



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јован Д. Рудић

**Испитивање утицаја стандардизованог  
екстракта ароније на морфолошке  
карактеристике јајника, хормонски и  
оксидациони статус код пацова са  
синдромом полицистичних јајника**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Jovan D. Rudić

**Ispitivanje uticaja standardizovanog ekstrakta  
aronije na morfološke karakteristike jajnika,  
hormonski i oksidacioni status kod pacova sa  
sindromom policističnih jajnika**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2023. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Jovan D. Rudić

**Evaluation of the effect of standardized aronia  
extract on ovarian morphological characteristics,  
hormonal and oxidative status in rats with  
polycystic ovary syndrome**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Јован Рудић
Датум и место рођења: 6.11.1969. Бијело Поље, Црна Гора
Садашње запослење: Специјалиста гинекологије и акушерства, субспецијалиста гинеколошке онкологије, ГАК Народни фронт, Београд
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: Испитивање утицаја стандардизованог екстракта ароније на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника
Број страница: 111
Број слика: 56 слика, 3 табеле
Број библиографских података: 199
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): медицина
Ментор: Доктор медицинских наука, Јована Јоксимовић Јовић, доцент, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 16.01.2020.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: Одлука број 01-4863/16-10 од 24.06.2020. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата: 1. Проф. др. Марина Томовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник 2. Проф. др. Александра Димитријевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан 3. НС Верица Милошевић, научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, члан
Комисија за оцену и одбране докторске дисертације: 1. Проф. др. Марина Томовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник 2. Проф. др. Александра Димитријевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан 3. Проф. др. Саша Раичевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета Црне Горе за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан
Датум одбране дисертације:

<b>Autor</b>
Ime i prezime: Jovan Rudić
Datum i mesto rođenja: 6.11.1969. Bijelo Polje, Crna Gora
Sadašnje zaposlenje: Specijalista ginekologije I akušerstva, subspecijalista ginekološke onkologije
<b>Doktorska disertacija</b>
Naslov: Ispitivanje uticaja standardizovanog ekstrakta aronije na morfološke karakteristike jajnika, hormonski i oksidacioni status kod pacova sa sindromom policističnih jajnika
Broj stranica: 111
Broj slika: 56 slika, 3 tabele
Broj bibliografski podataka: 199
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): medicina
Mentor: Doktor medicinskih nauka, Jovana Joksimović Jović, docent, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
<b>Ocena I odbrana</b>
Datum prijave teme: 16.01.2020.
Broj odluke I datum prihvatanja teme doktorske disertacije: Odluka broj 01-4863/16-10 od 24.06.2020. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenost uslova kandidata: 1. Prof. dr. Marina Tomović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska tehnologija, predsednik 2. Prof. dr. Aleksandra Dimitrijević, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Ginekologija i akušerstvo, član 3. NS Verica Milošević, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: 1. Prof. dr. Marina Tomović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska tehnologija, predsednik 2. Prof. dr. Aleksandra Dimitrijević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Ginekologija i akušerstvo, član 3. Prof. dr. Saša Raičević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta Crne Gore za užu naučnu oblast Ginekologija i akušerstvo, član
Datum odbrane disertacije

<b>Author</b>
Name and surname: Jovan Rudić
Date and place of birth: 6.11.1969. Bijelo Polje, Crna Gora
Current employment: Specialist of Gynaecology and Obstetrics, subspecialist in Gynaecological oncology, The Obstetrics and Gynaecology Clinic Narodni Front, Belgrade
<b>Doctoral Dissertation</b>
Title: Evaluation of the effect of standardized aronia extract on ovarian morphological characteristics, hormonal and oxidative status in rats with polycystic ovary syndrome
No. of pages: 111
No. of images: 56 figures, 3 tables
No. of bibliographic data: 199
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac
Scientific area (UDK): medicine
<b>Mentor:</b> PhD, Jovana Joksimović Jović, Assistant Professor, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac
<b>Grade and Dissertation Defense</b>
Topic Application Date: 16.01.2020
Decision number and date of acceptance of the doctoral: Decision number 01-4863/16-10, date 24.06.2020.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. PhD Marina Tomović, Associate Professor at Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac for narrow scientific field Pharmaceutical technology, president 2. PhD Aleksandra Dimitrijević, Associate Professor at Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac for narrow scientific field Gynaecology and Obstetrics, member 3. PhD Verica Milošević, Scientific Advisor at Institute for Biological Research 'Siniša Stanković' University of Belgrade
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1. PhD Marina Tomović, Associate Professor at Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac for narrow scientific field Pharmaceutical technology, president 2. PhD Aleksandra Dimitrijević, Full Professor at Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac for narrow scientific field Gynaecology and Obstetrics, member 3. PhD Saša Raičević, Full Professor at Medical faculty University of Crna Gora for narrow scientific field Gynaecology and Obstetrics, member
Date of Dissertation Defense:

## Сажетак

Синдром полицистичних јајника (енгл. *Polycystic Ovary Syndrome* - PCOS) представља најчешћи ендокринолошки и метаболички поремећај жена репродуктивне доби и водећи узрок ановулаторног инфертилитета. Иако је последњих година доста разјашњено о патогенези, дијагнози, клиничким манифестацијама и терапији PCOS, још увек постоје многе недоумице и последичне неизвесности у избору терапијског приступа у клиничкој пракси. Метформин (МЕТ) је једна од првих терапијских опција за третман PCOS. Нежељени ефекти метформина се везују за гастроинтестиналне тегобе, које су некада разлог престанка употребе. Недавне студије сугеришу да комплементарни и алтернативни третмани, укључујући биљне лекове, могу ублажити симптоме PCOS. *Aronia Melanocarpa L.*, која се обично назива црна аронија, припада породици *Rosaceae*. Антиоксидативна активност црне ароније је препозната у многим студијама. Ови подаци су нас довели до идеје да истражимо потенцијалне предности примене стандардизованог екстракта ароније (САЕ) у дехидроепиандростероном-индукованом моделу PCOS код пацова. Такође, имали смо за циљ да истражимо синергистичке ефекте САЕ и МЕТ терапије у ублажавању репродуктивних и метаболичких абнормалности код PCOS. Наши налази су потврдили да је САЕ сам или у комбинацији са МЕТ био у стању да ублажи репродуктивне и метаболичке поремећаје у моделу PCOS пацова изазваног DHEA. Ефекат самостално примењеног САЕ није значајно утицао на ефекте МЕТ код PCOS. Потврђен је синергистички ефекат ова два агенса у већини процењених карактеристика PCOS. Ови резултати могу послужити као основа за даља клиничка испитивања у вези са применом САЕ код жена са PCOS како би се проценио посебан допринос овог екстракта репродуктивним и метаболичким профилима у овој популацији пацијената, посебно код оних са гојазним фенотипом PCOS.

Кључне речи: *Aronia Melanocarpa*; анимални модел; антиоксиданси; хидроепиандростерон; еструс; метформин; оксидативни стрес; синдром полицистичних јајника; пацови; тестостерон.

## Abstract

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is the most common endocrinological and metabolic disorder in reproductive age women, and it is the leading cause of anovulatory infertility. Although the pathogenesis, diagnosis, clinical manifestations and therapy of PCOS have been clarified in recent years, there are still many doubts and consequent uncertainties in the choice of therapeutic approach in clinical practice. Metformin (MET) is one of the first therapeutic options for the treatment of PCOS. Adverse effects of MET are related to gastrointestinal complaints, which are sometimes the reason for cessation of use. Recent studies suggest that complementary and alternative treatments, including herbal medicines, can alleviate PCOS symptoms. *Aronia Melanocarpa* L., commonly called black chokeberry, belongs to the Rosaceae family. The antioxidant activity of black chokeberry has been recognized in many studies. These data led us to the idea to investigate the potential benefits of using a standardized *Aronia* extract (SEA) in a dehydroepiandrosterone-induced PCOS model in rats. Also, we aimed to investigate the synergistic effects of SEA and MET therapy in alleviating reproductive and metabolic abnormalities in PCOS. Our findings confirmed that SAE alone or in combination with MET was able to alleviate reproductive and metabolic disorders in a DHEA-induced PCOS rat model. The effect of self-administered SAE did not significantly influence the effects of MET in PCOS. A synergistic effect of these two agents has been confirmed in most of the PCOS features assessed. These results may serve as a basis for further clinical trials regarding the use of SAE in women with PCOS to evaluate the specific contribution of this extract to reproductive and metabolic profiles in this patient population, especially those with an obese PCOS phenotype.

**Keywords:** *Aronia melanocarpa*; animal model; antioxidants; dehydroepiandrosterone; estrus; metformin; oxidative stress; polycystic ovary syndrome; rats; testosterone.



## Садржај

1. УВОД .....	1
1.1. Синдром полицистичних јајника ( <i>Polycystic Ovary Syndrome - PCOS</i> ) .....	2
1.1.1. Дефиниција PCOS и историјат .....	2
1.1.2. Епидемиологија .....	4
1.1.3. Етиологија PCOS .....	4
1.1.3.1. Генетски фактори .....	4
1.1.3.2. Епигенетика и PCOS .....	5
1.1.3.3. Интраутерина андрогенизација и PCOS .....	5
1.1.3.4. Токсини пореклом из окружења и PCOS .....	6
1.1.3.5. Исхрана као окидач за настанак PCOS .....	6
1.1.3.6. Социокономски фактори и PCOS .....	6
1.1.4. Патогенеза PCOS .....	7
1.1.4.1. Хиперандрогенемија и PCOS .....	7
1.1.4.2. Хиперинсулименија и PCOS .....	8
1.1.4.3. Молекулски механизми у основи патофизиологије PCOS .....	9
1.1.4.3.1. Оксидациони стрес (ОС) .....	9
1.1.4.3.2. Инфламација ниског степена .....	10
1.1.5. Клиничка презентација PCOS .....	10
1.1.5.1. PCOS и гојазност .....	11
1.1.5.2. PCOS и хипертензија .....	12
1.1.5.3. PCOS и кардиоваскуларни систем .....	12
1.1.5.4. PCOS и психа .....	13
1.1.5.5. PCOS и кожне промене .....	13
1.1.5.6. PCOS и трудноћа .....	13
1.1.6. Терапија PCOS .....	14
1.1.6.1. Промена стила живота, исхрана и физичка активност у третману PCOS .....	15
1.1.6.2. Метформин .....	16
1.1.6.3. Орални контрацептиви .....	18
1.1.6.4. Кломифен цитрат .....	18
1.1.6.5. Инозитоли .....	19
1.2. Анимални модели у истраживању PCOS и избор модела за индукцију PCOS код пацова ....	19

1.3. Фитотерапија PCOS .....	21
1.3.1. Aronia Melanocarpa L. ....	21
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА .....	23
2.1. Циљеви истраживања:.....	24
2.2. Хипотезе истраживања: .....	24
3.1. Принципи етичности којима се руководило у експерименталном раду.....	26
3.2. Набавка животиња и услови чувања животиња за време спровођења експерименталног протокола .....	26
3.3. Експерименталне групе.....	26
3.4. Третмани.....	27
3.4.1. Индукција PCOS код пацова .....	27
3.4.2. Третман PCOS пацова .....	28
3.5. Варијабле које се мере у студији .....	28
3.5.1. Антропометријски параметри .....	28
3.5.2. Цитолошка анализа вагиналног бриса .....	29
3.5.3. Прикупљање узорака крви и ткива за биохемијске и хистолошке анализе .....	29
3.5.3.1. Биохемијске анализе .....	29
3.5.3.1.1. Одређивање липидног статуса .....	29
3.5.3.1.2. Одређивање хормонског статуса .....	30
3.5.3.1.2.1. Одређивање концентрације тестостерона, естрадиола и прогестерона .....	30
3.5.3.1.2.2. Одређивање концентрације LH, FSH, Анти-Милеровог хормона (AMH) и инсулина .....	30
3.5.3.1.3. Одређивање параметара оксидативног стреса из крви и хомогената ткива јајника .....	31
3.5.3.1.3.1. Одређивање концентрације TBARS.....	31
3.5.3.1.3.2. Одређивање концентрације $O_2^-$ .....	31
3.5.3.1.3.3. Одређивање концентрације $H_2O_2$ .....	31
3.5.3.1.3.4. Одређивање концентрације $NO_2^-$ .....	31
3.5.3.1.3.5. Одређивање активности CAT.....	32
3.5.3.1.3.6. Одређивање активности SOD.....	32
3.5.3.1.3.7. Одређивање концентрације GSH .....	32
3.5.3.1.4. Одређивање параметара оксидативног стреса и AMH из ткива јајника.....	32
3.5.3.1.5. Одређивање концентрације протеина из крви и из хомогената ткива јајника ....	33
3.5.3.2. Хистолошка анализа јајника и утеруса .....	33

3.5.3.2.1. Припрема ткива за хистолошку анализу .....	33
3.5.3.2.2. Морфометријска анализа јајника .....	33
3.5.3.2.3. Морфометријска анализа утеруса .....	34
3.5.3.2.4. Имунохистохемијска анализа јајника .....	34
3.5.4. Ултразвуча анализа јајника .....	35
3.5.5. Орални тест оптерећења глукозом (ОГТТ).....	35
4. РЕЗУЛТАТИ.....	36
4.1. Потврда успешно индукованог модела PCOS код пацова .....	37
4.1.1. Испитивање промена у еструсном циклусу код пацова након петонедељног третмана DHEA.....	37
4.1.2. Испитивање промена у концентрацији тестостерона у серуму код пацова након петонедељног третмана DHEA.....	39
4.1.3. Испитивање хистолошких карактеристика (фоликуларних цисти и жутих тела) код пацова након петонедељног третмана DHEA.....	40
4.1.4. . Испитивање оксидационог статуса код пацова након петонедељног третмана DHEA..	42
4.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на карактеристике PCOS код пацова..	43
4.2.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на антропометријске параметре .....	43
4.2.1.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на телесну масу .....	43
4.2.1.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на финалну телесну масу .....	44
4.2.1.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на принос телесне масе.....	45
4.2.1.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на телесну дужину.....	46
4.2.1.5. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на индекс телесне масе (BMI).....	47
4.2.1.6. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на индекс телесних масти .....	48

4.2.1.7. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на масу оваријума .....	49
4.2.1.8. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на релативну масу оваријума .....	50
4.2.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на еструсни циклус .....	51
4.2.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на липидни статус .....	53
4.2.3.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ниво холестерола у серуму .....	53
4.2.3.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ниво триглицерида у серуму.....	54
4.2.3.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ниво липопотеина велике густине (HDL) у серуму .....	55
4.2.3.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ниво липопотеина ниске густине (LDL) у серуму .....	56
4.2.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на регулацију гликемије .....	57
4.2.4.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију глукозе током оралног теста оптерећења глукозом (ОГТТ) .....	57
4.2.4.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на површину испод криве гликемије анкон оралног теста оптерећења глукозом (ОГТТ).....	59
4.2.4.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију инсулина .....	60
4.2.5. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на хормонски статус .....	61
4.2.5.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности тестостерона у серуму .....	61

4.2.5.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности естрадиола у серуму .....	62
4.2.5.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности прогестерона у серуму .....	63
4.2.5.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности LH у серуму .....	64
4.2.5.5. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности FSH у серуму .....	65
4.2.5.6. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на LH/FSH однос .....	66
4.2.5.7. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности AMH у серуму .....	67
4.2.6. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на оксидациони стрес у крви .....	68
4.2.6.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију $O_2^-$ .....	68
4.2.6.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију $H_2O_2$ .....	69
4.2.6.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију TBARS .....	70
4.2.6.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију $NO_2^-$ .....	71
4.2.6.5. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на активност SOD .....	72
4.2.6.6. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на активност CAT .....	73

4.2.6.7. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију GSH.....	74
4.2.7. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на оксидациони стрес у ткиву јајника .....	75
4.2.7.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију TBARS у ткиву јајника.....	75
4.2.7.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на активност SOD у ткиву јајника .....	76
4.2.7.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на активност CAT у ткиву јајника .....	77
4.2.7.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију GSH у ткиву јајника .....	78
4.2.8. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на АМН у ткиву јајника .....	79
4.2.9. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ултразвучне карактеристике јајника.....	80
4.2.9.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на лонгитудинални дијаметар јајника (Д1) на крају експерименталног протокола .....	80
4.2.9.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на трансверзални дијаметар јајника (Д2) на крају експерименталног протокола.....	81
4.2.9.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на антерио-постериорни дијаметар јајника (Д3) на крају експерименталног протокола .....	82
4.2.9.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на волумен јајника на крају експерименталног протокола .....	83
4.2.9.5. Ултрасонографски приказ левог јајника након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на крају експерименталног протокола.....	84

4.2.10. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на хистолошке промене у ткиву јајника.....	86
4.2.10.1 Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на број цистичних фоликула у централном пресеку ткива јајника .....	90
4.2.10.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на број жутих тела у на централном пресеку ткива јајника .....	91
4.2.10.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на број примарних, секундарних и атретичних фоликула у ткива јајника .....	92
4.2.11. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на макроскопски изглед јајника .....	93
4.2.12. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на хистолошке промене у ткиву утеруса.....	94
4.2.12.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на висину луминалног епитела утеруса .....	95
4.2.12.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на дебљину ендометријума утеруса.....	96
4.2.13. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на инунореактивност АМРК у ткиву јајника.....	97
5. ДИСКУСИЈА .....	99
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	108
ЛИТЕРАТУРА.....	111

# **1. УВОД**



## 1.1. Синдром полицистичних јајника (*Polycystic Ovary Syndrome - PCOS*)

### 1.1.1. Дефиниција PCOS и историјат

Синдром полицистичних јајника (енгл. *Polycystic Ovary Syndrome - PCOS*) представља најчешћи ендокринолошки и метаболички поремећај жена репродуктивне доби, односно жена у пременопаузалном периоду (1, 2), и водећи узрок ановулаторног инфертилитета (3). Овај хетерогени поремећај представља скуп различитих симптома и знакова, пре свега репродуктивних, али и метаболичких, кардиоваскуларних, имунолошких, психогених, естетских, као и бројних других. Вишак андрогена и/или дисфункција оваријумске функције, у одсуству других дијагноза које оправдавају присуство ова два ентитета (конгенитална адренална хиперплазија; хиперпролактинемија, андроген-секретујуће неоплазме), указује на присуство PCOS. Осим у репродуктивном, PCOS се може дијагностиковати и у другим животним периодима жене. Постоје одређени докази који указују на постојање овог синдрома чак и у препуберталном, али и постменопаузалном периоду, испољеном кроз различите нерепродуктивне, придружене манифестације, које оправдавају озбиљност приступа у дијагнози и правовременој терапији PCOS и компликација које могу бити субклиничког или клиничког карактера. Од периода пре адолесценције па све до касне менопаузе, PCOS пацијенти имају шаренолику симптоматологију током животног века. Препуберталне манифестације су најчешће повезане са појавом превремене пубархе, док је у менопаузалној доби PCOS повезан са дијабетес мелитусом тип 2, и повећаним ризиком за настанак кардиоваскуларних болести (4).

Први пут описани од стране научника *Stein и Leventhal* (5) полицистични јајници су препознати код жена још давне 1935. године, због чега је овај синдром често називан и Штајн-Левенталов синдром. Ови научници су тада препознали жене које имају хирзутизам, аменореју и увећане јајнике са присуством бројних цисти. Од тог периода до данас, дефиниција PCOS, као и дијагностички критеријуми, су више пута разматрани и промењени. 1990. године су у 10. ревизији Интернационалне класификације болести, склероцистични синдром јајника и Штајн-Левенталов синдром представљени као синоними, када је и за дијагнозу овог синдрома било довољно да жена има неуредне менструалне циклусе и хирзутизам. Осим овог критеријума који је предложио Национални институт за здравље/Национални институт за здравље деце и људске болести (*NIH/NICHD*) (6), дијагностичке критеријуме за PCOS касније су понудиле још две групе: Европско друштво за хуману репродукцију и ембриологију/Америчко друштво за репродуктивну медицину (*ESHRE/ACPM*) (7) и Друштво за вишак андрогена и PCOS (8). Ови критеријуми су сажети у Табели 1. Данас је за дијагнозу PCOS најприхваћенији концензус из Ротердама од 2004. године (*ESHRE/ACPM*). Иако је још пре 1 деценију, 2012. године, предложено да се назив овог синдрома промени, обзиром да полицистична морфологија јајника није неопходна за његову дијагнозу, а сам назив семантички имплицира на обољење јајника, што је увелико превазиђено новијим научним сазнањима, до данас није предложен нов назив.

Ипак, постоје одређени недостаци ове класификације. Код адолесценткиња, после менархе циклуси су често неуредни, што онемогућава препознавање ентитета као што је

олиго/ановулација у овом периоду. Такође, у периоду адолесценције је често немогуће извршити ултразвучни преглед јајника трасвагиналном сондом. Раније претежно присутан код гојазних, PCOS се данас сматра поремећајем који могу имати и гојазне, али и жене нормалне телесне масе. PCOS код жена може бити присутан са или без полицистичне морфологије јајника, са или без хиперандрогенизма, са или без оваријалне дисфункције. Инсулинска резистенција и хиперинсулинемија нису укључене у оквир критеријума за дијагнозу, али често су присутне код PCOS пацијената (9), без обзира на телесну масу.

Интересантно је напоменути да су се од 2004. године до данас технике визуализације јајника сонографским техникама усавршиле, тако да је ранији критеријум за потврду полицистичне морфологије јајника био постојање 12 или више од 12 фоликула пречника 2-9 mm и/или волумен јајника већи од 10 cm<sup>3</sup>. Повећањем резолуције ултразвучне слике могуће је детектовати и мање фоликуле, тако да је коришћењем тродимензионалног ултразвука мерен средњи број фоликула по јајнику (више од 20.1, уз 100% специфичности и 70% сензитивности за дијагнозу PCOS), као и максимални број фоликула по једној сонографској равни (10, уз 100% специфичности и 90% сензитивности за дијагнозу PCOS). Уз поменуто, волумен јајника већи од 13 cm<sup>3</sup> представља новију инстанцу у дијагнози PCOS (10).

Узимајући у обзир хетерогеност клиничког испољавања овог поремећаја, јасно је да PCOS често буде непрепознат од стране лекара, а пацијент остаје без правовремене и тачне дијагнозе. Сматра се да од момента јављања лекару до постављања дијагнозе PCOS, једна трећина пацијената посети лекара специјалисту чак 3 пута у току 2 године (11) Комплексност овог мултиорганског поремећаја огледа се у још увек, недовољном познавању дефинитивних етиолошких фактора, патогенетских механизма, испољавању манифестација, као и некуративној, углавном симптоматској терапији.

Група	Напомена	Присутни симптоми и знаци		Потребно за дијагнозу	
<i>NIH/NICHD 1992</i>	Пре постављања дијагнозе PCOS искључити вишак андрогена другог порекла	1. Клинички или биохемијски хиперандрогенизам	2. Поремећај менстуационог циклуса	све	
<i>ESHRE/ASRM (Rotterdam criteria) 2004</i>		1. Клинички или биохемијски хиперандрогенизам	2. Олигоовулација / ановулација	3. Полицистични јајници	2 од 3
<i>Androgen Excess Society 2006</i>		Клинички или биохемијски хиперандрогенизам	Оваријална дисфункција и / или полицистични јајници		све

Табела 1. Дијагностички критеријуми за дијагнозу PCOS.

### 1.1.2. Епидемиологија

Из горе наведеног, јасно је да епидемиолошки подаци о PCOS варирају у односу на примењене дијагностичке критеријуме. Овај поремећај погађа 4-20% жена у репродуктивном периоду (12). Сматра се да се да је преваленција PCOS чак 2-3 пута већа када се примењују Ротердамски у односу на *NIH/NICHD* критеријуме. У светској популацији 1 од 10 жена има дијагнозу PCOS. 40% жена са PCOS има инфертилитет (3), док 90-95% жена које имају ановулаторни инфертилитет има дијагнозу PCOS.

Поред недоследности у дијагностичким протоколима, епидемиолошки подаци о PCOS су различити због присуства одређених недостатака спроведених студија, најчешће у методологији и дизајну студије (4). Такође, неуниформне смернице за регистровање олигоменореје, клиничког и биохемијског хиперандрогенизма утичу на селекцију PCOS, али и контролних пацијената који су укључени у студије. Самим тим није могуће направити валидна поређења студија и донети недвосмислене и јасне закључке. На пример, *NIH* критеријуми дефинишу овулаторну дисфункцију као мање од 6 циклуса годишње, што искључује PCOS дијагнозу код жена са регуларним циклусима, или оних са субклиничком овулаторном дисфункцијом. Поред тога, Ротердамски критеријуми не дају смернице за раздвајање хипоталамусне аменореје и полицистичне морфологије јајника од PCOS.

Недавна студија која представља систематски преглед литературе и мета-анализу, показала је да је учесталост основних клиничких карактеристика PCOS следећа: 15% за овулаторну дисфункцију; 13% за хирзутизам; 11% за биохемијски хиперандрогенизам; 28% за полицистичну морфологију јајника (13).

### 1.1.3. Етиологија PCOS

Хетерогени поремећај као што је PCOS подразумева постојање бројних етиолошких фактора који могу утицати на појаву и клиничку презентацију.

#### 1.1.3.1. Генетски фактори

Студије на сродницима и на близанцима показале су да је код PCOS заступљен аутозомно-доминантни образац наслеђивања (14). Аутозомно-доминантни образац наслеђивања испитиван код PCOS пацијената указује да је за наслеђивање полицистичне морфологије јајника и превременог губитка косматости као код мушкараца вероватно одговоран исти ген. Такође, сестре пацијената са PCOS имају увећане јајнике и повишене нивое андрогена у серуму као што су андростенедион и дехидроепиандростерон-сулфат (15). Са друге стране, постоје и студије које говоре у прилог томе да PCOS има олигогенску основу (16). Ипак, не може се рећи да постоје гени који су фундаментално повезани са PCOS, иако постоје охрабрујући подаци који издвајају неколико важних гена повезаних са PCOS (17). То су гени укључени у стероидогенезу на нивоу јајника и адреналних жлезда, гени

укључени у механизам дејства стероидних хормона, гени укључени у механизам дејства и регулацију гонадотропина, гени укључени у механизам дејства и секрецију инсулина, гени укључени у енергетску хомеостазу, као и хроничну инфламацију. Велика студија која је испитивала геном код различитих PCOS фенотипова - *Genome-wide association studies GWAS*, показала је да је ипак слична генетска основа заступљена код свих испитиваних испољених манифестација PCOS (18), издвајајући 16 гена који могу бити одговорни за фенотипско испољавање PCOS карактеристика. Интересантно је поменути да се потомство мајки које су имале дијагнозу PCOS, испољава различите манифестације у односу на пол. Тако, ћерке PCOS мајки имају репродуктивне (неуроендокрина дисфункција, хиперандрогенизам, полицистична морфологија јаника, хиперинсулинемија), док синови имају, али углавном метаболичке манифестације (липидни статус) (19, 20). Свакако врло значајни аспект се односи на кардиоваскуларне ризике, па се потомци PCOS жена морају са пажњом прегледати током детињства и касније током живота, како би се на време препознали фактори ризика и правовремено третирани у циљу смањења настанка будућих кардиоваскуларних догађаја (21).

Обзиром да се испитивањем генома не може објаснити већина фактора ризика за настанак PCOS, неопходно је укључити друге етиолошке чиниоце који могу бити одговорни за настанак PCOS, као што су епигенетски фактори и фактори окружења (интраутерина андогенизација).

#### 1.1.3.2. Епигенетика и PCOS

У последње време, све је више речи о епигенетици и њеном утицају на различита стања и болести. Уплив епигенетике у PCOS доживљава експанзију у научној литератури последњих година. Епигенетика се дефинише као скуп промена које настају изменама секвенци дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) и последичним преносом тако измењеног материјала на ћерке ћелије које настају митотским деобама. Оно што је интересантно јесте да те промене могу бити и реверзбиле, то јест да се у ћеркама ћелијама изгубе или модификују, што доводи до великих варијација од раног ембрионалног развоја до каснијег фенотипског испољавања различитих манифестација. Метилација ДНК, измене хроматина, некодирајуће рибонуклеинске киселине (*non-coding RNAs*), а нарочито мале *miRNA*, су само неки од епигенетских чинилаца које имају утицај на PCOS (22).

#### 1.1.3.3. Интраутерина андогенизација и PCOS

Обзиром да је хиперандрогенизам један од најизраженијих и најзаступљенијих карактеристика PCOS, труднице који су пре зачећа имале PCOS на рачун повишених вредности андрогена у циркулацији врше андогенизацију фетуса, што утиче на развој репродуктивних, метаболичких и психијатријских последица код потомства (23). Женски потомци PCOS трудница имају већу дужину аногениталне бразде, што говори о испољеном дејству пренаталне изложености повишеним нивоима андрогена (24). Поред тога, бројни

анимални модели у PCOS истраживањима управо користе пренаталну андрогенизацију мајке као средство за добијање PCOS код женских потомака (25). Студије на анималним моделима потврдиле су да је за репрограмирање осовине хипоталамус-хипофиза-оваријум (ХХО) неопходно деловање андрогена у такозваном „кључном прозору у развојном периоду“ (*key developmental window*) (26), што ће касније у животу довести до испољавања карактеристичних манифестација везаних за PCOS.

Сублимација два поменути етиолошка фактора доводи до епигенетског репрограмирања ембриона у развоју индукујући важне промене у геномским регионима који карактеришу фенотип PCOS. Овакав епигенетски "потпис" PCOS може бити одговоран за одржавање ендокриних и метаболичких дисфункција мајке на потомство (27).

#### 1.1.3.4. Токсини пореклом из окружења и PCOS

Хемијски загађивачи пореклом из окружења дефинишу се као токсини који могу имати негативан утицај на биолошке организме, на целокупно здравље људи, па и на репродуктивни систем. Познато је да загађивачи као што су дим цигарета, олово, жива, различити пестициди, имају негативне последице на репродуктивно здравље жена, на настанак PCOS и других поремећаја (28). Ове супстанце се називају и хемикалијама које нарушавају хомеостазу ендокриног система - *endocrine-disrupting chemicals (EDCs)*. Овакве супстанце, као и бројни отпадни продукти фармацеутских препарата, естрогени и фитостероли, могу бити присутни у окружењу и нарушавати репродуктивно здравље. Познато је да је бисфенол А, супстанца са одређеним нивоом естрогенске активности, одговорна за настанак PCOS (29).

#### 1.1.3.5 Исхрана као окидач за настанак PCOS

Исхрана се повезује са PCOS кроз утицај на, пре свега, метаболичке факторе, иако је преклапање репродуктивних и метаболичких поремећаја, којима је инсулинска резистенција заједнички именован, неизбежна. Постоје студије које су се бавиле испитивањем утицаја исхране на настанак PCOS, при чему није показано да повећан унос угљених хидрата доводи до промена нивоа тестостерона, анти-Милеровог хормона (АМН), као ни до хиперинсулинемије код жена које имају уредан менстациони циклус, немају историју PCOS или инфертилитета (30). Са друге стране, постоје и докази који упућују да је високи унос угљених хидрата кроз исхрану окидач за настанак PCOS (31), што се повезује и са метаболичким променама и патофизиологијом шећерне болести тип 2.

#### 1.1.3.6. Социоекономски фактори и PCOS

Низак социоекономски статус може бити повезан са настанком PCOS на више начина. Пре свега, лоше животне навике, које доводе до гојазности, могу бити активатори хормонских промена или генски условљених измена физиолошких процеса који се повезују са PCOS. Поред тога, познато је да ниска порођајна тежина може бити у корелацији са настанком PCOS у каснијој животној доби, што се, са друге стране, доводи у везу са феталним репрограмирањем о чему је било речи у ранијем тексту (28).

#### 1.1.4. Патогенеза PCOS

Иако деценијама уназад постоје велики напори да се ресветле патофизиолошки механизми који леже у основи PCOS, до данас није у потпуности дефинисано како долази до овог комплексног поремећаја код жена и како се он испољава у различитим облицима током животне доби.

##### 1.1.4.1. Хиперандрогенемија и PCOS

Вишак андрогена у организму жена представља кључну патофизиолошку инстанцу у PCOS. Овај поремећај, који се може јавити у облику хирзутизма (60-76%) или хиперандрогенизма (75-90%) PCOS пацијената (32). Најчешће се хиперандрогенизам испољава кроз повишене вредности слободног (невезаног) тестостерона у серуму, који испољава биолошка дејства. Овакве повишене вредности слободне фракције тестостерона негативно утичу на синтезу и секрецију глобулина који везује полне хормоне (*sex hormone-binding globulin* - SHBG) у јетри, што се одражава кроз снижене вредности SHBG у серуму код PCOS пацијената. Повишене вредности тестостерона изнад 5.2 nmol/L могу указивати на озбиљне облике хиперандрогенизма, као што су постојање андроген-секретујућих тумора или хипертекозе јајника (33).

Секреција андрогена се код жена одвија на нивоу јајника (25%) и на нивоу адреналних жлезда (25%) и на нивоу периферних ткива као што су јетра, кожа и масно ткиво (50%).

Да ли је примарни патофизиолошки догађај у патофизиологији PCOS јајник, хипофиза или хипоталамус, још увек остаје ствар дебате. Дефинитивно, ХХО осовина јесте поремећена и механизми негативне повратне спреге не функционишу као у физиолошким условима. Поред тога, хиперинсулинемија која је заједно са хиперандрогенизмом присутна у чак 60-90% случајева, директно и индиректно је повезана патофизиолошким процесима који леже у основи PCOS. Студије и клиничка пракса показују да су јајници код PCOS пацијената у могућности да одреагују овулацијом на повећање секреције фоликулостимулишућег хормона (FSH) узроковано применом кломифен-цитрата. Поред тога, код гојазних PCOS пацијената, редукција телесне масе доводи до нормализације нивоа инсулина и естрогена, као и гонадотропина, што доводи до нормализације менструационог циклуса. Из свега наведеног, закључује се да јајници ипак нису примарни чинилац у редоследу промена које наступају код PCOS пацијената.

Секреција андрогена на нивоу јајника се одвија на нивоу тека ћелија фоликула. Повећање серумског нивоа лутеинизирајућег хормона (LH) из хипофизе, које је условљено повећањем пулсатилности секреције гонадотропин-ослобађајућег хормона (GnRH), делује на тека ћелије фоликула јајника, које подлежу хиперплазији и појачано секретују тестостерон. Обзиром да постоји релативна инсуфицијенција у секрецији FSH на нивоу хипофизе, смањује се могућност матурације фоликула, а гранулоза ћелије фоликула јајника нису у могућности да изврше комплетну ароматизацију секретованог тестостерона од стране тека ћелија, тако да се укупна секреција тестостерона повећава (34). Тај повишен ниво тестостерона делује на хипоталамус и хипофизу, смањујући могућност естрогена и прогестерона да успоре фреквенцу пулсатилне секреције GnRH (35). Поремећена равнотежа између тестостерона, FSH и AMH доводе до немогућности селекције доминантног фоликула и до хроничне ановулације (36). AMH се секретује од стране гранулоза ћелија фоликула, и делује тако што спречава превођење примордијалних у примарне фоликуле. Самим тим се код PCOS налази већи број малих фоликула, чији је следствени развој блокиран, па се као резултат јавља карактеристична полицистична морфологија јајника (37). Заправо, повећан број антралних фоликула који постоји код PCOS пацијената, промовише даље регрутовање примарних фоликула, и повећава број гонадотропин-независних преантралних и малих антралних фоликула (38, 37). Обзиром да су андрогени рецептори у максималном проценту експримирани на преантралним фоликулима, јасно је да се дејства повишеног нивоа андрогена испољавају у раном стадијуму фоликулогенезе (39).

#### 1.1.4.2. Хиперинсулименија и PCOS

Хиперинсулинемија која постоји код PCOS пацијената доводи до смањења SHBG од стране јетре, али и до стимулације стварања тестостерона у тека ћелијама фоликула јајника и тако повећава ниво слободног тестостерона (40). Поред тога, високи нивои инсулина утичу на усходну регулацију LH рецептора на тека ћелијама, и на тај начин доводе до заостајања фоликула у расту (41).

Инсулинска резистенција се дефинише као немогућност периферних ткива да одговоре на дејство инсулина. Ипак ова резистенција је код PCOS пацијената селективна, и односи се пре свега на резистенцију скелетних мишића, јетре и масног ткива на дејство инсулина, док се сензитивност на дејство инсулина одржава у јајницима и надбубрежним жлездама. Оваква појава представља парадокс, обзиром да су ткива која секретују стероидне хормоне сензитивна на дејство инсулина, иако постоји резистенција на нивоу периферних ткива (42).

Инсулинска резистенција и хомпензаторна хиперинсулинемија постоје код великог броја жена са PCOS (43).

### 1.1.4.3. Молекулски механизми у основи патофизиологије PCOS

Неки од молекулских механизма који леже у основи патофизиолошких процеса када је реч о PCOS јесу оксидациони стрес (ОС) и инфламација ниског степена. Ови механизми се у великој мери преклапају, али се дидактички могу поделити како би се детаљније објаснила дејства појединачних фактора који заједно чине комплексну плејаду у мрежи патофизиолошких догађаја PCOS.

#### 1.1.4.3.1. Оксидациони стрес (ОС)

Слободне кисеоничке врсте (*reactive oxygen species* - ROS) се у физиолошким условима стварају у организму током ћелијског дисања, процесом који се назива оксидативна фосфорилација који се дешава у митохондријама. Такође, ROS се могу стварати у организму приликом дејства различитих нокси и негативно утицати на биолошке системе (44). Капацитет антиоксидативне заштите који постоји у организму довољан је да се избори са стварањем ROS у малој мери, како би заштитио ћелије од оштећења. Међутим, када капацитет антиоксидативних механизма није у могућности да елиминира велике количине ROS настаје оксидациони стрес. ОС представља неравнотежу између накупљања ROS (али и реактивних азотних врста - *reactive nitrogen species* - RNS ) и могућности антиоксидативног система заштите да елиминира ова једињења. На тај начин долази до оштећења макромолекула, протеина, нуклеинских киселина и липида који улазе у састав ћелијских мембрана. Ове молекулске промене утичу на целокупно здравље, па и на репродуктивни систем (45).

Анализом нивоа прооксидантних молекула у крви и ткивима, као што су малондиалдехид, азот моноксид, ксантиноксидаза, водоник пероксид, супероксид анјон радикал, као и нивоа антиоксидативних ензима као што су супероксид дисмутаза (*superoxide dismutase* - SOD) и каталаза (*catalase* - CAT), глутатион редуктаза, глутатион пероксидаза, долазимо до закључака да се ниво оксидационог стреса код PCOS пацијената повећава (46). Поред тога, студије на животињама којима се PCOS индукује различитим методама, показују да је ниво прооксиданаса код PCOS знатно већи у односу на контролне вредности, и да је антиоксидативни капацитет смањен (47).

ОС може бити условљен генетским факторима и факторима из околине. Уопштено, на терену ОС, PCOS се повезује са апоптозом ћелија која се покреће оштећењем митохондрија, али и тачкастим мутацијама гена које су повезане са метаболичким компликацијама (48). Затим, ОС може деловати на различите сигналне путеве који су важни за хомеостазу репродуктивног система, као што су NF $\kappa$ B и MAPK (49).

