2b subfrakcija u poređenju sa KG žena, dok ta razlika između gojaznih žena sa PCOS i žena u KG nije bila statistički značajna. Takođe, obe grupe žena sa PCOS imale su značajno niži udeo HDL 3b i HDL 3c subfrakcija od žena u KG (Tabela 24).

Ovo istraživanje je pokazalo neočekivanu razliku u profilu HDL subfrakcija između žena sa PCOS i KG žena. Žene sa PCOS su imale značajno viši relativni udeo HDL 2b i HDL 2a subfrakcija, a niži udeo HDL 3b i HDL 3c subfrakcija od žena u KG. Prethodno smo uočili da i žene sa PCOS i žene iz KG imaju prilično visoke koncentracije HDL-H. Jedno od objašnjenja ovih rezultata, koje smo već pomenuli, je da su žene sa PCOS bile značajno mlađe od žena u KG, što se odrazilo na razlike u profilu HDL subfrakcija, koji sugerise da je HDL profil povoljniji u PCOS. Takođe, potencijalni razlog može biti i relativno mali broj žena u KG. Pošto do sada ima par publikovanih istraživanja HDL

subfrakcija u PCOS, nema dovoljno relevantnih podataka sa kojima bi se ovaj nalaz mogao uporediti. Buduća istraživanja sa većim brojem žena će pokazati do kakvih promena u profilu HDL subfrakcija dolazi u PCOS i kako te promene utiču na razvoj KVB kasnije u toku života. Ovaj deo analize govori samo o distribuciji HDL subfrakcija u PCOS, a ne o njihovoj funkcionalnosti, odnosno ateroprotektivnim svojstvima. Stoga je i urađena analiza PON1 distribucije na HDL subfrakcijama, u cilju ispitivanja antioksidativnog kapaciteta HDL čestica u PCOS.

Analiza HDL čestica unutar PCOS grupe pokazala je da gojazne žene sa PCOS imaju značajno manje dijemetre HDL čestica i viši udeo malih HDL 3b subfrakcija od normalno uhranjenih žena sa PCOS. Ovaj rezultat je potpuno u skladu sa rezultatima svih dosadašnjih istraživanja koja su pokazala smanjenje veličine HDL čestica kod pacijenata sa višim rizikom za KVB (232, 233). Na osnovu toga možemo pretpostaviti da sam PCOS ne utiče na profil HDL subfrakcija, već da se u osnovi uočenih promena zapravo nalazi gojaznost.

Potvrda ove pretpostavke se uočava u daljoj analizi korelacija u PCOS grupi. U Tabeli 26 vidi se da se sa povećanjem ITM (marker ukupne gojaznosti) i odnosa struk/kuk (marker abdominalne gojaznosti) smanjuje dijametar HDL čestica. Dakle, kod gojaznih i žena sa izraženijom abdominalnom gojaznošću HDL čestice se smanjuju. Ovo je takođe pokazano i u drugim istraživanjima koja su analizirala efekat gojaznosti na profil HDL subfrakcija (234, 235). Korelaciona analiza je takođe pokazala da sa porastom koncentracije HDL-H raste i veličina HDL čestica (Tabela 26) i udeo HDL 2 subfrakcija, a smanjuje se udeo HDL 3 subfrakcija (Tabela 27). Ovo je u skladu sa zaključkom velikog broja studija koje su ispitivale uzročno-posledičnu vezu između promena u raspodeli HDL subfrakcija i rizika za razvoj KVB. Te studije su pokazale da je povećan rizik za razvoj KVB povezan sa smanjenom količinom HDL 2 subfrakcija (125, 126). Štaviše, ova korelaciona analiza potvrđuje da su rezultati istraživanja za HDL subfrakcije u PCOS dobri i da je nepredviđena razlika u profilu HDL subfrakcija između PCOS i KG posledica razlike u starosti između ispitivanih grupa (žene iz KG su bile značajno starije). Kao važan rezultat izdvaja se i pozitivna korelacija relativnog udela HDL 3a čestica sa koncentracijom TG. Kao što je već objašnjeno u uvodnom delu i diskusiji vezanoj za distribuciju LDL subfrakcija, u hipertrigliceridemiji je pojačana CETP-om posredovana razmena TG i estara holesterola između VLDL, LDL i HDL čestica, te nastaju LDL i HDL čestice koje su bogate TG. Hipertrigliceridemija je posledica abdominalne

gojaznosti koju karakteriše višak androgena (hiperandrogenemija) i smanjenje efekata insulina zbog IR. Ove čestice bogate TG zatim hidrolizuje hepatična lipaza, čija je aktivnost povećana u prisustvu viška androgena, što dovodi do pojačane konverzije većih HDL 2 subfrakcija u male, guste HDL 3 čestice. Nastale male HDL 3 čestice ne pokreću novi ciklus reverznog transporta holesterola, već se ubrzano katabolišu, tj. njihov klirens se povećava (123), što se reflektuje kroz smanjenje koncentracije HDL-H. Promene u strukturi malih HDL čestica usled povećanog sadržaja TG smanjuju njihove antiaterogene sposobnosti.

Konačno, u ove nalaze se potpuno uklapaju i korelacije sa indeksima NAFLD (LAP i HIS) i ICO u PCOS grupi (Tabela 29). NAFLD je stanje, koje se karakteriše povećanim nakupljanjem masti odnosno triglicerida u jetri. Pored toga što NAFLD ima multifaktorijalnu patogenezu, ključnu ulogu u njenom razvoju, pored abdominalne gojaznosti, ima IR (190). To znači da NAFLD predstavlja faktor rizika za KVB (137). Sa druge strane, IR, glavni patofiziološki mehanizam u PCOS koji dovodi do razvoja kardiometaboličkih poremećaja, podstiče povećanu sekreciju androgena iz jajnika i nadbubrežnih žlezda i tim mehanizmom održava abdominalnu gojaznost u ovom sindromu. Prema tome, IR i abdominalna gojaznost su zajedničke metaboličke karakteristike i PCOS i NAFLD. U delu diskusije o distribuciji LDL subfrakcija je već pomenuto da je NAFLD povezana sa aterogenom dislipidemijom koju karakterišu povišene cirkulišuće koncentracije TG u VLDL česticama, smanjena koncentracija HDL-H uz povećanje malih, gustih LDL čestica (226). Rezultati velike MESA studije su jasno potvrdili ovakav lipidni profil i nedvosmisleno pokazali progresivno smanjenje veličine HDL čestica sa povećanjem ozbiljnosti NAFLD (227). Naši rezultati korelacije veličina HDL čestica i indeksa NAFLD su u potpunosti bili u skladu sa rezultatima pomenute studije, tj. veličina HDL čestica je manja što su veći LAP, HIS i ICO. Vrednosti ovih indeksa opisuju NAFLD, jer se radi o indeksima koji ukazuju na postojanje abdominalne gojaznosti, aterogenijeg lipidnog profila, povećane akumulacije lipida, odnosno TG u jetri što doprinosi kontinuiranom metaboličkom i kardiovaskularnom riziku i u PCOS i u NAFLD.

Iako smo utvrdili da je u PCOS viši udeo HDL 2b subfrakcija u odnosu na KG, dalja analiza je pokazala da je relativni udeo HDL 2b subfrakcija u korelaciji sa višim vrednostima PAB, koji je marker povećanog stvaranja slobodnih radikala (Tabela 28).

Ovaj nalaz sugerira da se u ispitivanoj grupi žena sa PCOS OS razvija brže od promena u distribuciji HDL subfrakcije.

Viša aktivnost SOD je korelirala sa višim ukupnim udelom HDL 3 subfrakcija, što možemo tumačiti kao kompenzatorno povećanje SOD kada su akumulirane male HDL čestice koje imaju niži ateroprotektivni potencijal. SOD je ključni antioksidativni enzim koji konvertuje $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 i sprečava dalju oksidaciju ključnih molekula. Povećanje aktivnosti SOD može da spreči oksidativnu modifikaciju HDL čestica, odnosno gubitak antioksidativnog i ateroprotektivnog dejstva. HDL čestice snažno štite lipidne i proteinske grupe LDL čestica od oksidacije izazvane slobodnim radikalima, sprečavajući akumulaciju primarnih i sekundarnih oksidacionih proizvoda. U stanju povišenog OS slobodni radikali modifikuju lipidne i proteinske grupe i na HDL česticama dovodeći do nastanka lipidnih i proteinskih radikala. Prvenstveno dolazi do akumulacije lipidnih hidroperoksida (eng. *lipid hydroperoxides*, LOOH) što zauzvrat podržava dalju oksidaciju strukturnih komponenata HDL molekula i nepovoljno utiče na njegove protektivne uloge (236). Takođe, viša koncentracija prooksidansa MDA je bila u korelaciji sa većim udelom HDL 3a subfrakcija što ukazuje na veću podložnost oksidaciji manjih HDL čestica, odnosno manji antioksidativni potencijal. To se takođe slaže sa činjenicom da, usled smanjene antioksidativne sposobnosti malih HDL čestica, dolazi do nakupljanja krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Vekić i sar. (121) koji nalaze da osobe sa većim udelom malih HDL 3b subfrakcija imaju povišen OS izražen povećanim koncentracijama MDA. Skorašnja studija je pokazala da je HDL izolovan kod pacijenata sa KAB imao kompromitovanu antioksidativnu i zaštitnu endotelnu ulogu. Ovo je povezano sa smanjenom aktivnosti PON1 na malim HDL subfrakcijama usled njihove modifikacije izazvane delovanjem MDA (237). OS može da inhibira aktivnost LCAT, da oksiduje i apolipoprotein A-1, te da na taj način nepovoljno utiče na sazrevanje HDL čestica, kao i na njihove ateroprotektivne uloge.

