



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Дејана Д. Ракић

**Испитивање утицаја примене  
емпаглифлозина на репродуктивне и  
метаболичке карактеристике синдрома  
полицистичних јајника код пацова**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Dejana D. Rakić

**Ispitivanje uticaja primene empagliflozina na  
reproduktivne i metaboličke karakteristike  
sindroma policističnih jajnika kod pacova**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2024. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Dejana D. Rakic

**Evaluation of the effect of empagliflozin  
administration on reproductive and metabolic  
characteristics in rats with polycystic ovary  
syndrome**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024.

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Дејана Ракић
Датум и место рођења: 14.06.1994.
Садашње запослење: истраживач приправник за ужу научну област Гинекологија и акушерство, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, лекар на специјализацији Гинеколошко-акушерске клинике Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: Испитивање утицаја примене емпглифлозина на репродуктивне и метаболчке карактеристике синдрома полицистичних јајника код пацова
Број страница: 136
Број слика: 56 графикона, 6 слика и 4 табеле
Број библиографских података: 281
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): медицина
<b>Ментор:</b> титула, име и презиме, звање, назив факултета/института и универзитета доц. др Јована Јоксимовић Јовић, доцент за ужу научну област Физиологија, Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: Одлука број: IV-03-184/5 од 04.05.2024. године

<b>Autor</b>
Ime i prezime: Dejana Rakic
Datum i mesto rođenja: 14.06.1994. Kragujevac
Sadašnje zaposlenje: istraživač pripravnik za užu naučnu oblast Ginekologija i akušerstvo, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu, lekar na specijalizaciji Ginekološko akušerske klinike Univerzitetskog kliničkog centra u Kragujevcu
<b>Doktorska disertacija</b>
Naslov: Ispitivanje uticaja primene empagliflozina na reproduktivne i metaboličke karakteristike sindroma policističnih jajnika kod pacova
Broj stranica: 136
Broj slika: 56 grafikona, 6 slika i 4 tabele
Broj bibliografskih podataka: 281
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): medicina
<b>Mentor:</b> titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/instituta i univerziteta
doc. dr Jovana Joksimović Jović docent za užu naučnu oblast fiziologija Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije:
Odluka broj: IV-03-184/5 od 04.05.2024. godine

<b>Author</b>
Name and surname: Dejana Rakic
Date and place of birth: 14.06.1994. Kragujevac
Current employment: Junior Researcher, Department of Gynaecology and Obstetrics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, resident in Cliniiic for Gynecology and Obstetrics of University clinical center in Kragujevac
<b>Doctoral Dissertation</b>
Title: Evaluation of the effect of empagliflozin administration on reproductive and metabolic characteristics in rats with polycystic ovary syndrome
No. of pages: 136
No. of images: 56 graphs, 6 images, 4 tables
No. of bibliographic data: 281
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): medicine
<b>Mentor:</b> title, name and surname, position, name of faculty / institute and university PhD Jovana Joksimović Jović, Assistant Professor, Physiology at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Topic Application Date:
09.01.2023.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:
Decision number: IV-03-184/5 date 04.05.2024.

## Сажетак

Синдром полицистичних јајника (енгл. *Polycystic Ovary Syndrome* - PCOS) је честа мултифакторска ендокринопатија у репродуктивном добу жене, које је повезан са неплодношћу и метаболичким поремећајима. У последње време доста је истраживана етиопатогенеза овог поремећаја, као и модулација терапијског приступа. Још увек постоје многе несугласице у избору терапије, а метформин представља један од најчешће примењиваних агенаса у терапији PCOS. Обзиром да постоји повезаност метаболичких поремећаја и PCOS, гликемијски статус веома је важан код ових пацијената, те инхибитори натријум глукозног котранспорта типа 2 (SGLT2) представљају потенцијално охрабрујући, нови терапијски приступ. Показано је да ови лекови побољшавају метаболизам глукозе, смањују количину масног ткива, смањују оксидативни стрес и штите кардиоваскуларни систем. Ови подаци су нас навели да истражимо ефекте примене емпаглифлозина (ЕМРА) у PCOS моделу код пацова и упоредимо их са ефектима метформина. Потврдили смо да ЕМРА делује позитивно на соматометријске параметре, метаболизам глукозе и липида, ниво полних хормона, смањује оксидациони стрес, побољшава оваријалну функцију и морфологију, као и морфологију утеруса. Примена ЕМРА у дозама од 5 mg/kg, 15 mg/kg и 45 mg/kg током 4 недеље третмана побољшава метаболички и репродуктивни статус у PCOS моделу пацова изазваног применом естрадиол-валератоа и режима исхране богате мастима. Најбољи ефекти су остварени у групама које су добијале средњу и највећу примењену дозу ЕМРА, што је било упоредиво са ефектима метформина. Ови резултати могу навести на даља клиничка истраживања примене ЕМРА код пацијенткиња са PCOS.

Кључне речи: Синдром полицистичних јајника, метформин, емпаглифлозин, пацов, инхибитори котранспорта натријума и глукозе типа 2, метаболички синдром, репродукција

## Summary

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a common multifactorial endocrinopathy in women of reproductive age, associated with infertility and metabolic disorders. Recently, much research has focused on the etiopathogenesis of this disorder and the modulation of therapeutic approaches. There are still many controversies in the choice of therapy, and metformin is one of the most commonly used agents in PCOS therapy. Considering the link between metabolic disorders and PCOS, glycemic status is crucial in these patients, and sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitors (SGLT2Is) represent a potentially promising new therapeutic approach. These drugs have been shown to improve glucose metabolism, reduce adipose tissue, decrease oxidative stress, and protect the cardiovascular system. These data prompted us to investigate the effects of empagliflozin (EMPA) in a PCOS rat model and compare them with the effects of metformin. We confirmed that EMPA positively affects somatometric parameters, glucose and lipid metabolism, levels of sex hormones, reduces oxidative stress, improves ovarian function and morphology, as well as uterine morphology. Administration of EMPA at doses of 5 mg/kg, 15 mg/kg, and 45 mg/kg during 4-week treatment improved metabolic and reproductive status in a PCOS rat model induced by estradiol valerate and a high-fat diet. The best effects were achieved in groups receiving the middle and highest applied doses of EMPA, which was comparable to the effects of metformin. These results may prompt further clinical research on the use of EMPA in patients with PCOS.

**Keywords:** Polycystic Ovary Syndrome, metformin, empagliflozin, rats, sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitors, metabolic syndrome, reproduction



## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. ДЕФИНИЦИЈА И ЕВОЛУЦИЈА КОНЦЕПТА СИНДРОМА ПОЛИЦИСТИЧНИХ ЈАЈНИКА</b> .....	2
<b>1.2. КРИТЕРИЈУМИ ПОСТАВЉАЊА ДИЈАГНОЗЕ PCOS</b> .....	3
<b>1.3. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА PCOS</b> .....	4
<b>1.4. ИСТРАЖИВАЊЕ УЗРОКА НАСТАНКА PCOS</b> .....	4
1.4.1. Утицај генетских и епигенетских фактора за настанак PCOS .....	4
1.4.2. Исхрана, животне навике, фактори спољашње средине и pcos .....	5
<b>1.5. ПАТОФИЗИОЛОШКА РАЗМАТРАЊА У НАСТАНКУ PCOS</b> .....	6
1.5.1. Секреција гонадотропинских хормона и ановулација .....	6
1.5.2. Инсулинска резистенција и pcos .....	8
1.5.3. Гојазност и дислипидемија код pcos .....	9
1.5.4. Улога и импликације антимилеровог хормона у pcos .....	9
1.5.5. Полицистична морфологија јајника .....	10
1.5.6. Неправилност менструационог циклуса и pcos.....	10
1.5.7. Механизми инфламације и поремећаја редокс равнотеже у основи pcos.....	11
<b>1.6. ФЕНОТИПСКА ЕКСПРЕСИЈА PCOS</b> .....	12
<b>1.7. КОМПЛИКАЦИЈЕ ПОВЕЗАНЕ СА PCOS</b> .....	12
<b>1.8. СТРАТЕГИЈЕ У ЛЕЧЕЊУ PCOS</b> .....	13
1.8.1. Хигијенско-дијететски режим.....	14
1.8.2. Медикаментозно лечење.....	14
1.8.2.1. <i>Метформин</i> .....	14
1.8.2.2. <i>Тиазолидиндион (tzd) и агониста пароксизом пролифератор активаторског рецептора <math>\gamma</math> (prar <math>\gamma</math>)</i> .....	15
1.8.3.3. <i>Аналози глукагон сличног пептида-1 (glp- 1)</i> .....	15
1.8.3.4. <i>Суплементација у PCOS</i> .....	16
1.8.3.5. <i>Натријум глукозни контранспортер 2 инхибитори (sglt-2i)</i> .....	16
<b>1.9. РАЗМАТРАЊА РАЗВОЈА АНИМАЛНИХ МОДЕЛА У ИСТРАЖИВАЊУ PCOS</b> .....	17
<b>2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	<b>19</b>
<b>ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ</b> .....	20
<b>ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ</b> .....	20
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>21</b>

<b>3.1. ЕТИЧКИ ПРИНЦИПИ КОЈИ СУ СЕ ПОШТОВАЛИ У ЕКСПЕРИМЕНТИМА</b> .....	22
<b>3.2. ДОБАВЉАЊЕ ЖИВОТИЊА И УСЛОВИ У КОЈИМА СУ ЖИВОТИЊЕ БОРАВИЛЕ ТОКОМ ЕКСПЕРИМЕНАТА</b> .....	22
<b>3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ГРУПЕ</b> .....	22
<b>3.4. ТРЕТМАН ЗА ИЗАЗИВАЊЕ PCOS КОД ЖИВОТИЊА</b> .....	23
<b>3.5. ТРЕТМАН ЕМПАГЛИФЛОЗИНОМ И МЕТФОРМИНОМ НАКОН ИНДУКЦИЈЕ PCOS</b> .....	23
<b>3.6. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ</b> .....	24
3.6.1. Соматометријски параметри .....	24
3.6.2. Одређивање фазе еструсног циклуса цитолошком анализом вагиналног лавата .....	24
3.6.3. Биохемијски параметри .....	25
3.6.3.1. Прикупљање узорка крви за биохемијске анализе .....	25
3.6.3.2. Липидни статус.....	25
3.6.3.3. Хормонски статус.....	25
3.6.3.3. Одређивање биомаркера оксидационог стреса из крви.....	26
3.6.3.4. Хомогенизација ткива јајника и одређивање параметара оксидативног стреса из хомогената ткива јајника .....	28
3.6.4. Хистолошка анализа органа .....	28
3.6.5. Ехосохографска визуализација јајника .....	29
3.6.6. Орални тест оптерећења глукозом (ОГТТ).....	29
3.6.7. Детерминисање вредности артеријског крвног притиска и срчане фреквенције.....	29
<b>3.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА</b> .....	29
<b>1.8. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА</b> .....	30
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1. ПОТВРДА УСПЕШНОСТИ ИНДУКЦИЈЕ МОДЕЛА PCOS КОД ПАЦОВА</b> .....	32
4.1.1. Соматометријски параметри код пацова након индукције PCOS .....	32
4.1.1.1. Телесна маса пацова .....	32
4.1.1.2. Тежина јајника пацова код којих је индукован PCOS.....	33
4.1.1.3. Индекс масе јајника пацова код којих је индукован PCOS.....	34
4.1.2. Утицај индукције PCOS код женки пацова на еструсни циклус .....	35
4.1.2.2. Испитивање карактеристика фаза циклуса код пацова након индукције PCOS.....	36
4.1.3. Хормонски статус пацова након изазваног PCOS.....	37