Индиректна потврда улоге ОС у патогенези PCOS добијена је позитивним резултатима примене различитих антиоксиданаса, као суплементана у третману PCOS пацијената (50), али и на анималним експерименталним моделима (51).



#### 1.1.4.3.2. Инфламација ниског степена

Инфламација ниског степена (*low grade inflammation* - LGI) се дефинише као пораст концентрације одређених параметара инфламације као одговор на штетне ноксе. Ти параметри су одређени проинфламаторни цитокини, као на пример фактор некрозе тумора  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$  – TNF- $\alpha$ ), интерлеукин-1, интерлеукин-6, С-реактивни протеин (CRP), али и класични параметри инфламације као што су брзина седиментације еритроцита или број леукоцита.

Студије су показале да је код PCOS пацијената заступљена инфламација ниског степена, анализирањем одређених параметара у крви тих пацијената. Тако је ниво CRP (52), TNF- $\alpha$  и неких проинфламаторних цитокина повишен код PCOS пацијената, док ове вредности корелирају са нивоом инсулина, андрогена и акумулацијом масног ткива, што је детаљно описано у чланку који је објављен од стране *Repaci* и сарадника, још 2011. године (53). Са једне стране ови медијатори могу настати као последица PCOS, током различитих патофизиолошких процеса, док са друге стране могу утицати на настанак PCOS. Тако је, на пример, показано да TNF- $\alpha$  може узроковати хиперплазију тека ћелија фоликула јајника и довести до повећања продукције тестостерона (54), али и деловати на смањење активности инсулинског рецептора, промовишући на тај начин инсулинску резистенцију (55).

Акумулација висцералног масног ткива, која настаје код PCOS, повезана је са инфламацијом ниског степена и са хиперинсулинемијом. Масно ткиво (висцерално, које је више метаболички активно, али и супкутано), са друге стране, као ендокрини орган, секретује прегршт медијатора, адипокина, који су укључени у патофизиологију PCOS (56), иако је доказано да се адипокини налазе у повишеној концентрацији и код негојазних PCOS пацијената (57), што свакако указује на комплексност механизма који су укључени у патолошке процесе PCOS.

#### 1.1.5. Клиничка презентација PCOS

Клиничка слика PCOS пацијената знатно варира од случаја до случаја, што је и утицало на то да многи су пацијенти остану непрепознати на време, неблагоприятно третирано, и у ризику за настанак озбиљних компликација.

На основу Ротердамских критеријума (Табела 1), који су најзаступљенији када је реч о дијагнози PCOS, разликујемо 4 фенотипа, који се добијају комбинацијом 3 клиничка ентитета. Фенотипови су названи словима абецедне: А, В, С, D (58):

- Фенотип А. Ултразвучно потврђена полицистична морфологија јајника, олиго/ановулација, хиперандрогенизам

- Фенотип В. Ултразвучно непотврђена полицистична морфологија јајника, олиго/ановулација, хиперандрогенизам

- Фенотип С. Ултразвучно потврђена полицистична морфологија јајника, уредни менструациони циклуси, хиперандрогенизам
- Фенотип D. Ултразвучно потврђена полицистична морфологија јајника, олиго/ановулација, без хиперандрогенизма.

Фенотипови А и В се називају „класичним“ PCOS. Они се карактеришу израженим поремећајима циклуса, које најчешће и доводе пацијенте лекару. Поред тога, код ових облика постоји изражена хиперинсулименија, дислипидемија, а нивои АМН су знатно повишени. Повећан је ризик од стеатозе јетре и метаболичког синдрома.

Фенотип С се повезује са блажим степеном хиперинсулименије, хиперандрогенемије и дислипидемије. Овај „овулаторни“ облик PCOS се углавном среће код пацијената вишег социоекономског статуса, што говори у прилог томе да навике у исхрани знатно утичу на образац по коме се дешава овулација код PCOS.

Фенотип D се карактерише нормалним нивоима андрогена, док су циклуси углавном уредни са повременим нерегуларностима. Најблажи облик метаболичких поремећаја и хормонског дисбаланса се среће код овог облика PCOS.

Иако је корисна, ова класификација није фаворизирана од стране бројних научника. По свему судећи, PCOS пацијентима је потребан индивидуални приступ, са опсежним разматрањем личне и породичне анамнезе, коморбидитета, фактора ризика, клиничких и субклиничких компликација, како би се на време откриле и превенирале ситуације које могу озбиљно угрозити здравље.

#### 1.1.5.1. PCOS и гојазност

Верује се да гојазност игра централну улогу у развоју PCOS јер се наводи да многе жене са овим стањем имају прекомерну тежину или гојазност. Постоји јака корелација између PCOS и гојазности. Фактори као што су инсулинска резистенција, хиперандрогенемија и дистрибуција телесне масти испитивани су код гојазних и негојазних PCOS пацијената. Већина студија није могла да утврди да ли је PCOS допринео гојазности или обрнуто. Гојазност може бити важан фактор за предвиђање PCOS. Код жена које су предиспониране за PCOS, метаболички и хормонски проблеми који су присутни, као што су инсулинска резистенција и хиперандрогенизам, могу довести до повећања телесне тежине и на крају гојазности. Гојазност заузврат може погоршати симптоме PCOS, као што су даљи метаболички проблеми и репродуктивне абнормалности (59). Постоје и механизми помоћу којих развој PCOS може допринети даљем повећању телесне тежине и ометати напоре да се успостави ефикасан губитак тежине (60). Већина коморбидитета повезаних са гојазношћу повезана је са кардиометаболичком дисфункцијом. Ово укључује развој стања као што су дијабетес мелитус типа 2, хипертензија, али и друге карактеристике метаболичког синдрома. Малигни тумори повезани са гојазношћу, као што је карцином ендометријума, такође су повезани са основном кардиометаболичком дисфункцијом, инсулинском резистенцијом и компензаторном хиперинсулинемијом (61).

PCOS и његови метаболички коморбидитети могу се објаснити ефектом зачараног круга. Хронични вишак андрогена пореклом из јајника и/или надбубрежне жлезде, који постоји чак и пренатално или настаје у раном периоду живота, доводи до повећања количине абдоминалног масног ткива и андрoидне гојазности код жена оболелих од PCOS (62). Абдоминална адипозност фаворизује хипоадипонектинемију и дисфункцију масног ткива, ослобађање инфламаторних медијатора, али и оксидативни стрес (63). Абдоминално масно ткиво подстиче настанак вишка андрогена директним одговором јајника и надбубрежних жлезда на инфламаторне медијаторе или индиректно развојем инсулинске резистенције и компензаторне хиперинсулинемије, обзиром да инсулин олакшава лучење андрогена од стране ових жлезда, чиме се зачарани круг затвара.

#### 1.1.5.2. PCOS и хипертензија

Приближно 40% PCOS пацијената има хипертензију, без обзира на присуство гојазности (64). Иако је гојазност независно повезана за хипертензијом, повишене вредности артеријског крвног притиска код PCOS пацијената нормалне телесне масе потврђују да се у овом случају гојазност може искључити као предиктор за настанак хипертензије (65). Такође, повишене вредности андрогена код PCOS жена корелирају са повећаном дебљином интима-медија слоја у крвним судовима срца, такође независно од присуства гојазности (66). Поред наведеног, повећана активност симпатикуса, која постоји код PCOS, може бити један од разлога за настанак хипертензије (67). На молекулском нивоу, једна од заједничких карактеристика PCOS и хипертензије, јесте ОС који се налази у основи патогенезе PCOS а повезан је са настанком хипертензије утичући на редок-зависну сигнализацију у крвним судовима (68). Индукција PCOS код женки пацова *Wistar Kyoto* соја доводи до повећања вредности систолног, средњег артеријског и пулсног крвног притиска, приближавајући их вредностима какве имају пацови са урођеном склоношћу за развој хипертензије (*Spontaneously hypertensive rats* – SHR). Интересантно, SHR женке имају донекле поремећену репродуктивну функцију (69, 70) (мању телесну масу, мањи број овулација, одложен пубертет, хормонски дисбаланс), као и повећану активност симпатикуса (71), што се све може довести у везу са променама које настају у PCOS.

#### 1.1.5.3. PCOS и кардиоваскуларни систем

PCOS пацијенти имају висок ризик од кардиоваскуларног морбидитета (72). Показано је да чак и млађе жене које имају PCOS имају компромитовану кардиоваскуларну функцију и повећан ризик за настанак инфаркта миокарда (73).

Студије на животињама показале су да се код индукције PCOS модела на пацовима као резултат добија поремећај активности азот моноксид синтазе и Na/K-АТПазе у ткиву срца (74). Индукцијом PCOS код пацова хроничном применом тестостерон-енантата, добијене су повишене вредности систолног и дијастолног притиска у левој комори на свим перфузионим притисцима у режиму ауторегулације на *Langendorff* апарату када се испитује

изоливано срце ретроградном перфузијом. Такође, параметри оксидационог стреса у крви, коронарном венском ефлуенту, као и у ткиву срца пацова којима је индукован PCOS су промењени у корист повећања прооксидантних параметара и смањења ензима антиоксидативне заштите. Кардиомиоцити су код ових пацова хипертрофисали за 8.3%, док је дебљина зида леве коморе била увећана 7.3% (75). Ове промене које су добијене након хроничне примене андрогена код женки пацова говоре у прилог томе да се овакав хормонски миље, који се може упоредити са хормонским променама код PCOS пацијената, може бити у основи развоја ризика за кардиоваскуларне догађаје.

#### 1.1.5.4. PCOS и психа

Висок проценат пацијената који болују од PCOS има неки од проблема везан за ментално здравље (76). Пацијенти који болују од PCOS доживљавају негативне социјалне, емоционалне, физичке и психолошке последице које утичу на квалитет живота и на целокупно здравље (77). Веома често ови пацијенти имају мањак самопоуздања, тешкоће у социјалним контактима, депресију, анксиозност, усамљеност, проблеме сексуалне природе. Поред тога, физичке карактеристике које су често удружене са дијагнозом PCOS, као што су гојазност, хирзутизам, акне, губитак косе, олигоовулаторни циклуси, доводе до нарушавања самопоуздања и последичних психолошких последица (78, 79).

#### 1.1.5.5. PCOS и кожне промене

Дерматолошке манифестације PCOS играју значајну улогу у дијагнози и чине значајан део симптома које доживљавају жене са овим синдромом (80). Кожне манифестације PCOS су у највећем проценту акне, затим хирзутизам, себореја, андрогена алопеција, *acanthosis nigricans* и акрохордони (81). Ове промене су свакако последица постојања хормонских промена, пре свега хиперандрогенизма и хиперинсулинемије, што потврђује системски, мултиоргански карактер PCOS и у складу са тим адекватни терапијски приступ који подразумева модификацију стила живота, исхране, као и друге нефармаколошке и фармаколошке агенсе.

#### 1.1.5.6. PCOS и трудноћа

PCOS пацијенти врло често током трудноће развијају гестацијски дијабетес мелитус (ГДМ), трудноћом-индуковану хипертензију или прееклампсију, претермински порођај и малу телесну масу за гестациону доб. Према подацима, ризик од побачаја код жена са PCOS је три пута већи него код здравих жена (82, 83).

Током трудноће долази до физиолошког смањења сензитивности на инсулин због ослобађања плацентних хормона. Ови хормони подстичу коришћење хранљивих материја

од стране фетуса, али с друге стране, инсулинска резистенција повезана са трудноћом је главни патогени механизам који води развоју ГДМ код предиспонираних жена, као што су PCOS пацијенти. Липидни профил је значајно измењен код трудница, а најизраженије разлике су уочене у повећаној концентрацији триглицерида, липопротеина ниске густине и смањеној концентрацији липопротеина високе густине (84). Све ове метаболичке промене доводе до повећања концентрације циркулишућих проинфламаторних цитокина у плазми, као што су фактор некрозе тумора  $\alpha$  и интерлеукин 6, уз смањење нивоа антиинфламаторних молекула у плазми као што су адипонектин и интерлеукин 10 (85). Штавише, прекомерна експресија инфламаторних медијатора, заједно са повећањем реактивних врста кисеоника, може довести до метаболичких промена и васкуларних болести и индуковати инхибицију сигналних путева у деловању инсулина, што резултује настанком инсулинске резистенције, смањеном експресијом инсулинских гена и последично, смањењем лучења инсулина од стране  $\beta$ -ћелија панкреаса и настанка ГДМ (86). У многим случајевима, ови фактори су већ присутни код жена са PCOS, па постаје јасно како је ова категорија трудница у већем ризику за настанак ГДМ.

Гестацијски хипертензивни поремећаји су водећи узроци морбидитета и морталитета мајки, утичући на 3-10% свих трудноћа, укључујући подгрупу трудноћа које резултирају прееклампсијом (87). Две велике мета-анализе откриле су два до четири пута повећану стопу хипертензије изазване трудноћом као и прееклампсије код жена са PCOS (88, 89), а велика студија широм земље спроведена у Шведској открила је да је PCOS повезан са 1,5 пута повећаном вероватноћом настанка прееклампсије, чак и након прилагођавања група према индексу телесне масе, паритету и употреби репродуктивне технологије у концепцији (90).

Из наведених чињеница јасно је да је PCOS код трудница озбиљан фактор ризика за настанак бројних перинатолошких компликација, исход трудноће, и здравље мајке и плода, што потенцира сврсисходност истраживања у овом пољу, са тенденцијом смањења перинаталног морбидитета и морталитета.

#### 1.1.6. Терапија PCOS

Иако је последњих година доста разјашњено о патогенези, дијагнози, клиничким манифестацијама и терапији PCOS, још увек постоје многе недоумице и последичне неизвесности у избору терапијског приступа у клиничкој пракси.

Лечење PCOS треба бити усмерено не само за ублажавање симптома, већ и на спречавање настанка дугорочних компликација. Комбиновани орални контрацептиви и антиандрогени представљају стандардне третмане за смањење нивоа андрогена и лечење симптома уз обезбеђивање заштите ендометријума. Међутим, терапијски план треба да буде прилагођен пацијенту у зависности од жеље пацијенткиње да затрудни, потребе за естетским приступом и присуства пратећих метаболичких промена.

Општи циљеви терапије жена са PCOS укључују ублажавање симптома хиперандрогенизма, метаболичке поремећаје, као и смањење фактора ризика за настанак дијабетеса мелитуса тип 2 и кардиоваскуларних болести. Не мање значајно, правовремено лечење PCOS обезбеђује и превенцију хиперплазије ендометријума, планирање и постизање

безбедне трудноће, али и побољшање општег стања пацијента. Самим тим долази до побољшања квалитета живота. Ипак, третман PCOS често није адекватно спроведен код великог броја пацијената, управо јер захтева мултидисциплинарни, али и персонализовани приступ. Поред тога, изостанак успеха често се доводи са прекидом терапије код пацијентиња због појаве нежељених ефеката медикамената (91). Са друге стране, велики број пацијената остаје непрепознат од стране лекара, због шаренолике клиничке презентације PCOS.

#### 1.1.6.1. Промена стила живота, исхрана и физичка активност у третману PCOS

Модификација понашања, у смислу повећања физичке активности и промена начина исхране, представља прву линију у терапији PCOS пацијената који су гојазни (92). Препорука је да се калоријски унос смањи, првенствено на рачун угљених хидрата и да се постепено повећава ниво физичке активности, а све у циљу смањења телесне масе. Обзиром да је централни проблем код ове популације пацијената репродуктивно здравље, недавно објављен преглед литературе са систематском мета-анализом података недвосмислено потврђује позитивне ефекте комбинованог третмана (физичка активност и исхрана) у односу на монотретман (физичка активност или исхрана) на репродуктивну функцију жена са PCOS (93). Овакав комбиновани приступ довео је до повећања регуларности менструационих циклуса, смањено вредност андрогена и инсулина код пацијената, као и антропометријске параметре.

Студија која је показала позитиван ефекат на смањење инсулинске резистенције укључила је пацијенте у протокол физичке активности који се састојао од вежби са снажним интензитетом (осам узастопних недеља, три сесије вежбања под надзором сваке недеље током последње четири узастопне недеље). Свака сесија трајала је 60 минута, а укључивала је 40 минута индивидуалног протокола вежбања који се изводи или на циклоергометру или на моторизованој траци за трчање којој претходи 10-минутно загревање и након тога 10-минутни одмор (94). Ипак, утврђено је да ће пацијенти са PCOS вероватније остати у седећем положају него да изводе енергичне вежбе. Умерене аеробне вежбе такође могу краткорочно да побољшају инсулинску сензитивност код PCOS. Такође, студије су објавиле да би жене са PCOS могле да постигну побољшање у смислу инсулинске осетљивости и абнормалног нивоа андрогена, путем снажних аеробних вежби и тренинга снаге (95). Минимална аеробна активност се препоручује више од 150 минута недељно, укључујући интензивне вежбе дуже од 90 минута (96).

Неке студије су показале да, када је унос угљених хидрата мањи од 45% укупног дневног калоријског уноса, дијета може бити од ефикасна за смањење индекса телесне масе, као и нивоа укупног холестерола у серуму код особа са PCOS (97). Штавише, студије показују да одржавање дијете са ниским садржајем угљених хидрата дуже од месец дана може значајно повећати нивое фоликулостимулирајућег хормона и глобулина који везује полне хормоне (98). Иако неки докази указују на ефекат исхране са ниским садржајем угљених хидрата на PCOS, дефинитивни механизми који објашњавају везу још увек нису у потпуности разјашњени. Добро је познато да метформин има сличне ефекте у смањењу телесне тежине. Неке студије су поредиле ефекте модификације исхране са ефектима

комбинованог третмана који подразумева примену метформина и модификацију начина исхране на PCOS. Показано је да промена начина исхране може да смањи инсулинску резистенцију и да повећа нивое глобулина који везују полне хормоне у серуму у поређењу са метформином (99).

Модификације начина живота, укључујући и модификације у исхрани, ретко су ефикасне у дугорочном периоду. Незадовољавајући дугорочни резултати могу бити повезани са чињеницом да се испитанице често враћају на претходну тежину и да не одржавају нормалан индекс телесне масе.

### 1.1.6.2. Метформин

Метформин (1,1-диметилбигванид), у литератури је познат још давне 1772. године, као једињење које има потенцијал да смањи ниво глукозе у крви. Метформин је једна од првих терапијских опција када је у питању третман PCOS у најширем смислу (и код жена које желе да остваре потомство у скоријој будућности, као и код оних које то не планирају). Обзиром да је у широкој употреби код ових пацијената, резултати који су произашли из различитих опсервација у клиничким испитивањима дају конкретнију слику о ефекту овог медикамента у PCOS третману. Различити подаци су најпре последица примене различитих дијагностичких критеријума за PCOS, као и шаренолике клиничке слике и придружених метаболичких симптома у различитим PCOS фенотиповима.

Подаци о дејству метформина на ниво андрогена су неусаглашени. Постоје докази да метформин може директно утицати на стероидогенезу у јајнику, што доводи до смањења продукције андрогена. Овакав ефекат је од великог значаја у третману PCOS (100). Поред тога, постоје подаци да метформин не утиче на ниво андрогена и SHBG, приписујући корисне ефекте смањењу нивоа инсулина код PCOS пацијената са хирзутизмом (101). Такође, резултати студија које су спроведене у циљу испитивања дејства метформина у индукцији овулације су дали охрабрујуће резултате. Ипак, мали број узорака, велики број збуњујућих варијабли, као и честа комбинација метформина са кломифен цитратом или гонадотропинима, су неке од чињеница које се не могу заобићи у сагледавању бенефита употребе метформина у сврху индукције овулације. Свакако, неспорно је да, у комбинацији са гонадотропинима, метформин скраћује време стимулације јајника у припреми за вантелесну оплодњу код PCOS пацијената са инфертилитетом (102). Још једно позитивно дејство метформина се огледа у смањењу телесне масе гојазних PCOS пацијената, независно од промена начина живота (103).

Употреба метформина у превенцији настанка PCOS компликација, у дужем временском периоду није препозната као корисна, управо због различитости у PCOS презентацији и придружених метаболичких карактеристика код пацијената (104).

Метформин доводи до смањења производње глукозе у јетри, до смањења апсорпције глукозе од стране дигестивног тракта, као и до повећања сензитивности на инсулин у инсулин зависним ткивима, као што су јетра и скелетни мишић. Неколико сигналних путева је укључено у механизам дејства метформина.

На молекуларном нивоу, метформин инхибира респираторни ланац у митохондријама у јетри, што доводи до активације АМПК, повећавајући осетљивост на инсулин (преко ефеката на метаболизам масти), али и снижавајући сАМР, чиме се смањује експресија ензима неопходних за глуконеогенезу. Метформин такође има АМПК независне ефекте на јетру (105).

Инхибиција комплекса I респираторног ланца митохондрија је дефинисана као главна за неколико предложених механизма деловања метформина. Након инхибиције комплекса I, АМПК се активира повећаним нивоима аденозин монофосфата (АМР). Потом се повећава обим оксидације масти, укључивањем процеса бета-оксидације масних киселина, и долази до смањења липогенезе. Повећан ниво АМР-а инхибира глуконеогенезу у јетри независно од АМРК, спречавајући производњу сАМР-а стимулисану глукагоном. На тај начин метформин остварује антагонистичко дејство на глукагон.

АМПК је сензор ћелијске енергије који ступа у интеракцију са аденин нуклеотидима. АМПК, који формира хетеротримерни комплекс, везан је за АТР у базалном стању и, како се концентрације АТР/АДР/АМР мењају у ћелији, АТР се замењује са АДР или АМР, алостерички активирајући АМРК. Ово се дешава у време метаболичког стреса, као што су продужено гладовање и интензивно вежбање (106).

Поремећај на нивоу АМПК је у корелацији са инсулинском резистенцијом али и ендокрином и репродуктивном функцијом повезаном са РСОС. АМПК регулише хомеостазу глукозе и осетљивост на инсулин тако што инхибира инфламацију и подстиче трансдукцију инсулинске сигнализације (107). Поред тога, активација АМПК метформиним ублажава ендокрину и репродуктивну дисфункцију повезану са РСОС (108). Штавише, показало се да АМПК смањује активност NF-κB и нивое проинфламаторног цитокина TNFα (109). Метформин, који је заправо, агонист АМПК, могао би да ублажи инфламаторне одговоре посредоване TNFα и хемокинима и дисфункцију гранулоцита на начин зависан од АМПК (110).

Недавно предложени механизам деловања метформина је и промовисање редокс стања у цитоплазми, услед инхибиције активности глицерофосфат дехидрогеназе 2 у јетри. У јетри, глицерол је фосфорилисан у глицерол-3-фосфат и конвертован у дихидроксиацетон фосфат помоћу глицерофосфат дехидрогеназе 2. Дакле, глицерофосфат дехидрогеназа 2 је неопходна за улазак глицерола у путеве глуконеогенезе. Глицерофосфат дехидрогеназа 2 је такође редокс-зависан ензим који је кључна компонента α-глицерофосфатног пута, који јед један од два главна редокс пута (други је малат-аспартат шатл) у ћелији. Ови редокс путеви играју кључну улогу у одржавању редокс равнотеже цитосола и митохондрија преносећи редукционе еквиваленте између два одељка, што доводи до промена у односу NADH и NAD<sup>+</sup>. Важно је да инхибиција глицерофосфат дехидрогеназе 2 смањује глуконеогенезу само од редокс зависних супстрата (глицерол и лактат), што разликује овај механизам од онога што би се очекивало код инхибиције комплекса I, као и свих других предложених механизма за деловање метформина (111, 112).

Нежељени ефекти метформина се везују за гастроинтестиналне тегобе, које су некада разлог престанка употребе (104). Симптоми као што су мучнина, повраћање, дијареја, надимање, често пролазе самостално, иако су понекад изражени у мери која доводи до прекида употребе лека. Уколико се метформин примењује у почетној дози од 500 mg/kg, уз



постепено повећање током две до четири недеље, док се не постигне максимална доза (у зависности од клиничке слике), може се развити толеранција на овај лек, што омогућава његову дуготрајнију употребу (113). Поред тога, употреба метформина, као лека првог избора у трудноћи, за третман ГДМ је и даље контроверзна (114). Упркос значајним доказима који сугеришу да је метформин безбедан током трудноће, потребне су додатне студије које би поткрепиле доказима безбедност дугорочне примене овог лека (115).

### 1.1.6.3. Орални контрацептиви

Оралне контрацептивне пилуле су прва линија терапије за истовремено лечење менструационих ирегуларности, акни и хирзутизма код жена са PCOS. Постоје две врсте оралних контрацептивних пилула: комбиновани орални контрацептиви који садрже естроген и прогестаген, и контрацептиви који садрже само прогестаген.

Код жена са PCOS које не желе трудноћу, орални контрацептиви су третман избора за побољшање клиничких симптома вишка андрогена као што су акне и хирзутизам, а такође помажу у регулисању менструационих циклуса и заштити ендометријума од ефеката несупротстављеног деловања естрогена. Садржај естрогена у оралним контрацептивима повећава нивое SHBG, чиме се смањује ниво слободних андрогена у циркулацији. Прогестинска компонента оралних контрацептива супримира лучење LH и смањује производњу андрогена у јајницима. ОЦП такође могу смањити производњу андрогена из надбубрежне жлезде. Нерегуларност циклуса се најбрже остварен ефекат, док се акне и хирзутизам повлаче за минимум 6 месеци од почетка употребе. Нискодозажни комбиновани контрацептиви су препорука за третман PCOS. Иако постоји ризик за кардиоваскуларне и метаболичке догађаје који је повезан са њиховом употребом, тренутни докази говоре у прилог већем корисном него штетном ефекту оралних контрацептива код PCOS пацијената (116).

### 1.1.6.4. Кломифен цитрат

Кломифен цитрат се широко користи као прва линија третмана код ановулацијског PCOS. Третман кломифен цитратом је једноставан, јефтин и ефикасан метод за изазивање овулације са минималним нуспојавама (117). Кломифен цитрат има антиестрогени ефекат који остварује везивањем за естрогенске рецепторе у хипоталамусу. Тако се стимулише повећање пулса гонадотропин-ослобађајућег хормона који потом индукује лучење гонадотропина из предњег режња хипофизе. Ипак, 20-25% пацијенткиња показује резистенцију на кломифен цитрат (118). Кломифен цитрат се често комбинује са другим медикаментима, мање или више успешно. На пример, комбинација пиоглитазина и кломифен цитрата се није показала супериорнијом од кломифен цитрата када посматрамо стопу зачећа и број овулација (119), док комбинација са метформином јесте (120). Ипак, поред познатих нежељених ефеката, као што су мучнина, повраћање, губитак косе,

главобоља и други, сматра се да антиестрогени ефекти кломифен цитрата на ендометријум и слуз грлића материце узрокују ниску стопу зачећа од 20% (121).

#### 1.1.6.5. Инозитоли

Стереоизомери инозитола, мио-инозитол (МИ) и Д-хиро-инозитол (ДЦИ), су хексахидроксициклохексани. Они су два најзаступљенија члана породице од укупно девет стереоизомерних инозитола, и широко су заступљени у природи. Ова једињења имају исту хемијску формулу као и глукоза. Инозитоли су саставни делови ћелијске мембране. На пример, фосфатидил-МИ представља прекурсор инозитол трифосфата које је секундарни гласник за многе хормоне укључујући инсулин и фоликулостимулишући хормон (ФСХ). Дисфункције овог сигналног пута могу довести до оштећења инсулинске сигнализације и узроковати инсулинску резистенцију (122). Управо због тога, инозитоли се сматрају корисним код инсулинске резистенције, па и код PCOS. Инсулин има више различитих сигналних путева у свом механизму деловања. Док се доминантно дејство дешава преко рецептора тирозин киназе и њених примарних тирозин-фосфорилисаних супстрата секундарних гласника, инозитол гликани такође посредују у многим метаболичким дејствима инсулина. Инозитол гликани су инсулиномиметици и имају ефекат активације, односно, сензибилизације ткива.

У оквиру инсулинске резистенције у организму, парадоксално, јајник остаје осетљив на дејство инсулина (ДЦИ парадокс) (123). Хиперинсулинемија доводи до повећања секреције ЛХ, али не и ФСХ, спречавајући селекцију доминантног фоликула. Инсулин повећава осетљивост ћелија гранулозе на ЛХ, чиме се повећава и производња андрогена у јајницима. Ово је посредовано стимулацијом цитокрома P450c17 $\alpha$ . Тека ћелије јајника код жена са PCOS имају повећану продукцију тестостерона. Хиперинсулинемија се супроставља овулацији, вероватно путем инозитолног пута (124). Инозитоли МИ и ДЦИ могу смањити инсулинску резистенцију, побољшати функцију јајника и смањити нивое андрогена код жена са PCOS. Утицај МИ на функцију јајника и квалитет ооцита је независан од њихове концентрације у циркулацији (125). Утврђено је да третман ДЦИ смањује ниво инсулина, липиде и крвни притисак код жена са PCOS (126). У току су бројне клиничке студије које ће показати ефикасност примене монотерапије и комбинације инозитола у третману PCOS.

#### 1.2. Анимални модели у истраживању PCOS и избор модела за индукцију PCOS код пацова

Експериментални модели болести које се јављају у хуманој популацији увек ограничени када је реч о индукцији код животиња, ниједан анимални модел не може осликати праву патофизиолошку ситуацију и све клиничке презентације које се јављају код људи. Ипак ови модели се веома често користе и пружају драгоцене податке о морфологији и функцији органа које не можемо анализирати у хуманој популацији.

Прегледом доступне научне литературе може се закључити да је третман андрогенима код пацова најзасупљенија метода за изазивање PCOS у студијама које користе овакве експерименталне моделе. Од свих андрогена који се могу применити у ту сврху (различити естри тестостерона – пропионат, енантат; DHEA) најчешће коришћен андроген је DHEA. Животиње које се користе за индукцију PCOS на овакав начин јесу у највећем броју случајева младе, препуберталне женке пацова. Међутим, иако већина литературних података говори у прилог коришћењу животиња препуберталног узраста, недавно спроведена студија показала је предност коришћења пацова постпуберталног узраста у односу на препуберталне, када је реч о испитивању јајника, али и материце (127). Адултне женке пацова, старе 6 недеља, након примена DHEA у дози од 6 mg/100g телесне масе, током 20-30 дана.

### 1.3. Фитотерапија PCOS

Недавне студије сугеришу да комплементарни и алтернативни третмани, укључујући биљне лекове и акупунктуру, могу ублажити симптоме PCOS, али су докази о њиховој ефикасности и безбедности недовољни (128). Стога је потребно истражити нове стратегије лечења које укључују комплементарне и алтернативне терапије да би се оптимизовао третман PCOS.

#### 1.3.1. *Aronia Melanocarpa* L.

*Aronia Melanocarpa* L., која се обично назива црна аронија, припада породици *Rosaceae*, а у Источну Европу је доспела из Северне Америке. Бобичасти плодови су горког и опорог укуса, па се ретко као свежи користе у исхрани. Наиме, чешће се плодови ароније користе за припремање џемова, сирупа, вина, чајева, тинктура, праха и осталих производа чије је конзумирање пријатније од плодова (129). Ипак, мора се напоменути да садржај корисних, биоактивних једињења знатно варира у односу на време брања, начин конзумације, технологију припреме производа, складиштење и других фактора, па се зато и разликују ефекти које различити производи припремљени од ароније остварују на здравље (130).

Фитохемијска анализа ароније показала је да је плод ове биљке изузетно богат фенолним једињењима, укључујући флавоноиде – процијанидине (35% од укупних полифенола), антоцијанине (40% од укупних полифенола), фенолне киселине и друге. Антоцијанини пореклом из плода ароније обезбеђују висок садржај цијанидин-3-галактозида, цијанидин-3-глукозида, цијанидин-3-арабинозида и цијанидин-3-ксилозида (131). Фенолне киселине које су заступљене у плодовима ароније су хлорогенска и неохлорогенска киселина, док се од флаванола нарочито истиче епикатехин, а од флавонола је најзаступљенији кверцетин (132). Познато је да је садржај главних биоактивних једињења у плодовима ароније висок. На пример, процијанидини су заступљени са чак више од 5% у односу на суву масу плода ароније (133). Поред наведених једињења, плодови ароније су богати и витаминима, и то највише витамином С, А, Е, К, В. Калцијум, магнезијум, фосфор, калијум, као и бакар, јод гвожђе, манган, цинк и селен су, такође, присутни елементи у плодовима ароније (134). Овакав хемијски састав говори у прилог бројним корисним ефектима које конзумација ове биљке остварује на здравље (135).

Антиоксидативна активност црне ароније је препозната у многим студијама (136). Обзиром да плод ароније садржи виши ниво полифенола у односу на друго воће (137), и представља атрактивну суплементацију када је реч о третману различитим болести и стања повезаних са оксидативним стресом (138, 139). Према доступним подацима из литературе, примена ароније показала је корисне ефекте као што су антидијабетесни, антиинфламаторни, антимулагени, имуномодулаторни, цитотоксични, кардиопротективни, ренопротективни, хепатопротективни и други (140).

Претходна истраживања су потврдила корисне ефекте *Aronia Melanocarpa* (примењене као стандардизовани екстракт *Aronia Melanocarpa* - СЕА) на метаболички

синдром код пацова (140). Штавише, претходни резултати су чак потврдили заштитну улогу СЕА код пацијената на хемодијализи са анемијом (141). Занимљиво је да је СЕА побољшала клиничке и биохемијске параметре код пацијената са потврђеним метаболичким синдромом чак и у већој мери код жена у поређењу са мушкарцима (142), вероватно укључујући улогу полних хормона на метаболизам липида.

Ови подаци су нас довели до идеје да истражимо потенцијалне предности примене СЕА у андрогеном индукованом моделу PCOS пацова. Штавише, имали смо за циљ да истражимо синергистичке ефекте СЕА и МЕТ терапије у ублажавању репродуктивних и метаболичких абнормалности код PCOS.

## 2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

## **2.1. Циљеви истраживања:**

1. Испитати морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.
2. Испитати утицај примене метформина на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.
3. Испитати утицај примене стандардизованог екстракта ароније на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.
4. Испитати утицај симултане примене метформина и стандардизованог екстракта ароније на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.

## **2.2. Хипотезе истраживања:**

1. Постоје промене у морфолошким карактеристикама јајника, хормонском и оксидационом статусу код пацова са синдромом полицистичних јајника.
2. Примена метформина утиче на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.
3. Примене стандардизованог екстракта ароније утиче на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.
4. Симултана примена метформина и стандардизованог екстракта ароније утиче на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ



### 3.1. Принципи етичности којима се руководило у експерименталном раду

Експерименти на животињама су спроведени у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Све спроведене експерименталне процедуре биле у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/ЕЕС) и принципима етичности. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

### 3.2. Набавка животиња и услови чувања животиња за време спровођења експерименталног протокола

Животиње су набављене из Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војномедицинске академије у Београду. За време трајања експерименталног протокола животиње су чуване у виваријуму Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

У овом истраживању коришћени су пацови *Wistar albino* соја, женског пола. Животиње су биле старости 6 недеља и просечне телесне масе 150-170 g. Пацови ове старосне доби припадају категорији постпуберталних животиња.

Студија је спроведена на 36 пацова, који су чувани у кавезима од плексигласа, тако што је по 3 животиње заједно боравило у једном кавезу. Контролисани услови околине у виваријуму током трајања експерименталног протокола подразумевали су стандардну температуру у просторији ( $23 \pm 1$  °C), влажност ваздуха оф  $55 \pm 5\%$ , као и смене циклуса светло/мрак на 12 сати. Пацови су имали неограничен приступ храни и води током трајања протокола (*ad libitum*). Чишћење кавеза и замена шушке вршена је 2 пута недељно, уз минималне манипулације животињама, како би се ублажили неповољни ефекти које такве манипулације могу остварити на еструсни циклус пацова.

### 3.3. Експерименталне групе

Истраживање је спроведено на 36 животиња. Животиње су најпре биле сврстане у 2 групе (контрола и PCOS), у оквиру којих су се налазиле подгрупе.

Наиме, на почетку експерименталног протокола неопходно је било потврдити успешност индукције PCOS код пацова. Тако су женке које имају уредан еструсни циклус биле подељене у 2 групе:

1. Контролну групу ( $n=6$ ) и на
2. PCOS групу ( $n=30$ ).

Након спроведеног третмана за индукцију PCOS, животиње из контролне групе и 6 животиња насумично изабраних из PCOS групе ће бити жртвоване у циљу верификације постојања промена које су настале индукцијом PCOS.

Након успешне потврде индукције PCOS, преостале животиње из PCOS групе су даље подељене на 4 групе:

1. PCOS + физиолошки раствор (n=6)
2. PCOS + метформин (n=6)
3. PCOS + СЕА (n=6)
4. PCOS + метформин + СЕА (n=6)

### 3.4. Третмани

#### 3.4.1. Индукција PCOS код пацова

PCOS група (n=30) је била подвргнута супкутаној апликацији дехидроепиандростерона (DHEA: sc-202,573; Santa Cruz Biotechnology), раствореног у 0.2 ml сусамовог уља, у дози 6 mg/100g телесне масе. Третман DHEA је спровођен сваког дана у исто време (између 11:00 и 12:00 часова) током 5 недеља третмана (127).

Контролна група (n=6) је истовремено када и PCOS група била подвргнута супкутаној апликацији сусамовог уља (растварач) у приближно истој запремини као и PCOS група. Такође, третман је спровођен сваког дана, током 5 недеља трајања протокола за индукцију PCOS.

Супкутане ињекције су биле даване са дорзалне стране врата животиње, где је физички било највише простора за примену уљаног раствора, и најмање бојазни да током хроничног, свакодневног третмана настану компликације по типу некрозе ткива.

Након периода индукције, ради потврде PCOS, животиње из контролне групе, као и 6 животиња из PCOS групе су жртвоване декапитацијом на гиљотини, након примене одговарајуће анестезије интраперитонеалном ињекцијом мешавине кетамина и ксилазина (50 mg/kg кетамина и 100 mg/kg ксилазина). Биохемијске и хистолошке анализе су спроведене у циљу потврде индукције PCOS код пацова (очекиван је настанак хиперандрогенемије, појаве цисти на јајнику, као и одсуства жутих тела). Цитолошки преглед вагиналног бриса био је вршен током последњих 12 дана третмана, у циљу идентификације фазе еструсног циклуса (очекује се перзистентан метаеструс/диеструс). Све животиње из контролне групе су биле жртвоване у метаеструс/диеструс фази циклуса, такође, ради елиминације утицаја фазе циклуса на параметре од интереса.

### 3.4.2. Третман PCOS пацова

Након потврде индукције PCOS, пацови из PCOS групе ће бити сврстани у 4 групе (6 животиња по групи). Групе код којих је примењиван метформин, добијале су ову супстанцу растворену у води у дози од 500 mg/kg, сваког дана у исто време. Групе код којих је примењиван СЕА, добијале су овај раствор у дози од 0.45 ml/kg, сваког дана у исто време. Група којој је примењиван метформин и СЕА, добијала је ове супстанце, сваког дана у исто време, у дозама које су наведене код њихове самосталне примене. Сви наведени третмани су спроведени гаважом, уз помоћ ригидне заобљене тупе каниле која је намењена за интрагастричну апликацију код пацова. Третмани су трајали 28 дана. Дозе ДНЕА, метформина и стандардизованог екстракта ароније су изабране на основу података из литературе (51, 140).