HDL dijometri i subfrakcije kod žena sa PCOS su korelirali samo sa skorom dislipidemije. Međutim, nije nađena korelacija sa oksidativno-stresnim skorom i skorom inflamacije. Uočena je negativna korelacija HDL dijametra i relativnog udela HDL 2b subfrakcije i skora dislipidemije, odnosno pozitivna korelacija relativnih udela HDL 3a i HDL 3b subfrakcija i pomenutog skora (Poglavlje 4.2.8.8.). Ovi rezultati su očekivani obzirom da je dislipidemija najčešća kardiometabolička komplikacija u PCOS i da se

odlikuje niskom koncentracijom HDL-H (pored hipertrigliceridemije i/ili povišene koncentracije LDL-H). Što je dislipidemija u PCOS izraženija, smanjuje se veličina HDL čestica i shodno tome distribucija HDL subfrakcija se pomera od većih HDL 2 subfrakcija ka manjim, gušćim HDL 3 subfrakcijama. Možemo pretpostaviti da je, među posmatranim karakteristikama PCOS, dislipidemija najvažniji faktor koji utiče na profil HDL subfrakcija u ovom sindromu. DOI skor je pozitivno korelirao sa udelom HDL 3a subfrakcija. To sugeriše da više vrednosti DOI skora mogu da ukažu na prisustvo manjih HDL čestica i ukazuju na još jedan značaj izračunavanja ovog skora kod žena sa PCOS.

Ispitivanje korelacije veličina i relativnih udela HDL subfrakcija u PCOS grupi sa KQRS je pokazalo da su dijometri HDL čestica i relativni udeli HDL 2b subfrakcija bili u negativnoj, a da je udeo HDL 3a subfrakcija u pozitivnoj korelaciji sa KQRS (Tabela 30). Na osnovu ovoga možemo zaključiti da je povišen rizik za KVB u PCOS povezan sa preraspodelom HDL čestica ka manjim subfrakcijama, tj. sniženju nivoa većih HDL 2 subfrakcija i povećanju nivoa manjih HDL 3 subfrakcija. Već je pomenuto da je ovo prvo istraživanje vezano za PCOS u kome je korišćen KQRS proračun za procenu rizika za KVB kod mladih osoba. Međutim, ovi rezultati su bili u skladu sa rezultatima drugih studija koje nisu koristile skorove za procenu rizika za KVB, ali su ispitivale raspodelu HDL subfrakcija i njihov uticaj na kardiovaskularni rizik. Velika studija Musunumuru i sar. (238) je pokazala da je sniženje HDL 2 subfrakcije povezano sa povećanim rizikom za KVB. Tian i sar. (239) su ukazali da pacijenti sa akutnim koronarnim sindromom imaju snižene udele HDL 2, a povišene udele HDL 3 subfrakcija.

5.3.3. Raspodela aktivnosti i udela enzima PON1 na HDL subfrakcijama

Pitanje koje je i dalje diskutabilno među istraživačkim grupama koje se bave lipidologijom, je koja HDL subfrakcija obezbeđuje bolju kardiovaskularnu zaštitu. Predloženo je da velike HDL čestice (HDL 2 subfrakcije) imaju najveći ateroprotektivni potencijal, zato što je pokazano da su nivoi ovih čestica niži kod pacijenata sa KAB, odnosno viši kod premenopauzalnih žena u odnosu na njihove odgovarajuće KG, u studijama koje su koristile metode selektivne precipitacije ili NMR spektroskopiju za ispitivanje heterogenosti HDL čestica (231, 240). Nasuprot tome, u *in vitro* istraživanjima je pokazano da su male HDL čestice (HDL 3 subfrakcije) efikasniji akceptori holesterola iz perifernih tkiva i takođe imaju bolja antioksidativna svojstva u odnosu na velike HDL čestice. Male HDL čestice su bogatije proteinima i sadrže manje holesterola, za razliku

od većih čestica, ali treba istaći da karakterizacija HDL subfrakcija zavisi od parametara koji se određuje u metodama za ispitivanje heterogenosti ovih lipoproteinskih čestica (lipidi, proteini, dijametar, broj čestica) (241, 242). Raznovrsnost metoda koje se koriste za ispitivanje HDL subfrakcija je delimično odgovorna za, kako se čini, neslaganja oko toga koja subfrakcija HDL ima najizraženija antiaterogena svojstva (237). Gde je tačna lokalizacija antioksidativnog enzima PON1 i kako se prenosi između HDL subfrakcija su važna pitanja koja će, kada budu dati odgovori, u određenoj meri razjasniti kontroverzu koja HDL subfrakcija ima veći ateroprotektivni potencijal. Ranije studije koje su koristile metodu ultracentrifugiranja za razdvajanje HDL subfrakcija su utvrdile da je aktivnost PON1 najzastupljenija na malim HDL 3 česticama (123, 231, 242). Novije studije HDL proteoma su potvrdile ove nalaze i dokazale da strukturni i, što je još važnije, funkcionalni proteini u HDL imaju tendenciju grupisanja u česticama koje imaju različita funkcionalna svojstva (243, 244). Očigledno je da manje HDL 3 čestice imaju snažniji antioksidativni potencijal delimično zbog višeg sadržaja PON1.

U inicijalnoj analizi raspodele PON1 na HDL subfrakcijama nismo utvrdili značajne razlike u distribuciji PON1 na HDL subfrakcijama između žena sa PCOS i KG (Tabela 31). Iako se može uočiti tendencija da žene u KG imaju neznatno veći udeo PON1 na velikim HDL 2b i HDL 2a subfrakcijama, odnosno manji udeo PON1 na malim HDL 3a, 3b i 3c subfrakcijama, te razlike nisu bile statistički značajne, što je najverovatnije posledica malog broja zdravih žena u KG. Poređenje ukupne zastupljenosti PON1 na većim (HDL 2) i manjim (HDL 3) subfrakcijama između ispitivanih grupa je potvrdilo ovaj trend mada bez statistički značajne razlike (Slika 43). Naime, već je pomenuto da je uspešna detekcija PON1 na gelu postignuta samo u 106 uzoraka (101 uzorak žena sa PCOS i 5 uzoraka žena u KG). Dalja analiza unutar PCOS grupe (prema stepenu uhranjenosti) pokazala je da gojaznost nije imala uticaja na raspodelu PON1 na HDL subfrakcijama (Tabela 32) što je potvrđeno poređenjem ukupne zastupljenosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama između normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS (Slika 44). Imajući u vidu da PON1 štiti LDL čestice od oksidacije, kao i činjenicu da su LDL čestice manjeg dijametra podložnije oksidativnoj modifikaciji, uporedili smo žene sa PCOS u zavisnosti od veličine LDL čestica (Tabela 33) i utvrdili da je aktivnost PON1 na HDL 3b i HDL 3c subfrakcijama bila značajno niža kod žena sa malim, gustim LDL česticama, nego kod žena čije su LDL čestice većeg dijametra. Ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama, odnosno HDL 3 subfrakcijama u zavisnosti od dijametra LDL

čestica je pokazao isti trend (Slika 45) Ovakav nalaz možemo tumačiti kao znak da je antioksidativna sposobnost HDL 3 čestica smanjena kod žena sa PCOS u uslovima povećanog rizika za KVB (237). Žene sa PCOS koje smo ispitivali imale su značajno manje dijemetre LDL čestica od žena u KG. Raspodela udela LDL frakcija u PCOS grupi je pokazala manji udeo većih (LDL I), odnosno veći udeo LDL II i III subfrakcija u odnosu na KG (Tabela 19). To potvrđuje postojanje karakteristične preraspodele ka manjim, gušćim, odnosno aterogenijim LDL česticama u grupi sa PCOS i ukazuje da su ove žene pod povećanim rizikom za KVB (220).

Korelaciona analiza između udela PON1 na HDL subfrakcijama i markera OS kod žena sa PCOS (Tabela 34) pokazala je da je aktivnost PON1 u serumu u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelima PON1 na HDL 2b i HDL 2a subfrakcijama, a u negativnoj korelaciji sa relativnim udelima na HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c subfrakcijama. Ovi rezultati su u skladu sa nalazom da su žene sa PCOS koje smo ispitivali imale više relativne udele HDL 2 subfrakcija nego HDL 3 subfrakcija. HDL 2 čestice koje su brojnije, nose i više PON1. PON1 se menja tokom sazrevanja HDL čestice. Neposredno nakon sinteze u jetri PON1 se vezuje za HDL 3 česticu koja se povećava i sa porastom sadržaja holesterola prelazi u veću HDL 2 česticu (135). Prethodne studije su pretpostavile da nascentni HDL koji se sintetiše u jetri i tankom crevu ne sadrži PON1 (123, 241, 245). Malo toga se zna o dinamici razvoja PON1 u HDL, posebno o njenom kretanju tokom sazrevanja i remodelovanja HDL. Razumevanje kako i kada se PON1 integriše u strukturu HDL čestice je danas važno pitanje za istraživače, kojim su se bavili i Gugliucci i sar. (237). HDL čestice konstantno podležu procesu remodelovanja u kome učestvuju LCAT, CETP, lipaze (lipoproteinska i hepatična) i određeni receptori. Remodelovanjem se modifikuje sadržaj i jezgra i omotača HDL čestice (246). Razmena lipida koja nastaje tokom sazrevanja HDL čestice dovodi do povećanja sadržaja, odnosno aktivnosti PON1 u vrlo malim i vrlo velikim HDL subfrakcijama. Porast aktivnosti PON1 u HDL 3c subfrakciji potvrđuje trenutno objašnjenje da ove čestice imaju najsnažniji antioksidativni potencijal. Povećanje PON1 aktivnosti u velikim HDL 2b česticama nastaje usled sazrevanja manjih HDL 2a čestica, dok se povećanje aktivnosti PON1 u HDL 3c česticama može objasniti sazrevanjem nascentnih, diskoidnih HDL čestica. PON1 se brzo premešta između HDL subfrakcija tokom njihovog sazrevanja, prelazi sa manjih HDL 3 na veće HDL 2 čestice i povećava se njena aktivnost (237, 246).