4.1.3.1. Ниво тестостерона у серуму.....	37
4.1.3.2 Ниво естрадиола у серуму.....	38
4.1.3.3. Ниво прогестерона у серуму.....	39
4.1.4. Ултразвучни преглед јајника пацова након индукције PCOS .....	40
4.1.4.1. Лонгитудинални пресек јајника .....	40
4.1.4.2. Трансверзални дијаметар јајника .....	41
4.1.4.3. Антеро-постериорни дијаметар јајника .....	42
4.1.4.4. Запремина јајника пацова .....	43
4.1.5. Ниво глукозе у крви пацова након изазваног PCOS .....	44
4.1.6. Параметри оксидационог стреса код пацова након изазваног PCOS.....	45
4.1.7. Хистологија јајника пацова након индукованог PCOS .....	46
4.1.7.2. Број цистичних фоликула јајника пацова након изазваног PCOS .....	47
4.1.7.3. Број жутих тела јајника пацова након индукције PCOS.....	48
<b>4.2. ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА НА</b>	
<b>КАРАКТЕРИСТИКЕ PCOS КОД ПАЦОВА И ПОРЕЂЕЊЕ СА ПРИМЕНОМ</b>	
<b>МЕТФОРМИНА.....</b>	<b>49</b>
4.2.1. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина у поређењу са применом метформина на морфометријске параметре .....	49
4.2.1.1. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина у поређењу са применом метформина на телесну масу.....	49
4.2.2. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина у поређењу са применом метформина на телесну масу након 8 недеља третмана .....	50
4.2.3. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина у поређењу са применом метформина на финалну телесну масу .....	51
4.2.4. Промена телесне масе пацова током трајања протокола .....	52
4.2.2. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина и метформина на еструсни циклус .....	53
4.2.3. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на крвни притисак .....	55
4.2.3.1. Вредности систолног притиска .....	55
4.2.3.2 Вредности дијастолног притиска.....	56
4.2.3.4. Срчана фреквенција.....	57
4.2.3.5. Пулсни притисак.....	58
4.2.3.6. Средњи артеријски притисак .....	59
4.2.4. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на ехосонографске параметре јајника.....	60
4.2.4.1. Лонгитудинални дијаметар јајника .....	60

4.2.4.2. Антериопостериорни дијаметар јајника .....	61
4.2.4.3. Трансверзални дијаметар јајника .....	62
4.2.4.4. Запремина јајника .....	63
4.2.5. Испитивања утицаја примене третмана емпаглифлозина и примене метформина на регулацију гликемије .....	64
4.6.1. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на липидни статус .....	65
4.6.1.1. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво холестерола у серуму .....	65
4.6.1.2. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво триглицерида у серуму .....	66
4.6.1.3. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво липопротеина велике густине у серуму (HDL) .....	67
4.6.1.4. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво липопротеина мале густине у серуму (LDL) .....	68
4.6.2. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на хормонски статус пацова .....	69
4.6.2.1 Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво естрадиола у серуму .....	69
4.6.2.2 Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво прогестерона у серуму .....	70
4.6.2.3. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво тестостерона у серуму .....	71
4.6.2.4. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво инсулина у серуму .....	72
4.6.2.5. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво LH у серуму .....	73
4.6.2.6. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво FSH у серуму .....	74
4.2.6.3. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на оксидациони стрес из крви .....	75
4.2.6.4. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на оксидациони стрес у ткиву јајника .....	82
4.2.7.2. Испитивање утицаја емпаглифлозина и метформина на хистолошке промене у ткиву утеруса .....	88
4.2.7.4. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина и метформина на хистолошке промене у ткиву јајника .....	92

## **5. ДИСКУСИЈА .....96**

### **5.1. ПРИМЕНА КОМБИНОВАНОГ ПРОТОКОЛА (ЕСТРАДИОЛ-ВАЛЕРАТ И РЕЖИМ ИСХРАНЕ БОГАТЕ МАСТИМА) НА ИНДУКЦИЈУ PCOS ..... 98**

<b>5.2. ПРИМЕНА РАЗЛИЧИТИХ ДОЗА ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И МЕТФОРМИНА ДОВОДИ ДО ПОБОЉШАЊА РЕПРОДУКТИВНИХ И МЕТАБОЛИЧКИХ КАРАКТЕРИСТИКА РСОS</b> .....	102
5.2.1. Ефекти примењених третмана на регулацију телесне масе .....	102
5.2.2. Ефекти примењених третмана на регулацију масе и запремине оваријума и утеруса .....	103
5.2.3. Ефекти примењених третмана на хормонски статус .....	103
5.2.4. Ефекти примењених третмана на регулацију крвног притиска.....	104
5.2.5. Ефекти примењених третмана на регулацију гликемије .....	106
5.2.6. Ефекти примењених третмана на регулацију липидног статуса и морфологије адипоцита .....	107
5.2.7. Ефекти примењених третмана на морфологију јајника .....	109
5.2.8. Ефекти примењених третмана на морфологију утеруса .....	111
5.2.9. Ефекти примењених третмана на редокс равнотежу у крви у ткиву јајника .....	112
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	<b>114</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>116</b>

# **1. УВОД**

## 1.1. ДЕФИНИЦИЈА И ЕВОЛУЦИЈА КОНЦЕПТА СИНДРОМА ПОЛИЦИСТИЧНИХ ЈАЈНИКА

Синдром полицистичних јајника (*Polycystic ovary syndrome- PCOS*) је најчешћи ендокринолошки поремећај жена репродуктивног периода са преваленцом од 6-20% у зависности од примењених дијагностичких параметара, често је повезан са инфертелитетом, абдоминалном гојазношћу, инсулинском резистенцијом и другим метаболичким поремећајима као и са повећаним ризиком за развој кардиоваскуларних обољења. Ово хетерогено обољење се манифестује бројним симптомима, доминантно поремећеном репродуктивном функцијом, али су присутни и метаболички, кардиоваскуларни и имунолошки поремећаји. Управо због хетерогености манифестација којим се испољава овај поремећај пацијенти са PCOS посећују лекаре различитих специјалисти - педијатре, гинекологе, ендокринологе, дерматологе, и друге. На PCOS може указати повишено стварање андрогена и поремећена функција оваријума када је искључено присуство других поремећаја који дају ову симптоматологију попут конгениталне адреналне хиперплазије, андроген секреторних тумора, Кушинговог синдрома, и употребе андрогена. Иако је етиологија и даље неразјашњена у потпуности, PCOS се сматра комплексним полигенетским и мултифакторијалним поремећајем, са јаким епигенетским утицајем.

У литератури се *Stein* и *Leventhal* сматрају откриватељима овог синдрома. Давне 1935. Године, они су приказали групу од 7 жена са заједничким тегобама које обухватају: поремећај менструационог циклуса, хирзутизам и увећане јајнике са присуством бројних малих фоликула (1). Ови аутори су први описали повезаност олигоменореје и повећања волумена јајника, и у таквим случајевима су саветовали спровођење клинасте ресекције јајника (2). Након ове хирушке процедуре долазило је до регулације менструалног циклуса, а чак код неких жена убрзо је долазило и до концепције. Иако се сматра да су *Stein* и *Leventhal* први описали овај синдром, студент медицине *Vallisneri* је 1721. године први регистровао случајеве удатих, инфертилних жена са јајницима сјајне, беле површине величине голубијег јајета (3). Потом су *Chereau* и *Rokitansky* описали фиброзно склеротичне лезије на јајницима и хидропс фоликула (4). *Bulius* и *Kretschmar* су први описали хипертекозу, давне 1897. године (5). *Lawson Tait* је 1879. године представио билатералну офоректомију као терапијски поступак код жена код којих је била присутна цистична дегенерација фоликула јајника (6). Обзиром да је тада било заговорника овакве, претерано радикалне методе, *John A. McGlenn* је 1915. године предложио пункцију оних цисти које су штрчале по површини, као прихварљивију методу лечења од претходно описане оваријане ресекције или офоректомије. Током почетка прошлог века PCOS је постао загонетни репродуктивни поремећај који је често бивао подвргнут хирушком третману. Седамдесетих година прошлог века дошло је до открића повезаности инсулинске резистенције, акантозе и хиперандрогенизма (7) са PCOS. Након тог открића, почели су се примењивати лекови који смањују осетљивост на инсулин, комбиновани орални хормонски контрацептиви као и антиандрогени попут спиронолактона у терапији PCOS.

## 1.2. КРИТЕРИЈУМИ ПОСТАВЉАЊА ДИЈАГНОЗЕ PCOS

Раних деведесетих година прошлог века *National Institute of Health* (НИН) одржао је конференцију на тему PCOS, где су представљени следећи дијагностички критеријуми за PCOS: хиперандрогенизам, олиго-ановулација и идиопатски инфертилитет. Ови критеријуми су убудуће бивали нашироко примењивани. Тринаест година касније у Ротердаму 2003. године, постављање дијагнозе допуњено је још једним критеријумом, те се према овој конференцији дијагноза постављала на основу присуства две од три присутне карактеристике: олиго/аменореја, клинички или биохемијски хиперандрогенизам, и ултразвучно визуализоване цисте на јајницима. На другој стручној конференцији у Ротердаму је одлучено да у циљу постављања дијагнозе је потребно присуство три параметара: (I) олиго/аменореја, (II) хиперандрогенизам (клинички или биохемијски) и (III) ултразвучно потврђено присуство полицистичне морфологије јајника (фенотип PCOS јајника, O-PCOS описак као волумен јајника већи од  $10 \text{ mL}^3$  и/или више од 12 фоликула величине од 2 до 9 mm пристуни барем на једном јајнику.) Приказана су два фенотипа PCOS: (I фенотип) жене које имају овулаторне менструалне циклусе и хиперандрогенизам (II фенотип), жене које имају олигоовулаторне или ановулаторне менструалне циклусе без присуства повећане секреције андрогена, а са ултразвучно потврђеном полицистичном морфологијом јајника. Трећу конференцију је 2006. године организовао *Androgen Excess and PCOS Society* (АЕ-PCOS), и тада је установљено да се дијагноза може поставити услед присуства: (I) хиперандрогенизма (хирзутизам или хиперандеогенемиде), (II) поремећене функције јајника (олигоовулације и морфолошки измењених јајника) и (III) одсуство других поремећаја који доводе до појачане продукције андрогена (8). Такође, АЕ-PCOS је дало препоруку да критеријум морфолошке карактеристике полицистичних јајника треба да буде присуство 12 фоликула величине од 2 до 9 mm (9).

Данас је у циљу постављања дијагнозе PCOS најчешће коришћен Ротердамски концензус постављен 2004. године, који примењују све релевантне установе. Ипак, недостаци овакве класификације дефинитивно постоје. Често је отежано праћење да ли су циклуси овулаторни, поготово код адолесценткиња када углавном није могуће вршити ултразвучни преглед трансвагиналном сондом. PCOS се може јавити код жена које су гојазне, али и код оних које су мршаве. Потом, полицистична морфологија јајника може бити присутна постојања овог синдрома, али није обавезна. Секреција андрогена може бити претерана, али и адекватна, са или без поремећене функције јајника. Инсулинска резистенција, иако често коегзистира са PCOS не сматра се дијагностичким критеријумом (10).

Управо због хетерогености клиничке слике PCOS код пацијената, и укључености специјалиста из различитих области медицине у трагање за правом дијагнозом, овај поремећај често бива недијагностикован или је његову дијагнозу потребан дужи временски период (11). Обзиром да се симптоми и знаци мењају током времена и да су различити, овај синдром се сматра комплексним, а сама срж проблема и даље је недовољно позната и неразјашњена.