Током трајања протокола који подразумева третман PCOS животиња, вршила се цитолошка анализа вагиналног бриса током последњих 12 дана.

Након 28 дана од индукције PCOS, животиње су жртвоване декапитацијом на гиљотини након примене одговарајуће анестезије (50 mg/kg кетамина и 100 mg/kg ксилазина, интраперитонеално), а узорци крви и ткива су узети за даљу анализу.

### 3.5. Варијабле које се мере у студији

#### 3.5.1. Антропометријски параметри

Приликом чишћења кавеза у којима су биле смештене животиње, два пута недељно током трајања експерименталног протокола, мерена је телесна маса пацова. Том приликом је и прерачуната доза коју пацови добијају за нередна 3-4 дана, у складу са повећањем телесне масе са старењем.

Такође, телесна маса животиња је измерена и непосредно пре жртвовања (финална телесна маса).

Принос телесне масе израчунат је као проценат повећања у односу на почетну телесну масу.

Телесна дужина животиња мерена је на крају експерименталног протокола, коришћењем флексибилног сантиметра од врха носа до аналног отвора (назо-анална дистанца), док су животиње биле у анестезији, непосредно пре жртвовања.

Индекс телесне масе (*Body mass index* - BMI) је израчунат на основу података добијених мерењем телесне масе и телесне дужине, према следећој формули:

$$\text{BMI} = \text{телесна маса} / \text{телесна дужина}^2$$

Индекс телесних масти (*Lee index*) је израчунат као количник кубног корена телесне масе и телесне дужине.

Маса левог оваријума је мерена након изоловања органа на аналитичкој ваги.

Релативна маса оваријума је израчуната као количник масе оваријума и телесне масе.

### 3.5.2. Цитолошка анализа вагиналног бриса

Фазе еструсног циклуса су процењиване цитолошким прегледом вагиналних размаза. Ујутро (између 9:00 и 10:00 часова), вагинално испирање је вршено коришћењем стаклене пипете са заобљеним врхом, напуњене малом количином физиолошког раствора. Испирак је постављан на предметно стакло, осушен на ваздуху и затим обојен хематоксилином. Након сушења, анализа обојених препарата је спроведена уз коришћење светлосног микроскопа.

Фазе циклуса еструса су идентификоване према преминацији специфичних ћелија на препарату. Проеструс — доминантно присутне округле ћелије са једром; еструс — доминантно присутне рожнате сквамозне ћелије; метаеструс — приближно иста заступљеност рожнатих сквамозних ћелија и леукоцити и диеструс — присуство епителних ћелија са једром и доминација леукоцита (143). Процена еструсног циклуса је вршена током 12 узастопних дана протокола за индукцију PCOS, а затим и протокола за третман PCOS. Такође, на почетку експерименталног протокола, у циљу селекције животиња који имају уредан еструсни циклус и њиховог укључивања у истраживање, пре било каквих третмана, вршена је провера фазе еструсног циклуса.

### 3.5.3. Прикупљање узорак крви и ткива за биохемијске и хистолошке анализе

Након декапитације, крв је прикупљена у адекватне епрувете и у циљу добијања плазме/серума, центрифугирана на 3000 обртаја, а узорци плазме/серума, као и лизата еритроцита ће бити складиштени на  $-20^{\circ}\text{C}$  до тренутка када ће бити анализирани.

#### 3.5.3.1. Биохемијске анализе

##### 3.5.3.1.1. Одређивање липидног статуса

Из серума ће бити одређене вредности триглицерида, укупног холестерола, LDL и HDL холестерола стандардним методама за лабораторијско одређивање концентрације ових параметара на апарату Dimension Xpand (Siemens, IL, USA).

### 3.5.3.1.2. Одређивање хормонског статуса

#### 3.5.3.1.2.1. Одређивање концентрације тестостерона, естрадиола и прогестерона

Комерцијални ELISA комплети (Elecsys Testosterone II, Estradiol III, и Progesterone II, Roche Diagnostics) су се користили за одређивање концентрације тестостерона (Т), естрадиола (Е) и прогестерона у серуму (П). Нивои Т, Е и П су одређени електрохемилуминисцентним имунотестом методом коришћењем Elecsys 2010 анализатора. Нивои Т и П су изражени у ng/mL, а Е2 је био изражено у pg/mL. Осетљивост тестова за Т је износила 0,025 pg/mL, за П је износила 0,03 pg/mL и за Е је износила 5 pg/mL. Коефицијенти варијансе интер и интратестове су износили за Т – 3,8 и 5%, за П – 3 и 5% и за Е – 2,2 и 3,9%.

#### 3.5.3.1.2.2 Одређивање концентрације LH, FSH, Анти-Милеровог хормона (АМН) и инсулина

LH, FSH, Анти-Милеровог хормона (АМН) и инсулина биће анализирани из узорака серума ELISA методом уз коришћење комерцијалних китова (Rat LH (Luteinizing Hormone) ELISA Kit, каталошки број - E-EL-R0026, ранг детекције 1.56~100 mIU/mL, сензитивност 0.94 mIU/mL; Rat FSH (Follicle Stimulating Hormone) ELISA Kit, каталошки број - E-EL-R0391, ранг детекције 3.13~200 ng/mL, сензитивност 1.88 ng/mL; Rat AMH (Anti-Mullerian Hormone) ELISA Kit, каталошки број - E-EL-R3022, ранг детекције 62.50~4000 pg/mL, сензитивност 37.50 pg/mL, Rat INS (Insulin) ELISA Kit, каталошки број - E-EL-R3034, ранг детекције 6.25~400 pg/mL, сензитивност 3.75 pg/mL). ELISA комплет користи принцип сендвич-ELISA. Микро ELISA плоча са 96 бунарчића која се налази у овом комплету је претходно обложена антителом специфичним за одговарајући хормон пацова (LH, FSH, АМН или инсулин). Узорци (или стандарди) су додавани у бунарчиће микро ЕЛИСА плоче и комбиновани су са специфичним антителом. Затим је биотин детекционо антитело специфично за одговарајући хормон пацова и коњугована Авидин-Horseradish пероксидаза-додавана сукцесивно у сваки бунар микро плоче, након чега је уследила инкубација. Након инкубације микро плоче су испиране, како би се ослободиле слободних компоненти. Раствор супстрата је додаван у сваки бунарчић, и само они бунарчићи који садрже примарно антитело специфично за одговарајући хормон, биотин детекционо антитело и коњугована Авидин-Horseradish пероксидазу су се пребојили плавом бојом. Реакција ензим-супстрат је прекинута додавањем стоп раствора, након чега је боја постала жута. Оптичка густина (ОД) је мерена спектрофотометријски на таласној дужини од 450 nm ± 2 nm. ОД вредност је пропорционална концентрацији одговарајућег хормона. Концентрацију одговарајућег хормона је израчуната у узорцима упоређивањем ОД узорака са стандардном кривом. Коефицијенти варијације су за сваки од поменутих хормона износили мање од 10%.

LH / FSH однос је израчунат из добијених вредности LH и FSH.

### 3.5.3.1.3. Одређивање параметара оксидативног стреса из крви и хомогената ткива јајника

Из узорака плазме одређивани су следећи параметри: индекс липидне пероксидације мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^-$ ) и водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Из лизирание суспензије еритроцита одређена је активност каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD) и редукованог глутатиона (GSH).

#### 3.5.3.1.3.1. Одређивање концентрације TBARS

Поступак одређивања TBARS је спроведен мешањем 0,8 mL узорка плазме са 0,4 mL трихлоросирћетне киселине. После хлађења ове мешавине током 15 минута на леду и центрифугирања на 6000 rpm, супернатант је прикупљен за даљу анализу. Коришћењем 1% тиобарбитурне киселине у 0,05 NaOH одвијала инкубација са прикупљеним супернатантом на 100 °C током 15 минута. Мерење је вршено на 530 nm таласне дужине. Као слепа проба коришћена је дестилована вода (144). Добијене вредности су изражаване у  $\mu\text{M/mL}$ .

#### 3.5.3.1.3.2. Одређивање концентрације $\text{O}_2^-$

Концентрација супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ) мерена је након реакције нитро плавог тетразолијума у ТРИС пуферу са узорцима плазме. Концентрација је мерена на таласној дужини од 530 nm. Као слепа проба је коришћена дестилована вода (145). Добијене вредности су изражаване у  $\text{nM/mL}$ .

#### 3.5.3.1.3.3. Одређивање концентрације $\text{H}_2\text{O}_2$

Принцип одређивања концентрације водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) заснован је на оксидацији фенол црвеног водоник пероксидом у реакцији катализованој Horse Radish пероксидазом. Укупно 200  $\mu\text{L}$  узорка плазме је преципитирано са 800  $\mu\text{L}$  свеже припремљеног раствора фенол црвеног, након чега је додато 10  $\mu\text{L}$  (1:20) HRP. Ниво  $\text{H}_2\text{O}_2$  је мерен на таласној дужини од 610 nm, а дестилована вода је служила као слепа проба (146). Добијене вредности су изражаване у  $\text{nM/mL}$ .

#### 3.5.3.1.3.4. Одређивање концентрације $\text{NO}_2^-$

Ниво  $\text{NO}_2^-$  је одређен као индекс производње  $\text{NO}$  са Грисовим реагенсом. Укупно 0,1 mL 3 N перхлоридне киселине, 0,4 mL 20 mM етилендиаминотетрасирћетне киселине и 0,2 mL узорка држано је на леду 15 минута, а затим центрифугирано 15 минута на 6000 rpm. Након изливања супернатанта, у талог је додато 220  $\mu\text{L}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Концентрација  $\text{NO}_2^-$  је мерена на таласној дужини од 550 nm, а дестилована вода је служила као слепа проба. Добијене вредности су изражаване у  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . (147)

#### 3.5.3.1.3.5. Одређивање активности CAT

За одређивање активности CAT коришћено је укупно 50  $\mu\text{L}$  CAT пуфера, 100  $\mu\text{L}$  узорка и 1 mL 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Детекција је изведена на таласној дужини од 360 nm. Дестилована вода је служила као слепа проба, а количина CAT је изражена као U/g ткива или U/g хемоглобина  $\times 10^3$  (148, 149).

#### 3.5.3.1.3.6. Одређивање активности SOD

Активност SOD је откривена методом епинефрина. Помешано је укупно 100  $\mu\text{L}$  узорка и 1 mL карбонатног пуфера, а затим је додато 100  $\mu\text{L}$  епинефрина. Детекција је извршена на таласној дужини од 470 nm, а количина SOD је изражена као U/g ткива или U/g хемоглобина  $\times 10^3$  (150).

#### 3.5.3.1.3.7. Одређивање концентрације GSH

Ниво редукованог глутатиона (GSH) је заснован на оксидацији GSH преко 5,5-дителиобис-6,2-нитробензојеве киселине. Екстракт GSH је добијен комбиновањем 0,1 mL 0,1% EDTA, 400  $\mu\text{L}$  плазме и 750  $\mu\text{L}$  таложног раствора (који садржи 1,67 g метафосфорне киселине, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl, и напуњен до 100 mL водом). После мешања у вортекс машини и екстракције на леду током 15 минута, смеша је центрифугирана је на 4000 rpm (10 минута). Мерење је вршено на таласној дужини од 420 nm, док је дестилована вода служила као слепа проба (151).

#### 3.5.3.1.4. Одређивање параметара оксидативног стреса и АМН из ткива јајника

Десни јајник је хомогенизован у хладном PBS-у (у односу 1/10 масе и запремине), центрифугиран на  $1200 \times g$ , на  $4^\circ\text{C}$ , а супернатант је прикупљен за даљу анализу (51).

Узорци супернатанта хомогенизованог ткива јајника су чувани на  $-70^\circ\text{C}$  до тренутка када су извођене биохемијске анализе. Из хомогената ткива јајника су одређивани TBARS,

активност CAT и SOD, као и концентрација GSH. Након одређивања концентрације протеина у истом узорку, вредности су израчунате и изражене на следећи начин: TBARS (nmol/mg протеина), CAT (U/mg протеина), SOD (U/mg протеина), GSH ( $\mu\text{mol/g}$  протеина).

Поред тога, из хомогената ткива јајника је одређивана концентрација АМН коришћењем одговарајућег кита (Rat AMH (Anti-Mullerian Hormone) ELISA Kit, каталошки број - E-EL-R3022) према упутству произвођача.

#### 3.5.3.1.5. Одређивање концентрације протеина из крви и из хомогената ткива јајника

Укупан садржај протеина у узорцима крви и ткива је квантификован модификованом Ловријевом методом (152).

#### 3.5.3.2. Хистолошка анализа јајника и утеруса

##### 3.5.3.2.1. Припрема ткива за хистолошку анализу

Леви јајник и утерус биће изоловани, измерени и фиксирани у 4% формалдехиду на собној температури. Након фиксације узорци ткива ће бити дехидратисани кроз серију алкохола растуће концентрације (50, 70, 96 и 100%), просветљени у ксилолу и укалупљени у парапласту. Попречни серијски пресеци дебљине 5 микрометара биће сечени на ротационом микротому. Након сушења, ткивни пресеци ће бити депарафисани у ксилолу, и рехидратисани у опадајућим концентрацијама алкохола (100, 96, 70, 50%), испрани у води а потом обојени хематоксилином по Мауер- и 2% раствором еозина. Након бојења, пресеци ће бити монтирани DPX-ом и покривени покривним стаклом.

##### 3.5.3.2.2. Морфометријска анализа јајника

Морфометријска анализа јајника биће спроведена анализом пресека бојених хематоксилином и еозином, у циљу квантификације примарних, секундарних, терцијарних, атретичних и цистичних фоликула, као броја жутих тела уз коришћење светлосног микроскопа (Olympus BX51).

Три пресека по јајнику – централни и 2 која су одговарала приближно 150  $\mu\text{m}$  испред и иза централног пресека, су одабрани за квантификацију фоликула (153). Бројани су само фоликули са видљивим ооцитом и једром. Фоликули су класификовани на следећи начин: преантрални, (здрави) антрални и атретични фоликули, према претходно установљеној методологији (154). Број жутих тела и број цистичних фоликула су бројани са највећег (централног) пресека. Критеријуми за цистичну идентификација фоликула су: један до четири слоја гранулозе ћелије, без лутеинизације, танак зид који се састоји од танких спљоштених ћелија које леже на танкој фиброзној капсули, димензије веће од нормалног



преовулаторног фоликула и дегенерација појединачних ћелија гранулоза слоја (155). Две особе су независно извршиле бројање фоликула, на микроскопу Olympus BX51, користећи увеличање од 100× и 400×. Прво су резултати по једном јајнику пацова обједињени, а затим су резултати из шест животиња из групе у обједињени.

#### 3.5.3.2.3. Морфометријска анализа утеруса

Морфометријска анализа јајника биће спроведена анализом пресека бојених хематоксилином и еозином. Пет различитих поља на сваком пресеку утеруса је анализирано у смислу одређивања дебљине ендометријума и висине епитела коришћењем софтвера Axiovision software (Zeiss) уз одговарајућу калибрацију (156).

#### 3.5.3.2.4. Имунохистохемијска анализа јајника

Имунохистохемијска анализа је била спроведена након обележавања АМРК у ткиву јајника, у циљу евалуације потенцијалног механизма дејства примењених супстанци.

Пресеци узети са централног нивоа јајника из сваке групе су изабрани да се одреди имунореактивност АМРК. Пресеци ткива јајника су узимани на суперфрост плочице. Пресеци су депарафинизовани, а затим третираны опадајућим концентрацијама етанола у циљу рехидратације (100, 100, 95 и 80%; по 5 мин). Након тога, пресеци су испрани водом са чесме, а затим два пута испрани дестилованом водом (1–2 мин). У циљу откривања антигена, плочице су држане у цитратном пуферу (pH = 6,0) током 10 минута у микроталасној пећници. Активност ендogene пероксидазе је инхибирана коришћењем 3% водоник пероксида, а затим су пресеци опрани физиолошким раствором пуферованим фосфатом (*phosphate buffered saline - PBS*, pH = 7,6) два пута. Епитопи су стабилизовани помоћу раствора протеинског блока. Након уклањања вишка серума, 50 µL поликлонског зечијег примарног антитела АМРК (АМРК alpha 1 (phospho Thr183) + АМРК alpha 2 (phospho Thr172), каталошки број GTX52341, GeneTex) је додато на плочице (разблажење 1:100). Све плочице су затим инкубирани у влажној комори на 37 °C током 1 сата. Након испирања у *PBS*-у (3 × 5 мин), биотиниловано секундарно антитело (СХП125; СциТек, Вест Логан, Утах) примењено је 20 мин. након тога. Стрептавидин-пероксидаза је додавана на плочице, а затим и 3,3'-диамино раствор бензидина (ДАБ). Мајеров хематоксилин је коришћен за контрастирање препарата. Узорци су монтирани монтирани DPX-ом и покривени покровним стаклом. Интензитет бојења је одређен семиквантитативно, при чему је одсуство имунореактивности обележавано са „-“, веома ниска реактивност са „+/-“, средња са „++“ и висока са „+++“.

#### 3.5.4. Ултразвучна анализа јајника

На почетку експеримента, као и једном недељно током трајања протокола, животиње су биле подвргнуте ултразвучној анализи јајника уз коришћење Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, MA, USA) апарата помоћу линеарне сонде пробојности 15.0 MHz. Ултразвучна анализа је вршена након примене адекватне анестезије (50 mg/kg кетамина и 100 mg/kg ксилазина). Трансабдоминалним приступом, у В моду, на основу топографских локализација (испод претходно визуализованих бубрега) и ехогених карактеристика вршено је мерење јајника у три димензије (уздужни (Д1), попречни (Д2) и антеропостериорни (Д3) пречник). Запремина јајника ( $\text{mm}^3$ ) израчуната је уз коришћење формуле за рачунање запремине елипсоидног тела, и то као производ  $\pi/6$  и уздужног (Д1), попречног (Д2) и антеропостериорног (Д3) пречника (запремина =  $\pi/6$  (Д1  $\times$  Д2  $\times$  Д3)) (157). Анализу је увек вршио исти истраживач.

#### 3.5.5. Орални тест оптерећења глукозом (ОГТТ)

Дан пре жртвовања, након ноћног гладовања, животињама ће бити урађен тест оралног оптерећења глукозом (ОГТТ). Након одређивања вредности гликемије наше, животињама ће гаважом бити администрирано 2g/kg глукозе, а узорци крви за гликемију биће узимани након 30, 60, 120 и 180 минута. Гликемија ће бити одређивана помоћу апарата Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), уз коришћење адекватних трачица, након пункције репне вене.

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

#### 4.1. Потврда успешно индукованог модела PCOS код пацова

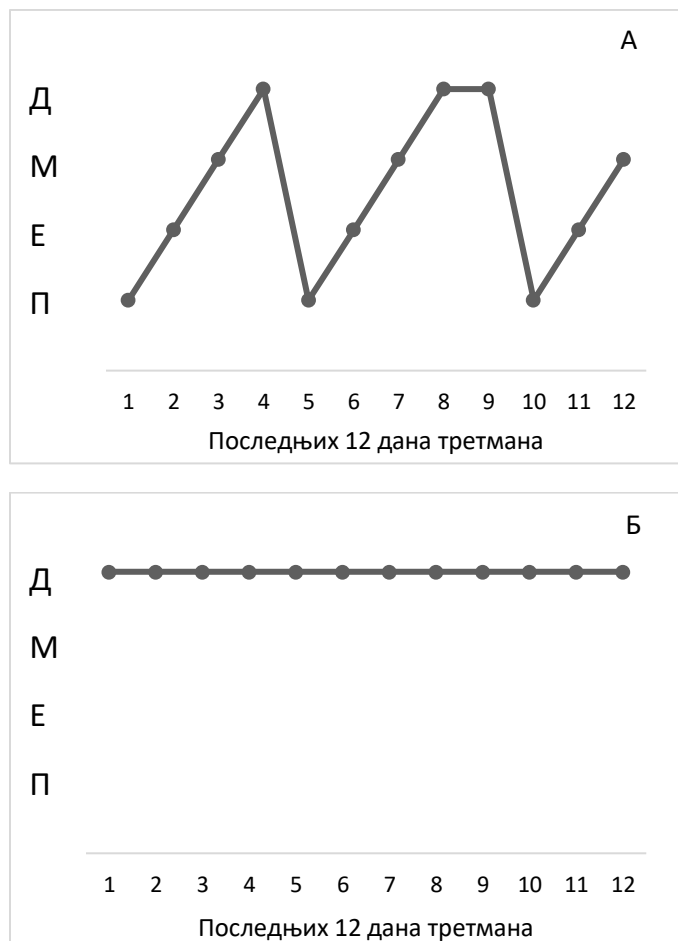
Као што је наведено у делу Материјал и методе, након петонедељног третмана који подразумева примену DHEA, а пре почетка примене метформина и СЕА, контролна група и 6 насумично изабраних животиња из PCOS групе је жртвовано у циљу потврде успешности индукције PCOS модела.

За процену успешности индукције PCOS модела код пацова евалуирани су следећи параметри: поремећај еструсног циклуса, ниво тестостерона у серуму, као и појава цисти и смањен број жутих тела на хистолошким пресецима ткива јајника.

##### 4.1.1. Испитивање промена у еструсном циклусу код пацова након петонедељног третмана DHEA.

Као што је представљено на Слици 4.1 А., пацови из контролне групе су имале 2 – 3 регуларна циклуса током последњих 12 дана протокола. Фазе циклуса су се смењивале регуларно (проеструс, еструс, метаеструс и диеструс). Циклус је код сваке животиње трајао 4-5 дана.

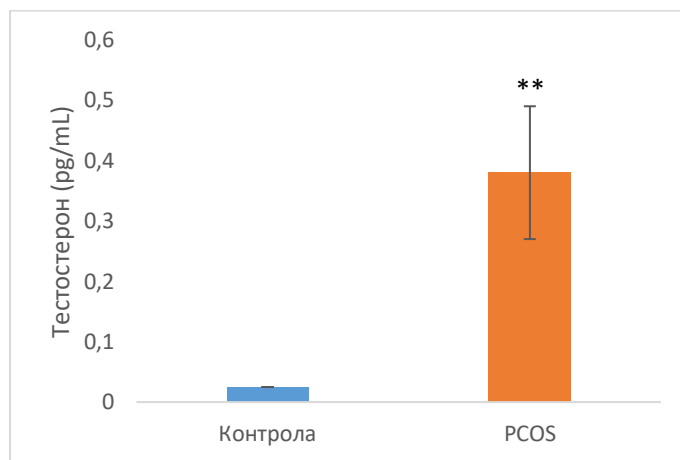
Свакодневна примена DHEA у дози од 6mg/100g телесне масе код пацова је довела до застоја у регуларној цикличности еструса. Пацови из PCOS групе су током последњих 12 дана третмана показали застој у диеструс фази, што представља једну од карактеристика PCOS.



Слика 4.1. Утицај примене DHEA у циљу индукције PCOS код пацова код две репрезентативне животиње из контроле и из PCOS групе. А – Контролна група; Б – PCOS група. Д – диеструс, М – метаеструс, Е – еструс, П – проеструс

4.1.2. Испитивање промена у концентрацији тестостерона у серуму код пацова након петонедељног третмана DHEA.

Након 5 недеља администрације DHEA, пацови из PCOS групе су имали значајно већи ниво тестостерона у серуму у односу на пацове из контролне групе ( $p < 0.01$ ), као што је представљено на Слици 4.2.



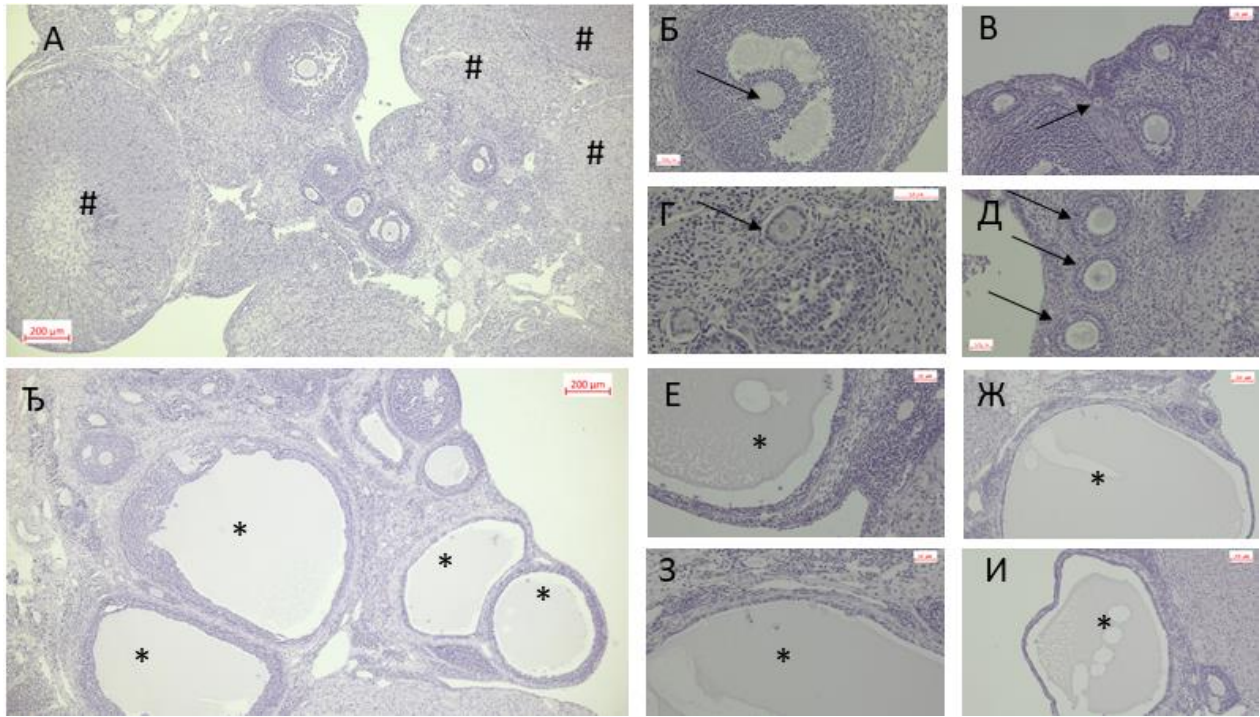
Слика 4.2. Утицај примене DHEA у циљу индукције PCOS код пацова на концентрацију тестостерона у контролној и PCOS групи.

#### 4.1.3. Испитивање хистолошких карактеристика (фоликуларних цисти и жутих тела) код пацова након петонедељног третмана DHEA.

Као што се може видети на Слици 4.3., постоје разлике у хистоморфолошким карактеристикама јајника код контролне (А, Б, Ц, Д и Е) и PCOS групе (Ф, Г, Х, И и Ј).

Пресек јајника из контролне групе показује нормалне хистоморфолошке карактеристике (А), присуство жутих тела (#), одсуство цисти, фоликуле у различитом стадијуму фоликулогенезе. На слици 4.3. Б приказан је здрав антрални фоликул са формираном кумулусом са ооцитом (стрелица) нормалних цитолошких карактеристика. Слика 4.3. Ц показује пример примордијалног фоликула који садржи ооциту и један слој спљоштених гранулоза ћелија (стрелица). Слика 4.3. Д показује пример примарног фоликула који садржи ооциту и један слој кубпидних гранулоза ћелија (стрелица). Слика 4.3. Е показује пример секундарних фоликула који садрже ооциту и више слојева кубоидних гранулоза ћелија (стрелице).

Слика 4.3. Ф приказује јајник из PCOS групе на коме се може уочити присуство већег броја фоликуларних цисти (\*). Карактеристике цисте су истањен зид фоликула, са 4 и мање слојева гранулоза ћелија, које предломом серијских пресека јајника не показују другачије карактеристике (више слојева гранулозе), као ни присуство кумулуса и ооците. На сликама 4.3. Г, Х, И и Ј приказане су фоликуларне цисте на различитим увећањима (\*).



Слика 4.3. Утицај примене DHEA у циљу индукције PCOS код пацова на хистолошке карактеристике јајника у контролној и PCOS групи. А – контролна група, фоликули у различитом стадијуму фоликулогенезе, присуство жутих тела (#), Бар = 200  $\mu\text{m}$ ; увеличање 5 x; Б – здрав антрални фоликул са формираним кумулусом, Бар = 50  $\mu\text{m}$ ; увеличање 200 x; В – примордијални фоликул (стрелица), Бар = 50  $\mu\text{m}$ ; увеличање 200 x, Г – примарни фоликул (стелица), Бар = 50  $\mu\text{m}$ ; увеличање 200 x, Д – секундарни фоликули (стрелице), Бар = 50  $\mu\text{m}$ ; увеличање 200 x, Ђ – PCOS група, фоликуларне цисте (\*), Бар = 200  $\mu\text{m}$ ; увеличање 5 x; Е - фоликуларна циста (\*), Бар = 50  $\mu\text{m}$ ; увеличање 200 x; Ж - фоликуларна циста (\*), Бар = 100  $\mu\text{m}$ ; увеличање 100 x; З - фоликуларна циста (\*), Бар = 50  $\mu\text{m}$ ; увеличање 200 x; И - фоликуларна циста (\*), Бар = 100  $\mu\text{m}$ ; увеличање 100 x.



4.1.4. . Испитивање оксидационог статуса код пацова након петонедељног третмана DHEA.

	Контрола	PCOS	Значајност (p)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	7.14±0.07	10.23±0.52	p<0.05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/ml)	5421.51±166.86	6355.26±190.19	p<0.01
TBARS (μmol/ml)	1.192±0.01	1.24±0.01	p<0.01
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/ml)	1229.43±15.97	1313.26±72.23	p>0.05
GSH (nmol/ml)	78551.79±3277.64	71783.16±1369.73	p<0.05
CAT (U/gHbx10 <sup>3</sup> )	5.5±0.90	3.166667±0.71	p<0.01
SOD (U/gHbx10 <sup>3</sup> )	62.41±4.54	42.06±3.27	p<0.01

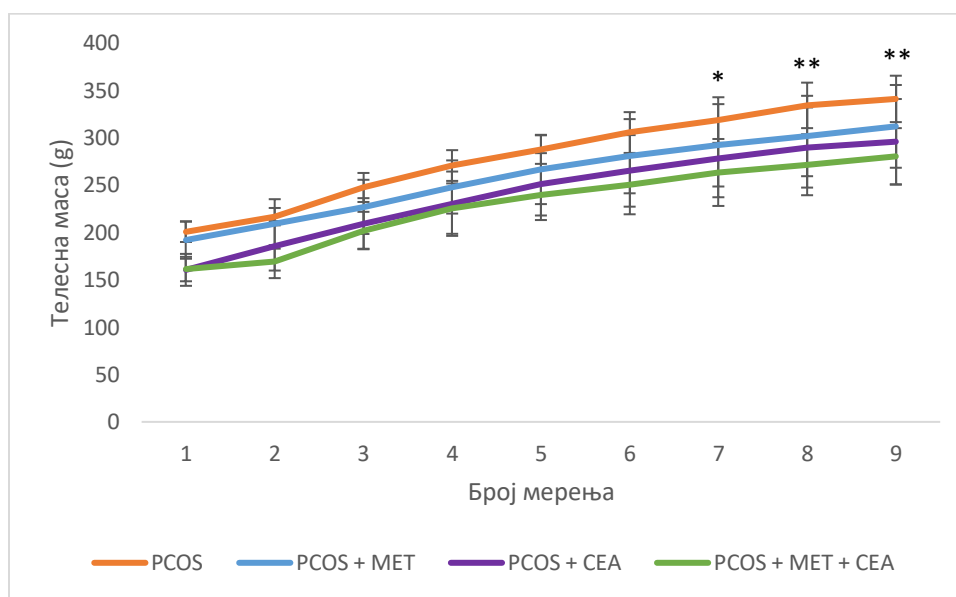
Табела 2. Параметри оксидационог стреса код пацова након индукције PCOS. Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна грешка.

Вредности параметара оксидационог стреса су били промењени након индукције PCOS код пацова. Вредности O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и TBARS су биле значајно веће након петонедељног третмана DHEA, док су вредности GSH, SOD и CAT биле значајно мање у PCOS групи.

4.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на карактеристике PCOS код пацова

4.2.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на антропометријске параметре

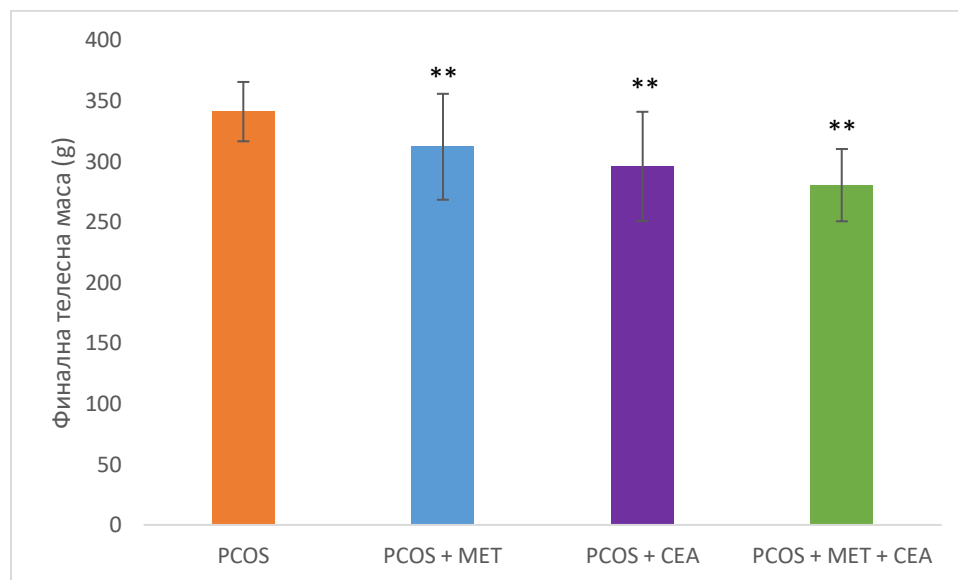
4.2.1.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на телесну масу



Слика 4.4. Промене телесне масе пацова. Мерење је вршено два пута недељно, током 4 недеље третмана. На графикону је приказана и финална телесна маса, израчуната непосредно пред жртвовање животиња. Бредности су представљене као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. \* статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ), \*\* статистички значајна разлика ( $p < 0.01$ ) између PCOS групе и осталих група.

Мерење телесне масе пацова вршено је два пута недељно, током четири недеље третмана. Током поменутог периода, није било статистички значајне разлике у телесној маси у оквиру сваке појединачне групе. Поређење између група показало је статистички значајно већу телесну масу групе PCOS у односу на групе PCOS + MET, PCOS + CEA и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.05$  у 7. мерењу - четврта недеља третмана, прво мерење, као и  $p < 0.01$  у 8. мерењу - четврта недеља третмана, друго мерење). На крају експеримента, финална телесна маса је била значајно већа у PCOS групи у односу на остале групе (девето мерење,  $p < 0.01$ ).

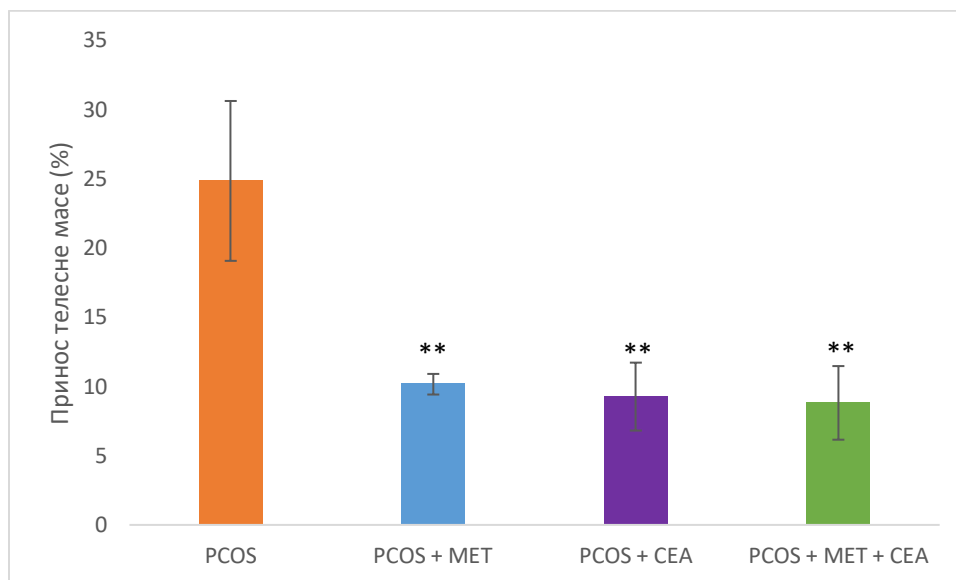
4.2.1.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на финалну телесну масу



Слика 4.5. Промене финалне телесне масе пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Финална телесна маса пацова којима је индукован PCOS је била статистички значајно мања након третмана метформином ( $p < 0.01$ ), стандардизованим екстрактом ароније ( $p < 0.01$ ), као и њихове комбиноване примене ( $p < 0.01$ ), у односу на групу која није била на третману (PCOS).

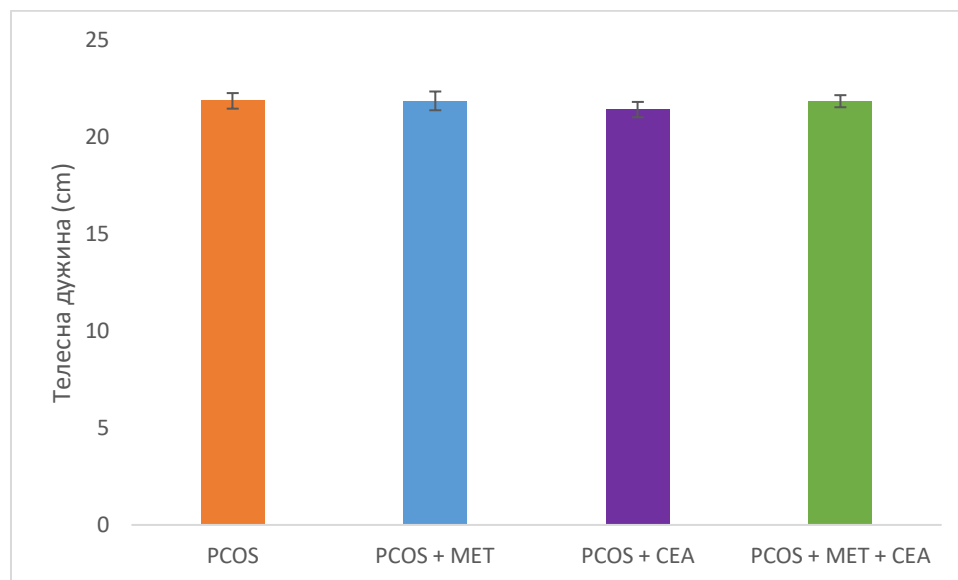
4.2.1.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на принос телесне масе



Слика 4.6. Промене приноса телесне масе пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Принос телесне масе пацова којима је индукован PCOS је била статистички значајно мања након третмана метформином ( $p < 0.01$ ), стандардизованим екстрактом ароније ( $p < 0.01$ ), као и њихове комбинације ( $p < 0.01$ ), у односу на групу која није била на третману (PCOS).