Viši udeo PON1 na HDL 3b subfrakciji je korelirao sa višim nivoima TAS i TOS, a nižim nivoom PAB. Pored toga, viši udeo PON1 na HDL 3c subfrakciji bio je u korelaciji sa višim TOS. Verovatno OS ima udela u premeštanju PON1 na određene subfrakcije kao neko kompenzatorno povećanje ili kompenzatorno premeštanje na rizičnije frakcije. Viši udeo PON1 na HDL 2a subfrakciji je korelirao sa višim koncentracijama ukupnih SH-grupa. U uslovima povišenog OS može doći do inhibicije aktivnosti PON1 na HDL 3 subfrakciji. OS doprinosi smanjenju aktivnosti PON1 kroz promene redoks statusa slobodnih SH-grupa proteinskog molekula ovog enzima, posebno SH-grupe aminokiseline cistein koja se nalazi u aktivnom centru enzima (111). Sa druge strane, PON1 ima ulogu u zaštiti HDL 3 čestica od oksidacije, pa se na taj način „troši“, odnosno smanjuje joj se aktivnost. Novija istraživanja su pokazala da je mijeloperoksidaza (MPO) enzim koji selektivno podstiče oksidaciju HDL unutar zida arterija smanjujući antiaterogeni potencijal HDL, odnosno transformišući antiaterogeni lipoprotein

u potencijalno aterogenu formu (247). Tokom procesa inflamacije MPO stvara ROS i oksiduje apolipoprotein A-1, glavnu proteinsku komponentu HDL, koja ima ključnu ulogu u reverznom transportu holesterola, tj. procesu sazrevanja HDL. Na ovaj način dolazi do smanjenja ateroprotektivne funkcije HDL. Osim toga, MPO, PON1 i HDL se vezuju jedni za druge, stvarajući trojni kompleks, gde PON1 delimično inhibira delovanje MPO, dok MPO inaktivira PON1 na HDL (247). MPO specifično oksiduje PON1 i ova oksidacija je kritična za vezivanje HDL unutar vaskularnog zida i za antioksidativnu aktivnost PON1. Tokom inflamacije uzajamno delovanje MPO i PON1 se odigrava na samoj HDL čestici tako da vezivanje PON1 za HDL delimično smanjuje aktivnost MPO, a MPO promoviše oksidativnu modifikaciju i disfunkciju PON1 i apolipoproteina A-1. PON1 je podložna napadu ROS i njena protektivna uloga ponekad može biti onemogućena kada dolazi do preteranog stvaranja ROS, kao što je slučaj u uslovima povišenog OS, odnosno uznapredovale ateroskleroze što su pokazale različite studije (237, 248). HDL sa modifikovanim PON1 postaje disfunkcionalan.

U ovom istraživanju smo analizirali i povezanost distribucije PON1 na HDL subfrakcijama sa izračunatim skorovima rizika kod žena sa PCOS (Tabela 35). Utvrdili smo da je antioksidativni skor u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom PON1 na HDL 2a subfrakciji, a u negativnoj korelaciji sa udelom PON1 na HDL 3c subfrakciji, čime smo potvrdili da izražena antioksidativna zaštita doprinosi snažnijem ateroprotektivnom

potencijalu HDL čestica što je posledica povećanja aktivnosti PON1 udruženog sa premeštanjem PON1 na veće HDL 2 čestice. U skladu sa ovim rezultatima, ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama je bio u pozitivnoj korelaciji, a ukupan udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama u negativnoj korelaciji sa pomenutim skorom. Pored toga, vrednosti oksidativno-stresnog skora su bile u pozitivnoj korelaciji sa udelom PON1 na malim HDL 3c subfrakcijama. U uslovima OS može da dođe do inhibicije LCAT što onemogućava sazrevanje HDL čestica, pa PON1 ostaje na HDL 3 česticama.

Pretragom dostupne literature, zaključili smo da je aktuelna studija, prva ove vrste koja se bavila ispitivanjem raspodele PON1 na svim HDL subfrakcijama u populaciji žena sa PCOS. Kao što smo već pomenuli, shvatanje kinetike i funkcije PON1, posebno kako se prenosi tokom sazrevanja i remodelovanja HDL čestica je od izuzetne važnosti za proces ateroskleroze koja može započeti veoma rano, tj. kod mladih osoba, u stanjima koja uključuju faktore rizika za njen nastanak (gojaznost, dislipidemija, inflamacija, povišen OS, IR). Upravo pomenute kardiometaboličke karakteristike odlikuju i PCOS i zbog toga žene sa ovim sindromom imaju povišen rizik za razvoj KVB kasnije u toku života. Gugliucci (249), ali i drugi autori (244, 248) su pokazali da je PON1 veoma podložan napadima slobodnih radikala i da njegova zaštitna uloga na HDL česticama može biti nadmašena u slučaju prevelikog stvaranja ovih jedinjenja, što je dokazano kod inflamacije u aterosklerotskim naslagama. Naši rezultati raspodele PON1 na HDL subfrakcijama nisu pokazali značajne razlike u distribuciji PON1 na HDL subfrakcijama između žena sa PCOS i KG iako je očekivano drugačije, s obzirom da su žene sa PCOS ipak imale povišen rizik za KVB. Gugliucci i sar. (250) su ispitivali aktivnost i distribuciju PON1 na HDL česticama kod pacijenata sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom (HBI). Pacijenti sa HBI, slično ženama sa PCOS imaju povišen rizik za KVB, kao i brojne metaboličke abnormalnosti (hipertenzija, IR, dislipidemija) koje mogu ubrzati aterosklozu. Rezultati njihove studije su pokazali da je aktivnost PON1 snižena kod pacijenata sa HBI i da je sistemsko povećanje aktivnosti PON1 posle hemodijalize udruženo sa premeštanjem PON1 između HDL subfrakcija, tj. transferom PON1 na veće HDL 2 subfrakcije. Povećanje aktivnosti PON1 na velikim HDL 2 česticama pruža podršku današnjem shvatanju da su ove čestice ključna antioksidativna HDL subfrakcija i odražava sazrevanje malih HDL 2 čestica. Jedan od razloga što se u našoj studiji PCOS i KG nisu razlikovale u pogledu raspodele PON1 na HDL subfrakcijama može biti mali broj žena u KG, zato što je uspešna detekcija PON1 na gelu postignuta samo u 5 uzoraka

KG. Međutim, kada smo uporedili žene sa PCOS u zavisnosti od veličine LDL čestica utvrdili smo da je aktivnost PON1 na malim HDL 3 subfrakcijama bila značajno niža kod žena sa malim, gustim LDL česticama, što je znak da je antioksidativna sposobnost HDL 3 čestica smanjena kod žena sa PCOS u uslovima povećanog rizika za KVB.

Osim toga, ovo istraživanje je pokazalo da gojazne žene sa PCOS imaju značajno manje dijemetre HDL čestica i viši udeo malih HDL 3 subfrakcija od normalno uhranjenih žena sa PCOS što je povezano sa visokim rizikom za KVB. Na osnovu toga možemo pretpostaviti da sam PCOS ne utiče na profil HDL subfrakcija, već da se u osnovi uočenih promena zapravo nalazi gojaznost.

Potrebne su prospektivne studije, na velikom broju ispitanika koje bi svojim metodološkim postupcima uklonile faktore koji bi mogli da utiču na ispitivanje raspodele i aktivnosti PON1 na HDL subfrakcijama u PCOS i koje će pokazati do kakvih promena u profilu HDL subfrakcija dolazi u PCOS, odnosno kako te promene utiču na razvoj KVB.

6. ZAKLJUČCI

Iz svih prethodno navedenih i objašnjenih rezultata ove aktuelne studije proistekli su sledeći zaključci:

1. Izračunati KQRS je pokazao da nema značajne razlike u skorima rizika između obe podgrupe gojaznih ispitanica (PCOS i KG), dok je značajna razlika bila prisutna između gojazne PCOS podgrupe i normalno uhranjenih podgrupa ispitanica (PCOS i KG).
2. Visoke vrednosti KQRS uočene su kod žena sa PCOS sa najvišim vrednostima obima struka, obima leve nadlaktice i odnosa struk/kuk što pokazuje da gojaznost predstavlja najviši rizik za KVB.
3. Hormonski status žena sa PCOS utiče na nivo KQRS, pa samim tim i na rizik za pojavu KVB kasnije u toku života.
4. Ispitivanje uticaja NAFLD indeksa i ICO na vrednosti KQRS u PCOS istaklo je LAP indeks kao pouzdaniji parametar za procenu većeg rizika za KVB u odnosu na ITM.
5. Pozitivna korelacija ICO sa KQRS kod žena sa PCOS potvrdila je uticaj abdominalne gojaznosti na povećanje rizika za KVB.
6. Izabrani model, sastavljen od NAFLD indeksa i ICO, pokazao je odličnu dijagnostičku tačnost u izdvajanju žena sa PCOS sa visokim rizikom za razvoj KVB.
7. Žene sa PCOS su imale niže vrednosti koncentracije HDL-H u odnosu na KG, bez značajnih razlika u vrednostima ostalih lipidnih parametara.
8. Hronična niskostepena inflamacija prisutna kod žena sa PCOS, podstaknuta je prisustvom gojaznosti, posebno abdominalne gojaznosti i utiče na kardiovaskularni rizik. Nivoi CRP, inflamatornog biomarkera i snažnog nezavisnog prediktora budućih KVB, su bili značajno viši kod žena sa PCOS u odnosu na KG. Takođe, gojazne žene sa PCOS imale su više vrednosti fibrinogena i brzine sedimentacije eritrocita.
9. Serumske koncentracije prooksidanasa i antioksidanasa su izmenjene kod žena sa PCOS što uzrokuje redoks disbalans. Žene sa PCOS su imale povišene nivoe markera OS, odnosno proizvoda njihovog delovanja poput MDA, AOPP, TOS i PAB, i snižene vrednosti parametara antioksidativne zaštite, tj. snižene koncentracije ukupnih SH-grupa i sniženu aktivnost PON1 u odnosu na KG.