### 1.3. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА PCOS

Подаци у литератури о заступљености PCOS у општој популацији се разликују у зависности од примењених дијагностичких критеријума, али и услед смерница за утврђивање олигоаменореје, клиничког и биохемијског хиперандрогенизма. Неколико је студија потврдило варијабилне епидемиолошке податке у вези PCOS, у зависности од примњених критеријума. Сматра се да је преваленца PCOS 2 до 3 пута већа ако се користе Ротердамски критеријуми у поређењу са преваленцом коа је израчуната када се користе NIH/NICHD критеријуми (12). Поред тога, подаци у литератури су различити и због различите методологије и дизајна спроведених студија (13). Светска здравствена организација је изнела податак да чак 70% жена које болују од PCOS нису дијагностиковане правовремено. Услед непостојања глобално стандардизованих протокола за PCOS постоје варијације у заступљености хиперандрогенизма, пормећаја менструалног циклуса, хирзутизма.

Системским прегледом литературе и мета анализом једна студија ја је представила да је заступљеност карактеристика у оквиру овог поремећаја следећа: 56,6% ановулаторни хиперандрогенизам, 15,5% овулаторни хиперандрогенизам, 13% хирзутизам (утврђено модификованом Фериман Галвејевом скалом), 28% полицистична морфологија јајника (8).

### 1.4. ИСТРАЖИВАЊЕ УЗРОКА НАСТАНКА PCOS

Много година је прошло од сазнања за овај поремећај, али етиологија и даље остаје загонетна. Многи научници покушавају да утврде јасан механизам настанка овог комплексног синдрома. Тренутно се PCOS сматра поремећајем чија је подлога полигенетска и мултифакторијална (8).

#### 1.4.1. Утицај генетских и епигенетских фактора за настанак PCOS

Неки аутори наводе да је начин наслеђивања PCOS аутозомно доминанан (14). Студије на монозиготним и дизиготним гемелима су потврдиле да је појава PCOS већа код монозиготних близанаца који имају већи степен генетске сличности (15). Након вршења бројних студија показано је да је исти ген (CYP17 који кодира 17  $\alpha$  хидроксилазу) одговоран за наслеђивање полицистично измењене морфологије јајника и губитка косматости код мушкараца (14, 16). У поређењу са општом мушком популацијом, мушкарци који су у првом колену сродства са женама оболелим од PCOS имају повишене вредности дихидроепианостерон-сулфата (DHEAS), у ранијем животном добу почињу губити косматост и подложни су настанку инсулинске резистенције.

Идентификација гена који леже у основи овог поремећаја је предмет бројних генетских истраживања јер би на тај начин било омогућено лакше постављање дијагнозе и побољшан терапијски приступ. Досадашње студије су показале да није у питању један ген који покреће овај патофизиолошки механизам, већ се сматра да је основа PCOS полигенетског порекла. Гени који су укључени у процес синтезе стероидних хормона у

јајницима и у надбубрежним жлездама, затим гени који детерминишу дејство хормона стероидне структуре, гени који учествују у дејству инсулина, потом гени који регулишу енергетску хомеостазу и настанак хроничне инфламације ниског степена су потенцијално одговорни за манифестације које са собом носи PCOS. Неки аутори сматрају да су гени који учествују у патогенези бројни и због чињенице да бројни фактори који доводе до настанка ановулације могу да доведу до настанка PCOS (17). Техникама анализе генома примењеним у студији проведеној у Кини иницијално је утврђено 11 гена (GDF8, LHCGR, THADA, DENND1A, YAP1, HMGA2, TOX3, SUMO1P1, ERBB4, INSRKRR1 и SERPINE1) који су фактори ризика за настанак PCOS, а потом су у наредним анализама открити и други гени (18). Данас се сматра да је 16 гена укључено у фенотипско испољавање овог поремећаја (19).

Епигенетика представља спектар модификација насталих променама секвенци дезоксирибонуклеинске киселине (DNK). Тако измењен DNK се даље може пренети на ћерке ћелије након митотске деобе. Промене које настају овим путем могу бити повратне, али и неповратне. Када даљом деобом ћерке ћелија долази до губитка генетског материјала или до његове измене, долази до појаве великих варијација како у пределу ране ембриогенезе тако и у каснијем адултном испољавању фенотипа. Метилација DNK и информационе рибонуклеинске киселине (RNK) је повишена у крви, серуму, масном ткиву, гранулоза и тека ћелијама јајника жена које имају PCOS (20). Истраживања повезаности метилације DNK и PCOS су новијег датума али неки аутори сматрају да можда ти дефекти у метилацији DNK доводе до поремећене регулације гена који су укључени у настанку упале, у синтезу хормона и сигнализацију и метаболизам глукозе и липида (21).

#### 1.4.2. Исхрана, животне навике, фактори спољашње средине и pcos

Поред генетских фактора, и фактори околине могу бити укључени у настанак овог поремећаја. Физика неактивност и лоше навике у исхрани имају битну улогу у прогресији PCOS. Инсулинска резистенција, иако није дијагностички критеријум представља спону између метаболичких и репродуктивних поремећаја. Исхрана богата угљеним хидратима може бити окидач за настанак PCOS (22), и може га довести у везу са метаболичким и патофизиолошким променама дијабетес мелитуса тип 2 (DM2). Иако гојазност и године старости повећавају ризик за настанак и PCOS и DM2, DM2 може настати и код младих, мршавих жена које болују од PCOS. Када говоримо о факторима спољашње средине који могу довести до настанка PCOS, круцијално је и да узмемо у обзир време када и како експозиција тим факторима у различитом животном периоду врши утицај. Интраутерина експозиција вишку андрогена и глукокортикоида током периода критичних за фетални развој, касније у току живота могу довести до развоја PCOS симптоматологије услед феталног репрограмирања (23). Ниска телесна маса на рођењу може бити у корелацији са каснијим настанком PCOS (23). Познато је да токсини из окружења и загађивачи имају негативан утицај на биолошке организме. Ови загађивачи могу се инхалирати, апсорбовати путем коже и мукозе или ингестирати, и негативно утицати на хумани репродуктивни систем (24). Загађивачи попут дима цигарета, пестицида, живе штетно утичу на општу популацију и оштећују ендокрини систем (25). Две недавно објављене студије су објасниле повезаност ових материја и PCOS (26, 27). Закључак тих студија је да су високи серумски нивои перифлуоринисаних једињења, бисфенола, пестицида, полицикличних ароматизованих хидрокарболних једињења могу бити одговорни за развој PCOS.

## 1.5. ПАТОФИЗИОЛОШКА РАЗМАТРАЊА У НАСТАНКУ PCOS

Обзиром да је PCOS широко заступљен поремећај деценијама се улаже напосао да се његови патофизиолошки механизми у потпуности открију и објасне али и поред бројних студија и развоја анималних експерименталних модела срж PCOS поремећаја и даље је недовољно расветљена.

### 1.5.1. Секреција гонадотропинских хормона и ановулација

Репродуктивне абнормалности настају услед неадекватне гонадотропинске стимулације, хиперандрогенизма, хроничне ановулације и полицистичне морфологије јајника. Поремећај у секрецији гонадотропина доприноси настанку ановулације PCOS. Постоји промена у пулсативности лучења лутеинизирајућег хормона (LH) у поређењу са секрецијом фоликулостимулирајућег хормона (FSH). Још увек је предмет разматрања да ли је поремећена функција хипоталамуса примарни узрок PCOS, или он настаје као последица поремећаја повратне спреге између гонадотропинских и полних, стероидних хормона.

Поремећена динамика у секрецији гонадотропина се јавља код већине жена чији јајници имају полицистичну морфологију а немају адекватну функцију, односно код пацијенткиња код којих не долази до овулације (28, 29, 30). Најчешћи поремећај је промењена средња вредност LH, услед повећања и фреквенце и амплитуде његовог излучивања (31, 32). Серумске концентрације FSH код пацијенткиња са PCOS су углавном нормалне или снижене.

Вредност LH је повишена у скоро 50% жена са PCOS, а однос LH и FSH је у 60% пацијенткиња 2:1, или већи. Поремећен однос LH/FSH није дијагностички критеријум јер ниво гонадотропина може варирати и код жена које немају PCOS. Периферном ароматизацијом андрогена настаје естроген који заједно са инхибином Б, синтетисаном у малим фоликулима јајника прави негативну повратну спрегу, повећава пулсативност гонадотропно ослобађајућег хормона (GnRH) и снижава секрецију FSH. Arroyo је показао да је LH одговор услед акутног повећања GnRH израженији код жена са PCOS које су мршаве јер је амплитуда пулсатилности LH, као и његова концентрација у серуму нижа код гојазних него код негојазних жена (33). Поремећај у пулсатилности секреције GnRH и смањење секреције допамина доводе до ановулације услед чега не долази ни до настанка жутог тела које би продуковало прогестерон. Егзактан механизам настанка ановулације није познат али се претпоставља да настаје услед претходно описане поремећене секреције GnRH и неадекватне секреције гонадотропина. Претпоставља се да је и инсулинска резистенција један од фактора настанка ановулације, обзиром да услед лечења метформином долази до успостављања овулаторних циклуса (34). Хронична елевација естрогена оннемогућава повећање секреције FSH, зауставља развој фоликула, који сами не производе довољно естрадиола неопходног за успостављање позитивне повратне спреге и повећаног ослобађања LH. У овулаторном менструационом циклусу пад нивоа естрогена се дешава у касној лутеалној фази, када услед неоплодне дође до регресије жутог тела, што доводи до повећања секреције FSH неопходног за развој нових фоликула у предстојећем менструационом циклусу. Међутим, стална високо концентрација естрогена, услед његове периферне продукције, оннемогућава успостављање негативне повратне спреге и повећање секреције FSH, спречавајући развој фоликула и доводећи

до хроничне ановулације. Преантрални, мали фоликули, услед недвољне стимулације FSH појачано синтетишу андрогене и доводе до настанка хиперандрогенизма. Ови фоликули инхибишу нормалну фреквенцу и амплитуду ослобађања LH, те не настаје доминантан фоликул, који би последично и овулирао.

Хиперандрогенизам је кључан патофизиолошки поремећај у PCOS. Хиперандрогенизам настаје услед појачања секреције андрогена у тека ћелијама, у надбубрежним жлездама али и процесом екстрагландуларне ароматизације у масном ткиву услед конверзије естрогена у андрогене дејством ензима ароматазе. (35) Клинички се манифестује хирзутизмом, акнама или андрогеном алопецијом. Хиперандрогенизам се разликује од вишка андрогена насталог као последица тумора јајника и надбубрежних жлезди који ослобађа андрогене. Тумори који ослобађају андрогене доводе до вирилизације која се манифестује повећањем мишићне масе, измењеним продубљеним гласом, повећаним клиторисом а то су знаци нетипични за PCOS. Остаје ствар разматрања да ли је примарно место поремећаја јајник, хипоталамус или хипофиза. Измењен је механизам повратне спреге и функција хипоталамо-хипофизно-оваријалне осовине (ННО) о чему је вече било речи у ранијем тексту. Узимајући у обзир да јајници могу одреаговати на стимулацију кломифен цитратом, да примена метформина може регулисати менструални циклус, да редукција телесне масе може довести до регулације нивоа естрогена и инсулина, можемо извести закључак да јајници ипак не представљају примарни поремећај у каскади измењених физиолошких механизма код PCOS пацијенткиња.

Хиперандрогенизам се најчешће манифестује када су повшене серумске вредности слободног тестостерона (Т), који је као независан активан, и испољава биолошка дејства. Слободни Т утиче и на синтезу и ослобађање глобулина који везује полне хормоне (engl. *Sex hormone-binding globulin- SHBG*), што доводи до смањења серумских вредности SHBG код PCOS пацијенткиња. Поред Т, могу бити повишене и вредности андростенедиона, дихидроепиандростерона, дихидроепиандростерон сулфата (DHEAS), 17 хидроксипрогестерона и естрогена. Обзиром да се Т конвертује у дехидротестостерон који има јачи ефекат, укупна серумска концентрација Т не мора еквивалентно и представљати андрогену биоактивност у ткивима. Мерење слободног Т нема клиничког значаја, и обично није неопходно онда када су присутни клинички знаци хиперандрогенизма као што су вирилизација и хирзутизам (36). The *AEPCOS Society* наводи да повишени серумски ниво DHEAS је довољан доказ хиперандрогенизма и довољан услов за постављање дијагнозе PCOS, иако се не сврстава у Ротердамски критеријум.