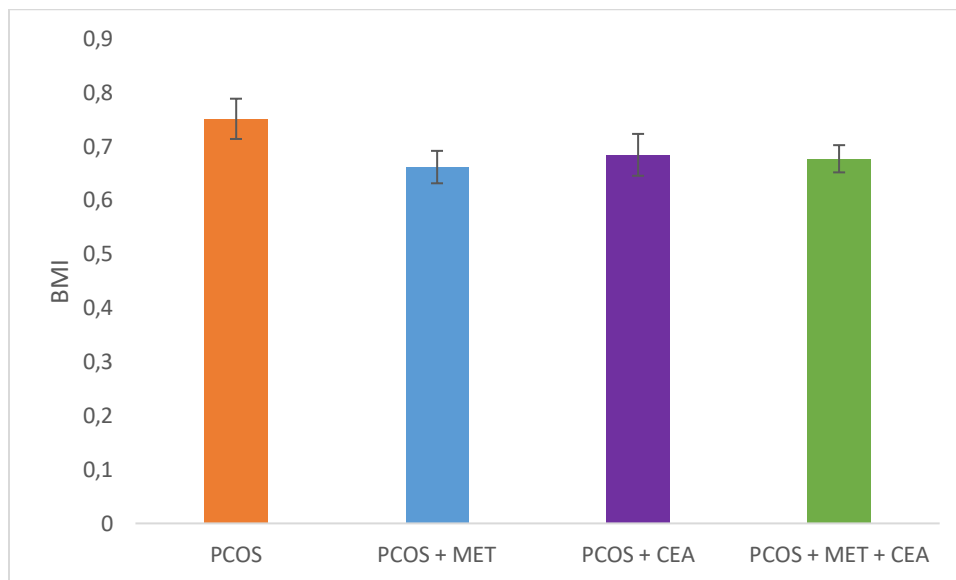
4.2.1.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на телесну дужину



Слика 4.7. Промене телесне дужине пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Није забележена статистички значајна разлика у телесној дужини пацова међу испитиваним групама.

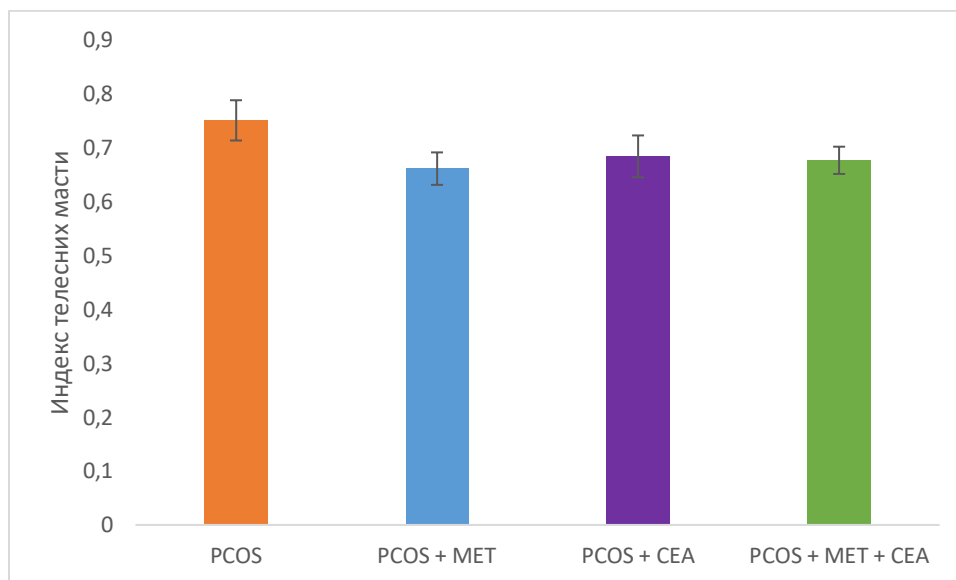
4.2.1.5. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на индекс телесне масе (BMI)



Слика 4.8. Промене индекса телесне масе пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Није забележена статистички значајна разлика у индексу телесне масе пацова међу испитиваним групама.

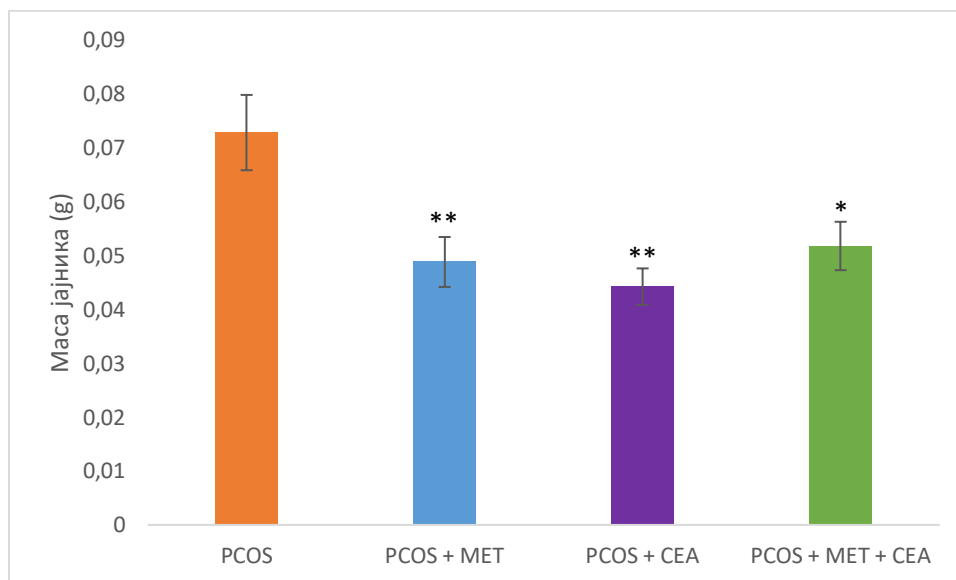
4.2.1.6. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на индекс телесних масти



Слика 4.9. Промене индекса телесних масти пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Није забележена статистички значајна разлика у индексу телесних масти пацова међу испитиваним групама.

4.2.1.7. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на масу оваријума

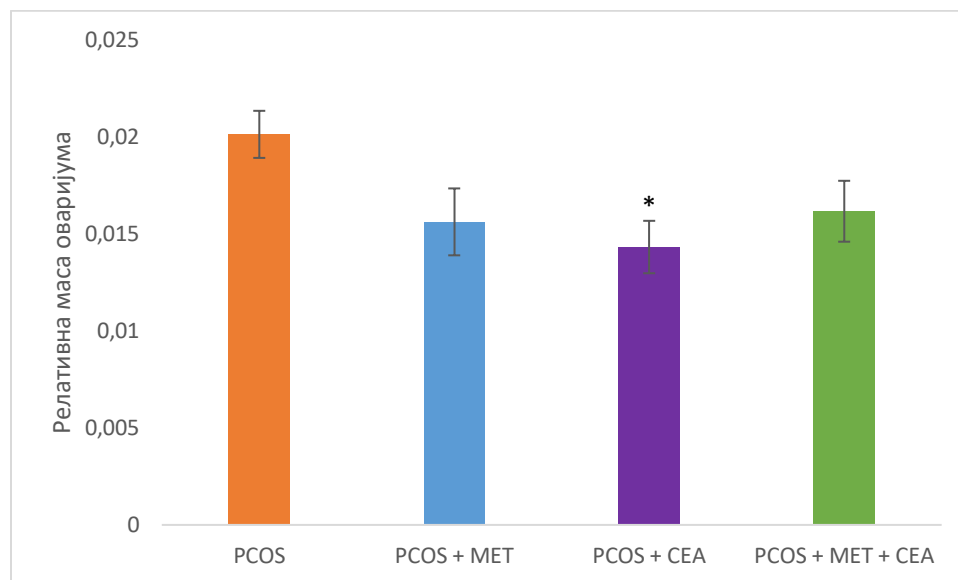


Слика 4.10. Промене масе јајника пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Маса оваријума пацова којима је индукован PCOS је била статистички значајно мања након третмана метформином ( $p < 0.01$ ), стандардизованим екстрактом ароније ( $p < 0.01$ ), као и њихове комбинације ( $p < 0.05$ ), у односу на групу која није била на третману (PCOS).



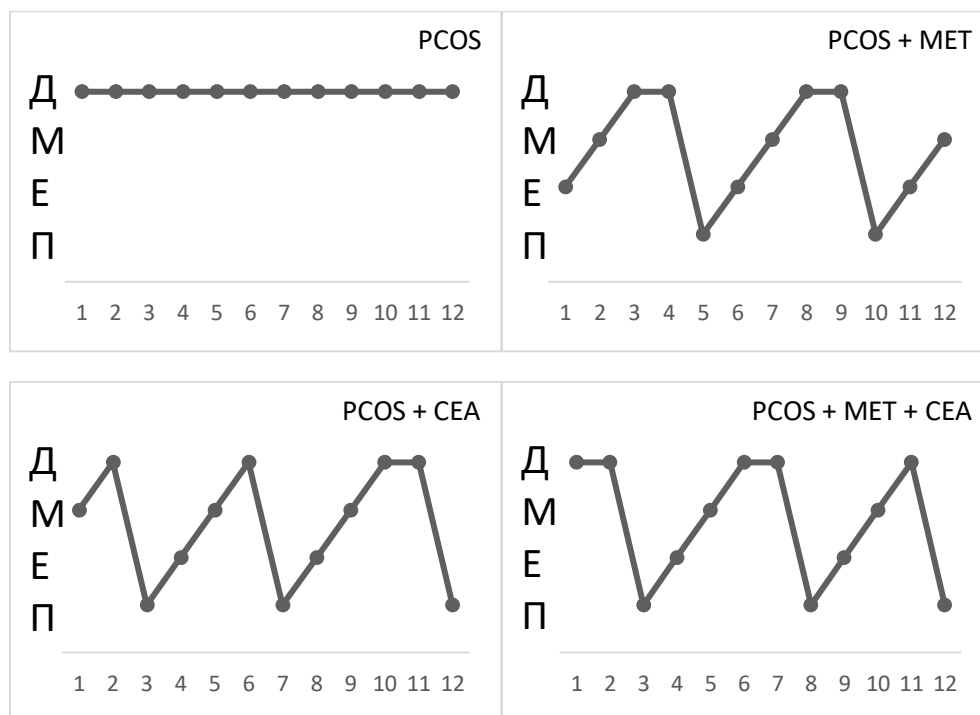
4.2.1.8. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на релативну масу оваријума



Слика 4.11. Промене релативне масе јајника пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

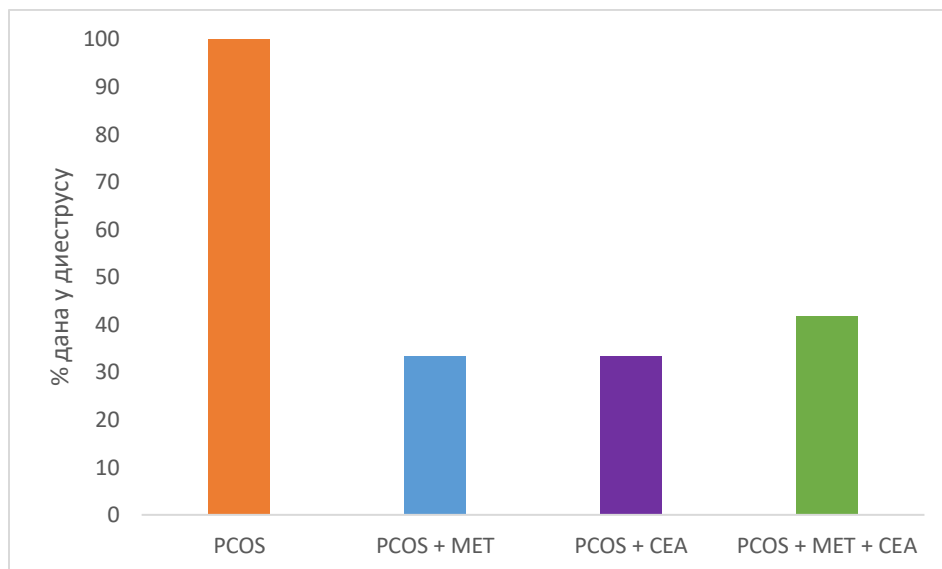
Релативна маса оваријума пацова којима је индукован PCOS је била статистички значајно мања након третмана стандардизованим екстрактом ароније ( $p < 0.05$ ) у односу на групу која није била на третману (PCOS). Између осталих група није регистрована статистички значајна разлика у релативној маси јајника. Дакле, третман метформином самостално, као ни у комбинацији са стандардизованим екстрактом ароније није довео до промене релативне масе јајника код пацова којима је индукован PCOS.

4.2.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на еструсни циклус



Слика 4.12. Промене еструсног циклуса код пацова са PCOS и након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене. Д – диеструс, М – метаеструс, Е – еструс, П – проеструс

На Слици 4.12. приказан је еструсни циклус током последњих 12 дана третмана код 4 репрезентивна шацова из групе PCOS, PCOS + MET, PCOS + SEA и PCOS + MET + SEA. PCOS група показује застој у дисетру фази циклуса, док остале групе (PCOS + MET, PCOS + SEA и PCOS + MET + SEA) показују регуларност у цикличности еструса, који је трајао 4-5 дана.

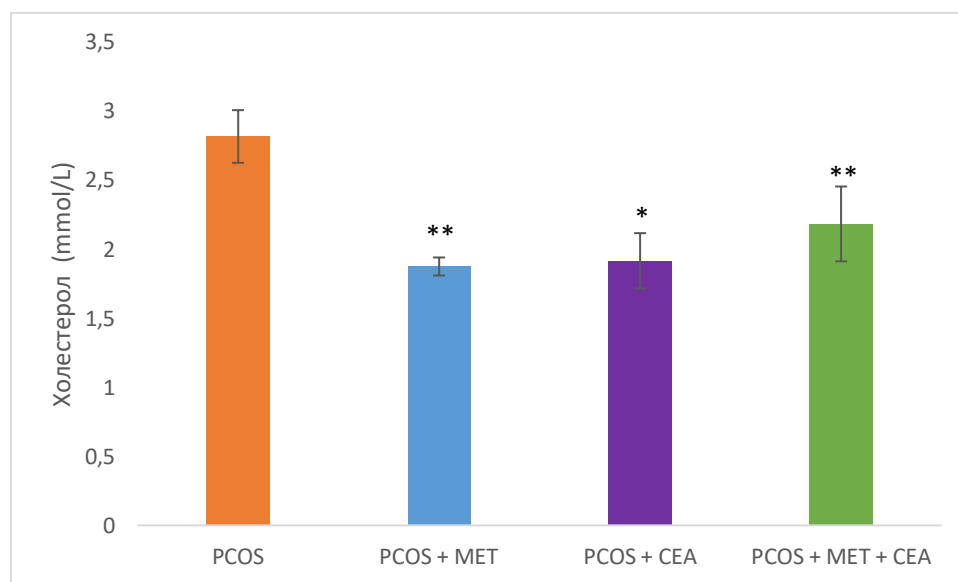


Слика 4.13. Процент дана у диструсу код пацова са PCOS и након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене.

Слика 4.13. показује да је PCOS група имала 100% дана у диструс фази циклуса, док су остале групе имале мањи проценат дана у диструс фази циклуса. Група PCOS + MET и група PCOS + CEA су имале 33.33% дана у диструс фази циклуса, док је група PCOS + MET + CEA имала 41.67% дана у диструс фази циклуса током анализираниог периода од 12 дана.

4.2.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на липидни статус

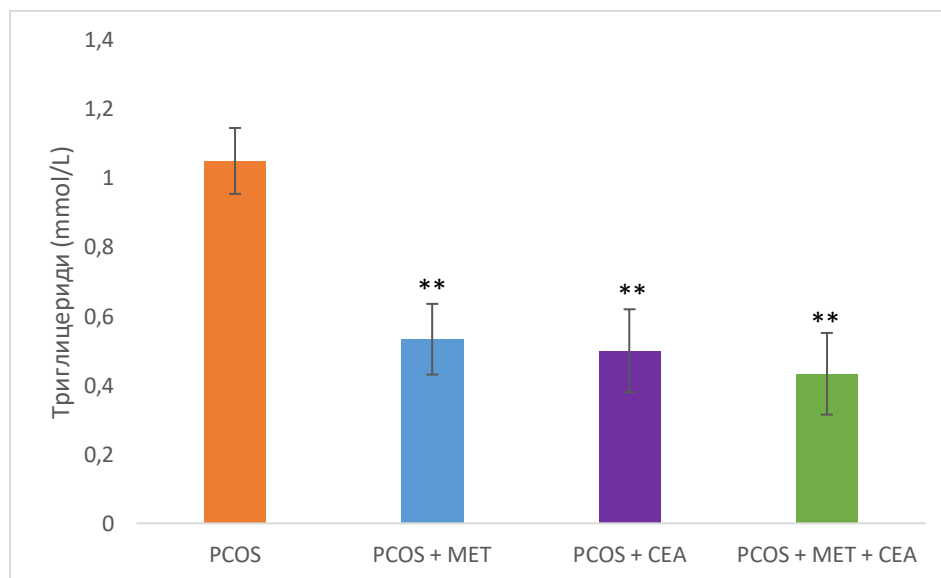
4.2.3.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ниво холестерола у серуму



Слика 4.14. Промене концентрације холестерола у серуму код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација холестерола у серуму код пацова којима је индукован PCOS је била статистички значајно мања након третмана метформином ( $p < 0.01$ ), стандардизованим екстрактом ароније ( $p < 0.05$ ), као и њихове комбинације ( $p < 0.01$ ), у односу на групу која није била на третману (PCOS).

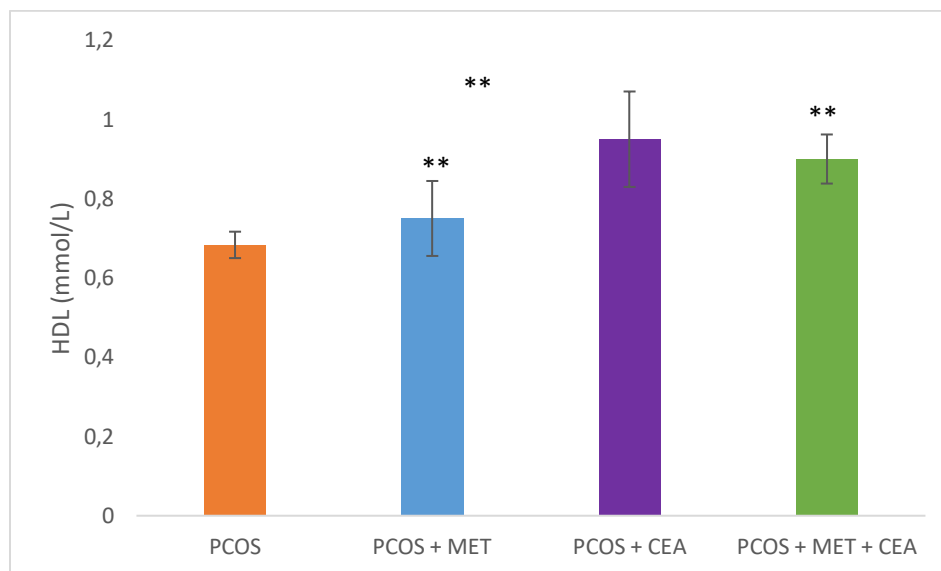
4.2.3.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ниво триглицерида у серуму



Слика 4.15. Промене концентрације триглицерида у серуму код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација триглицерида у серуму код пацова којима је индукован PCOS је била статистички значајно мања након третмана метформином ( $p < 0.01$ ), стандардизованим екстрактом ароније ( $p < 0.01$ ), као и њихове комбинације ( $p < 0.01$ ), у односу на групу која није била на третману (PCOS).

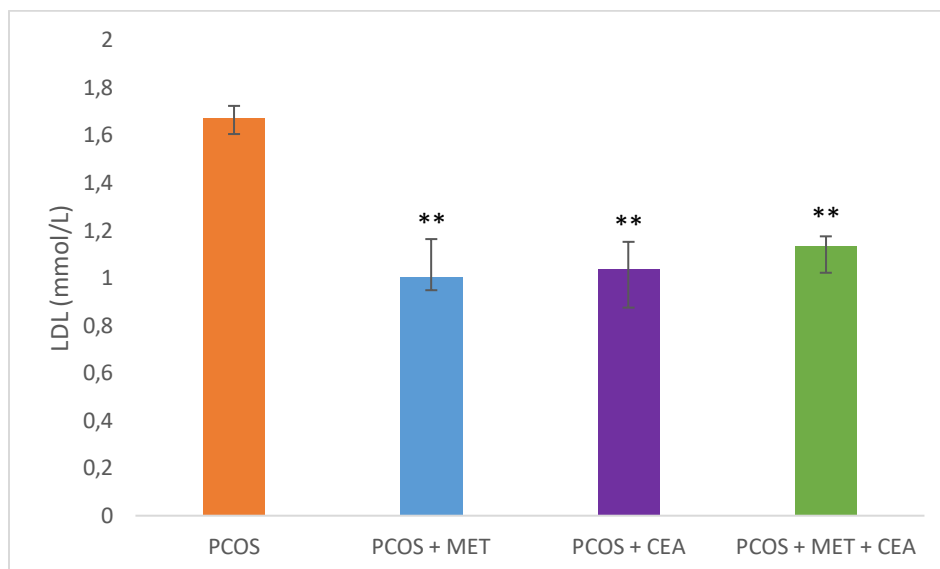
4.2.3.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ниво липопротеина велике густине (HDL) у серуму



Слика 4.16. Промене концентрације липопротеина велике густине (HDL) у серуму код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација липопротеина велике густине (HDL) у серуму код пацова којима је индукован PCOS је била статистички значајно већа након третмана метформином ( $p < 0.01$ ), стандардизованим екстрактом ароније ( $p < 0.01$ ), као и њихове комбинације ( $p < 0.01$ ), у односу на групу која није била на третману (PCOS).

4.2.3.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ниво липопротеина ниске густине (LDL) у серуму

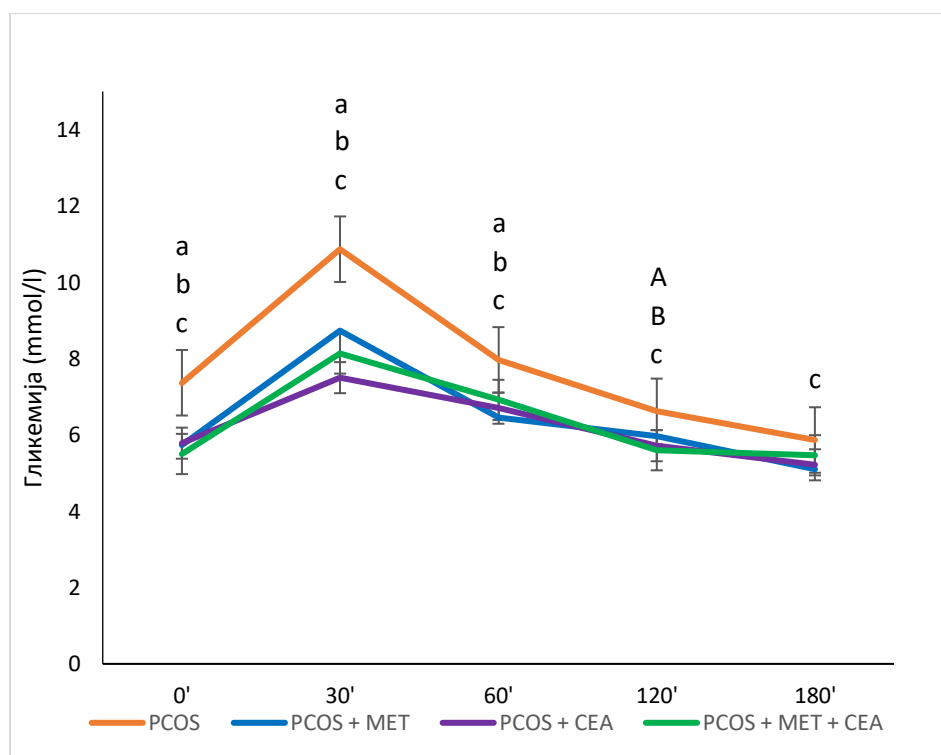


Слика 4.17. Промене концентрације липопротеина ниске густине (LDL) у серуму код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација липопротеина ниске густине (LDL) у серуму код пацова којима је индукован PCOS је била статистички значајно мања након третмана метформином ( $p < 0.01$ ), стандардизованим екстрактом ароније ( $p < 0.01$ ), као и њихове комбинације ( $p < 0.01$ ), у односу на групу која није била на третману (PCOS).

4.2.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на регулацију гликемије

4.2.4.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију глукозе током оралног теста оптерећења глукозом (ОГТТ)



Слика 4.18. Промене гликемије током оралног теста оптерећења глукозом код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене. а –  $p < 0.01$  према PCOS + MET, , б -  $p < 0.01$  према PCOS + CEA, с -  $p < 0.01$  према PCOS + MET + CEA, А -  $p < 0.05$  према PCOS + MET, В -  $p < 0.01$  према PCOS + MET + CEA.

Базалне вредности гликемије су биле сличне код група PCOS + MET, PCOS + CEA и PCOS + MET + CEA, без статистички значајних разлика. Међутим, PCOS група је показала значајно виши ниво гликемије наше, у базалним условима, пре оралног оптерећења глукозом, у односу на све 3 поменуте групе ( $p < 0.01$ ). Оваква разлика међу групама се одржавала у 30. и у 60. минути након оралног оптерећења глукозом, са значајно већим



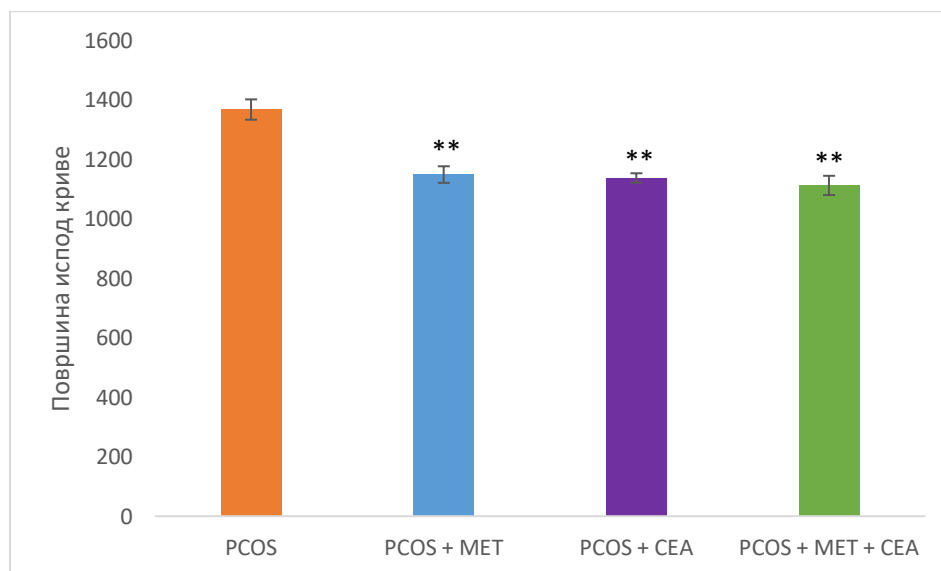
вредностима гликемије код PCOS групе у односу на PCOS + MET, PCOS + CEA и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ ), док се групе третиране метформином и аронијом међусобно нису разликовале у погледу нивоа глукозе у крви. У 120. минуту након администрације 2g/kg глукозе, вредности гликемије код PCOS групе су и даље значајно веће у односу на PCOS + MET ( $p < 0.05$ ), PCOS + CEA ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ ) групу. Коначно, у 180. минуту, вредности гликемије код PCOS групе су једино значајно веће у односу на PCOS + MET + CEA групу ( $p < 0.01$ ).

Минут	Поређење између група	р вредност
0'	PCOS vs. PCOS + MET	<0,01
0'	PCOS vs. PCOS + CEA	<0,01
0'	PCOS vs. PCOS + MET + CEA	<0,01
30'	PCOS vs. PCOS + MET	<0,01
30'	PCOS vs. PCOS + CEA	<0,01
30'	PCOS vs. PCOS + MET + CEA	<0,01
60'	PCOS vs. PCOS + MET	<0,01
60'	PCOS vs. PCOS + CEA	<0,01
60'	PCOS vs. PCOS + MET + CEA	<0,01
120'	PCOS vs. PCOS + MET	<0,05
120'	PCOS vs. PCOS + CEA	<0,05
120'	PCOS vs. PCOS + MET + CEA	<0,01
180'	PCOS vs. PCOS + MET + CEA	<0,01

Табела 3. Поређење гликемије између испитиваних група у базалним условима и након 30, 60, 120 и 180 минута од оралног оптерећења глукозом.

У Табели 3 приказано је поређење између испитиваних група, у односу на време узорковања крви за одређивање вредности гликемије.

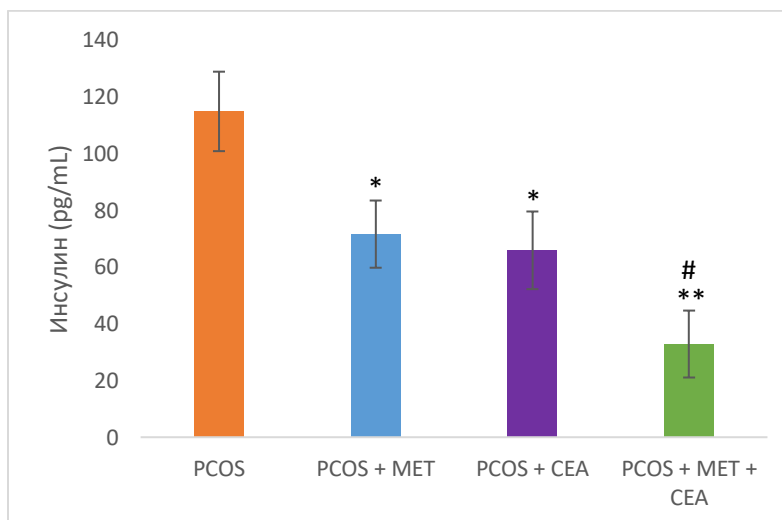
4.2.4.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на површину испод криве гликемије анкон оралног теста оптерећења глукозом (ОГТТ)



Слика 4.19. Промене површине испод криве гликемије након оралног теста оптерећења глукозом код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Површина испод криве гликемије у ОГТТ нумерички је представљена стубичастим дијаграмима на Слици 4.19. Овај параметар је био значајно већи код PCOS групе у односу на све три третиране групе (PCOS + MET ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ )).

4.2.4.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију инсулина

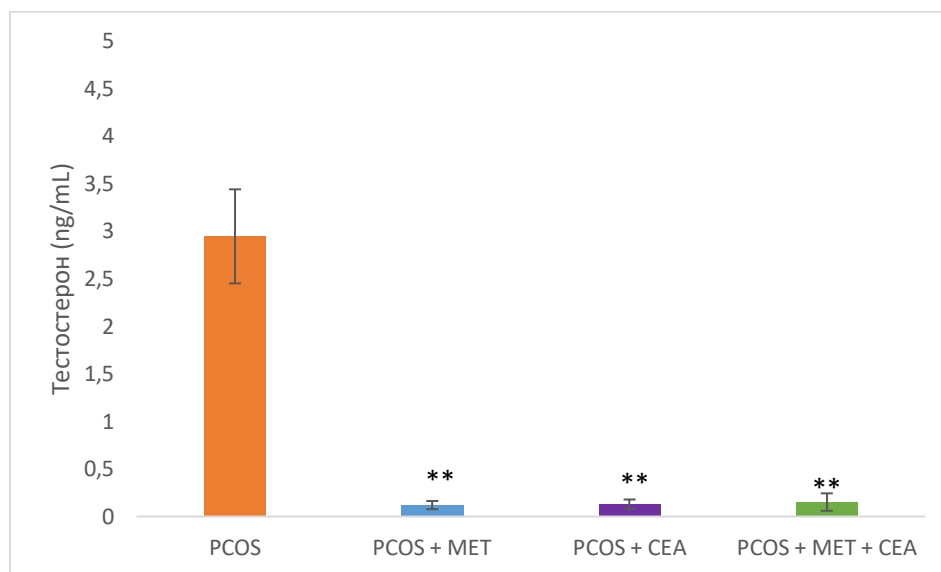


Слика 4.20. Промене концентрације инсулина код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Вредности инсулина у крви су се значајно разликовале између испитиваних група. Инсулинемија је била значајно већа код PCOS групе у односу на PCOS + CEA групу ( $p < 0.05$ ) и у односу на PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ ). Поред тога, PCOS + MET + CEA група је имала значајно ниже вредности инсулина не само у односу на PCOS групу, већ и у односу на PCOS + MET групу ( $p < 0.05$ ).

4.2.5. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на хормонски статус

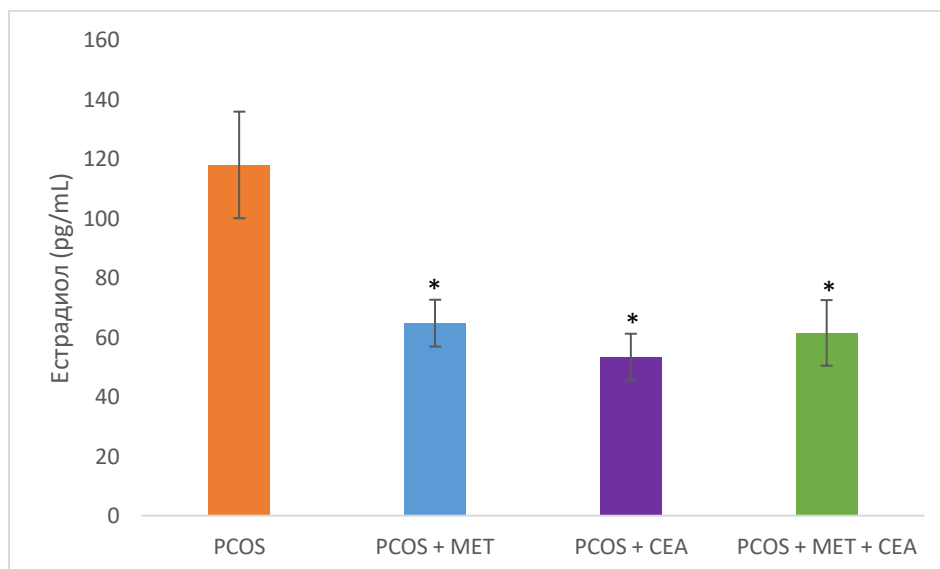
4.2.5.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности тестостерона у серуму



Слика 4.21. Промене концентрације тестостерона код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Вредности тестостерона у крви су биле значајно веће код PCOS групе у односу на PCOS + MET групу ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA групу ( $p < 0.01$ ) и у односу на PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ ). Вредности тестостерона између група третираних метформином и/или аронијом се нису значајно разликовале.

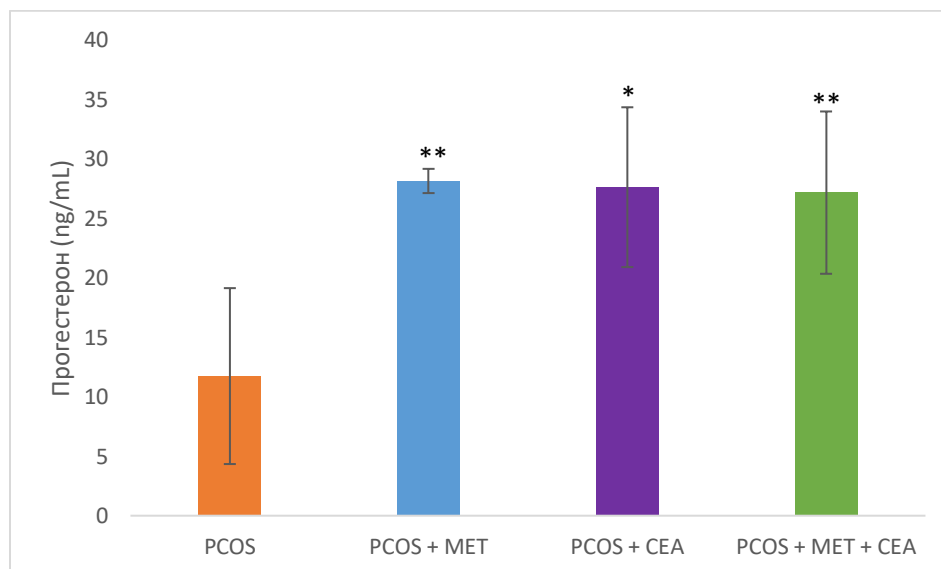
4.2.5.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности естрадиола у серуму



Слика 4.22. Промене концентрације естрадиола код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Вредности естрадиола у крви су биле значајно веће код PCOS групе у односу на PCOS + MET групу ( $p < 0.05$ ), PCOS + CEA групу ( $p < 0.05$ ) и у односу на PCOS + MET + CEA ( $p < 0.05$ ). Вредности естрадиола између група третираних метформином и/или аронијом се нису значајно разликовале.

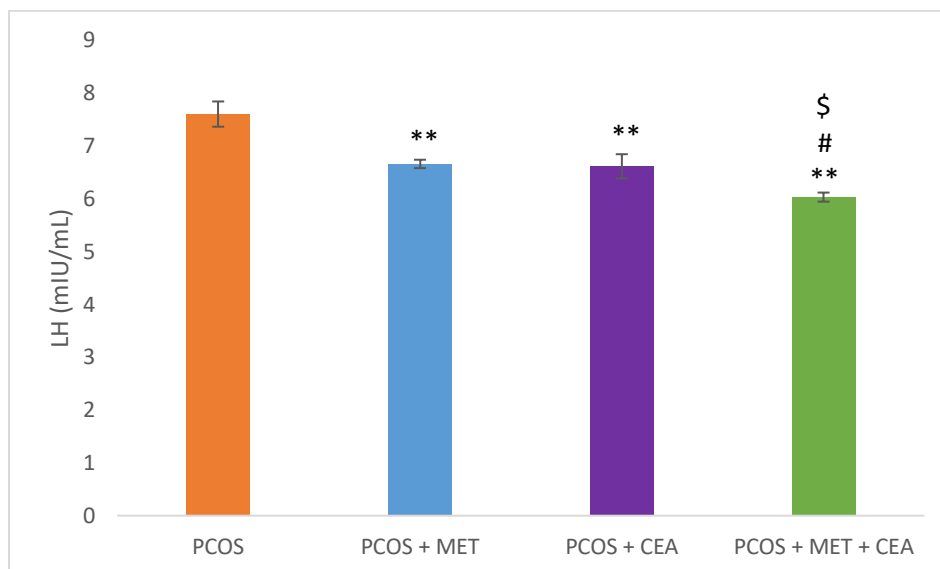
4.2.5.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности прогестерона у серуму



Слика 4.23. Промене концентрације прогестерона код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Вредности прогестерона у крви су биле значајно мање код PCOS групе у односу на PCOS + MET групу ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA групу ( $p < 0.05$ ) и у односу на PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ ). Вредности прогестерона између група третираних метформином и/или аронијом се нису значајно разликовале.