10. Značajno manje dijametare LDL čestica imale su žene sa PCOS u odnosu na KG. Iako se ukupan udeo malih gustih LDL čestica (LDL IV) nije značajno razlikovao između posmatranih grupa, kod žena sa PCOS relativni udeo velikih LDL I subfrakcija je bio značajno manji, dok je istovremeno udeo srednjih LDL II i malih LDL III subfrakcija bio značajno veći nego u KG.
11. Normalno uhranjene i gojazne žene sa PCOS imale su značajno manju veličinu LDL čestica od normalno uhranjenih i gojaznih žena u KG, pri čemu su gojazne žene sa PCOS imale najmanje LDL dijametare. Raspodela udela LDL frakcija u obe PCOS grupe je pokazala manji udeo LDL I, odnosno veći udeo LDL II i III subfrakcija u odnosu na normalno uhranjene i gojazne žene u KG.
12. Korelacije veličine LDL čestica sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima u PCOS grupi je ukazala na statistički značajnu negativnu korelaciju veličine LDL čestica sa odnosom struk/kuk i koncentracijom LDL-H, a pozitivnu korelaciju sa koncentracijom HDL-H.
13. Prisustvo OS kod žena sa PCOS dovodi do smanjenja dijametra LDL čestica. Uočena je negativna korelacija AOPP i MDA sa veličinom LDL čestica, kao i PAB sa relativnim udelom velikih LDL I subfrakcija. Veći udeo malih, gustih LDL IV čestica je bio u korelaciji sa višim koncentracijama i PAB i MDA.
14. Parametar antioksidativne zaštite TAS je pozitivno korelirao sa velikim LDL I česticama, odnosno negativno sa malim LDL IV česticama što pokazuje da antioksidansi imaju ulogu da uspore aterogenu lipidnu modifikaciju u PCOS.
15. Korelacije veličine LDL čestica sa NAFLD indeksima i ICO kod žena sa PCOS je ukazala na značajnu negativnu korelaciju LAP indeksa i ICO sa veličinom LDL čestica.
16. Analiza veličine i raspodele HDL subfrakcija kod žena sa PCOS i žena u KG je pokazala da se dijometri HDL čestica nisu razlikovali, ali da su žene sa PCOS imale značajno viši ukupan udeo HDL 2 subfrakcija, a niži udeo HDL 3 subfrakcija u odnosu na žene iz KG.
17. Uzimajući u obzir stepen uhranjenosti žena sa PCOS analiza veličine i raspodele HDL subfrakcija pokazala je da su gojazne žene sa PCOS imale značajno manje dijametare HDL čestica, a da su normalno uhranjene žene sa PCOS imale najviši udeo HDL 2, a najmanji udeo HDL 3 subfrakcija.

18. Kada se uzme u obzir i stepen uhranjenosti žena u KG poređenje ukupnih udela HDL 2 i HDL 3 subfrakcija pokazalo je da normalno uhranjene žene sa PCOS imaju značajno veći udeo HDL 2 subfrakcija od normalno uhranjenih i gojaznih žena u KG. Takođe, relativni udeli HDL 3 subfrakcija kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS bili su značajno niži nego kod gojaznih žena u KG.
19. Korelacije veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija sa antropometrijskim i biohemijskim parametrima u PCOS grupi je pokazala da se sa povećanjem ITM i odnosa struk/kuk smanjuje dijametar HDL čestica, odnosno sa porastom koncentracije HDL-H raste veličina HDL čestica kao i udeo HDL 2 subfrakcija, a smanjuje se udeo HDL 3 subfrakcija.
20. Korelacije ukupnih udela HDL subfrakcija sa parametrima OS kod žena sa PCOS su ukazale da je viša aktivnost SOD i veća koncentracija prooksidansa MDA korelirala sa višim ukupnim udelom HDL 3 subfrakcija.
21. Korelacije veličine HDL čestica i relativnih udela HDL subfrakcija sa indeksima NAFLD (LAP i HIS) i ICO u PCOS grupi su pokazale da je veličina HDL čestica manja što su veći LAP, HIS i ICO.
22. Analiza raspodele PON1 na HDL subfrakcijama nije pokazala značajne razlike u distribuciji PON1 na HDL subfrakcijama između žena sa PCOS i KG što je potvrđeno poređenjem ukupne zastupljenosti PON1 na većim (HDL 2) i manjim (HDL 3) subfrakcijama između ispitivanih grupa.
23. Gojaznost nije imala uticaja na raspodelu PON1 na HDL subfrakcijama unutar PCOS grupe što je potvrđeno poređenjem ukupne zastupljenosti PON1 na HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama između normalno uhranjenih i gojaznih žena sa PCOS.
24. Poređenjem žena sa PCOS u zavisnosti od veličine LDL čestica utvrdili smo da je kod žena sa malim LDL česticama ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama bio značajno viši, a ukupan udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama bio značajno niži nego kod žena koje imaju LDL čestice većeg dijametra.
25. Korelaciona analiza između udela PON1 na HDL subfrakcijama i markera OS kod žena sa PCOS pokazala je da je aktivnost PON1 u serumu u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 2 subfrakcijama, a u negativnoj korelaciji sa ukupnim udelom PON1 na HDL 3 subfrakcijama. Viši ukupan udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama korelirao je sa višim nivoima TAS i TOS,

a nižim nivoima PAB, dok je viši ukupan udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama bio u korelaciji sa višim koncentracijama ukupnih SH-grupa.

26. Svi pojedinačni skorovi (oksidativno-stresni skor i skorovi dislipidemije i inflamacije) su imali značajno višu vrednost kod žena sa PCOS u odnosu na KG. Kao rezultat toga i DOI skor je bio značajno veći kod njih u odnosu na KG, što ukazuje na značaj ovog rezultata u proceni kardiometaboličkog rizika kod žena sa PCOS.
27. Gojaznost, lipidni i parametri OS utiču na vrednosti skorova kod žena sa PCOS. Nezavisni prediktori oksidativno-stresnog skora su ukupni holesterol (pozitivna korelacija) i HDL-H (negativna korelacija), skora inflamacije su ITM i MDA (oba sa pozitivnom korelacijom), skora dislipidemije su ITM, AOPP i MDA (pozitivna korelacija) i TOS (negativna korelacija).
28. Prekomerno teške i gojazne žene sa PCOS imaju značajno više vrednosti skorova dislipidemije i inflamacije, kao i DOI skora u odnosu na normalno uhranjene žene.
29. Oksidativno-stresni skor i DOI skor imaju izuzetne diskriminativne sposobnosti da razdvoje žene sa PCOS od zdravih žena, odnosno predstavljaju indekse koji imaju dobru dijagnostičku tačnost za predviđanje kardiovaskularnog rizika kod žena sa PCOS.
30. Veličina dijametara LDL čestica značajno se smanjuje sa porastom KQRS, skora dislipidemije, prooksidativnog i oksidativno-stresnog skora kod žena sa PCOS. Udeli LDL II i LDL IV subfrakcija povećavaju se sa porastom skora dislipidemije, dok se sa porastom antioksidativnog skora povećava udeo LDL II, a smanjuje udeo LDL IV subfrakcija.
31. Dijametri HDL čestica i ukupni udeo HDL 2 subfrakcija značajno se smanjuju sa porastom KQRS i skora dislipidemije, dok se ukupni udeo HDL 3 subfrakcija povećava sa porastom KQRS, skora dislipidemije i DOI skora.
32. Ukupni udeo PON1 na HDL 2 subfrakcijama se povećava, dok se ukupni udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama smanjuje sa porastom antioksidativnog skora kod žena sa PCOS. Povećanje oksidativno-stresnog skora značajno povećava ukupni udeo PON1 na HDL 3 subfrakcijama.

7. LITERATURA

1. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger HM, Murad MH, Pasquali R, Welt CK. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin End Metab* 2013;98:4565-4592.
2. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine Rev* 2012;33:981-1030.
3. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774-800.
4. Vague J. Sexual differentiation, a factor affecting the forms of obesity. *Presse Méd* 1947;30:339-340.
5. Kahn CR, Fleu JS, Bar RS, Archers JA, Gorden P, Martin MM, et al. The syndromes of insulin resistance and acantosis nigricans. *N Engl J Med* 1976;294:739-745.
6. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Corellation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovary disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50:113-116.
7. Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK, et al. Relation of body fat distribution to metabolic complication of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:254-260.
8. Livadas S, Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovary syndrome: definitions, phenotypes and diagnostic approach. *Front Horm Res* 2013;40:1-21.
9. Conway GS, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, et al. The polycystic ovary syndrome: an endocrinological perspective from the European Society of Endocrinology. *Eur J Endocrinol* 2014;171:489-498.
10. Macut D, Bačević M, Božić-Antić I, Bjekić-Macut J, et. al. Predictors of subclinical cardiovascular disease in women with PCOS: interrelationship of dyslipidemia and arterial blood pressure, *Int J Endocrinol*, 2015;2015:1-9.
11. Macut D, Bjekić-Macut J, Savić-Radojević A. Dyslipidemia and oxidative stress in PCOS. *Front Horm Res*, 2013;40:51-63.

12. Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:127-141.
13. Welt CK, Carmina E. Lifecycle of polycystic ovary syndrome (PCOS): from in utero to menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98: 4629-4638.
14. Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM. *Williams textbook of endocrinology* 12th edition. Elsevier Saunders 2011;622-632.
15. Legro RS, Kunesman AR, Demers L, Wang SC, Bently-Lewis R, Dunaif A. Elevated dehydroepiandrosterone sulphate levels as the reproductive phenotype in the brothers of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol of Metab* 2002;87:2134-2138.
16. Sam S, Sung YA, Legro RS, Dunaif A. Evidence for pancreatic B cell dysfunction in brothers of women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 2008;57:84-89.
17. Franks S, McCarthy M, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl* 2006;29:278-285.
18. Urbanek M. The genetics of the polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metabol* 2007;3:103-111.
19. Xita N, Tsatsoulis A. Review: Fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006;91:1660-1666.
20. Franks S, Berga SL. Does PCOS have developmental origins? *Fertil Steril* 2012;97:2-6.
21. Abbott DH, Bacha F. Ontogeny of polycystic ovary syndrome and insulin resistance in utero and early childhood. *Fertil Steril* 2013;100:2-11.
22. Barra R, Cruz G, Mayerhofer A, Paredes A, Lara HE. Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of offspring. *Reproduction* 2014;148:137-145.
23. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, McAllister JM. Human ovarian theca cells in culture. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:65-71.
24. Dumesic DA, Richards JS. Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2013;100:23-38.

25. Hoang YD, McTavish KJ, Chang RJ, Shimasaki S. Paracrine regulation of theca androgen production by granulosa cells in the ovary. *Fertil Steril* 2013;100:561-567.
26. Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Mol Med* 2006;12:324-332.
27. Rice S, Christoforidis N, Gadd C, et al. Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 2005;20:373-381.
28. Dunaif A, Wu X, Lee A, Diamanti-Kandarakis E. Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:392-399.
29. Webber LJ, Stubbs S, Stark J, et al. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet* 2003;362:1017-1021.
30. Conway GS, Honour JW, Jacobs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989;30:459-470.
31. Arroyo A, Laughlin GA, Morales AJ, Yen SS. Inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome: influence of adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3728-3733.
32. Zawadzki A, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Merriam G eds. *Polycystic ovary syndrome*. Blackwell Scientific Publications 1992;377-384.
33. Polson DW, Adams J, Wadsworth J, Franks S. Polycystic ovaries--a common finding in normal women. *Lancet* 1988;1:870-872.
34. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;19:41-47.
35. Cussons AJ, Stuckey BG, Walsh JP, Burke V, Norman RJ. Polycystic ovarian syndrome: marked differences between endocrinologists and gynaecologists in diagnosis and management. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:289-295.

36. Rosen MP, Cedars MI. Female reproductive endocrinology and infertility. In: Gardner DG, Shoback D, eds. Greenspan's basic and clinical endocrinology 9th ed. The McGraw-Hill Companies Inc 2011;445-452.
37. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4237-4245.
38. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* 2009;91:456-488.
39. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961;21:1440-1447.
40. Yildiz BO, Bolour S, Woods K, Moore A, Azziz R. Visually scoring hirsutism. *Hum Reprod Update* 2010;16:51-64.
41. Endoh A, Kristiansen SB, Casson RP, Buster JE, Hornsby PJ. The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex, resulting from its low expression of 3-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;78:113-118.
42. Davison SL, Bell R, Donath S, Montalto JG, and Davis SR. Androgen levels in adult females: changes with age, menopause, and oophorectomy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3847-3853.
43. Stanczyk FZ. Diagnosis of hyperandrogenism: biochemical criteria. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:177-191.
44. Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, Kelestimur F, Macut D, Micic D, Pasquali R, Pfeifer M, Pignatelli D, Pugeat M, Yildiz BO, ESE PCOS Special Interest Group. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *Eur J Endocrinol* 2014;171:1-29.
45. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:405-413.

46. Rosner W, Vesper H. Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4542-4548.
47. Haring R, Hannemann A, John U, Radke D, Nauck M, Wallaschofski H, Owen L, Adaway J, Keevil BG, Brabant G. Age-specific reference ranges for serum testosterone and androstenedione concentrations in women measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:408-415.
48. Vicente FB, Smith FA, Sierra R, Wang S. Measurement of serum testosterone using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:70-75.
49. Bhasin S, Jasjua GK, Pencina M, D'Agostino R Sr, Coviello AD, Vasani RS, Travison TG. Sex hormone-binding globulin, but not testosterone, is associated prospectively and independently with incident metabolic syndrome in men: the Framingham Heart Study. *Diab Care* 2011;34:2464-2470.
50. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3666-3672.
51. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2027-2037.
52. Derksen J, Nagesser SK, Meinders AE, Haak HR, van de Velde CJ. Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women. *New Engl J Med* 1994;331:968-973.
53. Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JC, Eijkemans MJ, Fauser BC. PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: change in prevalence among WHO II anovulation and association with metabolic factors. *BJOG* 2006;113:1210-1217.
54. Ardaens Y, Robert Y, Lemaître L, Fossati P, Dewailly D. Polycystic ovarian disease: contribution of vaginal endosonography and reassessment of ultrasonic diagnosis. *Fertil Steril* 1991;55:1062-1068.
55. Diamanti-Kandarakis E, Panidis D. Unravelling the phenotypic map of polycystic ovary syndrome (PCOS): a prospective study of 634 women with PCOS. *Clin Endocrinol* 2007;67:735-742.

56. Malcolm CE, Cumming DC. Does anovulation exist in eumenorrhic women? *Obstet Gynecol* 2003;102:317-318.
57. Johnstone EB, Rosen MP, Neril R, Trevithick D, Sternfeld B, Murphy R, Addauan-Andersen C, McConnell D, Pera RR, Cedars MI. The polycystic ovary post-Rotterdam: a common, age-dependent finding in ovulatory women without metabolic significance. *Jl Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4965-4972.
58. Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, Duhamel A, Catteau-Jonard S. Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod* 2011;26:3123-3129.
59. Lujan ME, Jarrett BY, Brooks ED, Reines JK, Peppin AK, Muhn N, Haider E, Pierson RA, Chizen DR. Updated ultrasound criteria for polycystic ovary syndrome: reliable thresholds for elevated follicle population and ovarian volume. *Hum Reprod* 2013;28:1361-1368.
60. World Health Organisation. Global health observatory data, mortality and morbidity, cardiovascular diseases [04.09.2016.].
61. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“. Incidencija i mortalitet od akutnog koronarnog sindroma u Srbiji. Izveštaj br.9;2014.
62. Murri M, Luque-Ramirez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Hum Repr Update* 2013;19:268-288.
63. Duleba AJ, Dokras A. Is PCOS an inflammatory process? *Fertil Steril* 2012;97:7-12.
64. Iftikhar S, Collazo-Clavell ML, Roger VL, St Sauver J, Brown RD Jr, Cha S, Rhodes DJ. Risk of cardiovascular events in patients with polycystic ovary syndrome. *Neth J Med* 2012;70:74-80.
65. McMahan CA, Gidding SS, Fayad ZA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC Jr. Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. *Arch Intern Med* 2005;165:883-890.
66. Studen KB, Sever MJ, Pfeifer M. Cardiovascular risk and subclinical cardiovascular disease in polycystic ovary syndrome. *Front Horm Res* 2013;40:64-82.

67. Lim SS, Norman RJ, Davies MJ, Moran LJ. The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2013;14:95-109.
68. Evans DJ, Hoffmann RG, Kalkhoff RK, Kissebah AH. Relationship of androgenic activity to body fat topography, fat cell morphology and metabolic aberrations in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:304-310.
69. Yildiz BO. Polycystic ovary syndrome: is obesity a symptom? *Women's Health* 2013;9:505-507.
70. Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Ann Rev Pathol* 2007;2:31-56.
71. Manneras-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, et al. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metabol* 2011;96:304-311.
72. Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction* 2015;149:219-227.
73. Repaci A, Gambineri A, Pasquali R. The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Molec Cellul Endocrinol* 2011;15:30-41.
74. Xu XF, De Pergola G, Björntorp P. Testosterone increases lipolysis and the number of beta-adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrinology* 1991;128:379-382.
75. Salvado L, Palomer E, Barroso E, Vazquez- Carrera M. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:438-448.
76. Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med* 1985;36:429-451.
77. Conway GS, Jacobs HS, Holly JM, et al. Effects of luteinizing hormone, insulin, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor small binding protein 1 in the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990;33:593-603.
78. Macut D, Pfeifer M, Yildiz BO, Diamanti-Kandarakis E, editors. Polycystic ovary syndrome: novel insights into causes and therapy. *Front Horm Res* 2013;40:64-82.

79. Kelly CJ, Speirs A, Gould GW, Petrie JR, Lyall H, Connell JM. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:742-746.
80. Kim J, Montagnani M, Kon Koh K, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113:1888-1904.
81. Diamanti-Kandarakis E, Spina G, Kouli C, Migdalis I. Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4666-4673.
82. Papalou O, Victor VM, Diamanti-Kandarakis E. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome. *Curr Pharm Design* 2016;22:1-14.
83. Legro RS, Kusanman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med* 2001;111:607-613.
84. Macut D, Panidis D, Glisic B, et al. Lipid and lipoprotein profile in women with polycystic ovary syndrome. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86:199-204.
85. Dejager S, Pichard C, Giral P, Bruckert E, Federspiel MC, Beucler I, Turpin G. Smaller LDL particle size in women with polycystic ovary syndrome compared to control. *Clin Endocrinol* 2001;54:455-462.
86. Valkenburg O, Steegers-Theunissen RP, Smedts HP, Dallinga-Thie GM, Fauser BC, Westerveld EH, Laven JS. A more atherogenic serum lipoprotein profile is present in women with polycystic ovary syndrome: a case-control study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:470-476.
87. Pirwany IR, Fleming R, Greer IA, Packard CJ, Sattar N. Lipids and lipoprotein subfractions in women with PCOS: relationship to metabolic and endocrine parameters. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;54:447-453.
88. Macut D, Damjanovic S, Panidis D, et al. Oxidised low-density lipoprotein concentration - early marker of an altered lipid metabolism in young women with PCOS. *Eur J Endocrinol* 2006;155:131-136.
89. Li H, Horke S, Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014;237:208-219.

90. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-247.
91. Hyderali BN, Mala K. Oxidative stress and cardiovascular complications in polycystic ovarian syndrome. *Eur J Obstetrics, Gynecol, Reprod Biol* 2015;191:15-22.
92. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 2011;194:7-15.
93. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *The review of diabetic studies* 2010;7:15-25.
94. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod update* 1998;4:3-24.
95. Kuscu NK, Var A. Oxidative stress but not endothelial dysfunction exists in non-obese, young group of patients with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol* 2009;88:612-617.
96. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:49-80.
97. Nasiri N, Moini P, Eftekhari-Yazdi P, et al. Abdominal obesity can induce both systemic and follicular fluid oxidative stress independent from polycystic ovary syndrome. *Eur J of Obst Gyn and Repr Biol* 2015;184:112-116.
98. Savic-Radojevic A, Bozic Antic I, Coric V, Bjekic-Macut J, Radic T, Zarkovic M, Djukic T, Pljesa-Ercegovac M, Panidis D, Katsikis I, Simic T, Macut D. Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on glutathione peroxidase activity in non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Horm* 2015;14:101-108.
99. Lee JY, Baw C, Gupta S, Aziz N, Agarwal A. Role of oxidative stress in polycystic ovary syndrome. *Current Women's Health Reviews* 2010;6:96-107.
100. Gonzalez F, Sia CL, Shepard MK, Rote NS, Minium J. Hyperglycemia-induced oxidative stress is independent of excess abdominal adiposity in normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2012;27:3560-3568.
101. Gonzalez F, Rote NS, Minium J, et al. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:336-340.

102. Gonzalez F, Nair KS, Daniels JK, Basal E, Schimke JM, Blair HE. Hyperandrogenism sensitizes leukocytes to hyperglycemia to promote oxidative stress in lean reproductive-age women. *J Clin Endocrinol Metabol* 2012;97:2836-2843.
103. Zuo T, Zhu M, Xu W. Roles of oxidative stress in polycystic ovary syndrome and cancers. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:1-14.
104. Kandasamy S, Sivagamasundari RI, Bupathy A, et al. Evaluation of insulin resistance and oxidative stress in obese patients with polycystic ovary syndrome. *Int J Appl Biol Pharm Technol* 2010;1:391-398.
105. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285-1295.
106. Alanbay I, Ercan CM, Sakinci M, Coksuer H, Ozturk M, Tapan S. A macrophage activation marker chitotriosidase in women with PCOS: does low-grade chronic inflammation in PCOS relate to PCOS itself or obesity? *Arch Gyn Obst* 2012;286:1065-1071.
107. Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Kalimanovska-Ostic D, Jelić-Ivanovic Z, Zunic G. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Bio* 2007;40:181-187.
108. Hulsmans M, Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2010;14:70-78.
109. Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Alexandraki K, et al. Indices of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin. *Hum Reprod* 2006;21:1426-1431.
110. Fenkci IV, Serteser M, Fenkci S, Kose S. Paraoxonase levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Reprod Med* 2007;52:879-883.
111. Rozenberg O, Aviram M. S-Glutathionylation regulates HDL-associated paraoxonase 1 (PON1) activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:492-498.
112. Rainwater DL, Moore PH Jr, Shelledy WR, Dyer TD, Slifer SH. Characterization of a composite gradient gel for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res* 1997;38:1261-1266.

113. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular prevention. *Eur J Int Med* 2006;17:77-80.
114. Berneis K, Rizzo M, Hersberger M, et al. Atherogenic forms of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Int J Clin Pract* 2009;63:56-62.
115. Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, et al. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis* 1994;106:241-253.
116. Phelan N, O'Connor A, Kyaw-Tun T, Correia N, Boran G, Roche HM, Gibney J. Lipoprotein subclass patterns in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) compared with equally insulin-resistant women without PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3933-3939.
117. Berneis K, Rizzo M, Lazzarini V, Fruzzetti F, Carmina E. Atherogenic lipoprotein phenotype and low-density lipoproteins size and subclasses in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin End Met* 2007;92:186-189.
118. Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med* 2010;8:41-51.
119. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2000;43:1363-1379.
120. Blanche PJ, Gon EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981;665:408-419.
121. Vekic J, Kotur-Stevuljević J, Jelić-Ivanović Z, Spasić S, Spasojević-Kalimanovska V, Topić A, Zeljković A, Stefanović A, Žunić G. Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Invest* 2007;37:715-723.
122. Calabresi L, Franceschini G, Jonas A. Lecithin: cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins, and atheroprotection in humans. *Trends Cardiovasc Med* 2010;20:50-53.
123. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2011;17:594-603.

124. Steinberger J, Daniels SR. Obesity, insulin resistance, diabetes and cardiovascular risk in children: an American Heart Association scientific statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and the Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). *Circulation* 2003;107:1448-1453.
125. Mueller O, Chang E, Deng D, Franz T, Jing D, Kincaid R, Konigshofer Y, et al. PROCAM study: risk prediction for myocardial infarction using microfluidic high-density lipoprotein (HDL) subfractionation is independent of HDL cholesterol. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:490-498.
126. Watanabe H, Soderlund S, Soro-Paavonen A, Hiukka A, Leinonen E, Alagona C, Salonen R, et al. Decreased high-density lipoprotein (HDL) particle size, prebeta-, and large HDL subspecies concentration in Finnish low-HDL families: relationship with intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:897-902.
127. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006;58:342-374.
128. Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010;208:3-9.
129. Mackness M, Mackness B. Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:829-837.
130. Deakin S, Moren X, James RW. Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells. *Atherosclerosis* 2005;179:17-25.
131. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 2005;180:55-61.
132. Kotur-Stevuljević J, Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. PON1 status is influenced by oxidative stress and inflammation in coronary heart disease patients. *Clin Biochem* 2008;41:1067-1073.
133. Aviram M, Vaya J. Paraoxonase 1 activities, regulation, and interactions with atherosclerotic lesion. *Curr Opin Lipidol* 2013;24:339-344.

134. Rosenblat M, Volkova N, Ward J, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) inhibits monocyte-to-macrophage differentiation. *Atherosclerosis* 2011;219:49-56.
135. Gugliucci A, Caccavello R, Kotani K, Sakane N, Kimura S. Enzymatic assessment of paraoxonase 1 activity on HDL subclasses: a practical zymogram method to assess HDL function. *Clin Chim Acta* 2013;415:162-168.
136. Dokras A. Cardiovascular disease risk in women with PCOS. *Steroids* 2013;78:773-776.
137. Lonardo A, Sookoian S, Pirola CJ, Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metabolism* 2015;65:1136-1150.
138. Cerda C, Pérez-Ayuso RM, Riquelme A, Soza A, Villaseca P, Sir-Petermann T, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *J Hepatology* 2007;47:412-417.
139. Hwang JH, Stein DT, Barzilai N, Cui MH, Tonelli J, Kishore P, et al. Increased intrahepatic triglyceride is associated with peripheral insulin resistance: in vivo MR imaging and spectroscopy studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:1663-1669.
140. World Gastroenterology Organization Global Guidelines. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. World Gastroenterology Organization 2012.
141. Obika M, Noguchi H. Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012:1-12.
142. Sert A, Pirgon O, Aypar E, Yilmaz H, Dündar B. Relationship between aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index and carotida intima-media thickness in obese adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;5:182-188.
143. Lee JH, Kim D, Kim HJ, Lee CH, Yang JI, Kim W, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2010;42:503-508.
144. Xiang S, Hua F, Chen L, Tang Y, Jiang X, Liu Z. Lipid accumulation product is related to metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2013;121:115-118.

145. Parikh RM, Joshi SR, Menon PS, Shah NS. Index of central obesity - a novel parameter. *Med Hypotheses* 2007;68:1272-1275.
146. Joham AE, Boyle JA, Zoungas S, Teede HJ. Hypertension in reproductive-aged women with polycystic ovary syndrome and association with obesity. *Am J Hypertens* 2015;28:847-851.
147. Bentley-Lewis R, Seely E, Dunaif A. Ovarian hypertension: polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011;40:433-452.
148. Cascella T, Palomba S, Tauchmanova L, et al. Serum aldosterone concentration and cardiovascular risk in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4395-4400.
149. National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-3421.
150. World Health Organization. World Health report 2002: reducing risks, promoting health life. WHO 2002.
151. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Milašinović G, editor. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje arterijske hipertenzije. Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova, 2012.
152. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem* 1990;36:15-19.
153. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304-1313.
154. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-1111.
155. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after

- antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem* 2007;40:248-254.
156. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991;31:32-35.
157. Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JB, Farina M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quím Nova* 2009;1:169-174.
158. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277-285.
159. Ellman GI. Tissue sulfhydryle groups. *Arc Biochem Biophys* 1959;82:70-77.
160. Berlich M, Menge S, Bruns I, Schmidt J, Schneider B, Krauss GJ. Coumarins give misleading absorbance with Ellman's reagent suggestive of thiol conjugates. *Analyst* 2002;127:333-336 .
161. Misra HP, Fridovich I. Chemistry and metabolism of substances of low molecular weight: the role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-3175.
162. Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999;9:745-753.
163. Monteiro T, Oliveira F, Fins A, Dias CG, Silveira CM, Pereira SA, Almeida MG. Assessment of human paraoxonase activity by electrochemistry: a simple and novel approach. *Anal Methods* 2016;8:8141-8146.
164. Veglia F, Cighetti G, De Franceschi M, Zingaro L, Boccotti L, Tremoli E, et al. Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index. *Biomarkers* 2006;11:562-573.
165. Rainwater DL, Moore PH, Gamboa IO. Improved method for making nondenaturing composite gradient gels for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res* 2004;45:773-775.