Као што је већ наведено, примарно место продукције андрогена у јајнику су ендocrine ћелије - тека ћелије. Услед измењене амплитуде и фреквенце секреције LH, условљено повећањем пулсативности секреције GnRH, LH подстиче повећање волумена тека ћелија које онда појачано синтетишу Т. Гранулоза ћелије јајника су сензитивне на FSH, инсулину сличан фактор раста I и естроген (37). Услед релативног недостатка секреције FSH нарушава се матурација фоликула, а гранулоза ћелије јајника не могу да комплетно ароматизују Т, претходно синтетисан у тека ћелијама јајника, те се укупна продукција Т повећава (38). Повишена секреција Т делује на хипоталамус и хипофизу и инхибира прогестероном и естрогеном индуковану негативну повратну спрегу секреције GnRH, те је фреквенца и пулсатилности GnRh повишена. Андрогени, синтетисани у тека ћелијама се даље конвертују у потентније 5 алфа редуковане андрогене који се не ароматизују у естрогене те настали хиперандрогени миље спречава умножавање LH рецептора на гранулоза ћелијама, који је неопходан за даљи

раст фоликула. Раст фоликула је компромитован и фоликули остају мали (промера од 2-10 mm), окружени хипертекозом до које је довела појачана секреција LH. Атретични, мали фоликули шире оваријалну строму и повећавају волумен јајника и као резултат се јавља карактеристична полицистична морфологија јајника. Такви фоликули настављају да продукују андрогене и доводе до ановулације. Повећан број антралних фоликула даљу секрецију врши независно од секреције гонадотропина (39). Такво аутоstimулаторно излучивање хормона је главно обележје овог синдрома.

### 1.5.2. Инсулинска резистенција и PCOS

Инсулинска резистенција је стање поремећеног метаболизма угљених хидрата, када инсулин делује мање ефикасно на масти, мишиће и јетру, а услед смањене ефикасности компензаторно се постпрандијално лучење инсулина повећава те настаје хиперинсулинемија (40). У адипоцитима инсулинска резистенција повећава хидролизу депонованих триглицерида и повећава ниво циркулишућих масних киселина активацијом P450c17, која потенцира активност 17.20 лиазе (41). Повећана активност овог ензима поспешује синтезу Т из прегнанолона. Резистенција ткива на инсулин је огран-селективна и није испољена у свим органима једнако. У скелетним мишићима, јетри и масном ткиву јавља се смањена сензитивност на инсулин, док у јајницима и надбубрежним жлездама сензитивност на инсулин остаје нормална (42). Услед смањене осетљивости јетре на инсулин, глуконеогенеза повећава ниво шећера у крви и, компензаторно, доводи до хиперинсулинемије. У мишићима и адипоцитима инсулинска резистенција настаје услед поремећаја у посрецепторском сигналном путу (43). Биохемијски маркер инсулинске резистенције је повећан ниво инсулина наште. Секреција инсулина након теста оптерећења глукозом (OGTT) објашњава инсулински одговор, сензитивност ткива и динамичност секрције. Код особа које имају нормалну метаболичку активност, након двочасовног OGTT са 75 грама глукозе унете рег ос пик инсулина се постиже 30 минута од ингестије глукозе и он представља пандан прве фазе отпуштања инсулина. Потом ниво инсулина опада у наредна 2 сата. Код пацијенткиња које имају PCOS ниво инсулина је повишен, и спорије долази до смањења његових вредности након оптерећења глукозом.

Значај инсулинске резистенције, хиперинсулинемије и дејства инсулина у патогенези PCOS први пут је представљен 1980. године када је показана корелација између базалних вредности инсулина, андростенедиона, тестостерона и инсулина након теста оптерећења глукозом (44). Инсулинска резистенција је карактеристика која се јавља у склопу бројних стања и болести као што су DM2, гојазност, инфекција, трудноћа и PCOS. Она може настати услед присуства антитела на инсулински рецептор, мутације инсулинског рецептора и липодистрофија (45, 46). Инсулинска резистенција се јавља чешће код гојазних пацијенткиња, а преваленца је између 50% и 75% (47). До 35% пацијенткиња са PCOS има налаз OGTT изван референтних вредности, а 7-10% испуњава и дијагностичке критеријуме за DM2 (48). Значај инсулинске резистенције, хиперинсулинемије и дејства инсулина у патогенези PCOS показан је корелацијом између базалних вредности инсулина, андростенедиона и тестостерона након теста оптерећења глукозом (44).

Повишен ниво циркулишућег инсулина код пацијенткиња са PCOS инхибира продукцију SHBG из јетре и стимулише оваријалну андрогенезу. Инсулин се везује за своје рецепторе на тека ћелијама јајника, за интерстицијумске ћелије јајника као и за

хибридни рецептор insulin like growth factor - IGF1. Везивањем инсулина, активира се сигнални пут који делује независно од глукозног транспорта (49). Пuteви активације посредовани везивањем за инсулински рецептор су фосфатидил инозитол 3 киназни (PI-3K) пут активације, који је медијатор у метаболичком дејству инсулина, као и сигнални пут митоген активирани протеин киназе (MAPK). Везујући се за свој рецептор инсулин изазива конформационе промене које доводе до тирозин киназне пролиферације рецептора, протеинских супстрата и серијске активације PI-3K, као и сигналне трансдукције (50). Ова активације доводи до померања глукозних транспортера 4 (GLUT4) из интерцелуларних компартмана на ћелијску мембрану и на тај начин повећава улазак глукозе у ћелију.

Хиперинсулинемија пацијенткиња са PCOS доводи до смањења SHBG (49). Обзиром на смањену продукцију SHBG, мање андрогена постоји у везаним облику, док је више слободног, активног Т који се везује за рецептор циљних ткива. Због повишене концентрације слободног Т, многе пацијенткиње са PCOS имају клиничке симптоме хиперандрогенизма упркос нормалним вредностима укупног Т. Ниске вредности SHBG су повезане са ризиком од настанка DM2, а *Veltman Verhulst* је нашао корелацију између ниских вредности SHBG и повећаног ризика од развоја гестацијског дијабетеса пацијенткиња које болују од PCOS (51). Пацијенткиње које болују од DM2 и које су гојазне, имају 6 пута већу шансу да као коегзистирајући поремећај буде присутан и PCOS, у поређењу са здравом популацијом исте старости и телесне масе (52).

### 1.5.3. Гојазност и дислипидемија код pcos

Инсулинска резистенција је повезана са центрипеталном гојазношћу јер је висцерално масно ткиво метаболички активније од субкутаног сензитивније на липолизу и ослобађање масних киселина (53). Чак и негојазне пацијенткиње које болују од PCOS имају повишен ниво масти у организму, више интраабдоминалне перитонеалне и висцералне масти у поређењу са здравим женама истог индекса телесне масе (BMI). Инсулинска резистенција се погоршава са гојазношћу. Гојазност погоршава и хиперандрогенизам, снижавањем продукције SHBG и повећањем слободног Т што доводи до интензивирања хирзутизма, погоршавања функције јајника и појаве аcanthosis nigricans. Ирегуларност менструационог циклуса, дисфункционална крварења, хирзутизам и инфертилитет се чешће јављају код гојазних пацијенткиња са PCOS (54).

Дислипидемија представља метаболички поремећај кој се често јавља у оквиру PCOS, 70% ових пацијенткиња има поремећен липидни статус или пак горњу границу вредности липида. Повишене су вредности триглицерида, липопотеина велике густине (HDL) и липопротеина мале густине (LDL). Сматра се да су повишене вредности LDL генетски детерминисане или настају услед хиперандрогенизма. Дислипидемија се чешће јавља код гојазних жена услед веће количине адипоцита али се може јавити и код мршавих (55).

### 1.5.4. Улога и импликације антимицероног хормона у pcos

Антимилеров хормон (АМН), члан групе трансформишућег фактора раста бета (TGF- $\beta$ ), представља један од важних показатеља развоја PCOS (56). АМН се производи у гранулоза ћелијама преантралних фоликула величине до 4 mm. Студије су показале да је ниво АМН виши код пацијенткиња са PCOS због присуства бројних преантралних фоликула (56). Услед поремећене регулације функције гранулоза ћелија у оквиру PCOS, ниво АМН је и до седам пута већи, код како пацијенткиња које имају ановулаторне циклусе тако и код оних које имају овулаторне менструационе циклусе (56). Постоји повезаност хиперандрогенизма и високог нивоа АМН, али ова постојање ове корелације још увек није у потпуности разјашњено. АМН смањује број рецептора за FSH на фоликулима и снижава активност ароматазе, те спречава настанак доминантног фоликула. Према препорукама новог водича за приступ и терапију PCOS праћење нивоа АМН може бити дијагностички критеријум уместо ултразвучне анализе јајника (57). Такође се истиче да када је присутна ирегуларност менструационог циклуса заједно са знацима хиперандрогенизма, одређивање АМН није потребно, као ни ултразвучна дијагностика (57). Поред тога, препоруке су да ултразвук и одређивање нивоа АМН није потребно вршити код адолесцената због ниске специфичности (57).

#### 1.5.5. Полицистична морфологија јајника

Фундаменталне разлике између полицистичне морфологије јајника и нормалне морфологије јајника се јављају у фази раног развоја фоликула, указујући на интерстицијумски оваријални поремећај. Измењена морфологија јајника је карактеристика по ком овај синдром и носи назив, иако он може бити потврђен и без присутне патолошке морфологије јајника. Ултразвучни преглед се врши и ради искључивања тумора јајника који секретују андрогене код пацијенткиња које имају манифестну вирилизацију. Промене у морфолошким карактеристикама јајника код PCOS су прва детектована промена која је доведена у везу са ановилације у овом синдрому. Ендокрини миље у оваквим јајницима се карактерише као *steady state*, у ком гонадотропини и полни хормони веома мало варирају у току менструационог циклуса. Јајници су измењене величине, са хипердензном стромом између малих периферно постављених фоликула. Према Ротердамским критеријумима, потребно је да волумен јајника буде већи од 10 ml<sup>3</sup> и да буде присутно више од 12 фоликула величине између 2mm и 9 mm на бар једном јајнику. Овај критеријум се не може примењивати код пацијенткиња које користе оралну контрацептивну терапију (58). Оваква измењена морфологија јајника је честа појава код жена које имају хиперандрогенизам услед конгениталне адреналне хиперплазије, Кушинговог синдрома и узимања лекова који садрже андроген (59). Описано је и да трећина жена са оваквом оваријалном карактеристиком има уредан менструациони циклус. Током пубертета и у стању хиперпролактиније такође се могу полицистично измењени јајници (60). Пацијенткиње које имају полицистичну морфологију јајника могу имати нормалан ниво гонадотропина, стероидних хормона, као и регуларни овулаторни циклус (61).

#### 1.5.6. Неправилност менструационог циклуса и pcos

Пацијенткиње које болују од PCOS могу имати различит поремећај менструационог циклуса, од аменореје, олигоменореје до обилних крварења која

изазивају анемију (62). Поремећај у менструалном крварењу обично почиње од менархе. Будући да код већине адолесценткиња у прве 2-4 године од менархе хипоталамо-хипофизно-оваријумска осовина није зрела, са постављањем дијагнозе PCOS обично се чека до 18. године живота (63). Најчешћи поремећај менструационог циклуса који се јавља је аменореја или олигоменореја услед изостанка овулације. Обзиром да не долази до овулације, не долази ни до стварања жутог тела које продукује прогестерон, те изостаје менструално крварење нормалног интензитета и трајања. Хиперандрогенизам који се јавља код PCOS пацијенткиња може изазвати аменореју, спречити деловање естрогена на пролиферацију ендометријума и изазвати атрофични ендометријум. Крварење код пацијенткиња са PCOS може бити и обилно услед ановулацијеи последичног изостанка продукције прогестерона, ендометријум таквих пацијенткиња је изложен непотпуном дејству естрогена (64). Естроген континуирано изазива пролиферацију ендометријума, поспешује митотску активност и доводи до хиперплазије ендометријуама. Хиперплазија ендометријума представља преанцерозу и може довести до настанка карцинома енедометријума.