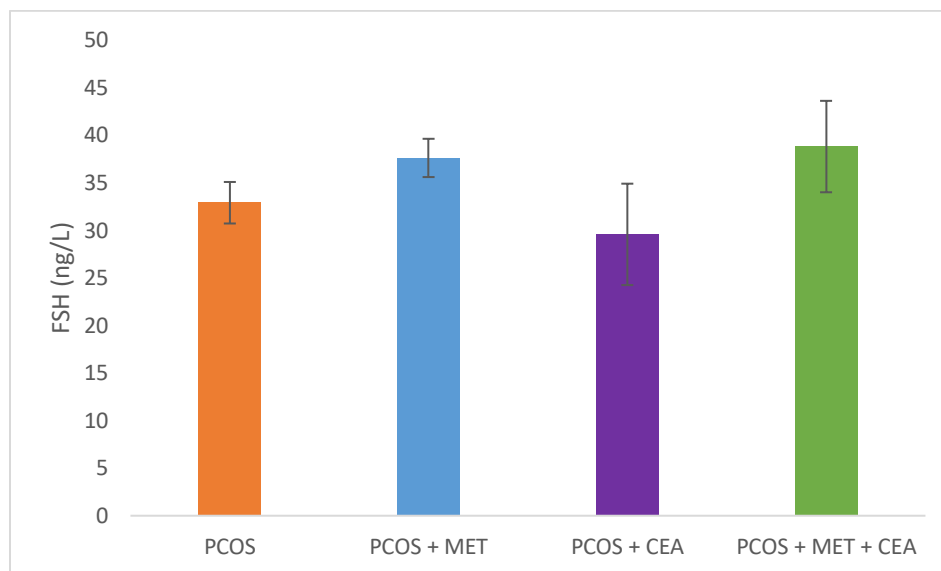
4.2.5.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности LH у серуму



Слика 4.24. Промене концентрације LH код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Вредности LH у крви су биле значајно веће код PCOS групе у односу на PCOS + MET групу ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA групу ( $p < 0.001$ ) и у односу на PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ ). Поред тога, PCOS + MET + CEA група је показала значајно нижи ниво LH у односу на PCOS + MET групу ( $p < 0.05$ ), као и у односу на PCOS + CEA групу ( $p < 0.05$ ).

4.2.5.5. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности FSH у серуму

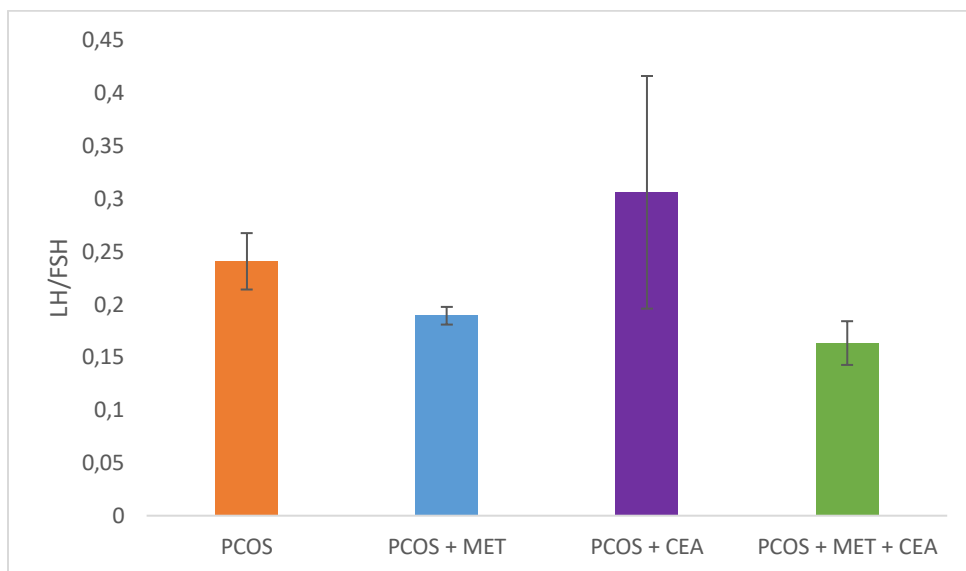


Слика 4.25. Промене концентрације FSH код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Вредности FSH у крви се нису значајно разликовале између испитиваних група.



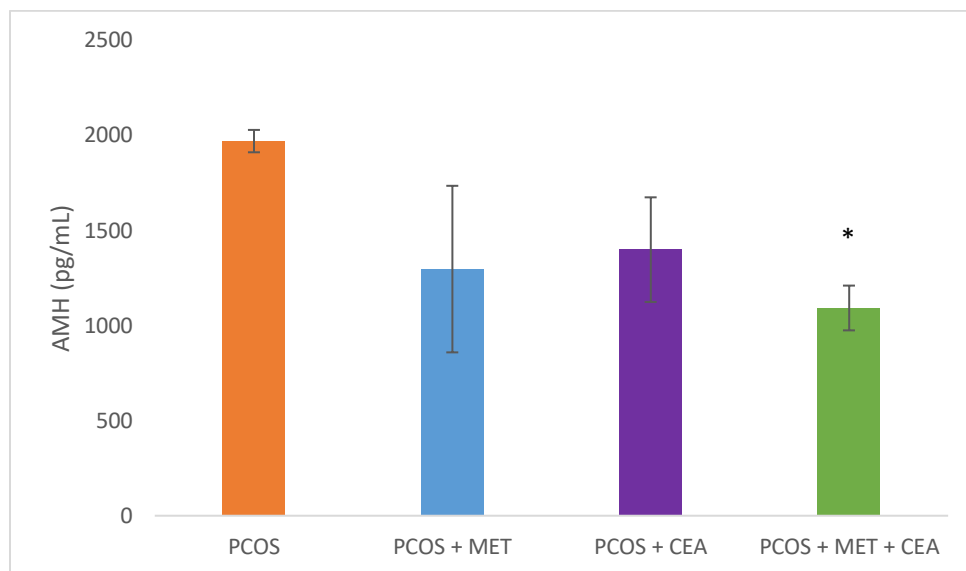
4.2.5.6. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на LH/FSH однос



Слика 4.26. Промене LH/FSH односа код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Промене LH/FSH односа нису биле статистички значајне између посматраних група.

4.2.5.7. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на вредности АМН у серуму

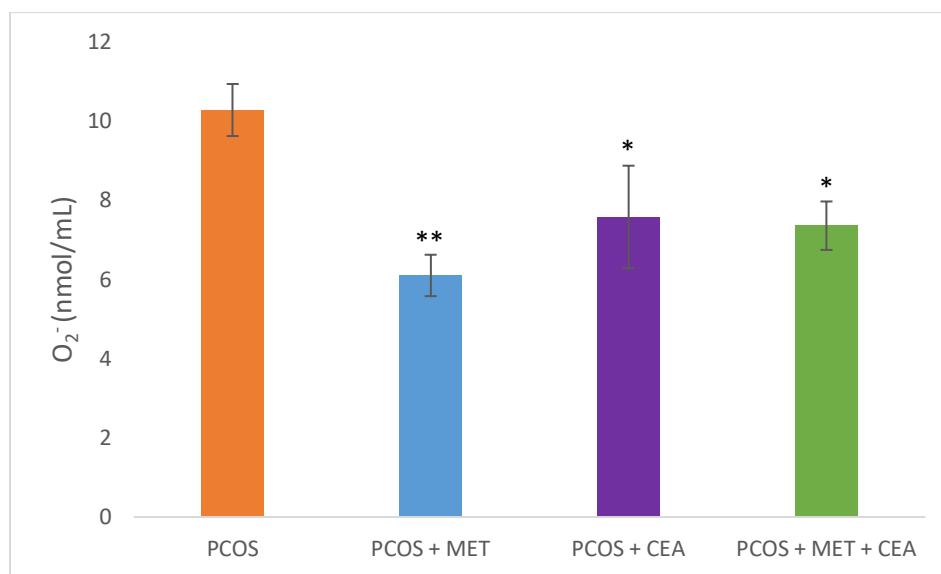


Слика 4.27. Промене концентрације АМН код пацова са PCOS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Вредности АМН у крви су биле значајно веће код PCOS групе у односу на PCOS + MET + CEA ( $p < 0.05$ ). Групе третиране само метформином или само аронијом се нису значајно разликовале од PCOS групе у погледу концентрације АМН у крви.

4.2.6. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на оксидациони стрес у крви

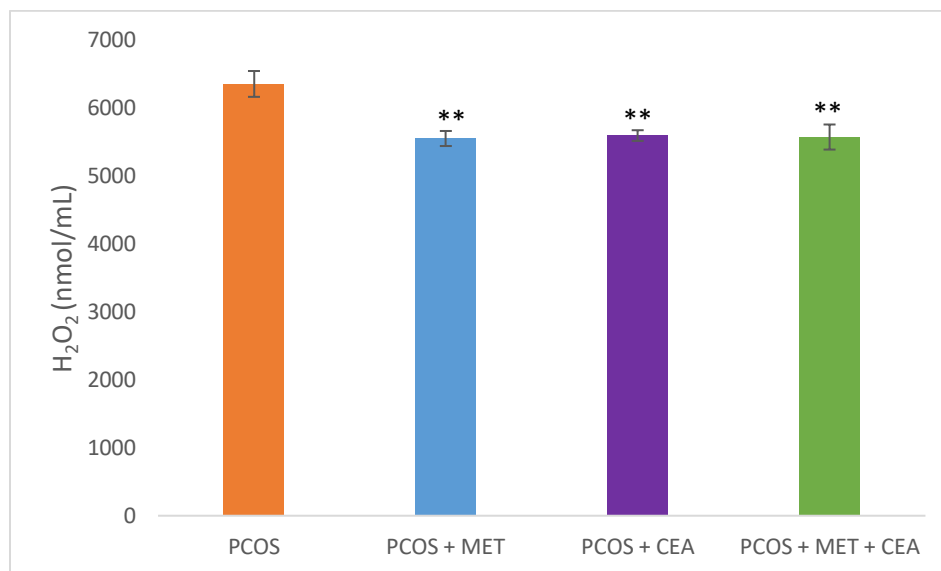
4.2.6.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију  $O_2^-$



Слика 4.28. Промене концентрације  $O_2^-$  након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација  $O_2^-$  је била значајно већа код PCOS групе у односу на све три третиране групе (PCOS + MET ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA ( $p < 0.05$ ) и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.05$ )). Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу концентрације  $O_2^-$ .

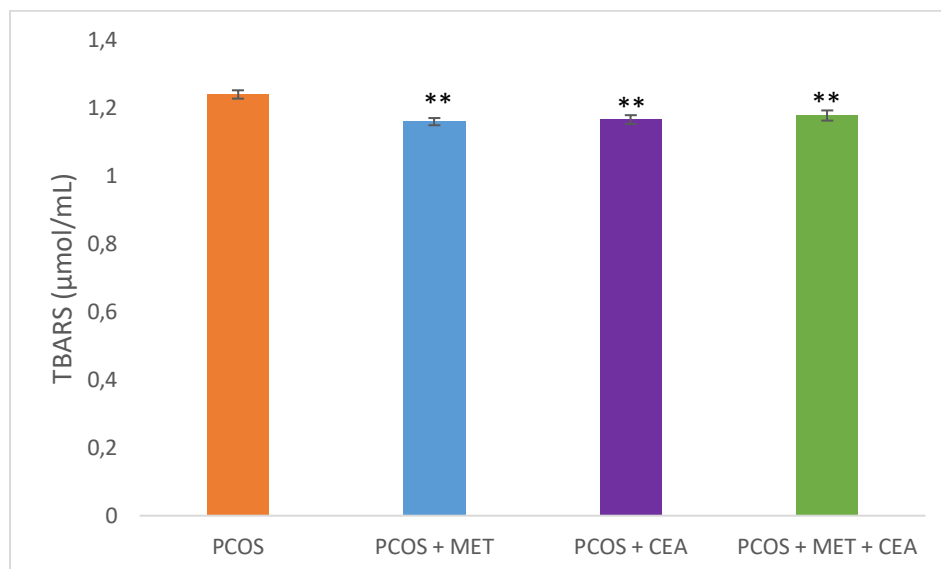
4.2.6.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију  $H_2O_2$



Слика 4.29. Промене концентрације  $H_2O_2$  након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација  $H_2O_2$  је била значајно већа код PCOS групе у односу на све три третиране групе (PCOS + MET ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ )). Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу концентрације  $H_2O_2$ .

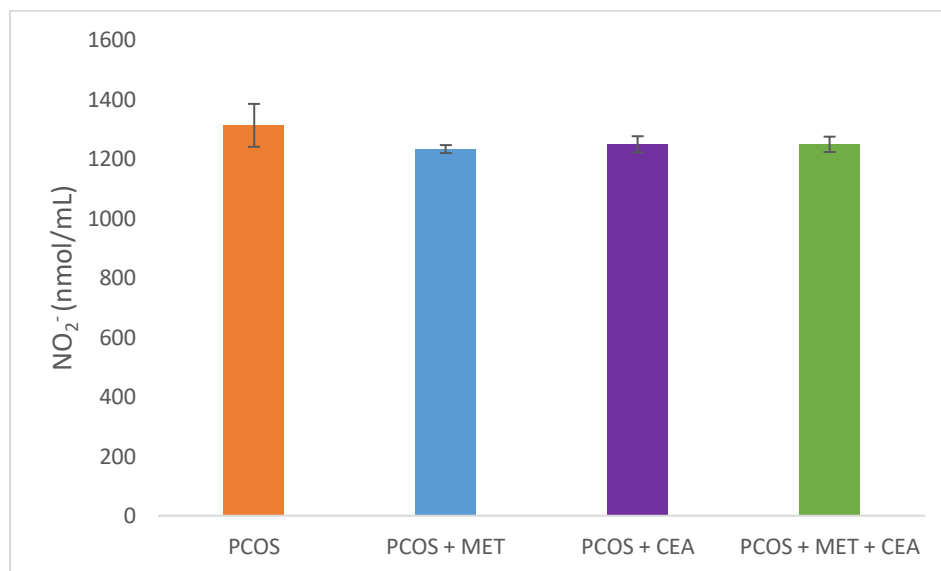
4.2.6.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију TBARS



Слика 4.30. Промене концентрације TBARS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација TBARS је била значајно већа код PCOS групе у односу на све три третиране групе (PCOS + MET ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ )). Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу концентрације TBARS.

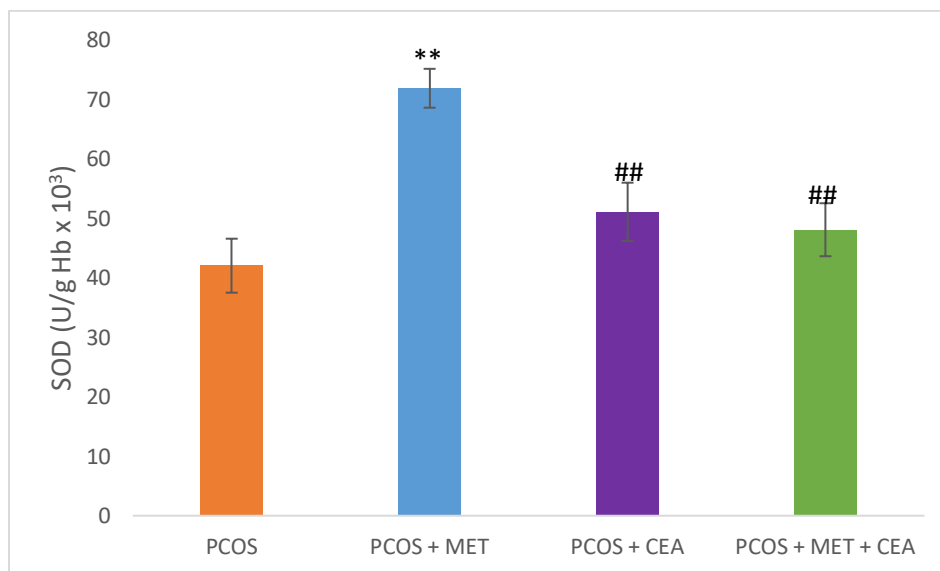
4.2.6.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију  $\text{NO}_2^-$



Слика 4.31. Промене концентрације  $\text{NO}_2^-$  након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација  $\text{NO}_2^-$  се није значајно разликовала међу испитиваним групама.

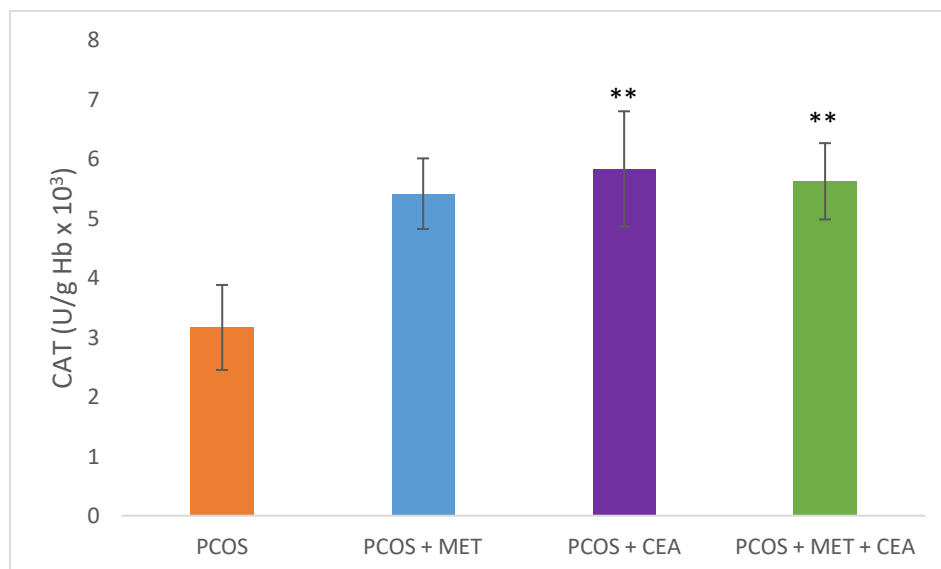
4.2.6.5. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на активност SOD



Слика 4.32. Промене активности SOD након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Активност SOD је била значајно већа код PCOS + MET групе односу на PCOS групу ( $p < 0.01$ ). Поред тога, PCOS + MET група је имала значајно веће вредности овог параметра у односу на PCOS + CEA ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA групу ( $p < 0.01$ ).

4.2.6.6. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на активност САТ

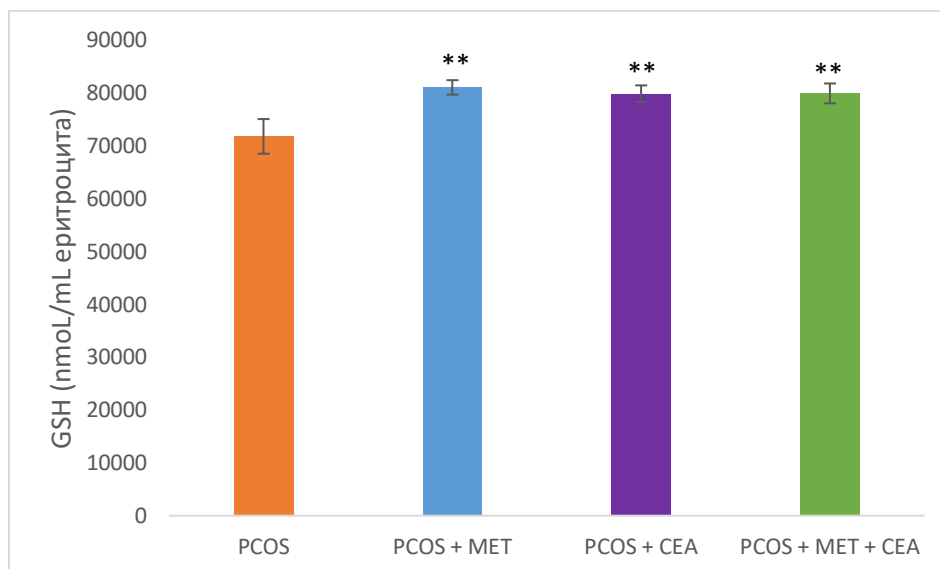


Слика 4.33. Промене активности САТ након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Активност САТ је била значајно већа код PCOS + CEA ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA групе ( $p < 0.01$ ), у односу на PCOS групу. PCOS + MET група није имала статистички значајну разлику у активности САТ односу на PCOS групу ( $p > 0.05$ ). Ипак, вредности се нису значајно разликовале између 3 групе третиране метформином и/или аронијом.



4.2.6.7. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију GSH

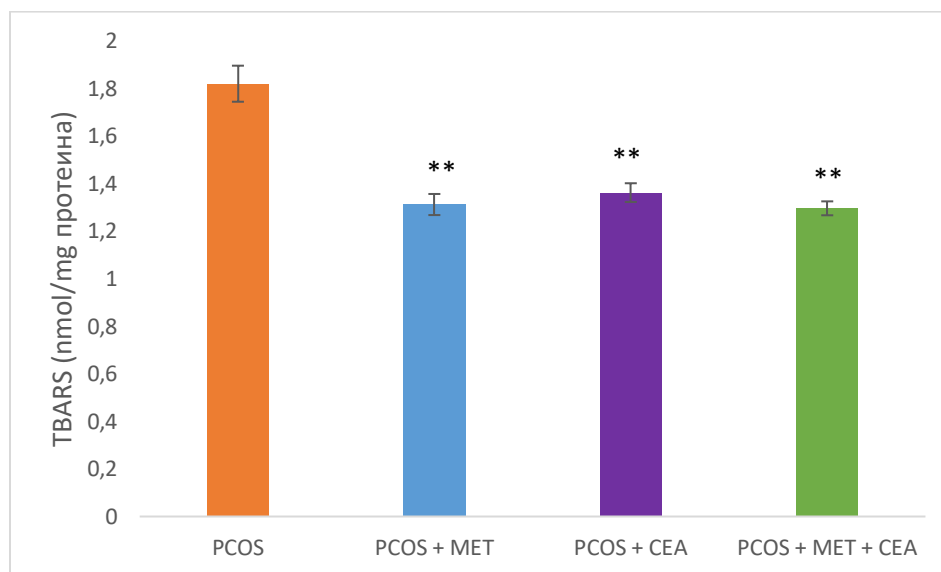


Слика 4.34. Промене концентрације GSH након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација GSH је била значајно мања код PCOS групе у односу на све три третиране групе (PCOS + MET ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ )). Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу концентрације GSH.

4.2.7. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на оксидациони стрес у ткиву јајника

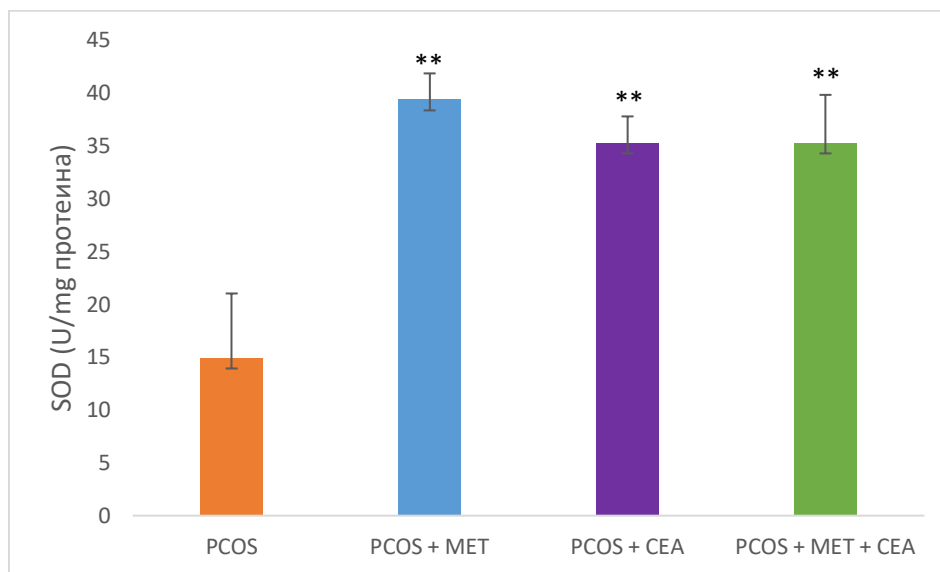
4.2.7.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију TBARS у ткиву јајника



Слика 4.35. Промене концентрације TBARS након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација TBARS је била значајно већа код PCOS групе у односу на све три третиране групе (PCOS + MET ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ )). Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу концентрације TBARS.

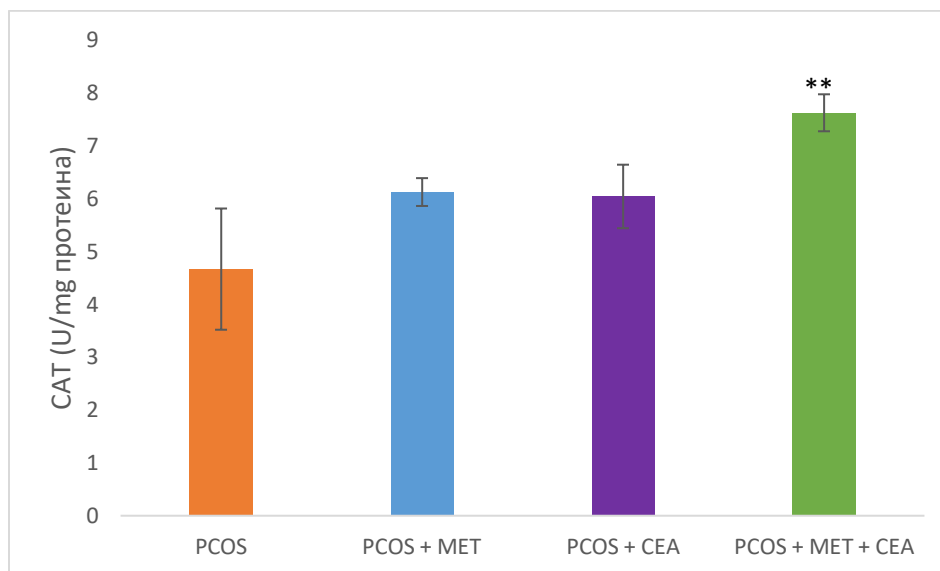
4.2.7.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на активност SOD у ткиву јајника



Слика 4.36. Промене активности SOD након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Активност SOD је била значајно мања код PCOS групе у односу на све три третиране групе (PCOS + MET ( $p < 0.01$ ), PCOS + CEA ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.01$ )). Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу активности SOD.

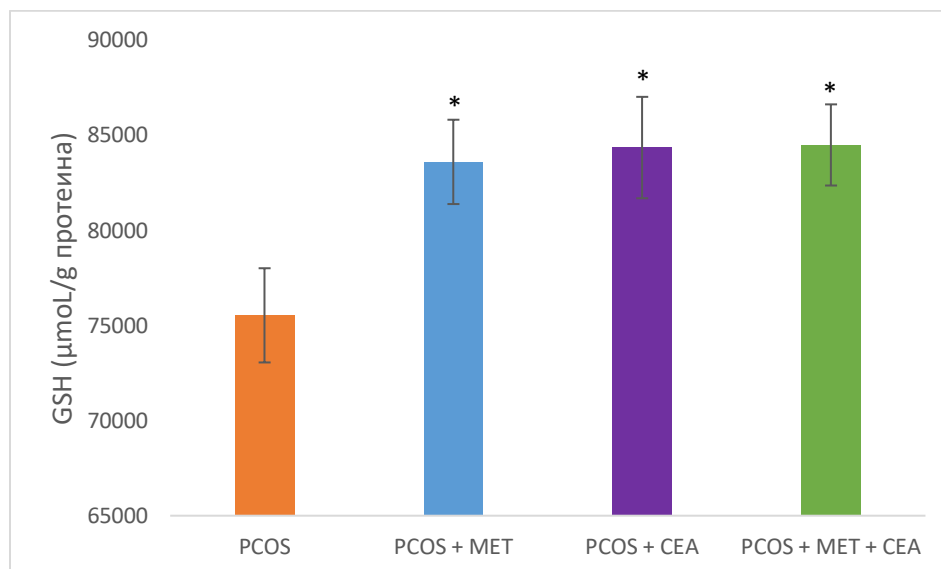
4.2.7.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на активност САТ у ткиву јајника



Слика 4.37. Промене активности САТ након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Активност САТ је била значајно већа код PCOS + MET + CEA групе у односу на PCOS групу ( $p < 0.01$ ). Између осталих група није било статистички значајне разлике у активности САТ у јајнику.

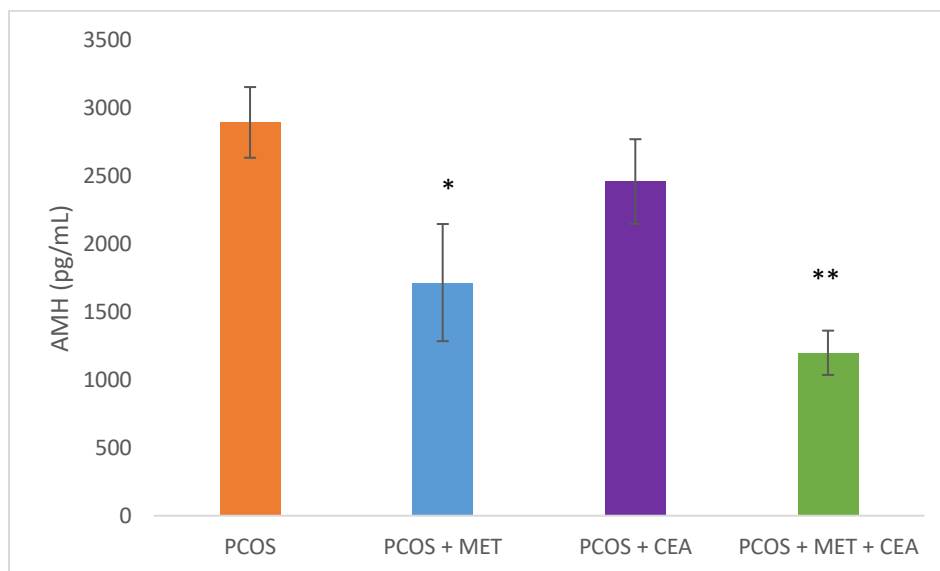
4.2.7.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на концентрацију GSH у ткиву јајника



Слика 4.38. Промене концентрације GSH након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација GSH је била значајно мања код PCOS групе у односу на све три третиране групе (PCOS + MET ( $p < 0.05$ ), PCOS + CEA ( $p < 0.05$ ) и PCOS + MET + CEA ( $p < 0.05$ )). Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу концентрације GSH.

4.2.8. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на АМН у ткиву јајника



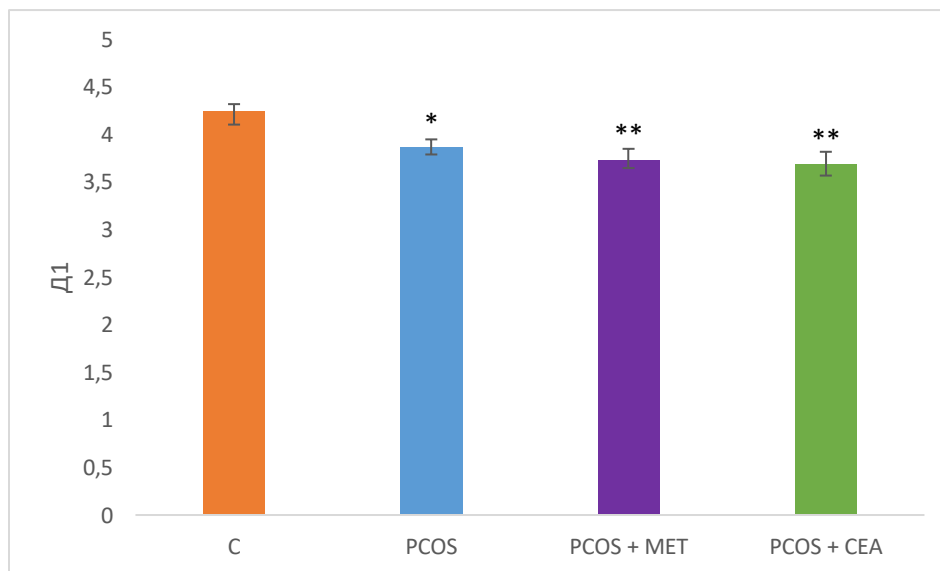
Слика 4.39. Промене концентрације АМН након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Концентрација АМН је била значајно већа код PCOS групе у односу на PCOS + MET групу ( $p < 0.05$ ), и PCOS + MET + CEA групу ( $p < 0.01$ ). Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу концентрације АМН.

#### 4.2.9. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на ултразвучне карактеристике јајника

Током трајања експерименталног протокола, једном недељно вршена је ултразвучна анализа јајника код пацова. Како се вредности нису значајно разликовале између група, као ни унутар групе током трајања протокола, резултати нису представљени табеларно или графички. На крају експерименталног протокола, непосредно пред жртвовање животиња урађена је последња ултразвучна анализа јајника, а вредности испитиваних параметара су представљене графички у наставку.

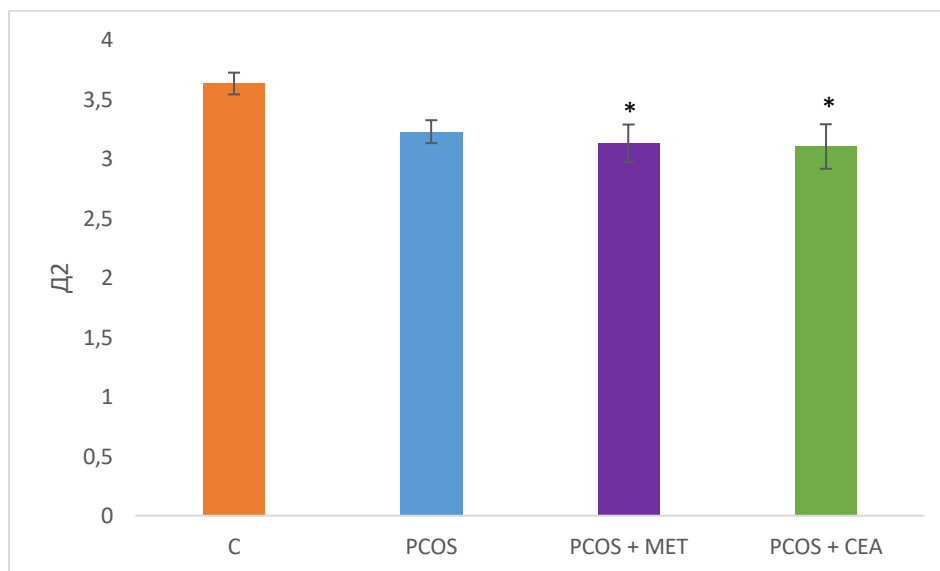
##### 4.2.9.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на лонгитудинални дијаметар јајника (Д1) на крају експерименталног протокола



Слика 4.40. Промене величине Д1 након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Лонгитудинални дијаметар (Д1) је било значајно већи код PCOS групе у односу на PCOS + MET групу ( $p < 0.05$ ), PCOS + CEA групу ( $p < 0.01$ ) и PCOS + MET + CEA групу ( $p < 0.01$ ). Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу промене лонгитудиналног дијаметра оваријума.

4.2.9.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на трансверзални дијаметар јајника (Д2) на крају експерименталног протокола

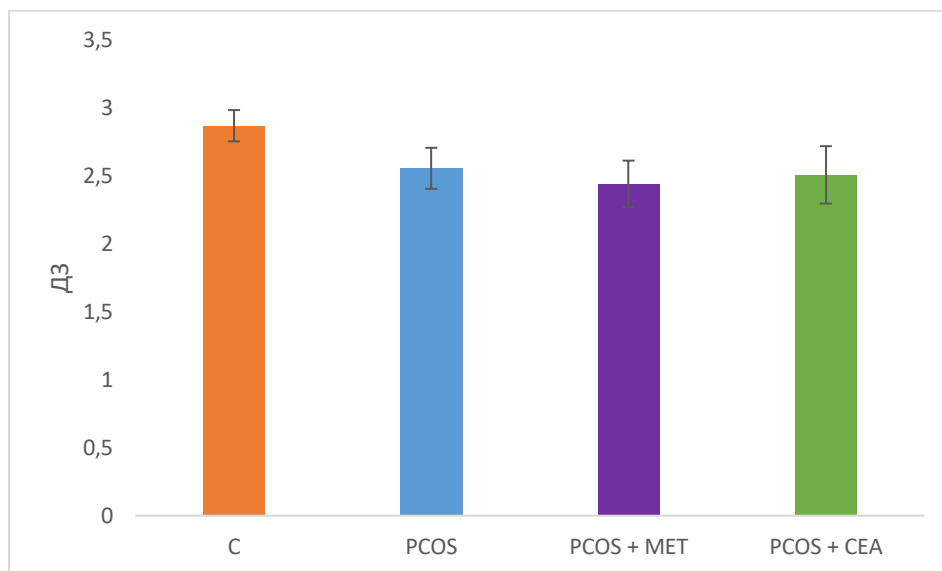


Слика 4.41. Промене величине Д2 након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Трансверзални дијаметар јајника (Д2) је био значајно мањи у групама третмираним СЕА у односу на PCOS групу ( $p < 0.05$ ). Третман МЕТ није имао ефекта на промену овог параметра.



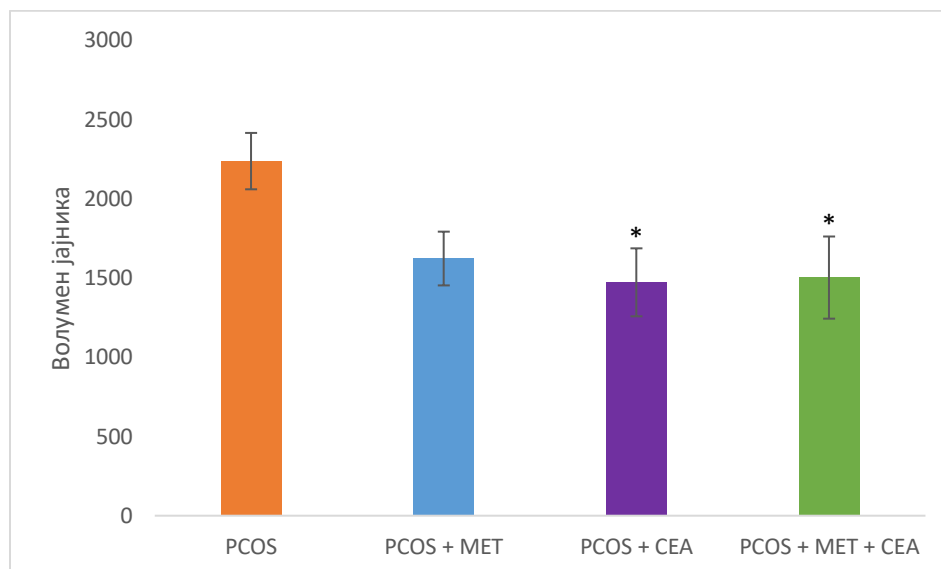
4.2.9.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на антерио-постериорни дијаметар јајника (ДЗ) на крају експерименталног протокола



Слика 4.42. Промене величине ДЗ након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Антерио-постериорни дијаметар (ДЗ) се није међусобно статистички значајно разликовао између испитиваних група.