166. Vekic J, Topic A, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle-aged Serbian population. *Clin Biochem* 2007;40:310-316.
167. Fiamegos Y, Stalikas C, Pilidis G. 4-Aminoantipyrine spectrophotometric method of phenol analysis: Study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection. *Anal Chim Acta* 2002;467:105-114.
168. Macut D, Simic T, Lissounov A, Pljesa-Ercegovac M, Bozic I, Djukic T, Bjekic-Macut J, Matic M, Petakov M, Suvakov S, Damjanovic S, Savic-Radojevic A. Insulin resistance in non-obese women with polycystic ovary syndrome: relation to byproducts of oxidative stress. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011;7:451-455.
169. Kaya C, Erkan AF, Cengiz SD, Dunder I, Demirel OE, Bilgihan A. Advanced oxidation protein products are increased in women with polycystic ovary syndrome: relationship with traditional and nontraditional cardiovascular risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2009;92:1372-1377.
170. Kurdoglu Z, Ozkol H, Tuluce Y, Koyuncu I. Oxidative status and its relation with insulin resistance in young non-obese women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2012;35:317-321.
171. Gourgari E, Lodish M, Shamburek R, Keil M, Wesley R, Walter M, Sampson M, Bernstein S, Khurana D, Lyssikatos C, Ten S, Dobs A, Remaley AT, Stratakis CA. Lipoprotein particles in adolescents and young women with PCOS provide insights into their cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:4291-4298.
172. Roe A, Hillman J, Butts S, Smith M, Rader D, Playford M, Mehta NN, Dokras A. Decreased cholesterol efflux capacity and atherogenic lipid profile in young women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:841-847.
173. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, Bandinelli S, Corsi AM, Giallauria F, et al. SHBG, sex hormones, and inflammatory markers in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1053-1059.
174. Ji X, Zhang B, Ying CM. Fibrinogen to be a laboratory screening biomarker for polycystic ovary syndrome (PCOS) patients: a Meta-analysis. *J Reprod Contracept* 2015;26:91-101.

175. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, et al. Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1994;61:455-460.
176. Pasquali R, Zanutti L, Fanelli F, Mezzullo M, Fazzini A, Morselli Labate AM, et al. Defining hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome: a challenging perspective. *J Clin End Met* 2016;101:2013-2022.
177. Wiegman A, Hutten BA, de Groot E, Rodenburg J, Bakker HD, Büller HR, et al. Efficacy and safety of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;292:331-337.
178. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, AHA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1512-1531.
179. Orio F Jr, Palomba S, Spinelli L, Cascella T, Tauchmanová L, Zullo F, et al. The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin End Met* 2003;89:3696-3701.
180. Bickerton AS, Clark N, Meeking D, Shaw KM, Crook M, Lumb P, et al. Cardiovascular risk in women with polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Clin Pathol* 2005;58:151-154.
181. Elting MW, Korsen TJ, Bezemer PD, Schoemaker J. Prevalence of diabetes mellitus, hypertension and cardiac complaints in a follow-up study of a Dutch PCOS population. *Hum Reprod* 2001;16:556-560.
182. Chen MJ, Yang WS, Yang JH, Chen CL, Ho HN, Yang YS. Relationship between androgen levels and blood pressure in young women with polycystic ovary syndrome. *Hypertension* 2007;49:1442-1447.
183. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin End Met* 2010;95:2038-2049.

184. Skafar DF, Xu R, Morales J, Ram J, Sowers JR. Female sex hormones and cardiovascular disease in women. *J Clin End Met* 1997;82:3913-3918.
185. Mendelsohn ME, Karas RH. The Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New Engl J Med* 1999;340:1801-1811.
186. Chu MC, Rath KM, Huie J, Taylor HS. Elevated basal FSH in normal cycling women is associated with unfavourable lipid levels and increased cardiovascular risk. *Hum Repr* 2003;18:1570-1573.
187. Goodarzi M, Carmina E, Azziz R. DHEA, DHEAS and PCOS. *J Ster Bioch* 2015;145:213-225.
188. Carmina E, Lobo RA. Prevalence and metabolic characteristics of adrenal androgen excess in hyperandrogenic women with different phenotype. *J End Invest* 2007;30:111-116.
189. Schaffrath G, Kische H, Gross S, Wallaschofski H, Völzke H, Dörr M, et al. Association of sex hormones with incident 10-year cardiovascular disease and mortality in women. *Maturitas* 2015;82:424-430.
190. Tziomalos K, Arthyros VG, Karagiannis A. Non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: pathogenesis and treatment options. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10:162-172.
191. Targher G, Solagna E, Tosi F, Castello R, Spiazzi G, Zoppini G, Muggeo M, Day CP, Moghetti P. Abnormal serum alanine aminotransferase levels are associated with impaired insulin sensitivity in young women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2009;32:695-700 .
192. Macut D, Tziomalos K, Božić-Antić I, Bjekić-Macut J, Katsikis I, Papadakis E, Andrić Z, Panidis D. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with insulin resistance and lipid accumulation product in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2016;31:1347-1353.
193. Kahn HS. The “lipid accumulation product“ performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. *BMC Cardiovasc Disord* 2005;5:26-36.
194. Wiltgen D, Benedetto IG, Mastella LS, Spritzer PM. Lipid accumulation product index: a reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *Hum Repr* 2009;24:1726-1731.

195. Wehr E, Gruber HJ, Giuliani A, Moller R, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. The lipid accumulation product is associated with impaired glucose tolerance in PCOS women. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:986-990.
196. Macut D, Bozic Antic I, Bjekic-Macut J, Panidis D, Tziomalos K, Vojnovic Milutinovic D, Stanojlovic O, Kastratovic-Kotlica B, Petakov M, Milic N. Lipid accumulation product is associated with metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Hormones* 2016;15:35-44.
197. Carmina E, Bucchieri S, Esposito A, Del Puente A, Mansueto P, Orio F, et al. Abdominal fat quantity and distribution in women with polycystic ovary syndrome and extent of its relation to insulin resistance. *JCEM* 2007;92:2500-2505.
198. Monami M, Bardini G, Lammana C, Pala L, Cresci B, Francesconi P, et al. Liver enzymes and risk of diabetes and cardiovascular disease: results of the Firenze Bagno a Ripoli (FIBAR) study. *Metabolism* 2008;57:387-392.
199. Talbott E, Clerici A, Berga SL, Kuller L, Guzick D, Detre K, et al. Adverse lipid and coronary heart disease risk profiles in young women with polycystic ovary syndrome: a result of a case-control study. *J Clin Epidemiol* 1998;51:415-422.
200. Macut D, Micić D, Cvijović G, Šumarac M, Kendereški A, Zorić S, et al. Cardiovascular risk in adolescent and young adult obese females with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14:1353-1359.
201. Glueck CJ, Morrison JA, Goldenberg N, Wang P. Coronary heart disease risk factors in adult premenopausal white women. *Metabolism* 2009;58:714-721.
202. Holte J, Bergh T, Berne C, Lithell H. Serum lipoprotein lipid profile in women with polycystic ovary syndrome: relation to anthropometric, endocrine and metabolic variables. *Clin Endocrinol* 1994;41:463-471.
203. Sidhwani S, Scoccia B, Sunghay S, Stephens-Archer CN, Mazzone T, Sam S. PCOS is associated with atherogenic changes in lipoprotein particle number and size independent of body weight. *Clin Endocrinol* 2011;75:76-82.
204. Kim JJ, Chae SJ, Choi YM, Hwang KR, Song SH, Yoon SH, et al. Atherogenic changes in low-density lipoprotein particle profiles were not observed in non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2013;28:1354-1360.
205. Wild RA, Rizzo M, Clifton S, Carmina E. Lipid levels in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2011;95:1073-1079.

206. Kim JJ, Choi YM. Dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 2013;56:137-142.
207. Attie AD, Scherer PE. Adipocyte metabolism and obesity. *J Lipid Research* 2009;50:395-399.
208. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, González F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril* 2011;95:1048-1058.
209. Boulman N, Levy Y, Leiba R, Shachar S. Increased C-reactive protein levels in the polycystic ovary syndrome: a marker of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2160-2165.
210. Heshmati N, Shahgheibi S, Nikkhoo B, Amini S, Abdi M. Association of prooxidant-antioxidant balance with clinical and laboratory parameters and its relation to different drug regimens in polycystic ovary syndrome women with normal BMI. *Indian J Clin Biochem* 2017;32:315-322.
211. Artimani T, Karimi J, Mehdizadeh M, Yavangi M, Khanlarzadeh E, Ghorbani M, et al. Evaluation of pro-oxidant/antioxidant balance (PAB) and its association with inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol Endocrinol* 2017;4:1-5.
212. Dursun P, Demirtas E, Bayrak A, Yarali H. Decreased serum paraoxonase 1 (PON1) activity: an additional risk factor for atherosclerotic heart disease in patients with PCOS? *Hum Reprod* 2006;21:104-108.
213. Baskol G, Aygen E, Erdem F, Caniklioglu A, Narin F, Sahin Y, Kaya T. Assessment of paraoxonase 1, xanthine oxidase and glutathione peroxidase activities, nitric oxide and thiol levels in women with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstetrica Gynecol Scandinavica* 2012;91:326-330.
214. Chen L, Xu WM, Zhang D. Association of abdominal obesity, insulin resistance, and oxidative stress in adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2014;102:1167-1174.
215. Marseglia L, D Angelo G, Manti S, Aversa S, Arrigo T, Reiter RJ, Gitto E. Oxidative stress in obesity: a critical component in human disease. *Int J Mol Sci* 2015;16:378-400.