#### 1.5.7. Механизми инфламације и поремећаја редокс равнотеже у основи pcos

У основи PCOS, може се разматрати постојање инфламације ниског степена, која представља повећање параметара инфламације као што су проинфламаторни цитокини. Бројне студије су анализирале параметре крви код пацијенткиња које болују од PCOS доказавши присуство инфламације ниског степена (65, 66, 67). Оваква хронична инфламација се погоршава у присуству гојазности и хиперинсулинемије. Бројне студије су показале да глукоза може довести до активације моноцитно-макрофагног система. Хиперандрогенизам доводи до матурације адипоцита и настанка центрипеталне гојазности (68). Висцерално масно ткиво представља ендокрини орган и секретује адипокине који су повишени и код гојазних и код негојазних пацијенткиња које болују од PCOS, што је један од показатеља да су механизми укључени у поремећај PCOS сложени (69). Ендотелна дисфункција такође повећава продукцију проинфламаторних цитокина. Многи фактори укључени у плејаду оксидационог стреса и инфламације представљају маркере ризика за развој кардиоваскуларних обољења, и показују степен оштећења ендотела код пацијенткиња које болују од PCOS. Ти фактори су асиметрични диметиларгинин (ADMA), С реактивни протеин (CRP), хомоцистеин, инхибитор активатора плазминогена I (PAI I), васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF). Овакво стање хроничне инфламације код пацијенткиња које имају PCOS може бити узрок каснијих компликација у трудноћи, попут поремећаја плацентације, прееклампсије, али и спонтаних побачаја.

Оксидациони стрес (OS) представља прекомерну производњу слободних кисеоничних радикала (енгл. Reactive oxygen species- ROS). Прекомерна производња ROS узрокује поремећаја између оксидационог стреса и поремећаја хомеостазе између оксидационог и антиоксидационог одбрамбеног система и доводи до губитка способности организма да се избори од ROS и стварајући ћелијско оштећење. ROS су супероксид анјони ( $O_2^-$ ), хидроксилни радикали (OH), азот моноксид (NO) и водоник пероксид ( $H_2O_2$ ). Ћелијско оштећење које настаје дејством ROS је на нивоу маркомолекула, липида, протеина, нуклеинских киселина. Антиоксидативни системи могу бити ензимски и неензимски. Ензимски антиоксидациони систем чине супероксид димутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GSH-Px) и глутатион редуктаза (GR)



(70). Неензимски антиоксидантни систем лине витамин С, Витамин Е, глутатион, меланотонин, каротеноиди, цинк, бакар, селен и многи други. Бројне студије су показале повезаност оксидационог стреса и PCOS (70). Стања која често коегзистирају са PCOS попут центрипеталне гојазности, дислипидемије, инсулинске резистенције такође поспешују формирање кисеоничних врста и настанак оксидационог стреса (71). Постоје студије које указују на то да је OS повезан са неповољним исходима трудноће који се јављају код пацијенткиња са PCOS (72). Претходни прегледни радови су пажњу усмеравали на редокс неравнотежу, развој ооцита, повезаност хиперандрогенизма и OS, али постоје и новије студије које су истраживале и утицај OS на ендометријум. Истраживања су показала да су ендометријални рецептори код PCOS редуковани, и да у ендометријуму долази до OS (73). Инфламаторни медијатори изазивају оштећење ендометријалних рецептора, ремете децидуализацију ендометријума и имплантацију ембриона (70). Потом OS делује и на сигналне путеве који одржавају хомеостазу репродуктивног система попут MARK, FOXO, Keap1- Nrf2 I NF-κB (74). Доказ да OS чини саставни део патогенезе PCOS је и то да се услед примене суплемената у терапији PCOS, односно примене антиоксиданаса, испољава позитиван ефекат (75).

## 1.6. ФЕНОТИПСКА ЕКСПРЕСИЈА PCOS

Клиничка презентација PCOS је веома разносврсна, обзиром да је и сама ендокринопатија сложена, самим тим велики проценат пацијенткиња остаје недијагностикован и развија озбиљне компликације. Према Ротердамским критеријумима постоје 4 фенотипа који настају комбинаториком 3 клиничка облика. Фенотипови су:

- А: олигоовулација или ановулација, хиперандрогенизам, ултрасонорафски верификована полицистична морфологија јајника;
- В: олигоовулација или ановулација, хиперандрогенизам;
- С: хиперандрогенизам, ултрасонографски верификована полицистична морфологија јајника;
- D: олиго/ановулација , ултрасонографски верификована полицистична морфологија јајника.

Класични PCOS тип су фенотип А и В, који су и најтежа форма, и најчешће доводе до других метаболичких поремећаја. Фенотип С је овулаторни фенотип где постоји блажи облик дислипидемије који углавном може бити регулисан адекватном исхраном. Фенотип D је праћен повременим ирегуларностима у менструационом циклусу, али је метаболички и хормонски поремећај најблажи.

## 1.7. КОМПЛИКАЦИЈЕ ПОВЕЗАНЕ СА PCOS

Пацијенткиње које болују од PCOS чешће су инфертилне, а у случају концепције чешће наступа спонтани побачај, док је у трудноћи чешћа стопа појаве

пreekлампсије и гестацијског дијабетеса. Као последица хроничне ановулације и изложености неопонентном дејству естрогена може настати хиперплазија ендометријума, из које се може развити карцином ендометријума. Хиперандрогенизам, хиперинсулинемија, снижен ниво SHBG додатно повећавају ниво естрогена у циркулацији и повећавају ризик од настанка карцинома ендометријума (76).

Приближно 40% PCOS пацијенткиња развија хипертензију (77, 78). Постоји хипотеза да симпатикусни нервни систем има битну улогу у развоју хипертензије. Као потпора овој теорији излазе и чињеница да особе које имају полицистичну болест бубрега често имају и хипертензију и да њихова мишићна влакна имају повећану активност без обзира на функционалност бубрега (79). То сазнање поткрепљује хипотезу да повећана активност симпатикуса може постојати код PCOS и може довести до појачане активације адренорецептора и повећати крвни притисак (80).

Хиперандрогенизам који се јавља код PCOS пацијенткиња представља фактор ризика за настанак кардиоваскуларних болести (81). Гојазност може бити важан фактор у развоју хипертензије код PCOS пацијенткиња, као и повишен ниво андрогена. Хиперандрогенизам доводи до задебљања и калцификације интима и медија слоја у крвним судовима и задебљања интима медије каротидних артерија код младих PCOS пацијенткиње (82). PCOS пацијенткиње имају повишен ризик за настанак кардиоваскуларних догађаја. Код ових пацијенткиња често постоји ендотелна дисфункција и хронична инфламација која учествује у патогенези атеросклерозе (65). Жене које имају PCOS имају повећан ризик за настанак инфаркта миокарда чак и када су у млађем животном добу, и када нису гојазне (83, 84). Поремећен липидни статус (повишен ниво укупних триглицерида, LDL, VLDL), који је чест код PCOS пацијенткиња, фактор је ризика за настанак инфаркта миокарда (81). Аутор бројних публикација на ову тему, Осибогун, истиче значај PCOS за развој кардиоваскуларних догађаја, без обзира на вредности BMI, али истичући битност фенотипа PCOS у процењивању ризика настанка кардиоваскуларних болести (81).

Доказано је да код пацова, којима је индукован PCOS применом андрогена, долази до поремећене активности NO синтазе и натријум-калијум АТРазне пумпе у срцу пацова (85). Приликом испитивања изолованог срца пацова, притисци током срчаног циклуса у левој комори су били повишени након индукције PCOS модела. Дошло је до хипертрофије кардиомиоцита као и до укупног задебљања зида леве коморе (86). Овакве промене које су добијене услед андрогеном индукованог PCOS подстичу чињеницу да хормонски миље у коме је доминантан хиперандрогенизам представља један од водећих ризика за развој кардиоваскуларних догађаја.

## 1.8. СТРАТЕГИЈЕ У ЛЕЧЕЊУ PCOS

Иако је ова ендокринопатија откривена пре неколико деценија велики напредак у терапијском приступу није учињен. Велики труд је уложен у разоткривање што већег броја патофизиолошких механизма који учествују у развоју овог поремећаја, како би се направио дефинитивни протокол лечења. Ипак, јединствени, униформни механизам настанка PCOS који се може детектовати код свих пацијенткиња оболелих од PCOS се не зна, те се третирају манифестације и компликације ове ендокринопатије. Терапијски и куративни приступ требало би да регулише хиперандрогенизам, менструациони

циклус, да изврши индукцију овулације, регулише метаболичке поремећаје (попут хиперинсулинизма и дислипидемије), да спречи хиперплазију ендометријума и да снизи ВМІ код гојазног фенотипа PCOS. Иако кардиоваскуларни поремећаји не представљају дијагностички PCOS критеријум они су дефинитивно стање које је повезано са PCOS (87).

### 1.8.1. Хигијенско-дијететски режим

Почетни терапијски приступ је хигијенско дијететски режим, који омогућава регулацију телесне масе, увођењем физичке активности и адекватног режима исхране. Губитак телесне масе побољшава преддијабетесно стање, пролонгира настанак DM2, опструктивне апнеје у сну и неалхолне масне јетре. Студије су показале да дијететски режим треба да садржи висок ниво угљених хидрата и масти са рестрикцијом уноса калорија како би се смањила инсулинска резистенција и извршила прерасподела масти у организму (88, 89). Интернационални водич саветује 150 минута аеробног вежбања недељно (90). Хетерогеност овог поремећаја захтева индивидуални приступ и углавном уз измену режима исхране потребан је и медикаментозни третман.

### 1.8.2. Медикаментозно лечење

Медикаментозно лечење PCOS поремећаја се користи за регулацију менструационог циклуса, хирзутизма и постизање концепције. Инсулинска резистенција је једна од мета у лечењу овог поремећаја, и постоје бројне клиничке и експерименталне студије које презентују обећавајуће терапијске приступе лечења инсулинске резистенције.