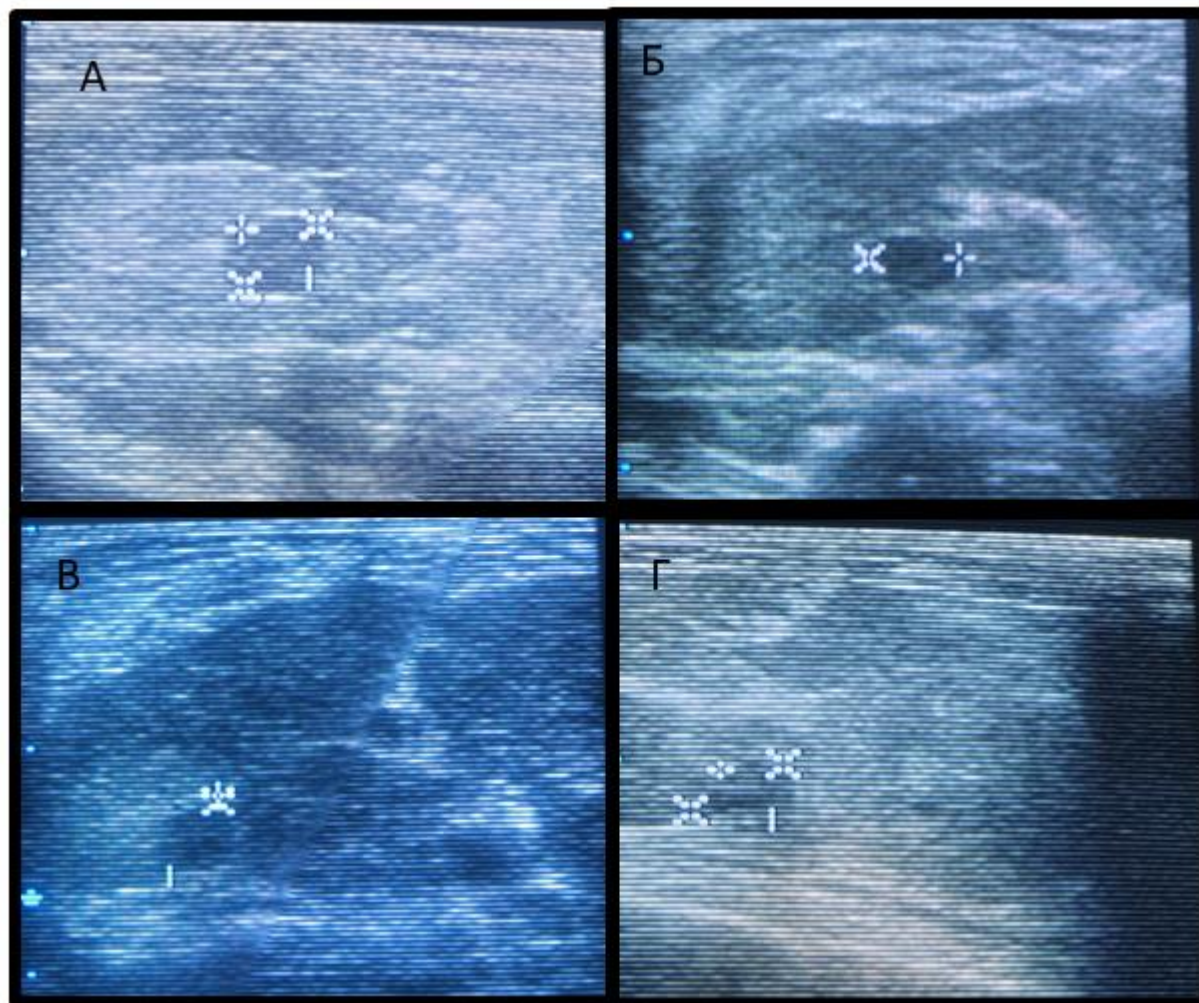
4.2.9.4. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на волумен јајника на крају експерименталног протокола



Слика 4.43. Промене волумена јајника након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Волумен јајника је било значајно већи код PCOS групе у односу на PCOS + CEA групу ( $p < 0.05$ ) и PCOS + MET + CEA групу ( $p < 0.05$ ), док у односу на PCOS + MET групу није било статистички значајне разлике. Групе третиране метформином, аронијом или комбинацијом ова два агенса нису се међусобно разликовале у погледу промене лонгитудиналног дијаметра оваријума.

4.2.9.5. Ултрасонографски приказ левог јајника након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на крају експерименталног протокола

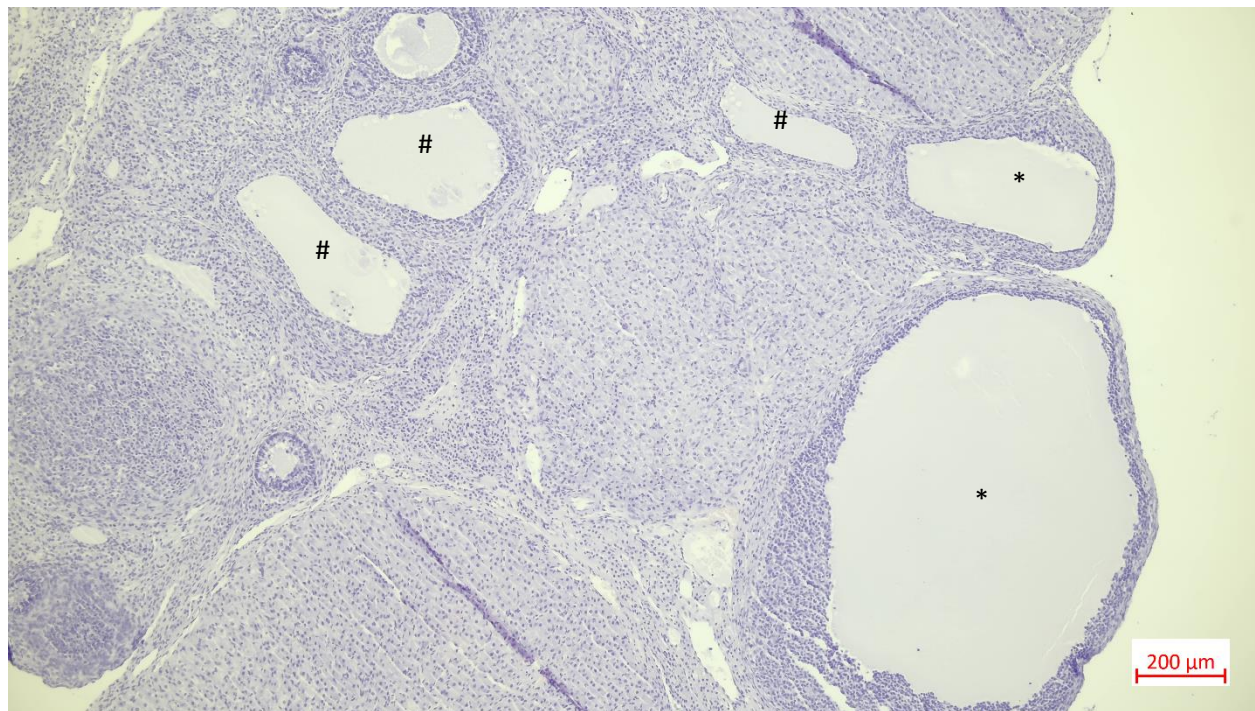


Слика 4.44. Ултрасонографски приказ левог јајника након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на крају експерименталног протокола. А - PCOS група, Б - PCOS + MET група, В - PCOS + SEA група, Д - PCOS + MET + SEA група.

На Слици 4.44. виде се ултрасонографски прикази левог јајника који су репрезентативни за све 4 испитиване групе. У свим испитиваним групама јајници су према ултразвучним карактеристикама приказани као овалне, јасно разграничене изеохоичне формације. У PCOS групи (слика 4.43. А) могу се уочити хипоехогене кружне формације (које би могле одговарати цистама), као и жаришта атретичних фоликула и подручја хипертекозе у сржи јајника. Међутим, групе PCOS + MET, PCOS + SEA, као и PCOS + MET

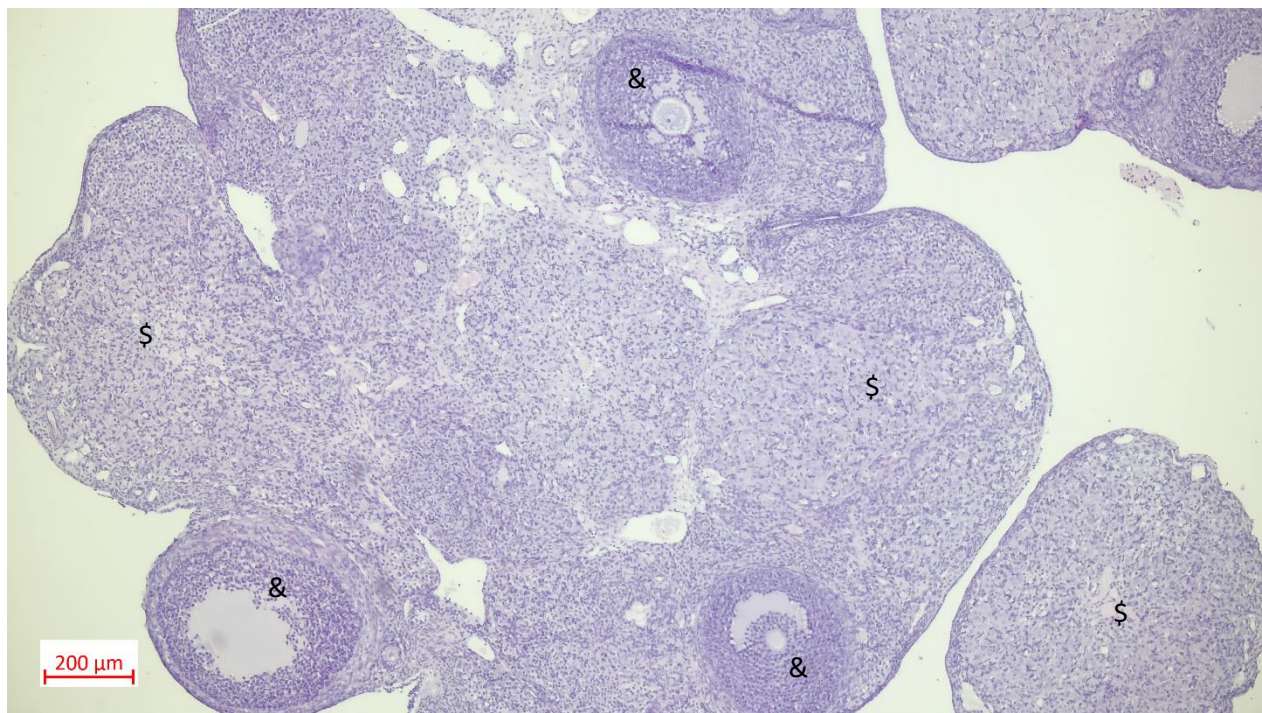
+ СЕА (Слика 4.43. Б, В, и Д3) показују нормалне структуре јајника без формација испуњених течношћу и без хипертекозе.

4.2.10. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на хистолошке промене у ткиву јајника

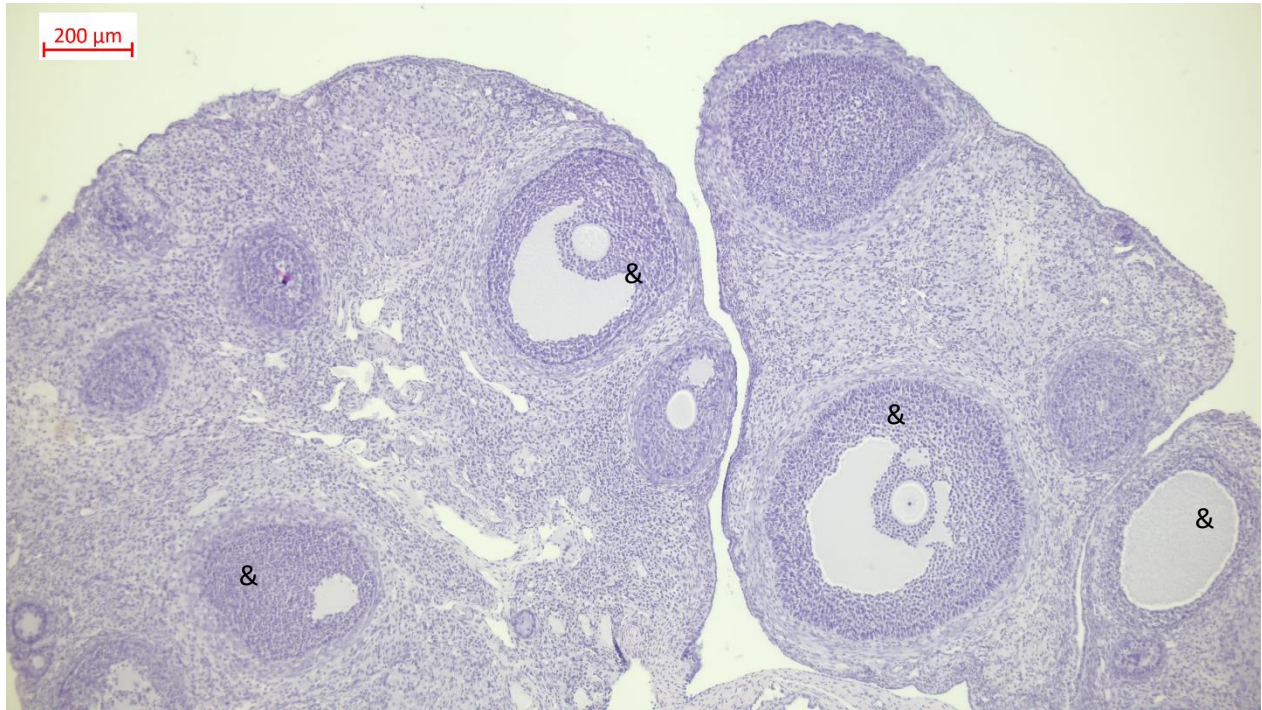


Слика 4.45. Репрезентативни приказ јајника из PCOS групе. На слици су представљени цистични фоликули (\*), атретични фоликули (#). Бар = 200  $\mu\text{m}$ ; увеличање 5 х.



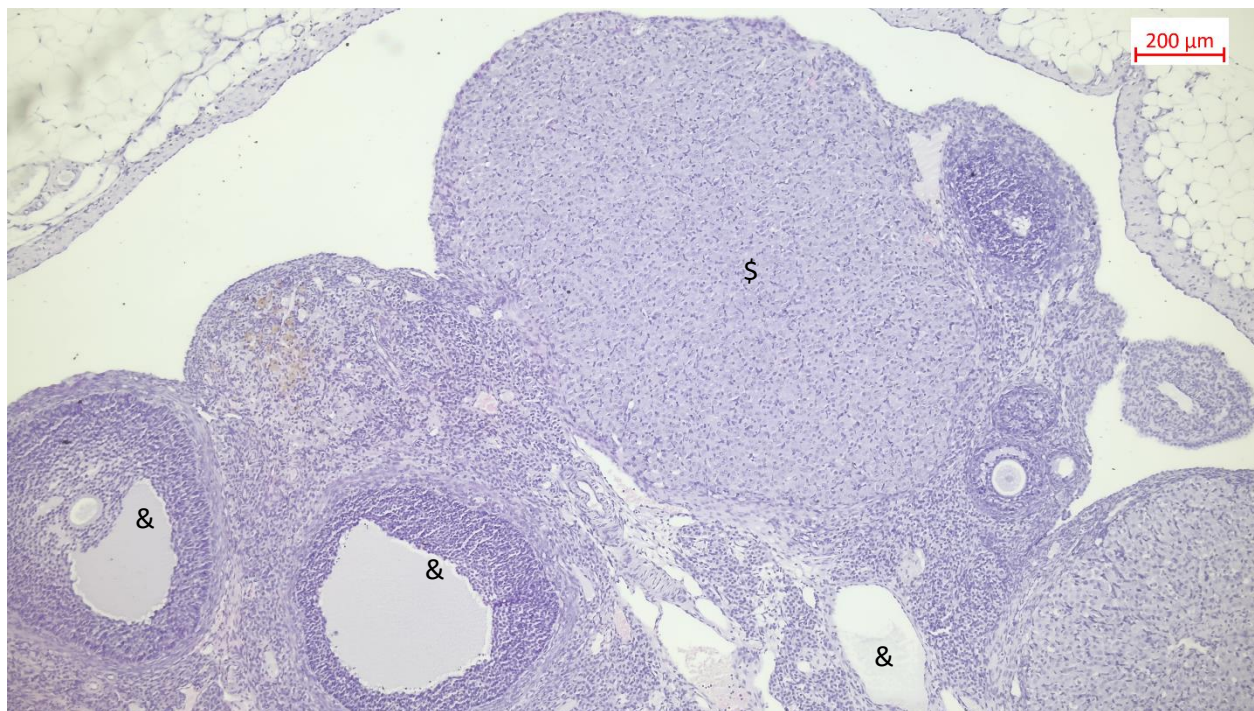


Слика 4.46. Репрезентативни приказ јајника из PCOS + MET групе. На слици су представљена жута тела (\$), здрави антрални фоликули (&). Бар = 200 μm; увељичање 5 х.



Слика 4.47. Репрезентативни приказ јајника из PCOS + CEA групе. На слици су представљени здрави антрални фоликули (&). Бар = 200  $\mu\text{m}$ ; увеличање 5 х.



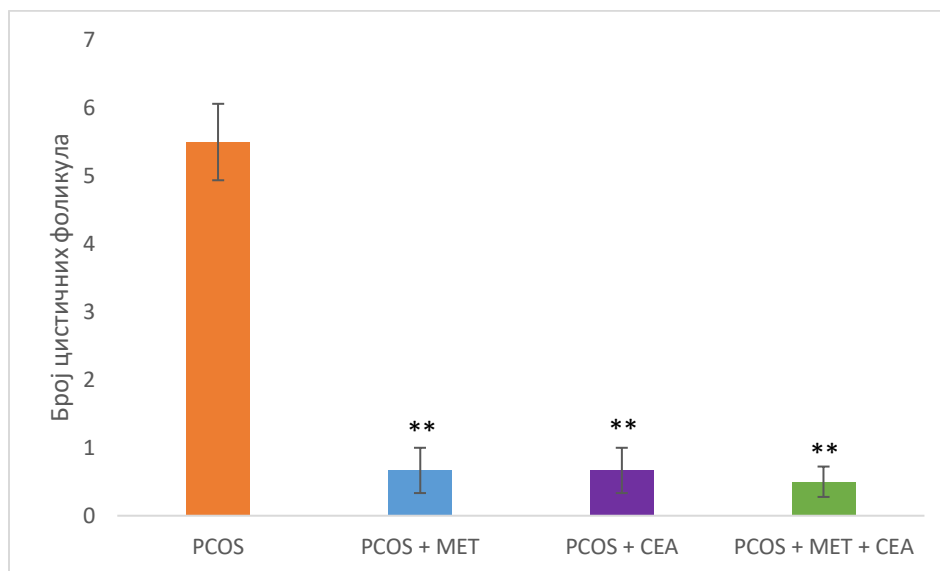


Слика 4.48. Репрезентативни приказ јајника из PCOS + MET + SEA групе. На слици су представљена жута тела (\$), здрави антрални фоликули (&). Бар = 200  $\mu\text{m}$ ; увеличање 5 х.

На Сликама 4.45., 4.46., 4.47., 4.48. су представљени репрезентативни пресеци ткива јајника из све четири испитиване групе. Значајно мањи број жутих тела и повећање броја цисти уочава се у PCOS групи. Са друге стране, групе третиране метформином и аронијом су показале смањење броја цистичних фоликула, као и већи број жутих тела.



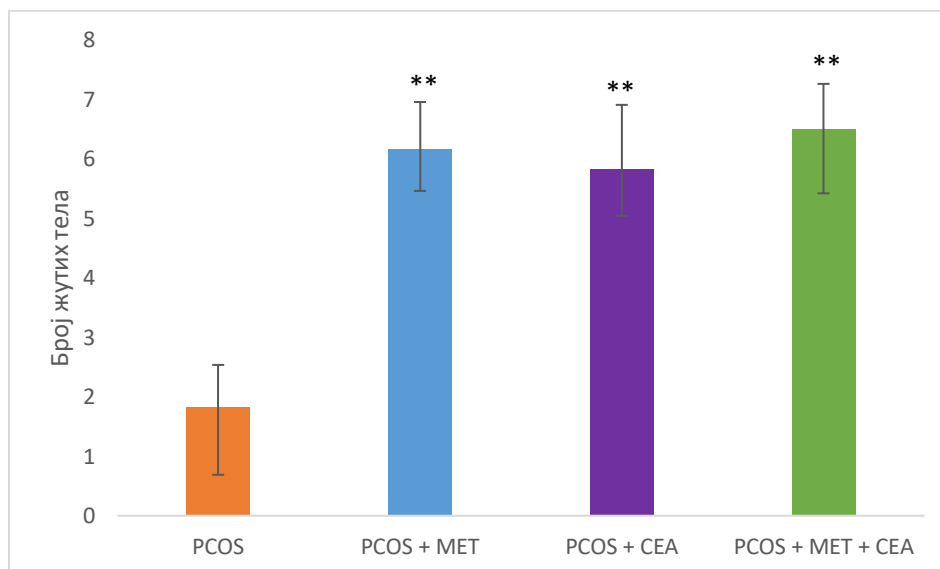
4.2.10.1 Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на број цистичних фоликула у централном пресеку ткива јајника



Слика 4.49. Промене у броју цистичних фоликула након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Број цистичних фоликула се значајно смањило ( $p < 0.01$ ) у све три третиране групе у односу на PCOS групу која је била без третмана.

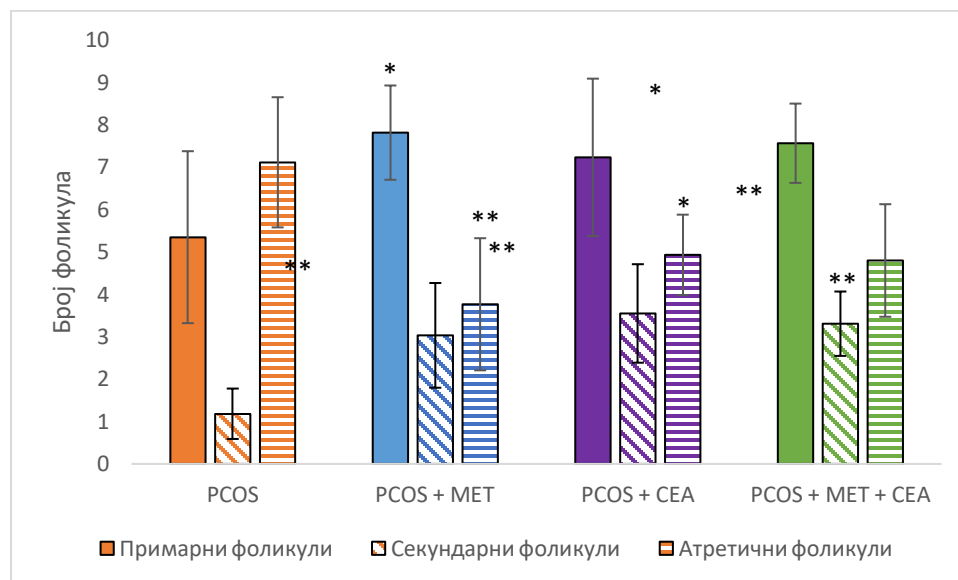
4.2.10.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на број жутих тела у на централном пресеку ткива јајника



Слика 4.50. Промене у броју жутих тела након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Број жутих тела се значајно повећао ( $p < 0.01$ ) у све три третиране групе у односу на PCOS групу која је била без третмана.

4.2.10.3. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на број примарних, секундарних и атретичних фоликула у ткива јајника



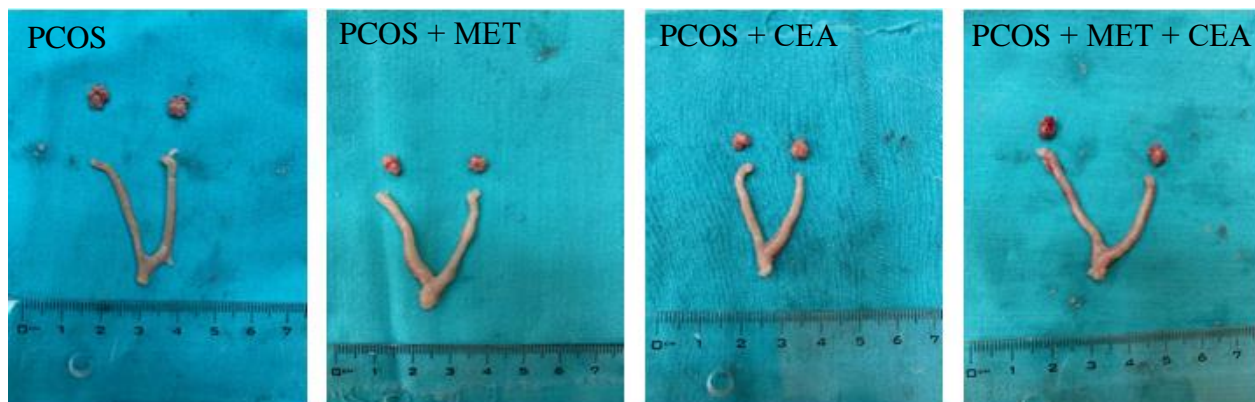
Слика 4.51. Промене у броју примарних, секундарних и атретичних фоликула након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Број примарних фоликула је био значајно већи ( $p < 0.05$ ) у групама које су биле на третману метформином (PCOS + MET и PCOS + MET + CEA), док група која је била на третману аронијом није показала значајну разлику у односу на PCOS групу која је била без третмана.

Број секундарних фоликула је био значајно већи ( $p < 0.01$ ) у све три третиране групе у односу на PCOS групу која је била без третмана.

Број атретичних фоликула је био значајно мањи у све три третиране групе у односу на PCOS групу која је била без третмана (PCOS + MET и PCOS + MET + CEA,  $p < 0.01$ ; PCOS + CEA,  $p < 0.05$ ).

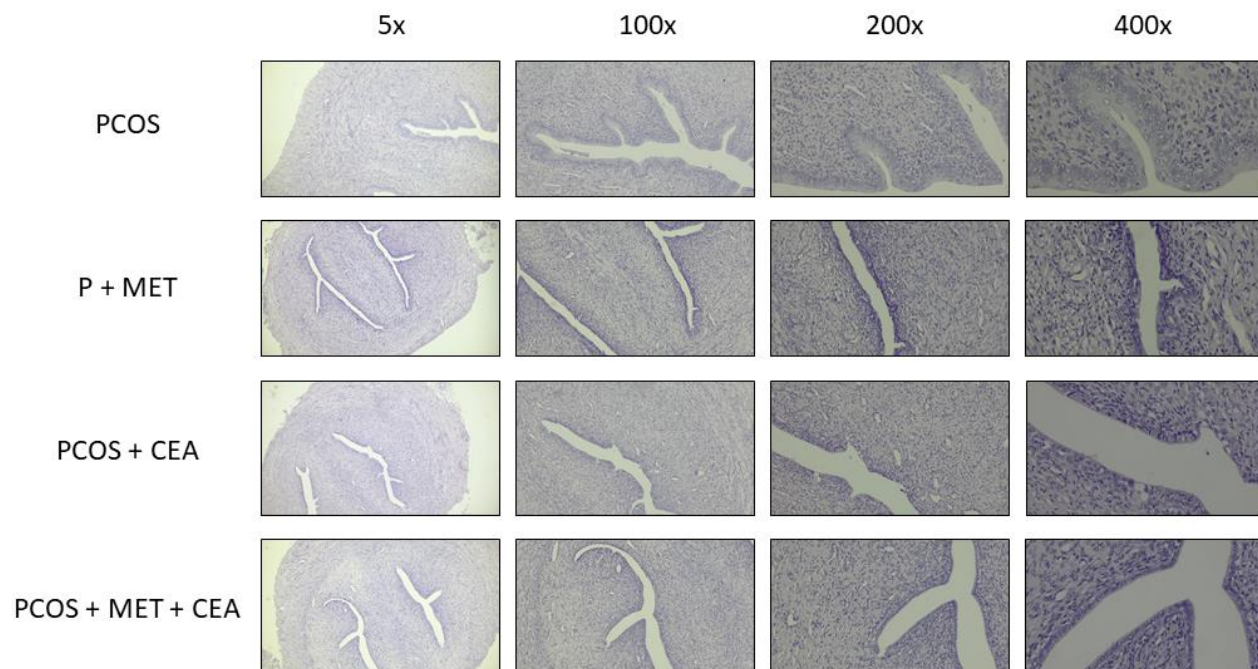
4.2.11. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на макроскопски изглед јајника



Слика 4.52. Макроскопски изглед јајника након завршеног експерименталног протокола

Одмах након жртвовања животиња, јајници и утерус су изоловани, препарисани и фотографисани. На Слици 4.52. се види да су јајници из PCOS групе већих димензија и са присуством већег броја цистичних фоликула који штрче по површини. Остале три групе показују јајнике као више прокрвљене структуре, са мањим бројем видљивих цистичних формација. Утерус PCOS групе импонује већим циркуларним обимом и блеђе је боје, од утеруса остале три групе.

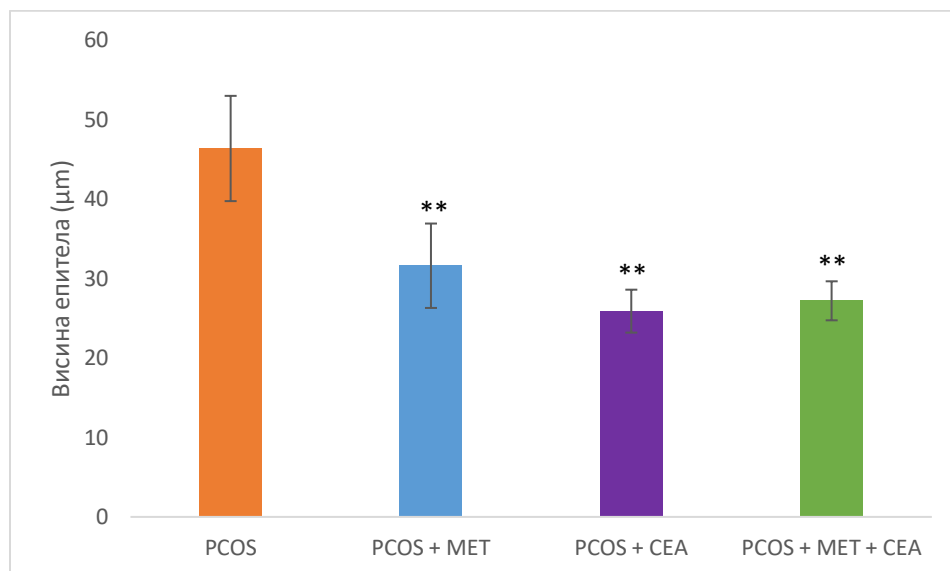
4.2.12. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на хистолошке промене у ткиву утеруса



Слика 4.53. Хистолошке карактеристике утеруса испитиваних група на различитим увељачањима.

На Слици 4.53. представљени су репрезентативни пресеци утеруса пацова након завршеног експерименталног протокола. Опште хистолошке карактеристике показују да је утерус животиња из PCOS групе са присутним тањим ендометријумом и хиперпластичним лиминалним епителом, док се у све три третиране групе ове карактеристике мењају у одређеном степену, што се накнадно доказало детаљном морфометријском анализом.

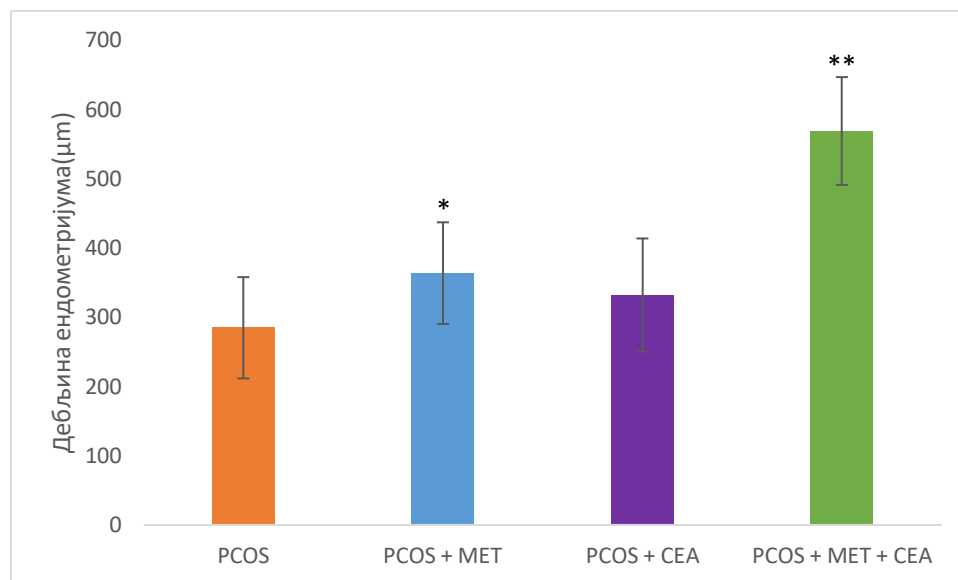
4.2.12.1. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на висину луминалног епитела утеруса



Слика 4.54. Промене у висини луминалног епитела након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Висина луминалног епитела је била највећа код пацова из PCOS групе, док су групе третиране метформином, стандардизованим екстрактом ароније, као и комбинацијом ова два агенса показале значајно смањење висине епитела ( $p < 0.01$ ).

4.2.12.2. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на дебљину ендометријума утеруса



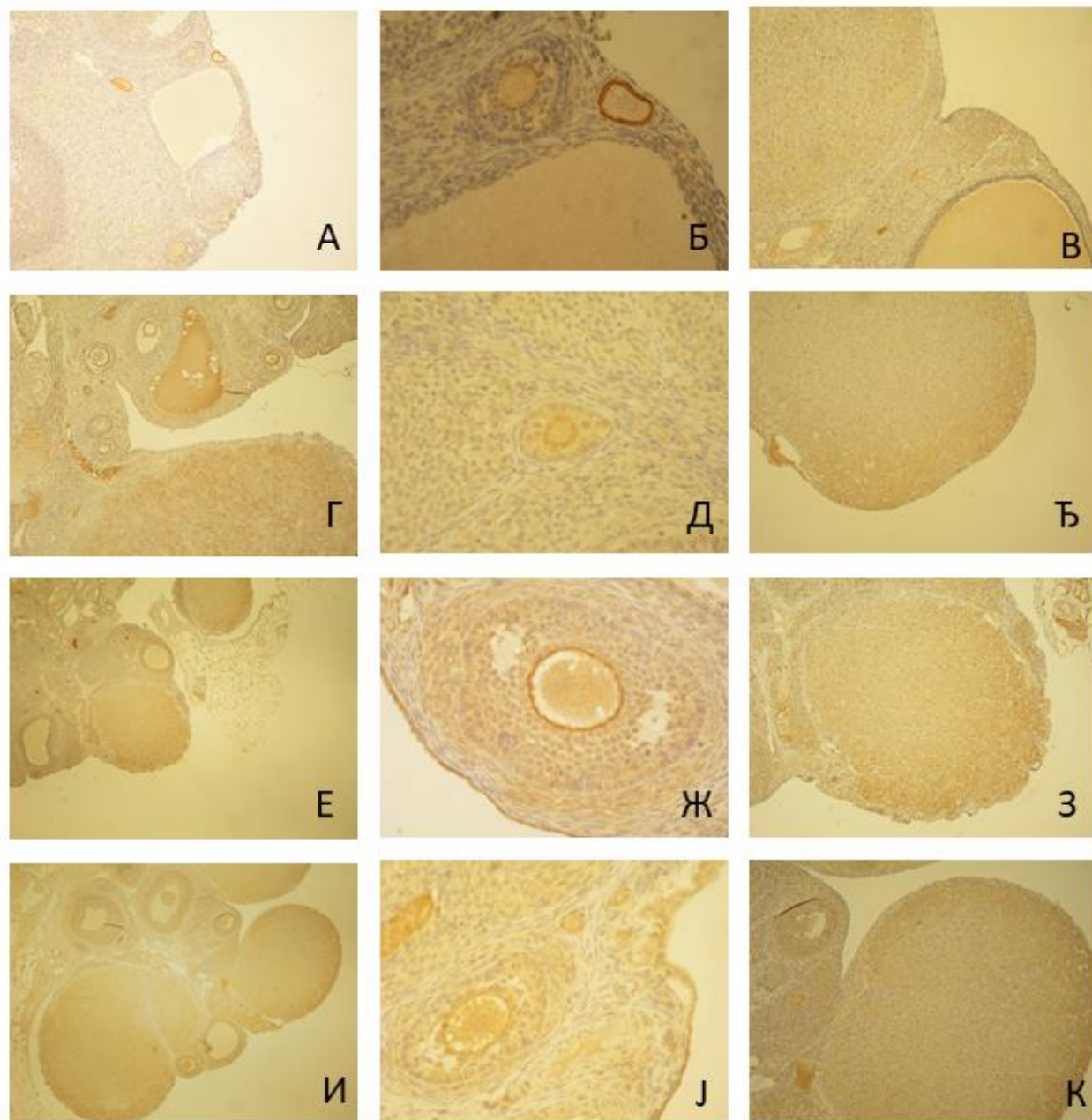
Слика 4.55. Промене у дебљини ендометријума након самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене

Дебљина ендометријума је била значајно већа код пацова из група које су биле третиране третиране метформином (PCOS + MET,  $p < 0.05$  и PCOS + MET + CEA,  $p < 0.01$ ), док група третирана стандардизованим екстрактом ароније није показала статистички значајну разлику у односу на PCOS групу.

4.2.13. Испитивање утицаја примене самосталног третмана метформином и стандардизованим екстрактом ароније, као и њихове комбиноване примене на инунореактивност АМРК у ткиву јајника

Као што је представљено на Слици 4.56., имунореактивност према АМРК је постојала у свима испитиваним групама. Најслабији интензитет бојења је уочен у PCOS групи (А, Б и В), док су све три третиране групе (PCOS + MET, PCOS + СЕА и PCOS + MET + СЕА) показале значајно већи интензитет бојења у односу на PCOS групу. Разлике у интензитету бојења између група третираним MET, СЕА као и њиховом комбинацијом није било.