216. Villa J, Pratley R. Adipose tissue dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Current Diabetes Reports* 2011;11:179-184.
217. Wu G, Cheserek MJ, Shi Y, Liu J, Wang L, Le G. Comparison of serum lipid and protein oxidation products levels in patients with different types of dyslipidemia. *Wei Sheng Yan Jiu* 2014;43:529-534.
218. Sam S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Obes Manag* 2007;3:69-73.
219. Rizzo M, Berneis K, Carmina E, Rini GB. How should we manage atherogenic dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome? *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:1-5.
220. Rizzo M, Berneis K. Lipid triad or atherogenic lipoprotein phenotype: a role in cardiovascular prevention? *J Atheroscler Thromb* 2005;12:237-239.
221. Rizzo M, Berneis K. The clinical relevance of low-density-lipoproteins size modulation by statins. *Cardiovasc Drug Ther* 2006;20:205-217.
222. James RW, Brulhart-Meynet MC, Lehmann T, Golay A. Lipoprotein distribution and composition in obesity: their association with central adiposity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:1115-1120.
223. Apridonidze T, Essah PA, Iuorno MJ, Nestler JE. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1929-1935.
224. Doi SA, Abbas JM, Parkinson L, Chakraborty J, Akanji AO. LDL species heterogeneity in the atherogenic dyslipidemia of polycystic ovary syndrome. *Am J Clin Pathol* 2008;129:802-810.
225. Chatrath H, Vuppalanchi R, Chalasani N. Dyslipidemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2012;32:22-29.
226. Lomonaco R, Chen J, Cusi K. An endocrine perspective of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ther Adv Endocrinol Metab* 2011;2:211-225.
227. DeFilippis AP, Blaha MJ, Martin SS, Reed RM, Jones SR, Nasir K, Blumenthal RS, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and serum lipoproteins: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2013;227:429-436.
228. Amor AJ, Pinyol M, Solà E, Catalan M, Cofán M, Herreras Z, Amigó N, Gilabert R, Sala-Vila A, Ros E, Ortega E. Relationship between noninvasive scores of

- nonalcoholic fatty liver disease and nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities: a focus on atherogenic dyslipidemia. *J Clin Lipidol* 2017;11:551-561.
229. Woudberg NJ, Pedretti S, Lecour S, Schulz R, Vuilleumier N, James RW, Frias MA, Pharmacological intervention to modulate HDL: What do we target? *Front Pharmacol* 2018;8:989-1005.
230. Hu W, Chen L, Mao S, Qiao J. A case-control study on reduced HDL2b in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2016;32:848-851.
231. Rosenson RS, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem* 2011;57:392-410.
232. Kim JY, Tfayli H, Michaliszyn SF, Lee S, Arslanian S. Distinguishing characteristics of metabolically healthy versus metabolically unhealthy obese adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2016;105:1603-1611.
233. Kontush A. HDL particle number and size as predictors of cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 2015;6:1-6.
234. Woudberg NJ, Goedecke JH, Blackhurst D, Frias M, James R, Opie LH, Lecour S, Association between ethnicity and obesity with high-density lipoprotein (HDL) function and subclass distribution. *Lipids Health Dis* 2016;15:1-11.
235. Liu A, Cardell J, Ariel D, Lamendola C, Abbasi F, Kim SH, Holmes TH, Tomasso V, Mojaddidi H, Grove K, Kushida CA, Reaven GM. Abnormalities of lipoprotein concentrations in obstructive sleep apnea are related to insulin resistance. *Sleep* 2015;38:793-799.
236. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, Joksic J, Sopic M, Gulan B, Janac J, Milosevic S. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis* 2015;241:192-198.
237. Gugliucci A, Menini T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta* 2015;439:5-13.

238. Musunuru K, Orho-Melander M, Caulfield MP, Li S, Salameh WA, Reitz RE, et al. Ion mobility analysis of lipoprotein subfractions identifies three independent axes of cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1975-1980.
239. Tian L, Li C, Liu Y, Chen Y, Fu M. The value and distribution of high-density lipoprotein subclass in patients with acute coronary syndrome. *PLoS One* 2014;9:1-8.
240. Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2014;103:341-349.
241. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:312-318.
242. Camont L, Lhomme M, Rached F, Le Goff W, Negre-Salvayre A, Salvayre R, et al. Small, dense high-density, lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:2715-2723.
243. Heinecke JW. The HDL, proteome: a marker - and perhaps mediator - of coronary artery disease. *J Lipid Res* 2009;50:167-171.
244. Heinecke JW. HDL's protein cargo: friend or foe in cardioprotection? *Circulation* 2013;127:868-869.
245. Marsche G, Saemann MD, Heinemann A, Holzer M. Inflammation alters HDL composition and function: implications for HDL-raising therapies. *Pharmacol Ther* 2013;137:341-351.
246. Gugliucci A. Activation of paraoxonase 1 is associated with HDL remodeling ex vivo. *Clin Chim Acta* 2014;429:38-45.
247. Huang Y, Wu Z, Riwanto M, Gao S, Levison BS, Gu X, et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest* 2013;123:3815-3828.
248. Shao B, Pennathur S, Heinecke JW. Myeloperoxidase targets apolipoprotein A-I, the major high density lipoprotein protein, for site-specific oxidation in human atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 2012;287:6375-6386.

249. Menini T, Heck C, Schulze J, de Mejia E, Gugliucci A. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in highdensity lipoprotein. *Planta Med* 2007;73:1141-1147.
250. Gugliucci A, Kinugasa E, Ogata H, Caccavello R, Kimura S. Activation of paraoxonase 1 after hemodialysis is associated with HDL remodeling and its increase in the HDL2 fraction and VLDL. *Clin Chim Acta* 2014;430:9-14.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Iva Perović Blagojević je rođena 17.09.1972. godine u Beogradu gde je završila osnovnu i srednju školu. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar upisala je 1991. godine, a diplomirala u martu 2000. godine sa prosečnom ocenom 9,47. Dobitnica je Nagrade fonda „Profesor Ivan Berkeš“ za Studenta generacije Farmaceutskog fakulteta – smer medicinska biohemija 2000. godine.

Pripravnički staž je obavila u Službi za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“, u Beogradu, gde je primljena u stalni radni odnos u junu 2000. godine. Specijalističke studije iz medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu završila je sa odličnim uspehom u februaru 2011. godine. Aprila 2011. godine postavljena je na mesto šefa Odseka biohemije u Službi za laboratorijsku dijagnostiku, KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“. U periodu od maja 2006. godine do marta 2008. godine honorarno je radila u RIA laboratoriji Instituta za ginekologiju i akušerstvo KCS. U toku 2007/2008. godine učestvovala je kao istraživač u CIBIS – ELD studiji koja je rađena u KBC-u „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“ u sklopu projekta koji je sprovodila Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Berlin (CHARITE – Universitätsmedizin Berlin).

Bila je organizator i predavač na dva kursa kontinuirane edukacije, „Novine u laboratorijskoj dijagnostici – mogućnosti odseka biohemije Službe za laboratorijsku dijagnostiku“ (april, 2013.god.) i „Hronična bolest bubrega – principi kliničko-laboratorijskog praćenja, faktori rizika i komplikacije“ (april, 2014.god.), održana u KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“. Održala je predavanje na 12. JUSK-u, maj 2016.god., na temu „Zašto treba biti akreditovan? Iskustvo Službe za laboratorijsku dijagnostiku KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje.“

Član Skupštine Komore biohemičara Srbije bila je u dva mandata (2006. – 2014. godine). Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije (DMBS). U aprilu 2016. godine izabrana je u IO DMBS. Doktorske akademske studije, modul - medicinska biohemija upisala je školske 2015/2016. godine.

Прилог 1

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ива Перовић Благојевић

Број индекса 39/15

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај редокс дисбаланса и инфламације на активност ензима параоксоназе 1 и његову дистрибуцију на липопротеинима високе густине у синдрому полицистичних јајника – ефекат на кардиоваскуларни ризик

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 08.06.2018.године

Ива Перовић Благојевић

Прилог 2

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Ива Перовић Благојевић

Број индекса 39/15

Студијски програм Докторске академске студије; модул: медицинска биохемија

Наслов рада Утицај редокс дисбаланса и инфламације на активност ензима
параоксоназе 1 и његову дистрибуцију на липопротеинима
високе густине у синдрому полицистичних јајника – ефекат на
кардиоваскуларни ризик

Ментор проф. др Светлана Игњатовић, проф. др Јелена Котур Стевуљевић

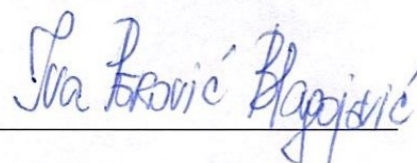
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 01.06.2018. године



Прилог 3

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај редокс дисбаланса и инфламације на активност ензима параоксоназе 1 и његову дистрибуцију на липопротеинима високе густине у синдрому полицистичних јајника – ефекат на кардиоваскуларни ризик

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

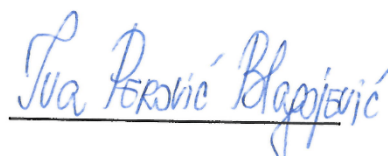
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 08.06.2018.године



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.