#### 1.8.2.1. Метформин

Метформин је дуго представљан златним стандардом који се користи као монотерапија и који доводећи до губитка бар 5% телесне масе побољшава секрецију инсулина, смањује секрецију андрогена и побољшава стопу зачећа (91). Метформин је орални антидијабетик који припада групи бигванидина. Први пут је синтетисан 1920. године, али се није користио до 1957. године, када је клиничком студијом показан његов ефекат на DM2 (92). Молекулски механизам дејства метформина је блокирање продукције аденозинтрифосфата (АТФ) и повећање нивоа аденозинмонофосфата (АМФ), блокирањем респираторног ланца митохондрија, чиме ћелије увод у стање смањене енергије и смањене потребе за адаптацијом, вршењем фосфорилације АМФ. Истовремено повећава сензитивност на GLUT4 транспортере. Врши транслокацију GLUT1 и GLUT4 транспортера ћелијске мембране чији је крајњи ефекат побољшање функције ендогених инсулин сензитивних молекула, као што је адипонектин (93). Повишен АМФ независно од АМФ киназе блокира глуконеогенезу у јетри инхибицијом липогенезе, гликогенолизе и адипогенезе, повећава-јући сензитивности периферног ткива на инсулин (94). Метформин делује као антагониста глукагона. Метформин смањује гастроинтестиналну апсорпцију глукозе, снижава ниво слободног Т у крви и

побољшава метаболизам масти (95). Постоје тврдње да метформин директно делујући на јајнике смањује продукцију андрогена (96). Иако повољно делује на индукцију овулације није регистрован као монотерапија у ове схрхе (97). Чак и када пацијенткиња није на хигијенско-дијететском режиму, применом метформина долази до регулације телесне масе и, самим тим, веће стопе овулација (98). У циљу индукције овулације, обично се примењује у комбинацији са гонадотропинима, и на тај начин се скраћује и побољшава стимулација овулације. Постоје студије које су потврдиле да је коришћењем метформина стопа концепције већа, али је и стопа спонтаних побачаја такође већа. Применом кломифен цитрата заједно са метформином смањује се стопа спонтаних побачаја. У поређењу примене метформина са кломифен цитратом, у методи индукције овулације, не постоји статистички значајна разлика успешности постизања овулације, поређењу са монотерапијском применом кломифен цитрата. Постоји дилема да ли се метформин може користити као терапија код негојанзих пацијенткиња са PCOS (99). Употреба метформина може да буде отежавајућа услед гастроинтестиналних тегоба као што су мучнина, дијареја, повраћање, осећај нелагодности у стомаку и надутост (97). Његова примена у трудноћи у терапији гестацијског дијабетеса је дозвољена, али и даље је предмет дискусије и има доста заговорника обзиром на слабију регулацију нивоа шећера у поређењу са применом инсулина. Потребне су додатне студије које би дале више података о његовом ефекту на ток и исход трудноће (100).

#### 1.8.2.2. Тиазолидиндион (tzd) и агониста пароксизом пролифератор активаторског рецептора $\gamma$ (prar $\gamma$ )

Тиазолидиндион (TZD) и агониста пероксизом пролифератор активираниог рецептора  $\gamma$  (PRAR  $\gamma$ ) су инсулински сензитајзери. PRAR  $\gamma$  повећава инсулинску активност делујући на пострецепторски механизам дејства инсулина и примарно повећава сензитивност масног ткива и скелтних мишића на инсулин (101). Тиазолидиндиони, као што су триоглитозин, росаглитозин и пиоглитозин, су ефикасни у терапији хиперинсулинизма, инсулинске резистенције код пацијенткиња које болују од PCOS без обзира на њихов BMI. Показано је да побољшавају толеранцију глукозе, ублажавају хиперандрогенемију и регулишу овулацију. Бројне студије су показале да регулишу дислипидемују боље од метформина (102, 103). Жене које лоше подносе терапију метформином могу користити и TZD као регулаторе метаболичних и репродуктивних абнормалности (104). Испитиван је и синергистички ефекат метформина и TZD, који се показао као делотворнији у регулацији менструационог циклуса и инсулинске резистенције у односу на монотерапију метформином (103). Терапија пиоглитазоном је ефикаснија за повећање инсулинске сензитивности и мање је хепатоксична али је губитак телесне масе мањи (105).

#### 1.8.3.3. Аналоги глукагон сличног пептида-1 (glp- 1)

Међу бројним корисним ефектима које медирају агонисти GLP- 1 рецептора су: регулација нивоа глукозе у крви, снижавање телесне масе путем инхибиције уноса хране и смањења пражњења желуца, стимулација пролиферације ћелија, смањење

запаљења и апоптозе, побољшање кардиоваскуларне функције и неуропротекција (106). Новије студије су показале да су ови лекови делотворни у регулацији хиперандрогенизма, регулацији менструационог циклуса и побољшања инсулинске резистенције. Такође доводе и до губитка телесне масе а самим тим дугорочно смањују ризик за настанак кардиоваскуларних обољења код гојазних PCOS пацијенткиња (107).

Агонисти GLP- 1 рецептора и метформин у комбинацији боље регулишу телесну масу, инсулинску резистенцију, хиперандрогенизам и индукују овулацију него монотерапија, чак и код оних пацијенткиња код којих је претходна монотерапија метформином била неделотворна (108). За сада, терапија агонистима GLP- 1 рецептора се може апликовати само субкутано, што многе пацијенткиње сматрају нелагодним.

#### 1.8.3.4. Суплементација у PCOS

Инозитол је циклични алкалоид који заједно са холином и фосфорном киселином учествује у метаболизму липида. Мио-инозитол (MI) и D-хиро-инозитол (DCI) су хексидрохосиклохексани, стереоизомери инозитола, најзаступљенији у природи од укупно 9 форми стереоизомера инозитола. Инозитол је компонента ћелијске мембране. Фосфатидил MI представља прекурсор у синтези инозитол трифосфата који је секундарни гласник за инсулин и FSH. MI и DCI имају битну биолошку улогу и различите ефекте на инсулин. Дисфункција инозитолног сигналног пута може довести до поремећаја у инсулинској сигнализацији и настанка инсулинске резистенције (109). Инозитол учествује и у метаболичком дејству инсулина и његовом сигналном путу, те се сматра делотворним у лечењу пацијенткиња које имају инсулинску резистенцију и PCOS. Показано је и да побољшава функцију јајника и смањује ниво андрогена, побољшавајући остопу овулација код жена PCOS (110). MI побољшава настанак овулације поспешујући раст фоликула, омогућавајући матурацију ооцита и регулацију хормонског дисбаланса (111). Унос MI се добро подноси и препоручена дневна доза је 2-4g дневно (111).

Алфа липоинска киселина и омега 3 масне киселине представљају суплементе, који регулишу метаболизам липида и инсулинску сензитивност. Њихово дејство је антиинфламаторно и антиоксидантно. Студије су показале позитиван ефекат коензима Q10 на оваријалну функцију, метаболизам липида, метаболизам глукозе, ниво инсулина. HOMA-IR и укупан ниво T код жена које имају PCOS (112). Студије на анималним моделима су показале да екстракт алоја гела такође регулише поремећену хомеостазу глукозе и побољшава инсулинску секрецију (113). Клиничке студије су потврдиле да суплементација L-карнитином такође ефикасно побољшава инсулинску резистенцију код PCOS пацијенткиња, побољшањем бета оксидације масних киселина и метаболизмом угљених хидрата. (111).

#### 1.8.3.5. Натријум глукозни контранспортер 2 инхибитори (sglt-2i)

Селективни SGLT-2i су протеини, чланови породице SGLT транспортера натријума и глукозе. Имају битну улогу у регулацији метаболизма глукозе, инсулин независним механизмом, али и повећавајући сензитивност на инсулин. Ефекат SGLT2i не зависи од секреције инсулина из бета ћелија панкреаса нити од инсулинске резистенције (111, 114, 115). Учествује у активном транспорту молекула глукозе и натријума према градијенту њихове концентрације. SGLT2 је транспортер високог

капацитета са ниском афинитетом и одговоран је за ресорпцију 90% глукозе на нивоу проксималног дела тубула бубрега (116). Транспорт глукозе SGLT2 врши се симпортом, натријум и глукоза у истом смеру пролазе кроз мембрану тубулоцита, сходно градијенту концентрације. Енергија која се ускладиштила у електрохемијском градијенту натријума омогућава кретање глукозе према њеном градијенту. Инхибицијом SGLT2 смањује се ниво глукозе, спречавањем реасорпције глукозе у проксималном тубулу, што доводи до излучивања глукозе путем урина. Гликозурија смањује ниво глукозе за трећину њене вредности (117). Многе студије су показале да SGLT2i смањује количину масног ткива, снижава артеријски крвни притисак, смањује оксидациони стрес, делује антиинфламаторно и кардиопротективно (116). Применом SGLT2i се убрзава липолиза и катаболизам. Студије су показале да терапијским дозама SGLT2i, после 12 месеци примене, ниво глукозе се смањује за 0.5-0.9%, смањује се телесна маса за 2 kg, систолни притисак се снижава за 2.5-5 mmHG, дијастолни за 1-2 mmHG, без изазивања тахикардије и са малим ризиком изазивања хипогликемије (118, 119).

Губитак телесне масе доминантно је последица губитка масног ткива (120, 121). Први SGLT2i, канаглифозин, FDA је одобрила 2013. године за лечење DM2. До сада су регистровани у терапији срчане инсуфицијенције и хроничне реналне инсуфицијенције, а бројне студије тренутно испитују његов потенцијални ефекат у терапији PCOS. Досадашњом терапијском применом доказан је позитиван ефекат у регулацији пормећаја гликемијског статуса и кардиоваскуларних функција, што додатно указује на могући успешни ефекат лечења PCOS (119). Канаглифозин је у поређењу са метформином подједнако ефикасан у смањењу HOMA IR и побољшању менструационог циклуса (122). Употреба SGLT2i до сада се показала ефикасном у терапији хормонских и метаболичких поремећаја, као и за соматометријске поремећаје PCOS. Досадашњи резултати су показали да применом SGLT2i код жена са PCOS долази до регулације телесне масе, метаболизма липида, секреције инсулина, андрогена и смањења крвног притиска (123). Доказано је да могу довести до губитка телесне масе и код жена које не болују од DM2 (124, 125).

Применом SGLT2i побољшава се ниво липида, мокраћне киселине у серуму са могућношћу настанка касних компликација PCOS. Механизам којим SGLT2i делују на патофизиолошке промене PCOS је и смањење оксидационог стреса који је посреован изменом натријум хидроксида и инхибицијом ниотинамид динуклеотид фосфата. (126) Обзиром да је као касна компликација PCOS описан настанак атеросклеротичних промена у рвним судовима у раније животном добу, услед ендотелијалне дисфункције, терапија SGLT2i може превенирати настанак оваквих промена (127). У поређењу са метформином SGLT2i није показао супериорност у регулацији BMI нити у смањењу центрипеталне гојазности, док се терапија GLP-1 агонистима показала као делотворнија, али без кардиопротективног ефекта (128). Иако SGLT2i још увек није регистрован у терапији PCOS, Интернационални водич за лечење PCOS из 2018. године, истиче битност регулације телесне масе и предлаже да би лекови који доводе до снижавања телесне масе могли бити веома корисни у лечењу гојазних PCOS пацијенткиња.

## **1.9. РАЗМАТРАЊА РАЗВОЈА АНИМАЛНИХ МОДЕЛА У ИСТРАЖИВАЊУ PCOS**

Да би се развио адекватан анимални модел PCOS, погодан за истраживање терапијских приступа, потребно је усредсредити се на хормонске, репродуктивне и метаболичке поремећаје овог синдрома. До сада није пронађен лек који би деловао на читав спекат абнормалности. Обзиром на хетерогеност симптома, PCOS терапија свакако мора бити индивидуално адаптирана сваком пацијенту. Обзиром на етичку ограниченост у студијама на људима анимални модели са индукованим карактеристикама PCOS су од изузетног значаја у истраживању овог синдрома. До данас су развијени броји експериментални модели PCOS на различитим животињама, као што су глодари (129) овце (130), резус мајмуни (131) али из практичних разлога модели глодара су најзаступљенији у истраживањима. Глодари су лаки за руковање, приступачни, кратког су репродуктивног циклуса и имају велике генетске сличности са људским геномом. Резлтати добијени на глодарима дају допринос лакшем разумевању етипатогенезе PCOS. Прегледом досадашње литературе долази се до закључка да је најзаступљенија метода индукције PCOS примена хормона. Најчешће се примењују андрогени, и то DHEA али у циљу индукције неопходно је примењивати их 20-30 дана узастопно, док код индукције естрадиол-валератом довољна је само једна апликација естрадиол валерата у дози од 4 mg (132). Животиње које се најчешће користе су препуберталне женке пацова, премда је скорашња студија дала предност постпубеталним животињама (133).