Слика 4.56. Имунореактивност фосфорилсане АМПК у ткиву јајника. PCOS група, А - увеличање 100 ×; Б - увеличање 400 ×; и В - увеличање 100 ×. PCOS + МЕТ група, Г - увеличање 100 ×; Д - увеличање 100 ×; и Ђ - увеличање 100 ×, PCOS + СЕА група, Е - увеличање 40 ×; Ж - увеличање 400 ×; и З - увеличање 100 ×; PCOS + МЕТ + СЕА група, И - увеличање 40 ×; J - увеличање 400 ×; и К - увеличање 100 ×.

## 5. ДИСКУСИЈА

PCOS представља веома комплексни синдром и упркос значајним напорима истраживача, основни механизми етиопатогенезе и даље остају недовољно јасни. Поред репродуктивних поремећаја, као што су ановулација, инфертилитет и хиперандрогенизам, метаболички поремећаји као што су гојазност, дислипидемија и инсулинска резистенција су честа обележја овог поремећаја. Обзиром да је терапија овог поремећаја најпре симптоматска и да се ниједним терапијским приступом не добијају трајни резултати у излечењу, велики број студија је усмерен ка истраживању комплементарног, алтернативног, приступа, са великим акцентом на антиоксидативни и антиинфламаторни ефекат примањених агенаса. Идеје да предложи нове стратегије третмана PCOS како би се побољшало што више аспеката у вези са мноштвом симптома овог хетерогеног синдрома, су теме нових научних истраживања.

Ова студија је истраживала ефекте САЕ, МЕТ, као и њихове комбинације на метаболичке и репродуктивне карактеристике PCOS модела пацова изазваног ДНЕА. Основна идеја је била да се испита да ли СЕА, као доказано моћан антиоксидативни агенс, који има потенцијала у регулацији метаболичких дисфункција, може имати корисне ефекте на анималном моделу PCOS. Уједно, желели смо да упоредимо ефекте које СЕА остварује на карактеристике PCOS у односу на МЕТ, који и даље представља златни стандард у третману овог синдрома, али и да испитамо њихове синергистичке ефекте. Наши резултати су потврдили улогу САЕ примењеног самостално или у комбинацији са МЕТ у ублажавању поремећаја који су повезани са PCOS.

Антропометријски параметри, еструсни циклус, морфологија јајника и утеруса, гликемијски, липидни и хормонски статус су измењени након индукције PCOS, док су САЕ, МЕТ, као и њихова комбинација, побољшали ове промене повезане са PCOS. Параметри ОС су поремећени код пацова са PCOS, док су сва три типа третмана побољшала системски оксидативни статус, али и параметре оксидационог статуса у ткиву јајника, и на тај начин редуковали погоршање специфичних параметара укључених у молекуларну основу репродуктивних и метаболичких поремећаја повезаних са PCOS. На крају, експресија фосфорилисане АМПК у ткиву јајника је регулисана након примене МЕТ, СЕА и њиховом комбинованом применом. Поред мноштва доказа који указују на благотворне ефекте биљке *Aronia Melanocarpa L.* код поремећаја повезаних са ОС, колико нам је познато, у садашњој литератури не постоји слично истраживање спроведено на моделу PCOS пацова. Наша студија је по први пут показала корисне ефекте примене екстракта *Aronia Melanocarpa* у моделу PCOS пацова и придружене метаболичке карактеристике.

Најпре, петонедељни третман ДНЕА, довео је до успешног моделирања PCOS код пацова. Пратећи методу коју су применили *Kim* и сарадници (127), група репродуктивних и метаболичких карактеристика која се манифестовала у анималном моделу, имала је веома сличне карактеристике као код пацијената са PCOS. Сви пацови из PCOS групе су остали ациклични, у фази перзистентног диеструса, током последњих 12 дана протокола за индукцију PCOS. Оваква карактеристика је уобичајена за моделе PCOS код пацова и представља знак потпуног престанка циклуса или поремећаја цикличности, као и одсуства овулација или ређих овулација у односу на физиолошки циклус (158, 159). Међутим, након четири недеље примене МЕТ, као лека који се често користи за регулацију циклуса и индукцију овулације код жена, пацови су повратили свој циклус на редован еструсни циклус, у трајању 4-5 дана (160). Занимљиво је да је СЕА примењен самостално, или у комбинацији са МЕТ, такође

имао потенцијала да поврати цикличност у третираним групама, што имплицира да су ови агенси имали сличан механизам деловања у обнављању нормалног трајања циклуса у PCOS моделу. Међутим, до сада нису објављене студије, како на животињским моделима тако ни код жена, које би упоредиле добијене резултате са литературом. Екстракт биљке *Aronia Melanocarpa* је први пут примењен у циљу третмана PCOS у нашој студији. Из тог разлога, резултати ове студије би свакако могли бити основа за будуће студије које би се спровеле као клиничка испитивања, а у циљу потврде позитивног ефекта *Aronia Melanocarpa* код пацијената са олигоовулаторним или ановулаторним PCOS.

Иако нису све претклиничке студије потврдиле ефекат индукције PCOS на повећање телесне масе, наши резултати су показали да модел PCOS изазван DHEA код постпуберталних пацова опонаша фенотип PCOS код гојазних пацијената. Слични резултати су добијени код других аутора након примене DHEA код постпуберталних пацова (161). С друге стране, модели PCOS индуковани код препуберталних животиња применом DHEA, често су резултовали непромењеном телесном масом у поређењу са групама без PCOS (163), што је још једна предност примењеног постпуберталног DHEA протокола у нашој студији. Финална телесна маса је била највећа у PCOS групи, док су сва три третмана смањила повећање телесне масе након индукције PCOS. Овај ефекат MET на губитак тежине је приказан и код жена са PCOS (163), али и у студијама на животињама (164). Поред тога, потврђен је ефекат примене САЕ на губитак телесне масе код пацова мошког пола код којих је изазван метаболички синдром (140), као и код пацијената, мушкараца и жена са метаболичким синдромом и дијабетес мелитусом (142). У поменутој студији, након две недеље САЕ третмана је значајно смањена телесна маса код мушких пацијената за дијабетес мелитусом, док је након четири недеље примене СЕА, телесна маса значајно смањена и код женских пацијената. Наша студија је показала да је четворонедељни протокол САЕ успешно смањило телесну масу код пацова са PCOS. У литератури постоје контроверзе у вези са губитком телесне масе и коришћењем полифенола у исхрани, вероватно због различитих примењених протокола, али и постојања збуњујућих фактора, као што су клинички или субклинички коморбидитети код људи (165, 166). Међутим, студије на животињама су потврдиле позитивне ефекте на губитак масе након конзумације екстракта ароније богатог полифенолима (167), а механизми којима се остварује ово дејство повезани су са модулацијом више путева сигнализације инсулина, адипогенезом и инфламацијом, што би свакако могло бити корисно и у лечењу PCOS.

Хистолошка анализа јајника је показала успешну индукцију PCOS која је манифестована присуством већег броја фоликуларних цисти, као и смањеним бројем жутих тела, што указује на смањење броја овулација. Присуство мањег броја старих жутих тела у PCOS групи, неколико фоликула у развоју са дељим слојем гранулозе који показују периодична одвајања слојева и кумулуса, као и увећана строма може се тумачити као дисфункција јајника, која је присутна и код PCOS (168). Након СЕА и MET третмана, самостално или у комбинацији, утврђено је побољшање карактеристика за процену хистоморфологије јајника, у смислу смањења броја цисти, постојање фоликула у различитим фазама раста, као и већи број жутих тела у поређењу са PCOS групом, што је дефинитивно указало на благотворне ефекте оба примењена протокола. Број примарних и секундарних фоликула се значајно повећао након третмана MET, док се број атретичних фоликула значајно смањило. Ови резултати су у сагласности са литературом (161). Као што је горе наведено, не постоје подаци из доступне литературе који би упоредили резултате

наше студије о броју фоликула након третмана СЕА, или комбинације МЕТ и СЕА. Број примарних фоликула се није значајно разликовао у односу на PCOS групу, док је број секундарних фоликула био значајно већи након третмана СЕА, а број атретичних фоликула значајно мањи. Комбинација МЕТ и СЕА је показала ефекат сличан МЕТ. У квантитативном смислу, највећи обим ових промена у фоликулогенези се дешавао у групи која је третирана МЕТ самостално. Ипак, СЕА није ометала овакве ефекте МЕТ у комбинованој примени.

Морфологија утеруса се значајно разликовала након сва три третмана, у односу на PCOS групу. У PCOS групи била је уочљива псеудохиперплазија луминалног, али и жлезданог епитела. При већем увећању, фрагментована једра и присуство инфламаторних ћелија – неутрофила, били су карактеристика модела PCOS у ткиву утеруса. Ови резултати се слажу са резултатима из литературе (169) у погледу хистоморфолошких својстава ткива материце након ДНЕА протокола. У погледу висине луминалног епитела, сва три третмана су довела до значајне редукције псеудохиперплазије у односу на PCOS групу, док су једра су изгледала нефрагментисано. Дебљина ендометријума се смањила након индукције PCOS у анималном експерименталном моделу (170), и то уз повећање дебљине миометријума, што је довело до укупног повећања дебљине зида утеруса. У нашем експерименту, такође, најтањи ендометријум је регистрован у PCOS групи. Ипак, након третмана, дебљина ендометријума је била значајно већа само у групама третираним МЕТ (PCOS + МЕТ и PCOS + МЕТ + СЕА), што даје предност метформину у односу на СЕА, када је самостални третман у питању. Већи ниво статистичке значајности, у групи PCOS + МЕТ + СЕА у односу на PCOS + МЕТ, говори у прилог синергистичком деловању МЕТ и СЕА у примењеном протоколу. Интересантно је да се ови подаци уклапају са концентрацијом прогестерона у серуму. Групе третиране МЕТ су довеле до већег повећања нивоа прогестерона ( $p < 0.01$ ) у односу на групу која је добијала само СЕА ( $p < 0.05$ ). Поред тога, смањена инфилтрација инфламаторним ћелијама је била присутна у све три третиране групе у односу на PCOS.

Претходне студије су показале да приближно 22% жена има ултразвучно потврђену полицистичну морфологију јајника, док само 5-10% пацијената уједно има и синдром полицистичних јајника, са свим, или већином пратећих карактеристика (171). Ултразвучна анализа јајника пацова показала је повећање волумена јајника у PCOS групи у односу на остале групе. Познато је да увећани јајници, са бројним малим фоликулима који се налазе око експандиране строге јајника, представљају ултразвучне карактеристике полицистичних јајника код жена (172). Ипак, када је реч о анималним моделима PCOS, у нашој претходној студији, хронични третман тестостерон-енантатаом довео је до значајног смањења волумена јајника (173). Тестостерон, као снажнији андроген који води порекло од ДНЕА, има различите метаболичке путеве у односу на ДНЕА, а слични резултати су добијени - вероватно најпрецизнијим алатом за мерење запремине органа - морфометријском методом *Cavalieri*, коју су користили *Kalhari* и сарадници (174), као у претходно поменутој студији. Наиме, модел PCOS пацова изазван ДНЕА коришћен у нашој студији показао је сличнију морфологију полицистичних јајника са увећаним јајницима као код жена са PCOS, што сугерише да је овај модел супериорнији од других у погледу опонашања морфологије јајника код PCOS пацијената. Смањење волумена јајника и Д2 је било супериорније када је САЕ примењен сам, или у комбинацији са МЕТ, за разлику од самог МЕТ, који није показао никакав ефекат на смањење ових параметара. Штавише, иако значајно, смањење Д1 у групи третираној МЕТ било је за 8,94%, док је израженији ефекат остварен третманом САЕ (смањење за 12,24%) и САЕ у комбинацији са МЕТ (смањење за 13,18%). Овакве промене

су показале да је САЕ супериорнији од самог МЕТ у променама ултрасонографских параметара јајника код PCOS.

У нашој студији након индукције PCOS регистрован је типичан хиперандрогенемски хормонски миље. Повишен ниво тестостерона, као истакнута карактеристика PCOS, такође је препознат у сличном истраживању (175). У поменутој студији, такође, приказан је и јасан ефекат третмана МЕТ на смањење нивоа тестостерона. Занимљиво је да су оба агенса коришћена у нашем истраживању, САЕ и МЕТ, самостално или у комбинацији, значајно смањила нивое тестостерона у серуму код експерименталних животиња. Као што је раније поменуто, у литератури нема података о ефектима *Aronia Melanocarpa* на хиперандрогенемију код жена. Међутим, постоји једна експериментална студија која показује ефекте екстракта *Aronia Melanocarpa* на смањење нивоа експресије дихидротестостерона у ткиву простате, и тенденцију смањења дихидротестостерона и нивоа 5-алфа редуктазе у серуму. Ови ефекти се могу приписати високом садржају антоцијанина и фенола у примењеном екстракту (176). Са друге стране, није пронађена никаква промена у нивоу естрадиола након индукције модела PCOS (није приказано у резултатима), иако су МЕТ, САЕ и њихова комбинација значајно смањили нивое естрадиола у поређењу са PCOS групом. Резултати студије која је, такође, испитивала утицај метформина на DHEA моделу PCOS код постпуберталних пацова, слажу се са резултатима наше студије у погледу смањења ниво естрадиола након третмана МЕТ (177). Ипак, у поменутој студији није дошло до повећања концентрације прогестерона у групи третираној МЕТ, што се може приписати краћем трајању протокола у односу на нашу студију (3 недеље). У нашој студији, ниво прогестерона је значајно повећан након третмана МЕТ, САЕ али и њихове комбинације. Слично томе, студија која је испитивала ефекат МЕТ на DHEA моделу PCOS, показала је значајно повећање концентрације прогестерона (161). Познато да антоцијанини, као што је цијанидин-3-глукозид пореклом из купине, могу испољити фитоестрогени ефекат (178), везујући се за естрогенске рецепторе алфа и бета (179). Поред тога, постоје студије које показују да сојини изофлавоноиди, као што су генистеин и даидзеин, такође испољавају фитоестрогену активност, али без промене нивоа естрадиола у серуму, управо у моделу PCOS код пацова (180). Могуће објашњење се може предложити ако САЕ, као и МЕТ, могу блокирати или смањити активност ароматазе (181) и на тај начин спречити андрогена, али и естрогена својства PCOS. Током патофизиолошких догађаја у настанку PCOS, осовина хипоталамус-хипофиза-гонаде се ремети, што доводи до измењене хормонске секреције, пре свега повећања нивоа тестостерона и ЛН (182). Повишен ниво ЛН стимулише лучење тестостерона у ћелијама теке фоликула јајника кроз стимулацију PI3K/Akt пута (183). PI3K пут је модератор ЛН-зависне Akt фосфорилације у фоликулима, регулише експресију гена *Cyp17A1* у јајницима и даље подиже активност ензима 17- $\alpha$  хидроксилазе. Обзиром да је 17- $\alpha$ -хидроксилаза основни ензим који катализује стероидогену конверзију прогестерона у андрогене, она повећава ниво андрогена. Овај образац се, такође, може уочити и у вези са односом тестостерона и прогестерона и њиховим обрнуто сразмерним нивоима након МЕТ или САЕ у третману PCOS у нашој студији. Гени *Cyp17A1* и *Cyp11a1* кодирају 17- $\alpha$  хидроксилазу и 17, 20-лиазу, два кључна ензима укључена у синтезу и метаболизам андрогена. Код андрогенизованих пацова, дошло је до повећања експресије *Cyp17* након третмана МЕТ, што је довело до побољшања динамике фоликулогенезе у јајнику (). Могло би се претпоставити да се овакве промене након третмана МЕТ дешавају и у нашој студији. Једно од ограничења наше студије била је техничка немогућност мерења активности наведених ензима укључених у стероидогенезу, што свакако представља план

за будућа истраживања у вези са применом САЕ код PCOS пацова како би се стекао дубљи увид у молекуларну основу поремећене хормонске равнотеже. Концентрација LH је била значајно смањена након оба примењена протокола (MET и СЕА), док је њихова комбинована примена довела до смањења у односу на PCOS групу, али и у односу на групе са самостално примењеним агенсима. Слично томе, у студији која је спроведена на DHEA моделу PCOS (185), MET је, такође, довео до смањења нивоа LH код пацова. Ипак, у погледу нивоа FSH, као и LH/FSH односа, резултати наше студије не корелирају са поменутом студијом. Вероватно је овакав резултат последица старости животиња које су укључене у протокол индукције PCOS, обзиром да су у нашој студији коришћене старије, постпуберталне животиње, а у наведеној студији млађе, препуберталне животиње. Са друге стране, студија у којој су коришћене постпуберталне животиње, као и у нашој студији, показала је да примена метформина током 30 дана нема ефекта на ниво FSH (175), што је био и резултат нашег експеримента. Резултати су показали да СЕА може да смањи LH у серуму, ниво инсулина и да повећа ниво прогестерона у серуму, што указује на то да се може постићи ефекат на побољшање ендокрине функције и инсулинске резистенције.

Концентрација АМН у крви се значајно смањила након комбиноване примене MET и СЕА, док се концентрација овог хормона у ткиву јајника смањила након третмана MET, али и комбиноване примене MET и СЕА. Сличне резултате су добили *Furat Rencher* и сарадници, који су испитивали ефекат MET и његове комбиноване примене са ресвератролом на истом PCOS моделу индукованом код пацова (51). MET самостално, у дози која је примењена и у нашој студији није довео до промена нивоа АМН у крви, док је у комбинацији са СЕА, АМН значајно смањен. Аутори претходно наведене студије су добили исти ефекат на АМН у комбинованој примени MET и ресвератрола, и у ткиву јајника и у серуму. Поред тога, ефекат телмисартана и витамина D у моделу PCOS код пацова који био исти као у нашој студији, је био сличан ефекту примењених третмана у нашој студији на ниво АМН у плазми (168). Свакако, виши нивои АМН у крви код PCOS групе представљају ефекат деловања DHEA на ХПО осовину, и резултат су повећања нивоа LH и тестостерона код ових животиња. Обзиром на највећи ниво промене АМН након комбинованог третмана MET и СЕА, као и на остваривање значајног смањења нивоа АМН у ткиву, поменута комбинација третмана, издваја се као супериорнија у односу на самостално примењене MET и СЕА на ниво АМН, који дефинитивно има веома битну улогу у патогенези PCOS.

Што се тиче контроле гликемије, САЕ је испољио анти/хипогликемијске ефекте, као што се и очекивало. Иако још увек није испитиван у PCOS, као у многим студијама, укључујући метаболички синдром (139), могли бисмо претпоставити корисне ефекте након третмана САЕ у нашој студији. Штавише, PCOS еквивалент је препознат и код мушкараца (186, 187), посебно у случају мушкараца са позитивном породичном анамнезом о PCOS код женских сродника, и знаковима хиперандрогенизма праћеним метаболичким променама и хормонским обрасцима PCOS. У студији у којој су мужјаци пацова који су добијали САЕ у истој дози која је коришћена у овој студији, дошло је до побољшања толеранције на глукозу у стању метаболичког синдрома (140). Штавише, СЕА није утицала на гликемију код здравих пацова, али је смањила нивое инсулина. У овој студији, пацови из PCOS групе су показали повећану базалну гликемију у поређењу свим осталим групама. Занимљиво је да су САЕ и MET третмани, самостално примењени, али и када су комбиновани, снизили базалну гликемију у односу на PCOS групу, али ниједан од њих није показао хипогликемијски ефекат. После 30 минута оптерећења глукозом, у ОГТТ, PCOS група је показала повећање

гликемије у поређењу са другим групама. Овакав тренд се наставио након 60 и 120 минута. Најинтересантније је да је након 180 минута примене глукозе, само група у којој је примењена комбинација САЕ и МЕТ показала значајно ниже нивое глукозе у поређењу са PCOS групом, фаворизујући заједничке ефекте два примењена агенса. Поред тога, анализа површине испод криве гликемије, показала веће вредности у PCOS групи у поређењу са свим другим групама. Овај резултат свакако треба узети у обзир када се расправља о побољшаној гликорегулацији, посебно као превенцији даљих метаболичких компликација које су истовремено изражене са PCOS-ом у каснијем животу. Упркос чињеници да МЕТ има скроман утицај на PCOS и гојазност повезану са PCOS, он и даље представља основни агенс у третману. Показано се да аронија делује инхибицијом  $\alpha$ -глукозидазе и дипептидил-пептидазе IV (188), за коју је доказано да је супериорнија када се комбинује са МЕТ у поређењу са самим МЕТ у лечењу PCOS (189). Ове тврдње треба усмерити на даља клиничка испитивања која комбинују САЕ и МЕТ код пацијената са PCOS, посебно оних са гојазним фенотиповима. Показало се да МЕТ побољшава телесну композицију и ниво инсулина код жена са PCOS које нису гојазне, али нема значајан утицај на индекс телесне масе, базалну гликемију, као и ниво липида (190) тако да се његова комбинација са САЕ може сматрати вредном. PCOS је мултисистемски поремећај са ткивно-селективном инсулинском резистенцијом, обзиром да јајник остаје сензитиван на дејство инсулина у присуству системске инсулинске резистенције и хиперинсулинемије. Такав парадокс би се могао објаснити метаболичким, али не и митогеним, дефектима у сигналног путу инсулина (191). Хиперинсулинемија код PCOS директно подиже ниво LH и, стога, индиректно појачава лучење андрогена посредовано дејством LH. Штавише, хиперинсулинемија смањује синтезу SHBG у јетри, и тако доводи до повећања слободног тестостерона. Ипак, немају сви PCOS пацијенти изражену хиперандрогенемију и/или хиперинсулинемију, тако да је важно разликовати различите фенотипове PCOS и предложити циљане и индивидуалне терапијске приступе за лечење PCOS. Инсулинемија је била значајно нижа у групи третираној МЕТ, као и у резултатима сличне студије која је поредила ефекте инхибитора фосфодиестеразе-4 и МЕТ код пацова са PCOS (164). Третман СЕА је, такође, довео до смањења инсулинемије, док је најјачи ефекат на смањење овог параметра показала комбинована употреба МЕТ и СЕА. Овакав синергистички ефекат МЕТ и СЕА је важно истаћи, обзиром на већ показане корисне ефекте СЕА на метаболички синдром код људи (142).

Дислипидемија често прати пацијенте са PCOS (192). Наша студија је показала повећање нивоа укупног холестерола, триглицерида и LDL холестерола у PCOS групи, као и других (191), док су након 4 недеље примене, обе врсте лечења значајно смањиле ове параметре. Међутим, нивои HDL холестерола се нису значајно променили, иако бисмо могли да спекулишемо да је САЕ био најбољи кандидат који је имао тенденцију да подигне нивое HDL у групи која је самостално третирана овим агенсом. Показало се да цијанидин-3-О- $\beta$ -глукозид, орално дат мишевима, значајно повећава нивое HDL у серуму (193). Такође, након конзумирања напитка који садржи *Aronia Melanocarpa*, повећао је HDL код старијих пацова (194). С друге стране, МЕТ је био у стању да снизи нивое укупног холестерола, триглицерида и LDL холестерола у моделу PCOS пацова индукованог летрозолом (195), као у нашој студији.

У основи свих поменутих репродуктивних и метаболичких промена уочених у нашој студији, промене ОС могле би да обезбеде механичку основу за резултате добијене након



примењених протокола. Познато је да се ОС може сматрати једним од чиниоца који играју улогу у патогенези PCOS-а, поред тихе инфламације. С друге стране, антиоксидативна својства биљке *Aronia Melanocarpa* су потврђена у различитим истраживањима, а MET и даље представља златни стандард у лечењу PCOS, упркос добро познатим штетним ефектима. У овој студији смо анализирали прооксидативне параметре и антиоксидативни одбрамбени систем у системској циркулацији и хомогенатима ткива јајника. Познато је да су маркери липидне пероксидације TBARS и MDA у крви и другим ткивима. У нашој студији, нивои TBARS су повећани у системској циркулацији и ткиву јајника у PCOS групи, што је било у складу са осталим истраживањима (195). Међутим, сва три третмана примењена у нашој студији су значајно смањила нивое TBARS. Доза MET примењена у нашој студији (500 mg/kg) била је у стању да спречи даљу пероксидацију липида у плазми и ткиву јајника, за разлику од ниже дозе MET (20 mg/kg) примењене у сличним истраживањима PCOS (161). Штавише, још једна студија је проценила ефекте MET (300 mg/kg) у моделу PCOS који је индукован пацовима пре наступања пубертета, који такође није био у стању да смањи нивое MDA када се примењивао самостално, али јесте када се примењивао у комбинацији са ресвератролом (51). Стога смо претпоставили да је доза примењена у нашој студији била довољна у борби против стварања липидних пероксида и последичних ланчаних реакција слободних радикала са полинезасићеним масним киселинама ћелијске мембране. Штавише, САЕ је показао сличан ефекат као MET у спречавању пероксидације липида у плазми и у ткиву јајника. Инсулинска резистенција повезана са PCOS, хиперандрогенизам, дислипидемија и гојазност такође су праћени повећаном пероксидацијом липида (196), док сјеу САЕ, као и MET, показао сличне ефекте на поменуте поремећаје. Прооксидантни молекули, као што су  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , показали су сличне алтерације у плазми, док су нивои  $NO_2^-$  остали непромењени међу испитиваним групама. Интересантне разлике су добијене испитивањем антиоксидативног одбрамбеног система у два испитивана одељка (крв и ткиво јајника). Правилно функционисање антиоксидативне ћелијске машинерије је веома важно јер SOD претвара  $O_2^-$  у  $H_2O_2$ , док се  $H_2O_2$  претвара у молекуле воде под дејством САТ и глутатион пероксидазе, док GSH служи као донор електрона у таквим реакцијама. Активност САТ је смањена у PCOS групи, али је само третман САЕ у комбинацији са MET био у могућности да побољша нивое овог антиоксидативног ензима у крви и јајницима. Међутим, самостално примењен САЕ је, такође, побољшао активност САТ активност у плазми, за разлику самосталног третмана MET. Када се анализира активност SOD у ткиву јајника, дошло је до јасног смањења активности након индукције PCOS, које је побољшано након примене САЕ, MET и њихове комбинације. Тај резултат, у погледу MET третмана примењеног у истој дози коришћеној у нашој студији (500 mg/kg), могао би се упоредити са другим ауторима (197). Међутим, када се анализира SOD у плазми, побољшање у односу на PCOS групу је постигнуто само у групи третираној MET. Занимљиво је да САЕ и САЕ у комбинацији са MET нису значајно променили активност SOD у поређењу са PCOS групом. Из свега наведеног могло би се закључити да самостално примењен третман MET није променио активност САТ у односу на PCOS групу, док САЕ (сам или у комбинацији са MET) није променио SOD активност у поређењу са PCOS групом. С друге стране, САЕ (самостално или у комбинацији са MET) могао је да утиче на повећање активности САТ, док ти третмани нису утицали на активност SOD у поређењу са PCOS групом. Нивои GSH су се били смањени у PCOS групи, што је у сагласности са претходно публикованом студијама на животињама, али и код пацијената са PCOS (47, 198). Повећање овог параметра је било очигледно након примене сва три протокола (MET, САЕ и MET + САЕ) у плазми, као и у хомогенату ткива јајника.

У погледу испитивања потенцијалног механизма дејства СЕА, и његовог поређења са механизмом који МЕТ остварује на морфологију и функцију јајника, испитивали смо имунореактивност према АМПК. АМПК је хетеротримерна треонин/серин киназа која се састоји од 3 субјединице (алфа, бета и гама), и присутна је у свима ткивима. За активацију АМПК неопходна је фосфорилација треонина 172, који се налази у склопу алфа каталитичке субјединице (106). У нашој студији испитивана је имунореактивност према алфа и бета субјединици фосфорилисане АМПК у ткиву јајника. Показано је да је PCOS група показала слабији интензитет бојења у односу на све три третиране групе (PCOS + МЕТ, PCOS + СЕА и PCOS + МЕТ + СЕА). Међутим, разлике нису уочене када се посматрају наведени третмани након индукције PCOS. Овакви резултати говоре у прилог потенцијано корисном ефекту који аронија остварује самостално, али и у комбинацији са МЕТ. Слични резултати су добијени од стране истраживача који су анализирали дејство ресерватрола у комбинацији са МЕТ на имунореактивност АМПК у ткиву јајника (51). Показана је већа реактивност у групама које су третиране МЕТ и МЕТ у комбинацији са ресерватролом у односу на PCOS групу. Такође, недавно спроведена студија је показала смањење активности фосфорилисане АМПК у PCOS условима, након инкубирања хуманих ћелија ендометријума уз присуство инсулина и тестостерона (199). У овој студији је третман суплементације миоинозитолом довео до регулисања нивоа АМПК у поменутих експериментима. Ипак у нашем истраживању, самостално примењен екстракт ароније био је у стању да повећа експресију АМПК у ткиву јајника, слично МЕТ. Имајући у виду наведене резултате, може се претпоставити да СЕА остварује сличне ефекте као и МЕТ, у погледу активације (фосфорилације) АМПК. Обзиром да је АМПК метаболички и енергетски сензор у ћелијама, и да се смањење активности очекује у условима када је ћелија у енергетском дефициту, као што је то случај у стању након индукције PCOS, сва три примењена терапијска протокола су активирала АМПК и довела до јасног повећања фосфорилације АМПК, што је, у складу са другим резултатима овог истраживања, довело до побољшања репродуктивне и метаболичке функције код пацова којима је индукован PCOS.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

## Главни закључак

Наши налази су потврдили да је САЕ сам или у комбинацији са МЕТ био у стању да ублажи репродуктивне и метаболичке поремећаје у моделу PCOS пацова изазваног DHEA.

Ефекат самостално примењеног САЕ није значајно утицао на ефекте МЕТ код PCOS.

Потврђен је синергистички ефекат ова два агенса у већини процењених карактеристика PCOS.

Ови резултати могу послужити као основа за даља клиничка испитивања у вези са применом САЕ код жена са PCOS како би се проценио посебан допринос овог екстракта репродуктивним и метаболичким профилима у овој популацији пацијената, посебно код оних са гојазним фенотипом PCOS.

## Остали закључци

1. Модел PSOS код постпуберталних пацова изазван петонедељном применом DHEA довео је до поремећаја еструсног циклуса, повећања нивоа тестостерона у серуму, цистичне морфологије јајника уз повећање прооксидативних молекула и смањење капацитета антиоксидативне заштите.

2. Третман МЕТ, СЕА и њиховом комбинацијом је имао исте ефекте у смањењу телесне масе на крају експерименталног протокола.

3. Третман МЕТ, СЕА и њиховом комбинацијом је имао исте ефекте у регулацији еструсног циклуса.

4. Третман МЕТ, СЕА и њиховом комбинацијом је имао исте ефекте на побољшање липидног статуса.

5. Третман комбинацијом МЕТ и СЕА је имао супериорније ефекте у регулацији гликемије и инсулинемије у односу на самостално примењене третмане.

6. Третман МЕТ, СЕА и њиховом комбинацијом је имао исте ефекте у регулацији нивоа тестостеронам естрадиола и прогестерона.

7. Третман комбинацијом МЕТ и СЕА је имао супериорније ефекте у регулацији нивоа LH и AMH у односу на самостално примењене третмане.

8. Третман комбинацијом МЕТ и СЕА је имао исте ефекте у регулацији нивоа AMH у ткиву јајника у односу на самостално примењене третмане.

9. Третман МЕТ, СЕА и њиховом комбинацијом је имао исте ефекте у регулацији нивоа прооксидантних параметара у крви.

10. САЕ (самостално или у комбинацији са МЕТ) је повећао активност CAT, док је третман МЕТ самостално повећао активност SOD. Сва три третмана су повећала ниво GSH.

11. Третман комбинацијом МЕТ и СЕА је имао супериорније ефекте у регулацији активности САТ у ткиву јајника у односу на самостално примењене третмане, док су ефекти на остале параметре ОС у ткиву јајника били слични након примењених третмана.

12. СЕА (самостално или у комбинацији са МЕТ) је имала ефекта на смањење волумена јајника.

13. Третман комбинацијом МЕТ и СЕА је имао супериорније ефекте у регулацији дебљине ендометријума у односу на самостално примењене третмане.

14. Третман МЕТ и СЕА, самостално и у комбинацији, довео је до повећања имунореактивности фосфорилисане АМПК у односу на PSOS групу.

# **ЛИТЕРАТУРА**

## Литература

1. Carmina, E. & Lobo, R. A. Polycystic ovary syndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1897–1899 (1999).
2. Conway, G. et al. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *Eur. J. Endocrinol.* 171, 1–29 (2014).
3. 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.
4. Ntumu M, Maya E, Lizneva D, Adanu R, Azziz R. The pressing need for standardization in epidemiologic studies of PCOS across the globe. *Gynecol Endocrinol.* 2019 Jan;35(1):1-3. doi: 10.1080/09513590.2018.1488958. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30646762.
5. Stein, I. F. & Leventhal, M. L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 29, 181–191 (1935).
6. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome. In: Givens JHF, Merriman G, editors. *The Polycystic Ovary Syndrome*. Cambridge, MA: Blackwell Scientific; 1992. pp. 377–384.
7. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004;81:19–25.
8. Azziz R, Carmina E, DeWailly D, 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.
9. Carmina E, Lobo R. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004;82:661–665
10. Allemand MC, Tummon IS, Phy JL, Foong SC, Dumesic DA, Session DR. Diagnosis of polycystic ovaries by three-dimensional transvaginal ultrasound. *Fertil Steril.* 2006;85(1):214–219.
11. Melanie Gibson-Helm, Helena Teede, Andrea Dunaif, Anuja Dokras. Delayed diagnosis and a lack of information associated with dissatisfaction in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2016; jc.2016-2963 DOI: 10.1210/jc.2016-2963
12. Deswal R, Narwal V, Dang A, Pundir CS. The Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Systematic Review. *J Hum Reprod Sci.* 2020 Oct-Dec;13(4):261-271. doi: 10.4103/jhrs.JHRS\_95\_18. Epub 2020 Dec 28. PMID: 33627974; PMCID: PMC7879843.

13. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al.: The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* 2009, 91:456–488.
14. Vink, J. M., Sadrzadeh, S., Lambalk, C. B. & Boomsma, D. I. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 2100–2104 (2006)
15. Govind A, Obhrai MS, Clayton RN. Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jan;84(1):38-43. doi: 10.1210/jcem.84.1.5382. PMID: 9920059.
16. Franks S, Gharani N, Waterworth D, et al. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 1997;12:2641–2648.
17. Prapas N, Karkanaki A, Prapas I, Kalogiannidis I, Katsikis I, Panidis D. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Hippokratia.* 2009 Oct;13(4):216-23. PMID: 20011085; PMCID: PMC2776334.
18. Day, F. et al. Large-scale genome-wide meta-analysis of polycystic ovary syndrome suggests shared genetic architecture for different diagnosis criteria. *PLoS Genet.* 14, e1007813 (2018).
19. Crisosto, N. et al. Higher luteinizing hormone levels associated with antimullerian hormone in postmenarchal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 111, 381–388 (2019)
20. Crisosto N, Echiburú B, Maliqueo M, Luchsinger M, Rojas P, Recabarren S, Sir-Petermann T. Reproductive and metabolic features during puberty in sons of women with polycystic ovary syndrome. *Endocr Connect.* 2017 Nov;6(8):607-613. doi: 10.1530/EC-17-0218. Epub 2017 Sep 14. PMID: 28912339; PMCID: PMC5640572.
21. Crisosto N, Sir-Petermann T. Family ties: offspring born to women with polycystic ovary syndrome. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, Volume 12, 2020, 119-124.
22. Stener-Victorin E, Deng Q. Epigenetic inheritance of polycystic ovary syndrome - challenges and opportunities for treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2021 Sep;17(9):521-533. doi: 10.1038/s41574-021-00517-x. Epub 2021 Jul 7. PMID: 34234312.
23. Risal, S. et al. Prenatal androgen exposure and transgenerational susceptibility to polycystic ovary syndrome. *Nat. Med.* 25, 1894–1904 (2019)
24. Barrett ES, Hoeger KM, Sathyanarayana S, Abbott DH, Redmon JB, Nguyen RHN, Swan SH. Anogenital distance in newborn daughters of women with polycystic ovary syndrome indicates fetal testosterone exposure. *J Dev Orig Health Dis.* 2018 Jun;9(3):307-314. doi: 10.1017/S2040174417001118. Epub 2018 Jan 9. PMID: 29310733; PMCID: PMC5997496.



25. Tehrani FR, Noroozzadeh M, Zahediasl S, Piryaei A, Azizi F. Introducing a rat model of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood. *Exp Physiol*. 2014 May 1;99(5):792-801. doi: 10.1113/expphysiol.2014.078055. Epub 2014 Feb 14. PMID: 24532600.
26. Franks S, Berga SL. Does PCOS have developmental origins? *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):2-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.029. PMID: 22192134; PMCID: PMC3263824.
27. Lambertini L, Saul SR, Copperman AB, Hammerstad SS, Yi Z, Zhang W, Tomer Y, Kase N. Intrauterine Reprogramming of the Polycystic Ovary Syndrome: Evidence from a Pilot Study of Cord Blood Global Methylation Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Dec 18;8:352. doi: 10.3389/fendo.2017.00352. PMID: 29326659; PMCID: PMC5741701.
28. Merkin SS, Phy JL, Sites CK, Yang D. Environmental determinants of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2016 Jul;106(1):16-24. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.05.011. Epub 2016 May 27. PMID: 27240194.
29. Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Lividas S, Palioura E, Economou F, Koutsilieris M, et al. Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E480–4.
30. Sjaarda LA, Schisterman EF, Schliep KC, Plowden T, Zarek SM, Yeung E, et al. Dietary carbohydrate intake does not impact insulin resistance or androgens in healthy, eumenorrheic women. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 11:2979–86
31. Legro RS, Kunesman AR, Dodson WE, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:165–9.
32. Sarah A. Kanbour and Adrian S. Dobs. Hyperandrogenism in Women with Polycystic Ovarian Syndrome: Pathophysiology and Controversies. *Androgens: Clinical Research and Therapeutics*. Dec 2022.22-30
33. O'Driscoll JB, Mamtora H, Higginson J, Pollock A, Kane J, Anderson DC. A prospective study of the prevalence of clear-cut endocrine disorders and polycystic ovaries in 350 patients presenting with hirsutism or androgenic alopecia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994;41(2):231–236.
34. Hughesdon PE. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called “hyperthecosis”. *Obstet Gynecol Surv*. 1982;37(2):59–77
35. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: An update on mechanisms and implications. *Endocr Rev*. 2012;33(6):981–1030
36. Lebbe M, Woodruff TK: Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Mol Hum Reprod* 2013; 19: 828–837.

37. Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S: Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet* 2003; 362: 1017–1021.
38. Nisenblat, V. & Norman, R. J. Androgens and polycystic ovary syndrome. *Curr. Opin. Endocrinol. Diab Obes.* 16, 224–231 (2009).
39. Lenie, S. & Smitz, J. Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 80, 685–695 (2009).
40. Baillargeon, J. P. & Carpentier, A. Role of insulin in the hyperandrogenemia of lean women with polycystic ovary syndrome and normal insulin sensitivity. *Fertil. Steril.* 88, 886–893 (2007)
41. Barbieri, R. L. et al. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62, 904–910 (1986)
42. Geffner ME, Golde DW: Selective insulin action on skin, ovary, and heart in insulin-resistant states. *Diabetes Care* 1988; 11: 500–505.
43. Lim SS, Davies MJ, Norman RJ, Moran LJ: Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2012; 18: 618–637.
44. Forman, H.J., Zhang, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* 20, 689–709 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>
45. 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 Jun 29;10:49. doi: 10.1186/1477-7827-10-49. PMID: 22748101; PMCID: PMC3527168.
46. Mohammadi M. Oxidative Stress and Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Review. *Int J Prev Med.* 2019 May 17;10:86. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM\_576\_17. PMID: 31198521; PMCID: PMC6547785.
47. Huang Y, Zhang X. Luteolin alleviates polycystic ovary syndrome in rats by resolving insulin resistance and oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2021 Jun 1;320(6):E1085-E1092. doi: 10.1152/ajpendo.00034.2021. Epub 2021 Apr 26. PMID: 33900851.
48. Zeng, X.; Huang, Q.; Long, S.L.; Zhong, Q.; Mo, Z. Mitochondrial dysfunction in polycystic ovary syndrome. *DNA Cell Biol.* 2020, 39, 1401–1409.

49. Lu J, Wang Z, Cao J, Chen Y, Dong Y. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Aug 20;16(1):80. doi: 10.1186/s12958-018-0391-5. PMID: 30126412; PMCID: PMC6102891.
50. Dubey P, Reddy S, Boyd S, Bracamontes C, Sanchez S, Chattopadhyay M, Dwivedi A. Effect of Nutritional Supplementation on Oxidative Stress and Hormonal and Lipid Profiles in PCOS-Affected Females. *Nutrients*. 2021 Aug 25;13(9):2938. doi: 10.3390/nu13092938. PMID: 34578816; PMCID: PMC8467908.
51. Furat Rencher S, Kurnaz Ozbek S, Eraldemir C, Sezer Z, Kum T, Ceylan S, Guzel E. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study. *J Ovarian Res*. 2018 Jun 29;11(1):55. doi: 10.1186/s13048-018-0427-7. PMID: 29958542; PMCID: PMC6025739.
52. N. Boulman, Y. Levy, R. Leiba, S. Shachar, R. Linn, O. Zinder, Z. Blumenfeld, Increased C-Reactive Protein Levels in the Polycystic Ovary Syndrome: A Marker of Cardiovascular Disease, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 89, Issue 5, 1 May 2004, Pages 2160–2165, <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031096>
53. Repaci, A., Gambineri, A., & Pasquali, R. (2011). The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(1), 30–41. doi:10.1016/j.mce.2010.08.002
54. Spaczynski, R.Z., Arici, A., Duleba, A.J., 1999. Tumor necrosis factor-alpha stimulates proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol. Reprod*. 61 (4), 993–998
55. Kaipia, A., Chun, S.Y., Eisenhauer, K., Hsueh, A.J., 1996. Tumor necrosis factor-alpha and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 137 (11), 4864–4870.
56. Jena D, Choudhury AK, Mangaraj S, Singh M, Mohanty BK, Baliarsinha AK. Study of Visceral and Subcutaneous Abdominal Fat Thickness and Its Correlation with Cardiometabolic Risk Factors and Hormonal Parameters in Polycystic Ovary Syndrome. *Indian J Endocrinol Metab*. 2018 May-Jun;22(3):321-327. doi: 10.4103/ijem.IJEM\_646\_17. PMID: 30090722; PMCID: PMC6063187.
57. Lin K, Sun X, Wang X, Wang H, Chen X. Circulating Adipokine Levels in Nonobese Women With Polycystic Ovary Syndrome and in Nonobese Control Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jan 7;11:537809. doi: 10.3389/fendo.2020.537809. PMID: 33488512; PMCID: PMC7817813.
58. Khan MJ, Ullah A, Basit S. Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives. *Appl Clin Genet*. 2019 Dec 24;12:249-260. doi: 10.2147/TACG.S200341. PMID: 31920361; PMCID: PMC6935309.

59. Rosenberg, S. L. (2019). The Relationship Between PCOS and Obesity: Which Comes First?. *The Science Journal of the Lander College of Arts and Sciences*, 13(1). Retrieved from <https://touro scholar.touro.edu/sjlcas/vol13/iss1/5>
60. Barber TM, Hanson P, Weickert MO, Franks S. Obesity and Polycystic Ovary Syndrome: Implications for Pathogenesis and Novel Management Strategies. *Clin Med Insights Reprod Health*. 2019 Sep 9;13:1179558119874042. doi: 10.1177/1179558119874042. PMID: 31523137; PMCID: PMC6734597.
61. Passarello K, Kurian S, Villanueva V. Endometrial cancer: an overview of pathophysiology, management, and care. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35:157-165.
62. Escobar-Morreale HF, San Millan JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome, *Trends Endocrinol Metab*, 2007, vol. 18 (pg. 266-272)
63. Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome, *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, vol. 91 (pg. 336-340)
64. Lo J. C., Feigenbaum S. L., Yang J., Pressman A. R., Selby J. V., Go A. S. Epidemiology and adverse cardiovascular risk profile of diagnosed polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006;91(4):1357–1363. doi: 10.1210/jc.2005-2430.
65. Vrbíková J., Cífková R., Jirkovská A., et al. Cardiovascular risk factors in young Czech females with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2003;18(5):980–984. doi: 10.1093/humrep/deg218.
66. Luque-Ramírez M., Mendieta-Azcona C., Alvarez-Blasco F., Escobar-Morreale H. F. Androgen excess is associated with the increased carotid intima-media thickness observed in young women with polycystic ovary
67. Lansdown A & Rees DA 2012 The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clinical Endocrinology* 77 791–801.
68. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V & Kovacic JC 2017 Impact of oxidative stress on the heart and vasculature: part 2 of a 3-part series. *Journal of the American College of Cardiology* 70 212–229. (<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.035>)
69. Pinilla L, Rodriguez-Padilla ML, Sanchez-Criado J, Gaytan F & Aguilar E 1992 Mechanism of reproductive deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Physiology and Behavior* 51 99–104. ([https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90209-k](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90209-k))
70. Pinilla L, Castellano JM, Romero M, Tena-Sempere M, Gaytán F & Aguilar E 2009 Delayed puberty in spontaneously hypertensive rats involves a primary ovarian failure independent of the

hypothalamic KiSS-1/GPR54/ GnRH system. *Endocrinology* 150 2889–2897. (<https://doi.org/10.1210/en.2008-1381>)

71. Martínez LA, Cifuentes F & Morales MA 2019 Ganglionic long-term potentiation in prehypertensive and hypertensive stages of spontaneously hypertensive rats depends on GABA modulation. *Neural Plasticity* 2019 7437894. (<https://doi.org/10.1155/2019/7437894>)

72. Osibogun O., Ogunmoroti O., Michos E. D. Polycystic ovary syndrome and cardiometabolic risk: opportunities for cardiovascular disease prevention. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2020;30(7):399–404. doi: 10.1016/j.tcm.2019.08.010.

73. Iftikhar S., Collazo-Clavell M. L., Roger V. L., et al. Risk of cardiovascular events in patients with polycystic ovary syndrome. *The Netherlands Journal of Medicine*. 2012;70(2):74–80.

74. Tepavčević S., Milutinović D. V., Macut D., et al. Cardiac nitric oxide synthases and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the rat model of polycystic ovary syndrome induced by dihydrotestosterone. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 2015;123(5):303–307. doi: 10.1055/s-0035-1548929.

75. Joksimovic Jovic J, Sretenovic J, Jovic N, Rudic J, Zivkovic V, Srejovic I, Mihajlovic K, Dragicin N, Andjic M, Milinkovic M, Milosavljevic Z, Jakovljevic V. Cardiovascular Properties of the Androgen-Induced PCOS Model in Rats: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Aug 31;2021:8862878. doi: 10.1155/2021/8862878. PMID: 34512871; PMCID: PMC8426083.

76. Hasan M, Sultana S, Sohan M, Parvin S, Rahman MA, Hossain MJ, Rahman MS, Islam MR. Prevalence and associated risk factors for mental health problems among patients with polycystic ovary syndrome in Bangladesh: A nationwide cross-Sectional study. *PLoS One*. 2022 Jun 22;17(6):e0270102. doi: 10.1371/journal.pone.0270102. PMID: 35731829; PMCID: PMC9216580.

77. Behboodi Moghadam Z, Fereidooni B, Saffari M, Montazeri A. Measures of health-related quality of life in PCOS women: a systematic review. *Int J Womens Health*. 2018; 10:397–408. pmid:30123008

78. Yin X, Ji Y, Chan CLW, Chan CHY. The mental health of women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Arch Womens Ment Health*. 2021; 24(1):11–27. pmid:32514730

79. Dokras A. Mood and anxiety disorders in women with PCOS. *Steroids*. 2012;77(4):338–341. pmid:22178257

80. Keen MA, Shah IH, Sheikh G. Cutaneous Manifestations of Polycystic Ovary Syndrome: A Cross-Sectional Clinical Study. *Indian Dermatol Online J.* 2017 Mar-Apr;8(2):104-110. doi: 10.4103/2229-5178.202275. PMID: 28405549; PMCID: PMC5372429.
81. Gowri BV, Chandravathi PL, Sindhu PS, Naidu KS. Correlation of skin changes with hormonal changes in polycystic ovarian syndrome: A cross-sectional study clinical study. *Indian J Dermatol.* 2015;60:419.
82. de Wilde M. A., Lamain-de Ruiten M., Veltman-Verhulst S. M., et al. Increased rates of complications in singleton pregnancies of women previously diagnosed with polycystic ovary syndrome predominantly in the hyperandrogenic phenotype. *Fertility and Sterility.* 2017;108(2):333–340. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.015.
83. Katulski K, Czyzyk A, Podfigurna-Stopa A, Genazzani AR, Meczekalski B. Pregnancy complications in polycystic ovary syndrome patients. *Gynecol Endocrinol.* (2015) 31:87–91. doi: 10.3109/09513590.2014.974535
84. Wang Q, Würtz P, Auro K, Mäkinen V-P, Kangas AJ, Soininen P, et al. Metabolic profiling of pregnancy: cross-sectional and longitudinal evidence. *BMC Med.* (2016) 14:205. doi: 10.1186/s12916-016-0733-0
85. Formoso G, Baldassarre MPA, Ginestra F, Carlucci MA, Bucci I, Consoli A. Inositol and antioxidant supplementation: safety and efficacy in pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev.* (2019) 35:e3154. doi: 10.1002/dmrr.3154
86. Wilcox G. Impact of pregnancy on inborn errors of metabolism. *Rev Endocr Metab Disord.* (2018) 19:13–33. doi: 10.1007/s11154-018-9455-2
87. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Seminars in Perinatology.* 2009;33(3):130–137. doi: 10.1053/j.semperi.2009.02.010.
88. Qin J. Z., Pang L. H., Li M. J., Fan X. J., Huang R. D., Chen H. Y. Obstetric complications in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2013;11(56)
89. Boomsma C. M., Eijkemans M. J. C., Hughes E. G., Visser G. H. A., Fauser B. C. J. M., Macklon N. S. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update.* 2006;12(6):673–683. doi: 10.1093/humupd/dml036.
90. Roos N., Kieler H., Sahlin L., Ekman-Ordeberg G., Falconer H., Stephansson O. Risk of adverse pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: Population based cohort study. *British Medical Journal.* 2011;343(7828) doi: 10.1136/bmj.d6309.d6309
91. Oberg E., Gidlöf S., Jakson I., Mitsell M., Egnell P.T., Hirschberg A.L. Improved menstrual function in obese women with polycystic ovary syndrome after behavioural modification

intervention—A randomized controlled trial. *Clin. Endocrinol.* 2019;90:468–478. doi: 10.1111/cen.13919.

92. Hoeger K.M., Dokras A., Piltonen T. Update on PCOS: Consequences, challenges, and guiding treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020;106:e1071–e1083. doi: 10.1210/clinem/dgaa839.

93. Kim CH, Lee SH. Effectiveness of Lifestyle Modification in Polycystic Ovary Syndrome Patients with Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Life (Basel)*. 2022 Feb 18;12(2):308. doi: 10.3390/life12020308. PMID: 35207595; PMCID: PMC8876590.

94. Woodward A, Broom D, Dalton C, Metwally M, Klonizakis M. Supervised Exercise Training and Increased Physical Activity to Reduce Cardiovascular Disease Risk in Women With Polycystic Ovary Syndrome: Study Protocol for a Randomized Controlled Feasibility Trial. *Trials (2020)* 21(1):101. doi: 10.1186/s13063-019-3962-7

95. Stepto NK, Hiam D, Gibson-Helm M, Cassar S, Harrison CL, Hutchison SK, et al. Exercise and Insulin Resistance in PCOS: Muscle Insulin Signalling and Fibrosis. *Endocr Connect (2020)* 9(4):346–59. doi: 10.1530/EC-19-0551

96. Escobar-Morreale HF. Polycystic Ovary Syndrome: Definition, Aetiology, Diagnosis and Treatment. *Nat Rev Endocrinol (2018)* 14(5):270–84. doi: 10.1038/nrendo.2018.24

97. Rodriguez Paris VA-O, Solon-Biet SA-OX, Senior AA-O, Edwards MC, Desai R, Tedla N, et al. Defining the Impact of Dietary Macronutrient Balance on PCOS Traits. *Nat Commun (2020)* 11(1):5262. doi: 10.1038/s41467-020-19003-5

98. Farshchi H, Rane A, Love A, Kennedy RL. Diet and Nutrition in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Pointers for Nutritional Management. *J Obstet Gynaecol (2007)* 27(8):762–73. doi: 10.1080/01443610701667338

99. Naderpoor N, Shorakae S, de Courten B, Misso ML, Moran LJ, Teede HJ. Metformin and Lifestyle Modification in Polycystic Ovary Syndrome: Systematic Review and Meta-Analysis. *Hum Reprod Update (2015)* 21(5):560–74. doi: 10.1093/humupd/dmv025

100. Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril.* 2003 Apr;79(4):956–62. doi: 10.1016/s0015-0282(02)04925-7. PMID: 12749437.

101. Harborne L., Fleming R., Lyall H., Sattar N., Norman J. (2003) Metformin or antiandrogen in the treatment of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4116–4123

102. Costello M.F., Chapman M., Conway U. (2006) A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 21: 1387–1399

103. Harborne LR, Sattar N, Norman JE, Fleming R. Metformin and weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome: comparison of doses. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Aug;90(8):4593-8. doi: 10.1210/jc.2004-2283. Epub 2005 May 10. PMID: 15886247.
104. Lashen H. Role of metformin in the management of polycystic ovary syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2010 Jun;1(3):117-28. doi: 10.1177/2042018810380215. PMID: 23148156; PMCID: PMC3475283.
105. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* 2017 Sep;60(9):1577-1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28776086; PMCID: PMC5552828.
106. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):251-262.
107. Zhu R, Zheng J, Chen L, Gu B, Huang S. Astragaloside IV facilitates glucose transport in C2C12 myotubes through the IRS1/AKT pathway and suppresses the palmitate-induced activation of the IKK/IkappaBalpha pathway. *Int J Mol Med.* 2016;37:1697-705.
108. Fulghesu AM, Romualdi D, Di Florio C, Sanna S, Tagliaferri V, Gambineri A, Tomassoni F, Minerba L, Pasquali R, Lanzzone A. Is there a dose-response relationship of metformin treatment in patients with polycystic ovary syndrome? Results from a multicentric study. *Hum Reprod.* 2012;27:3057-66.
109. Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci.* 2004;24:479-87.
110. Kai Y, Kawano Y, Yamamoto H, Narahara H. A possible role for AMP-activated protein kinase activated by metformin and AICAR in human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13:27.
111. Traci E LaMoia, Gerald I Shulman, Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action, *Endocrine Reviews*, Volume 42, Issue 1, February 2021, Pages 77-96
112. Madiraju AK, Qiu Y, Perry RJ, et al. Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism in vivo. *Nat Med.* 2018;24(9):1384-1394.
113. Nestler JE. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2008 Jan 3;358(1):47-54. doi: 10.1056/NEJMct0707092. PMID: 18172174.
114. Su, D. F., Wang, X. Y. (2014). Metformin vs insulin in the management of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 104 (3), 353-357. doi: 10.1016/j.diabres.2013.12.056



115. Jorquera G, Echiburú B, Crisosto N, Sotomayor-Zárate R, Maliqueo M, Cruz G. Metformin during Pregnancy: Effects on Offspring Development and Metabolic Function. *Front Pharmacol.* 2020 Jun 17;11:653. doi: 10.3389/fphar.2020.00653. PMID: 32625081; PMCID: PMC7311748.
116. Shah D, Patil M; National PCOS Working Group. Consensus Statement on the Use of Oral Contraceptive Pills in Polycystic Ovarian Syndrome Women in India. *J Hum Reprod Sci.* 2018 Apr-Jun;11(2):96-118. doi: 10.4103/jhrs.JHRS\_72\_18. PMID: 30158805; PMCID: PMC6094524.
117. Homburg R. Clomiphene citrate – end of an era? A mini-review. *Hum Reprod.* 2005;20:2043-2051.
118. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2361-2365.
119. Amirian, M., Shariat Moghani, S., Jafarian, F. et al. Combination of pioglitazone and clomiphene citrate versus clomiphene citrate alone for infertile women with the polycystic ovarian syndrome. *BMC Women's Health* 21, 302 (2021).
120. Ayaz A, Alwan Y, Farooq MU. Metformin-clomiphene citrate vs. clomiphene citrate alone: Polycystic ovarian syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 2013 Jan;6(1):15-8. doi: 10.4103/0974-1208.112372. PMID: 23869144; PMCID: PMC3713569.
121. Gonen, Y., Casper, R. F. (1990). Sonographic determination of a possible adverse effect of clomiphene citrate on endometrial growth. *Hum. Reprod.* 5 (6), 670–674. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137165
122. Croze ML, Soulage CO. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie.* 2013;95:1811–27.
123. Carlomagno G, Unfer V, Roseff S. The D-chiro-inositol paradox in the ovary. *Fertil Steril.* 2011;95:2515–6.
124. Kalra B, Kalra S, Sharma JB. The inositols and polycystic ovary syndrome. *Indian J Endocrinol Metab.* 2016 Sep-Oct;20(5):720-724. doi: 10.4103/2230-8210.189231. PMID: 27730087; PMCID: PMC5040057.
125. Artini PG, Di Bernardino OM, Papini F, Genazzani AD, Simi G, Ruggiero M, et al. Endocrine and clinical effects of myo-inositol administration in polycystic ovary syndrome. A randomized study. *Gynecol Endocrinol.* 2013;29:375–9.
126. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Reamer P, Gunn RD, Allan G. Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 1999;340:1314–20.

127. Kim EJ, Jang M, Choi JH, Park KS, Cho IH. An Improved Dehydroepiandrosterone-Induced Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Post-pubertal Improve PCOS's Features. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Dec 4;9:735. doi: 10.3389/fendo.2018.00735. PMID: 30564195; PMCID: PMC6288467.
128. Jia LY, Feng JX, Li JL, Liu FY, Xie LZ, Luo SJ, Han FJ. The Complementary and Alternative Medicine for Polycystic Ovary Syndrome: A Review of Clinical Application and Mechanism. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021 Feb 26;2021:5555315. doi: 10.1155/2021/5555315. PMID: 33727939; PMCID: PMC7935573.
129. Sidor, A.; Drożdżyńska, A.; Gramza-Michalowska, A. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and its products as potential health-promoting factors—an overview. *Trends Food Sci. Technol*. 2019, 89, 45–60.
130. Olechno E, Puścion-Jakubik A, Zujko ME. Chokeberry (*A. melanocarpa* (Michx.) Elliott)-A Natural Product for Metabolic Disorders? *Nutrients*. 2022 Jun 28;14(13):2688. doi: 10.3390/nu14132688. PMID: 35807867; PMCID: PMC9268775.
131. Zielińska A., Siudem P., Paradowska K., Gralec M., Kaźmierski S., Wawer I. *Aronia melanocarpa* Fruits as a Rich Dietary Source of Chlorogenic Acids and Anthocyanins: 1H-NMR, HPLC-DAD, and Chemometric Studies. *Molecules*. 2020;25:3234. doi: 10.3390/molecules25143234.
132. Oszmiański J., Lachowicz S. Effect of the Production of Dried Fruits and Juice from Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the Content and Antioxidative Activity of Bioactive Compounds. *Molecules*. 2016;21:1098. doi: 10.3390/molecules21081098.
133. Jurendić, T.; Ščetar, M. *Aronia melanocarpa* products and by-products for health and nutrition: A review. *Antioxidants* 2021, 10, 1052.
134. Cindrić I.J., Zeiner M., Mihajlov-Konanov D., Stinger G. Inorganic Macro- and Micronutrients in “Superberries” Black Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and Related Teas. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2017;14:539. doi: 10.3390/ijerph14050539.
135. Yang, S.-Q.; Wang, D.; Gao, Y.-X. Advances in studies on the function and application of *Aronia melanocarpa*. *Food Res. Dev*. 2021, 42, 206–213.
136. Sidor, A.; Gramza-Michałowska, A. Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* L.-A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules* 2019, 24, 3710.
137. Jurikova, T.; Mlcek, J.; Skrovankova, S.; Sumczynski, D.; Sochor, J.; Hlavacova, I.; Snopek, L.; Orsavova, J. Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules* 2017, 22, 944.

138. Šic Žlabur, J.; Dobričević, N.; Plietić, S.; Galić, A.; Bilić, D.P.; Voća, S. Antioxidant Potential of Fruit Juice with Added Chokeberry Powder (*Aronia melanocarpa*). *Molecules* 2017, 22, 2158.
139. Kasprzak-Drozd K, Oniszczyk T, Soja J, et al. The Efficacy of Black Chokeberry Fruits against Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6541. Published 2021 Jun 18. doi:10.3390/ijms22126541
140. Jakovljevic, V.; Milic, P.; Bradic, J.; Jeremic, J.; Zivkovic, V.; Srejovic, I.; Nikolic Turnic, T.; Milosavljevic, I.; Jeremic, N.; Bolevich, S.; et al. Standardized *Aronia melanocarpa* Extract as Novel Supplement against Metabolic Syndrome: A Rat Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 20, 6.
141. Milosavljevic, I.; Jakovljevic, V.; Petrovic, D.; Draginic, N.; Jeremic, J.; Mitrovic, M.; Zivkovic, V.; Srejovic, I.; Stojic, V.; Bolevich, S.; et al. Standardized *Aronia melanocarpa* extract regulates redox status in patients receiving hemodialysis with anemia. *Mol. Cell. Biochem.* 2021, 476, 4167–4175.
142. Tasic, N.; Jakovljevic, V.L.; Mitrovic, M.; Djindjic, B.; Tasic, D.; Dragisic, D.; Citakovic, Z.; Kovacevic, Z.; Radoman, K.; Zivkovic, V.; et al. Black chokeberry *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, glycemia and lipid profile in patients with metabolic syndrome: A prospective controlled trial. *Mol. Cell. Biochem.* 2021, 476, 2663–2673.
143. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002 Nov;62(4A):609-14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008. Epub 2003 Feb 11. PMID: 12659010.
144. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979, 95, 351–358.
145. Auclair, C.; Voisin, E. Nitroblue tetrazolium reduction. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*; Greenwald, R.A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1985; pp. 123–132.
146. Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 1980, 38, 161–170.
147. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982, 126, 131.
148. Beutler, E. Catalase. In *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*; Beutler, E., Ed.; Grune and Stratton: New York, NY, USA, 1982; pp. 105–106.
149. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984, 105, 121–126.
150. Misra, H.P.; Fridovich, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 3170.

151. Beutler, E. Reduced glutathione (GSH). In *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*; Beutler, E., Ed.; Grune and Stratton: New York, NY, USA, 1975; pp. 112–114.
152. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972;48:422–7.
153. Qiu S, Wu C, Lin F, Chen L, Huang Z & Jiang Z 2009 Exercise training improved insulin sensitivity and ovarian morphology in rats with polycystic ovary syndrome. *Hormone and Metabolic Research* 41 880–885.
154. Liu G, Shi F, Blas-Machado U, Duong Q, Davis VL, Foster WG & Hughes CL 2005 Ovarian effects of a high lactose diet in the female rat. *Reproduction, Nutrition, Development* 45 185–192.
155. Simão VA, de Almeida Chuffa LG & Cherici Camargo IC 2016 Ovarian sex steroid receptors and sex hormones in androgenized rats. *Reproduction* 152 545–559.
156. Marouf BH, Ismaeel DO, Hassan AH, Ali OJ. Therapeutic Effects of Silibinin Against Polycystic Ovary Syndrome Induced by Letrozole in Rats via Its Potential Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activities. *J Inflamm Res.* 2022;15:5185-5199
157. Nardo LG, Buckett WM & Khullar V 2003 Determination of the bestfitting ultrasound formulaic method for ovarian volume measurement in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 79 632–633.
158. Wen L, Lin W, Li Q, Chen G, Wen J. Effect of Sleeve Gastrectomy on Kisspeptin Expression in the Hypothalamus of Rats with Polycystic Ovary Syndrome [published correction appears in *Obesity (Silver Spring)*. 2020 Nov;28(11):2242]. *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(6):1117-1128. doi:10.1002/oby.22795
159. Zhai J, Li S, Hu M, Di F, Liu J, Du Y. Decreased brain and muscle ARNT-like protein 1 expression mediated the contribution of hyperandrogenism to insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18(1):32. Published 2020 Apr 25. doi:10.1186/s12958-020-00592-1
160. Zheng S, Chen Y, Ma M, Li M. Mechanism of quercetin on the improvement of ovulation disorder and regulation of ovarian CNP/NPR2 in PCOS model rats. *J Formos Med Assoc.* 2022;121(6):1081-1092. doi:10.1016/j.jfma.2021.08.015
161. Peng F, Hu Y, Peng S, Zeng N, Shi L. Apigenin exerts protective effect and restores ovarian function in dehydroepiandrosterone induced polycystic ovary syndrome rats: a biochemical and histological analysis. *Ann Med.* 2022;54(1):578-587. doi:10.1080/07853890.2022.2034933
162. Çelik LS, Kuyucu Y, Yenilmez ED, Tuli A, Dağlıoğlu K, Mete UÖ. Effects of vitamin D on ovary in DHEA-treated PCOS rat model: A light and electron microscopic study. *Ultrastruct Pathol.* 2018;42(1):55-64. doi:10.1080/01913123.2017.1385668

163. Jensterle M, Kravos NA, Ferjan S, Goricar K, Dolzan V, Janez A. Long-term efficacy of metformin in overweight-obese PCOS: longitudinal follow-up of retrospective cohort. *Endocr Connect.* 2020;9(1):44-54. doi:10.1530/EC-19-0449
164. Tohma YA, Onalan G, Tepeoglu M, et al. Phosphodiesterase 4 inhibitor plus metformin is superior to metformin alone for the treatment of polycystic ovary syndrome: A rat model study. *Exp Ther Med.* 2019;17(5):4013-4022. doi:10.3892/etm.2019.7428
165. Dallas C, Gerbi A, Elbez Y, Caillard P, Zamaria N, Cloarec M. Clinical study to assess the efficacy and safety of a citrus polyphenolic extract of red orange, grapefruit, and orange (Sinetrol-XPur) on weight management and metabolic parameters in healthy overweight individuals. *Phytother Res.* 2014;28(2):212-218. doi:10.1002/ptr.4981
166. Janssens PL, Hursel R, Westerterp-Plantenga MS. Long-term green tea extract supplementation does not affect fat absorption, resting energy expenditure, and body composition in adults. *J Nutr.* 2015;145(5):864-870. doi:10.3945/jn.114.207829
167. Qin B, Anderson RA. An extract of chokeberry attenuates weight gain and modulates insulin, adipogenic and inflammatory signalling pathways in epididymal adipose tissue of rats fed a fructose-rich diet. *Br J Nutr.* 2012;108(4):581-587. doi:10.1017/S000711451100599X
168. Kabel AM, Ashour AM, Omar MS, Estfanous RS. Effect of fish oil and telmisartan on dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats: The role of oxidative stress, transforming growth factor beta-1, and nuclear factor kappa B. *Food Sci Nutr.* 2020;8(9):5149-5159. Published 2020 Aug 5. doi:10.1002/fsn3.1819
169. Miao M, Peng M, Zhu Z, Yan X, Wei Z, Li M. Effects of dodder total flavone on polycystic ovary syndrome rat models induced by DHEA combined HCG. *Saudi J Biol Sci.* 2019 May;26(4):821-827. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.02.007. Epub 2019 Feb 19. PMID: 31049009; PMCID: PMC6486516.
170. Zhang X, Zhang C, Shen S, Xia Yj, Yi L, Gao Q, Wang Y. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Hum Reprod.* 2013 Nov;28(11):3074-85. doi: 10.1093/humrep/det341. Epub 2013 Aug 26. PMID: 23980058.
171. Franks S, McCarthy MI, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl.* 2006;29(1):278-290. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00623.x
172. Bozkurt M, Kara Bozkurt D, Kurban D, Takmaz T, Sevket O, Ozcan P. 2-D and 3-D ultrasonographic characteristics of the ovary in women with PCOS and multifollicular ovaries. *J Obstet Gynaecol.* 2021;41(6):920-926. doi:10.1080/01443615.2020.1803244

173. Joksimovic Jovic J, Jovic N, Sretenovic J, et al. Normotensive rats with PCOS exhibit the hypertensive pattern: focus on oxidative stress. *Reproduction*. 2021;163(1):11-21. Published 2021 Dec 9. doi:10.1530/REP-21-0219
174. Kalhori Z, Mehranjani MS, Azadbakht M, Shariatzadeh MA. L-Carnitine improves endocrine function and folliculogenesis by reducing inflammation, oxidative stress and apoptosis in mice following induction of polycystic ovary syndrome. *Reprod Fertil Dev*. 2019;31(2):282-293. doi:10.1071/RD18131
175. Zhao H, Zhou D, Chen Y, Liu D, Chu S, Zhang S. Beneficial effects of Heqi san on rat model of polycystic ovary syndrome through the PI3K/AKT pathway. *Daru*. 2017;25(1):21. Published 2017 Oct 11. doi:10.1186/s40199-017-0188-7
176. Kim NH, Jegal J, Kim YN, et al. The Effects of Aronia melanocarpa Extract on Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia in Rats, and Quantitative Analysis of Major Constituents Depending on Extract Conditions. *Nutrients*. 2020;12(6):1575. Published 2020 May 28. doi:10.3390/nu12061575
177. Rababa'h AM, Matani BR, Ababneh MA. The ameliorative effects of marjoram in dehydroepiandrosterone induced polycystic ovary syndrome in rats. *Life Sci*. 2020 Nov 15;261:118353. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118353. Epub 2020 Aug 30. PMID: 32877649.
178. Schmitt E, Stopper H. Estrogenic activity of naturally occurring anthocyanidins. *Nutr Cancer*. 2001;41(1-2):145-149. doi:10.1080/01635581.2001.9680625
179. Nanashima N, Horie K, Maeda H. Phytoestrogenic Activity of Blackcurrant Anthocyanins Is Partially Mediated through Estrogen Receptor Beta. *Molecules*. 2017;23(1):74. Published 2017 Dec 29. doi:10.3390/molecules23010074
180. Rajan RK, M SS, Balaji B. Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism. *Pharm Biol*. 2017;55(1):242-251. doi:10.1080/13880209.2016.1258425
181. Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, Whitehead SA, Mason HD. Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. *Endocrinology*. 2009;150(10):4794-4801. doi:10.1210/en.2009-0540
182. Doi SA, Al-Zaid M, Towers PA, Scott CJ, Al-Shoumer KA. Irregular cycles and steroid hormones in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2005;20(9):2402-2408. doi:10.1093/humrep/dei093
183. Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, Kotsuji F. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. *J Ovarian Res*. 2009;2(1):17. Published 2009 Nov 16. doi:10.1186/1757-2215-2-17

184. Mahamed RR, Maganhin CC, Sasso GRS, et al. Metformin improves ovarian follicle dynamics by reducing theca cell proliferation and CYP-17 expression in an androgenized rat model. *J Ovarian Res.* 2018;11(1):18. Published 2018 Mar 1. doi:10.1186/s13048-018-0392-1
185. Mahmoud AA, Elfiky AM, Abo-Zeid FS. The anti-androgenic effect of quercetin on hyperandrogenism and ovarian dysfunction induced in a dehydroepiandrosterone rat model of polycystic ovary syndrome. *Steroids.* 2022 Jan;177:108936. doi: 10.1016/j.steroids.2021.108936. Epub 2021 Nov 6. PMID: 34752810.
186. Legro RS. Is there a male phenotype in polycystic ovary syndrome families?. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13 Suppl 5:1307-1309.
187. Di Guardo F, Ciotta L, Monteleone M, Palumbo M. Male Equivalent Polycystic Ovarian Syndrome: Hormonal, Metabolic, and Clinical Aspects. *Int J Fertil Steril.* 2020;14(2):79-83. doi:10.22074/ijfs.2020.6092
188. Yamane T, Kozuka M, Konda D, et al. Improvement of blood glucose levels and obesity in mice given aronia juice by inhibition of dipeptidyl peptidase IV and  $\alpha$ -glucosidase. *J Nutr Biochem.* 2016;31:106-112. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.02.004
189. Wang Q, Shang J, Zhang Y, Zhou W. Metformin and sitagliptin combination therapy ameliorates polycystic ovary syndrome with insulin resistance through upregulation of lncRNA H19. *Cell Cycle.* 2019;18(19):2538-2549. doi:10.1080/15384101.2019.1652036
190. Morley LC, Tang T, Yasmin E, Norman RJ, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;11(11):CD003053. Published 2017 Nov 29. doi:10.1002/14651858.CD003053.pub6
191. Azziz R, Carmina E, Chen Z, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16057. Published 2016 Aug 11. doi:10.1038/nrdp.2016.57
192. Wild RA. Dyslipidemia in PCOS. *Steroids.* 2012;77(4):295-299. doi:10.1016/j.steroids.2011.12.002
193. Wang D, Xia M, Yan X, et al. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b. *Circ Res.* 2012;111(8):967-981. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.266502
194. Daskalova E, Delchev S, Vladimirova-Kitova L, Kitov S, Denev P. Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Functional Beverages Increase HDL-Cholesterol Levels in Aging Rats. *Foods.* 2021;10(7):1641. Published 2021 Jul 15. doi:10.3390/foods10071641

195. Ullah A, Jahan S, Razak S, et al. Protective effects of GABA against metabolic and reproductive disturbances in letrozole induced polycystic ovarian syndrome in rats. *J Ovarian Res.* 2017;10(1):62. Published 2017 Sep 15. doi:10.1186/s13048-017-0359-7
196. Enechukwu CI, Onuegbu AJ, Olisekodiaka MJ, et al. Oxidative stress markers and lipid profiles of patients with polycystic ovary syndrome in a Nigerian tertiary hospital. *Obstet Gynecol Sci.* 2019;62(5):335-343. doi:10.5468/ogs.2019.62.5.335
197. Ma X, Li X, Ma L, Chen Y, He S. Soy isoflavones alleviate polycystic ovary syndrome in rats by regulating NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Bioengineered.* 2021;12(1):7215-7223. doi:10.1080/21655979.2021.1979864
198. Donà G, Sabbadin C, Fiore C, et al. Inositol administration reduces oxidative stress in erythrocytes of patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(4):703-710. doi:10.1530/EJE-11-0840
199. Cabrera-Cruz H, Oróstica L, Plaza-Parrochia F, Torres-Pinto I, Romero C, Vega M. The insulin-sensitizing mechanism of myo-inositol is associated with AMPK activation and GLUT-4 expression in human endometrial cells exposed to a PCOS environment. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2020 Feb 1;318(2):E237-E248. doi: 10.1152/ajpendo.00162.2019.



## Биографија

Јован Рудић је рођен 6.11.1969. године у Бијелом Пољу, Црна Гора. Основну и средњу школу завршио је у Бијелом Пољу. Медицински факултет завршио је у Београду. Специјализацију из гинекологије и акушерства завршио је у Београду 2004. године на ГАК Народни фронт. Ужу специјализацију из гинеколошке онкологије завршио је у Београду, на Институту за онкологију и радиологију Србије. Студент је Докторских академских студија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Докторску дисертацију под називом „Испитивање утицаја стандардизованог екстракта ароније на морфолошке карактеристике јајника, хормонски и оксидациони статус код пацова са синдромом полицистичних јајника“ пријавио је 2020. године. Аутор је и коаутор више стручних публикација у домаћим и иностраним часописима.

## Библиографија

1. Rudic J, Jakovljevic V, Jovic N, Nikolic M, Sretenovic J, Mitrovic S, Bolevich S, Bolevich S, Mitrovic M, Raicevic S, Andric K, Dimkic Milenkovic A, Rakic D, Joksimovic Jovic J. Antioxidative Effects of Standardized Aronia melanocarpa Extract on Reproductive and Metabolic Disturbances in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Antioxidants (Basel)*. 2022 May 31;11(6):1099.
2. Joksimovic Jovic J, Sretenovic J, Jovic N, Rudic J, Zivkovic V, Srejovic I, Mihajlovic K, Dragicin N, Andjic M, Milinkovic M, Milosavljevic Z, Jakovljevic V. Cardiovascular Properties of the Androgen-Induced PCOS Model in Rats: The Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Aug 31;2021:8862878.
3. Joksimovic Jovic J, Jovic N, Sretenovic J, Zivkovic V, Nikolic M, Rudic J, Milošević V, Ristić N, Andric K, Dimkic Tomic T, Milicic B, Jakovljevic V. Normotensive rats with PCOS exhibit the hypertensive pattern: focus on oxidative stress. *Reproduction*. 2021 Dec 9;163(1):11-21.

Образац 1

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА СТАНДАРДИЗОВАНОГ ЕКСТРАКТА АРОНИЈЕ НА  
МОРФОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ЈАЈНИКА, ХОРМОНСКИ И ОКСИДАЦИОНИ  
СТАТУС КОЈИ ПАСУВА СА СИНДРОМОМ ПОЛИЦИСТИЧНИХ ЈАЈНИКА

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

у Крагујевцу, 13.01.2023 године,

  
потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА СТАНДАРДИЗОВАНОГ ЕКСТРАКТА АРОНИЈЕ НА  
МОРФОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ЈАЖНИКА, ХОРМОНСКИ И ОКСИДАЦИОНИ  
СТАТУС КОД ПАЦОВА СА СИНДРОМОМ ПОМИЦИСТИЧНИХ ЈАЖНИКА

истоветне.

у Крагујевцу, 13. 01. 2023. године,

  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Јован Рудић

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА СТАНДАРДИЗОВАНОГ ЕКСТРАКТА АРОНИЈЕ НА  
МОРФОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ЈАЈНИЦА, ХОРМОНСКИ И ОКСИДАЦИОНИ  
СТАТУС КОД ПЛЦОВА СА СИНДРОМОМ ПОМИЦИСТИЧНИХ ЈАЈНИЦА

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

у Крагујевцу, 13.01.2023 године,

  
потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>