Упркос напретку који је учињен на терену скривених аспекта PCOS, терапија остаје и даље непотпуна и недовољна (134). Претходна сазнања о потенцијално корисним ефектима SGLT2i код PCOS пацијената, која су контрадикторна али и непотпуна, навела су нас да истражујемо ефекте примене емпаглифлозина у различитим дозама, на анималном експерименталном моделу PCOS, како би покашали да расветлимо његове ефекте на репродуктивне и метаболичке карактеристике овог поремећаја.

## **2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА**



## **ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ**

- Испитати да ли примена ЕМПА доводи до промена хормонског статуса на моделу PCOS код пацова.
- Испитати да ли примена ЕМПА доводи до промена гликорегулације на моделу PCOS код пацова.
- Испитати да ли примена ЕМПА доводи до промена вредности крвног притиска на моделу PCOS код пацова.
- Испитати да ли примена ЕМПА доводи до промена липидног статуса на моделу PCOS код пацова.
- Испитати да ли примена ЕМПА доводи до промена системског оксидационог статуса и оксидационог статуса на нивоу јајника на моделу PCOS код пацова.
- Испитати да ли примена ЕМПА доводи до промена морфолошких карактеристика јајника, утеруса и масног ткива на моделу PCOS код пацова.
- Упоредити ефекте примене ЕМПА са ефектима метформина на карактеристике PCOS код пацова

## **ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ**

- Примена ЕМПА доводи до промена хормонског статуса на моделу PCOS код пацова.
- Примена ЕМПА доводи до промена гликорегулације на моделу PCOS код пацова.
- Примена ЕМПА доводи до промена вредности крвног притиска на моделу PCOS код пацова.
- Примена ЕМПА доводи до промена липидног статуса на моделу PCOS код пацова.
- Примена ЕМПА доводи до промена системског оксидационог статуса и оксидационог статуса на нивоу јајника на моделу PCOS код пацова.
- Примена ЕМПА доводи до промена морфолошких карактеристика јајника, утеруса и масног ткива на моделу PCOS код пацова.
- Ефекти примене ЕМПА су бољи од ефектата које остварује метформин на карактеристике PCOS код пацова

# **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

Спроведена студија је изведена као хронична, експериментална, на материјалу анималног порекла.

### **3.1. ЕТИЧКИ ПРИНЦИПИ КОЈИ СУ СЕ ПОШТОВАЛИ У ЕКСПЕРИМЕНТИМА**

Према одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу спроведени су експерименти на животињама. Све примењене процедуре су учињене поштујући одредбе прописаног акта (EU Directive for the protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes) као и етичке принципе. Протокол експеримента је одобрио Етички одбор за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број протокола 01-10636 од 04.10.2022 године).

### **3.2. ДОБАВЉАЊЕ ЖИВОТИЊА И УСЛОВИ У КОЈИМА СУ ЖИВОТИЊЕ БОРАВИЛЕ ТОКОМ ЕКСПЕРИМЕНТА**

Животиње су купљене од Одељења за одгајање лабораторијских и експерименталних животиња, Војномедицинске академије у Београду. Истраживање је спроведено на 42 пацова (контролна група - 6 животиња и *PCOS* група - 36 животиња), *Wistar albino* соја, женског пола, старости 6 недеља, просечне телесне масе 150-170 g).

Животиње су боравиле у виваријуму Факултета медицинских наука у Крагујевцу (3 животиње по кавезу) у контролисаним условима околине (температура -  $23\pm 1$  °C, циклус светло/мрак - 12/12h) уз неограничен приступ храни и води током трајања протокола (*ad libitum*). Пресвлачење пацова вршено су 2 пута недељно уз најмању могућу манипулацију, ради елиминације потенцијално негативног ефекта стреса на и хормонски статус и еструс код животиња.

### **3.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ГРУПЕ**

Истраживање је спроведено на 42 пацова. Иницијално потребно је било потврдити да је *PCOS* заиста индукован код пацова, па су животиње најпре сврстане у 2 групе - контролна и *PCOS* (контролна група - 6 животиња и *PCOS* група - 36 животиња).

Контролна група (n=6)	PCOS група (n=36)
<i>Након верификације индукције PCOS, 30 животиња из PCOS групе сврстане су у 5 група</i>	
Група P - PCOS + физиолошки раствор (n=6)	
Група P+E1 - PCOS + емпаглифозин, 5 mg/kg ТМ, дневно, током 4 недеље (n=6)	
Група P+E2 - PCOS + емпаглифозин, 15 mg/kg ТМ, дневно, током 4 недеље (n=6)	
Група P+E3 - PCOS + емпаглифозин, 45 mg/kg ТМ, дневно, током 4 недеље (n=6)	
Група P+M - PCOS + метформин, 500 mg/kg ТМ, дневно, током 4 недеље (n=6)	

Табела 1. Подела пацова на групе у току експерименталног протокола.

Након примењеног третмана за индуковање PCOS, пацови из контролне групе као и 6 из PCOS (насумично изабране) су жртвоване у циљу верификације да је индукција PCOS довела до промена. Након потврде да је PCOS индукован, преостале PCOS животиње подељене на 5 група: PCOS + физиолошки раствор, PCOS + емпаглифозин у дози од 5 mg/kg, PCOS + емпаглифозин у дози од 15 mg/kg, PCOS + емпаглифозин у дози од 45 mg/kg, PCOS + метформин у дози од 500 mg/kg (Табела 1).

### 3.4. ТРЕТМАН ЗА ИЗАЗИВАЊЕ PCOS КОД ЖИВОТИЊА

PCOS група је једнократно примила естрадиол-валерат (4 mg у 0.4 ml маслиновог уља), док је контролна група примила исту запремину маслиновог уља. Након 60 дана од апликације естрадиол-валерата очекује се да је модел PCOS успешно изазван код пацова. Унапређењем тог познатог протокола за индукцију PCOS, применом режима исхране богате мастима, тежили смо да развијемо модел који би осликавао клиничке манифестације PCOS које постоје код гојазних пацијенткиња (135, 136). Ради потврде PCOS, 6 животиња из контролне групе, као и шест животиња из PCOS групе су жртвоване декапитацијом на гиљотини након анестезије (50 mg/kg кетаминa и 100 mg/kg ксилазина). Биохемијске и хистолошке анализе су спроведене у циљу потврде индукције PCOS код пацова (очекивани су хиперандрoгенeмија, појава цисти на јајнику, одсуство жутих тела). Цитолошки преглед вагиналног бриса је вршен дванаест дана пред жртвовање, како би регистровали бар 2 узастопна циклуса код пацова, уколико цикличност еструса постоји. Жрвовање пацова који су припадли контролној групи вршено је у истој фази циклуса, у којој су жртвоване и третиране животиње.

### 3.5. ТРЕТМАН ЕМПАГЛИФЛОЗИНОМ И МЕТФОРМИНОМ НАКОН ИНДУКЦИЈЕ PCOS

Третмани након индукције PCOS су спроведени као што је наведено у Табели 1. Сви третмани су спроведени су гаважом, сваког дана, током укупно 28 дана трајања терапијског протокола. Дозе естрадиол-валерата (135), емпаглифозина (137) и метформина (138) су изабране на основу података из литературе. Након двадесетосам

дана од индукције PCOS, животиње су анестезиране (50 mg/kg кетамина и 100 mg/kg ксилазина) и жртвоване декапитацијом на гиљотини, а крв и ткиво јајника, утеруса, као и супкутано масно ткиво и периоваријално масно ткиво у прикупљени за даљу анализу.

### 3.6. ВАРИЈАБЛЕ КОЈЕ СЕ МЕРЕ У СТУДИЈИ

#### 3.6.1. Соматометријски параметри

Телесна маса животиња је мерена на почетку протокола, након индукције PCOS, као и два пута недељно током третмана емпаглифлозином и метформином. Током третмана било је неопходно одређивање телесне масе у циљу прерачунавања дозе емпаглифлозина и метформина коју је било потребно дати животињама. Мерење телесне масе се вршило приликом чишћења кавеза, тада је и прерачунавана доза коју пацови добијају за предстојећа 3-4 дана. Прерачуната доза примењеног лека је повећавана у складу са порастом телесне масе животиња. Након завршеног третмана емпаглифлозином и метформином животиње су мерене, као и непосредно пред жртвовање. Непосредно пре жртвовања је измерена телесна маса која представља финалну телесну масу и принос телесне масе је прорачунат као проценат повећања у односу на иницијалну телесну масу.

#### 3.6.2. Одређивање фазе еструсног циклуса цитолошким анализом вагиналног лавата

Еструсни циклус је праћен током последњих 12 дана индукције PCOS модела, као и последњих 12 дана третмана емпаглифлозином и метформином. Фазе еструсног циклуса су процењене цитолошким прегледом вагиналног размаза. Вагинална лаважа је вршена у јутарњим часовима (између 9:00 и 10:00 сати преподне) употребом стаклене пипете са заобљеним врхом испуњене малом количином физиолошког раствора. Испирак је апликован на претходно дезинфиковано стакло, осушен на ваздуху и потом обојем хематоксилином. По сушењу, обојени препарат је анализиран на светлосном микроскопу.

Фаза циклуса је одређена на основу преминације специфичних ћелија на препарату (139).

Фаза циклуса	Проеструс	Еструс	Метаеструс	Диеструс
Доминантно присутне ћелије	Обле ћелије са једром	Рожнате сквамозне ћелије	Приближно исти број рожнатих, сквамозних ћелија као у еструсној фази али су присутни и леукоцити	Леукоцити и ћелије са једром

Табела 2. Карактеристике различитих фаза еструсног циклуса код пацова.

Фаза циклуса у којој се животиња налазила је одређивана пре примене експерименталног протокола над животињом. Одређивање фазе циклуса пре почетка примене експерименталног протокола је вршено како би се идентификоване животиње које имају уредан, еструсни циклус и како би се екперимент наставио само са тим животињама.

### 3.6.3. Биохемијски параметри

#### 3.6.3.1. Прикупљање узорка крви за биохемијске анализе

По извршној декапитацији, након одговарајуће анестезије, крв је прикупљена у епрувете ради добијања плазме и серума, центрифугирање је извршено на 300 обртаја, а узорковани плазма/серум и лизати еритроцита складиштени на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до тренутка анализирања.

#### 3.6.3.2. Липидни статус

Коришћењем апарата Dimension Xpand (Siemens, IL, USA) из узорака серума су детерминисани параметри липидног статуса (укупни холестерол и триглицериди, као и LDL и HDL)

#### 3.6.3.3. Хормонски статус

Концентрација инсулина, као и нивои Т, Е, Р, FSH и LH су детерминисани из серума.

Нивои Т, Е, Р су одређени електрохемилуминисцентним имунотестом на Elecsys 2010 апарату. За анализу су коришћени следећи реагенси: Elecsys Testosterone II, Estradiol III, Progesterone II Roche Diagnostics. Ниво Т и Р су изражени у ng/mL, а Е у pg/ml. Сензитивност тестова за Т је износила 0,025 pg/ml, за Р 0,03 pg/ml, за Е 5 pg/ml. Коефицијенти варијансе инер и интратестова су били за Т 3,8 и 5%, за П 3 и 5% и за Е 2,2 и 5%.

Употребом комерцијалних китова за детекцију LH, FSH и инсулин ELISA методом детерминисане су концентрације наведених хормона. За анализу су коришћени следећи реагенси: Rat LH (Luteinizing Hormone) ELISA Kit, каталошки број - E-EL-R0026,; Rat FSH (Follicle Stimulating Hormone) ELISA Kit, каталошки број - E-EL-R0391, Rat INS (Insulin) ELISA Kit, каталошки број - E-EL-R3034. Опсег детекције за LH је износио 1.56~100 mIU/mL, док је сензитивност износила 0.94 mIU/MI. Опсег детекције за FSH је износио 3.13~200 ng/mL, док је сензитивност била 1.88 ng/MI. Опсег детекције за инсулин је износио 6.25~400 pg/mL, док је сензитивност била 3.75 pg/MI.

Микро ELISA плоча, са 96 бунарчића који су у саставу комплета, је већ претходно обложена антителом специфичним за одговарајући хормон (инсулин, FSH или LH). Узорци (као и стандарди) су додавани у бунарчиће микро ELISA плоче и мешани су са специфичним антителом. Потом је биотин детекционо антитело специфично за

адекватни хормон пацова и коњугована Авидин-Horseradish пероксидаза(HRP) додавана узастопно у сваки бунар. Након овог корака уследио је период инкубације. По завршеној инкубацији микро плоче су испиране, према упутству. Раствор супстрата је додат у сваки бунарчић, и само они бунарчићи који садрже примарно антитело специфично за одговарајући хормон су се обојили плавом бојом. Реакција ензим-супстрат је заустављена додавањем стоп раствора, након чега се пребојило у жуту боју. Оптичка густина (ОД) је одређивана спектрофотометријски на таласној дужини од 450 nm  $\pm$  2 nm. ОД вредност је била одговарајућа концентрацији хормона. Хормонска концентрација је израчуната у узорцима компарацијом узорака са стандардном кривом. Коефицијенти варијације су за сваки од хормона су биле мање од 10%.

LH / FSH однос је одређен на основу добијених вредности LH и FSH.

### 3.6.3.3. Одређивање биомаркера оксидационог стреса из крви

Из плазме и лизата еритроцита одређиване су вредности параметара антиоксидационог система заштите, као и про-оксиданаса: индекс липидне пероксидације изражен као TBARS, азот моноксид у облику нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^-$ ), водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), активност каталазе (CAT), активност супероксид дисмутазе (SOD) и концентрација редукованог глутатиона (GSH).

#### 3.6.3.3.1. Одређивање концентрације прооксидативних биомаркера

##### 3.6.3.3.1.1. Мерење концентрације TBARS

Одређивање TBARS је извршено мешањем 0,8 mL узорка плазме са 0,4 mL трихлоросирћетне киселине. После хлађења реакционе смеше, петнаестоминутном складиштењу на леду током 15 минута и накнадним центрифугирањем на 6000 rpm, супернатант је узоркован за даљу анализу.

Употребом 1% тиобарбитурне киселине у 0,05 NaOH извршена је инкубација са узоркованим супернатантом на 100 °C током 15 минута. Мерење је спроведено на спектрофотометру, на 530 nm таласне дужине. Као слепа проба употребљена је дестилована вода (140). Добијене вредности су изражаване у  $\mu\text{M/mL}$ .

##### 3.6.3.3.1.2. Мерење концентрације $\text{NO}_2^-$

Ниво  $\text{NO}_2^-$  је мерен као индекс продукције NO коришћењем Грисовог реагенса у реакцији. Помешано је 0,1 mL перхлорне киселине (3 N) са 0,4 mL EDTA (20 mM) и са 0,2 mL плазме. Смеша је складиштена је на леду укупно 15 минута. Након хлађења уследило је центрифугирање на 6000 rpm током 15 минута. По изливању супернатанта, у талог је додато 220  $\mu\text{L}$  калијум карбоната. Концентрација  $\text{NO}_2^-$  је измерена на спектрофотометру, на таласној дужини од 550 nm, док је дестилована вода је служила као слепа проба. Детерминисане вредности су изражене у nM/mL (141).

#### 3.6.3.3.1.3. Мерење концентрације $O_2^-$

По завршетку реакције која је настала мешањем узорка са са нитро тетразолијум плавим у ТРИС пуферу одређена је концентрација супероксид анјон радикала на таласној дужини од 530 nm, на спектрофотометру. Дестилована вода у истој запремини је представљала слепз пробу (142). Добијене вредности су изражаване у nM/mL.

#### 3.6.3.3.1.4. Мерење концентрације $H_2O_2$

Концентрација водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) је одређена базирањем на принципу оксидације фенол црвеног у реакцији која је катализована HRP. Коришћењем 200  $\mu$ L плазме извршена је преципитација са 800  $\mu$ L раствора фенол црвеног (свеже припремљеног) а потом је 10  $\mu$ L (1:20) HRP додато у реакциону смешу. Ниво  $H_2O_2$  је одређен на таласној дужини од 610 nm. Као слепа проба користила се дестилована вода. (143) Добијене вредности су изражаване у nM/mL.

#### 3.6.3.3.2. Одређивање активности/концентрације компоненти антиоксидационе заштите

##### 3.6.3.3.2.1. Мерење активности CAT

Ради мерења активности CAT коришћено је 50  $\mu$ L CAT пуфера, 100  $\mu$ l лизата еритроцита и 1 mL 10 mM водоник пероксида. Детектовање је изведено на таласној дужини од 360 nm. Дестилована вода је служила као слепа проба, а количина CAT је изражена као U/g хемоглобина  $\times 10^3$  (144).

##### 3.6.3.3.2.2. Мерење активности SOD

Активност SOD је одређена у реакцији са адреналином. Помешано је укупно 100  $\mu$ L лизата еритроцита и 1 mL карбонатног пуфера, а затим је додато 100  $\mu$ L адреналина. Детекција је извршена на таласној дужини од 470 nm, а количина SOD је изражена као U/g хемоглобина  $\times 10^3$  (145).

##### 3.6.3.3.2.3. Мерење концентрације GSH

Оксидација редукованог облика глутатиона преко 5,5-дитиобис-6,2-нитробензојеве киселине је коришћен принцип реакције за мерење концентрације GSH. Екстракт GSH је направљен комбинацијом 0,1 ml 0,1% EDTA, 400  $\mu$ L плазме и 750  $\mu$ L преципитационог раствора (који садржи 1,67 g метафосфорне киселине, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl, и до 100 mL воде). После вортекса и екстракција на леду током 15 минута, смеша је центрифугирана је на 4000 rpm током 10 минута. Мерење је извршено на



спектрофотометру, на таласној дужини од 420 nm, док је дестилована вода служила као слепа проба (144).

#### 3.6.3.4. Хомогенизација ткива јајника и одређивање параметара оксидативног стреса из хомогената ткива јајника

Обзиром да је леви јајник коришћен за хистолошку анализу, десни јајник је искоришћен за биохемијске анализе за одређивање параметара оксидационог стреса. Десни јајник је изолован, хомогенизован у хладном PBS-у у односу 1/10 масе и запремине и та смеша је центрифугирана на 3000 обртаја, на 4°C. Након центрифугирања, супернатант је прикупљен за даљу анализу. Супернатант је складиштен на -70°C до тренутка када су извршене биохемијске анализе.

Коришћењем истих принципа реакција којима су концентрације TBARS и GSH, као и активности CAT и SOD одређивани из крви, одређена је и њихова концентрација/активност из узорака хомогената ткива јајника. Вредности су изражене на g ткива јајника.

#### 3.6.4. Хистолошка анализа органа

Након жртвовања, лапаротомијом је отворен предњи трбушни зид. Експлорацијом трбуха и карлице изолован је леви јајник, периоваријално масно ткиво и утерус. Након тога, изоловано је супкутано масно ткиво из предела предњег трбушног зида. Ткива су измерена и фиксирана у 4% формалдехиду. Након 48 сати фиксације узорци ткива су и дехидратисани у 50, 70, 96 и 100% алкохолу, просветљени у ксилолу и након тога стандарним процедура укалупљени. На ротационом микротому су прављени серијски пресеци ткива, дебљине 5 микрометара. Након периода сушења, ткивни пресеци су депарафисани у ксилолу, и рехидратисани у опадајућим концентрацијама алкохола (100, 96, 70, 50%), испрани у води а потом обојени хематоксилином по Mayer- и 2% раствором еозина. Након бојења, пресеци су монтирани DPX-ом и покривени покровним стаклом.

Морфометријска анализа јајника, утеруса и масног ткива је спроведена анализом пресека бојених хематоксилином и еозином. Све анализе су спроведене коришћењем светлосног микроскопа (Leica). Пресеци ткива јајника су коришћени у сврху квантификације примарних, секундарних, терцијарних и атретичних фоликула. Из сваког јајника је анализирано по 3 пресека: централни и 150  $\mu\text{m}$  испред и иза централног пресека (146). Само они фоликули који су имали визуализовано ооциту и једро су бројени. Преантрални, (здрави) антрални и атретични фоликули су квантификовани према претходно утврђеној методологији (147). Са централног пресека су регистровани број жутих тела и број цистичних фоликула. Карактеристике за цистичну измену фоликула су: 1-4 слоја гранулоза ћелије, одсуство лутеинизације, истаљен зид сачињен од танких спљоштених ћелија на танкој фиброзној капсули, увећаних димензија.

Мерење дебљине ендометријума и висине луминалног епитела је вршено анализом пресека обојених хематоксилином и еозином уз употребу софтвера придруженом микроскопу (Leica). Дијаметар адипоцита и површина адипоцита су измерени коришћењем Adiposoft додатка за ImageJ.

### 3.6.5. Ехосохографска визуализација јајника

Након завршеног експерименталног протокола, животињама је извршена ехосонографска анализа јајника на апарату Hewlett-Packard Sonos 5500 (Andover, MA, USA). Сонда која је том приликом коришћена је била прилагођена за мале животиње (15.0 MHz). Након адекватне седације (50 mg/kg кетамина и 10 mg/kg ксилазина), уклоњене су длаке са коже предњег трбушног зида коришћењем креме за депилацију, а потом је приступљено ултразвучној анализи јајника. У В моду, на основу топографских локализација које су карактеристичне за анатомију пацова, (испод бубрега) и ехогених карактеристика јајника, регистроване су 3 димензије јајника: лонгитудинални, антеропостериорни и трансверзални дијаметар. Поред тога, на основу одговарајуће формуле израчуната је и запремина јајника.

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

Како би се проценила гликорегулација након спроведених третмана, спроведен је ОГТТ. Пре извођења овог теста регистрована је базална вредност гликемије. Након тога животињама методом гаваже апликовано 2g/kg глукозе, а крв за гликемију је упоркована по истеку 30, 60, и 120 минута. Гликемија је мерена коришћењем апарата Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), употребом адекватних трачица, по пунктирању репне вене.

### 3.6.7. Детерминисање вредности артеријског крвног притиска и срчане фреквенције

Вредност крвног притиска је мерена методом репне плетизмографије, на крају експерименталног протокола. Ова метода је неинвазивна метода и обезбеђује прецизно мерење систолног, дијастолног, средњег артеријског притиска и срчане фреквенције помоћу специјалног сензора за детектовање промена притиска и волумена унутар крвног суда (Rat Tail Cuff Method Blood Pressure Systems (MRBP-R), ИТЦ Life Science Inc. USA).

## 3.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

Прорачун величине узрока је извршен на основу резултата претходно објављене студије у којој је праћен утицај хидроалкохолног екстракта *Citrullus colocynthis* на морфолошке карактеристике јајника и хормонски статус код пацова којима је PCOS идукован применом естрадиол-валерата (148).

За прорачун је коришћен Т-тест за независне узорке, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0.05 и снаге студије 0.8 (бета грешка 0.2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (*G\*Power*). Узимањем у обзир резултате наведене студије, укупан студијски узорак је прорачунат на 42 (6 животиња по групи).

## 1.8. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА

Након провере нормалности расподеле података за континуалне варијабле, за процену утицаја независних варијабли на посматрани исход користили су се одговарајући параметарски или непараметарски тестови (Студентов  $t$  тест и  $t$  тест независних узорака, као и ANOVA или Kruskal Wallis тест, уз одговарајућу пост-хок анализу). Вредност  $p < 0.05$  се сматрају статистички значајном, а интервал поверења за све тестове ће бити 95%. Добијени резултати су груписани и приказани, табеларно и графички. Сви подаци су анализирани коришћењем статистичког програма IBM statistics SPSS верзија 2

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

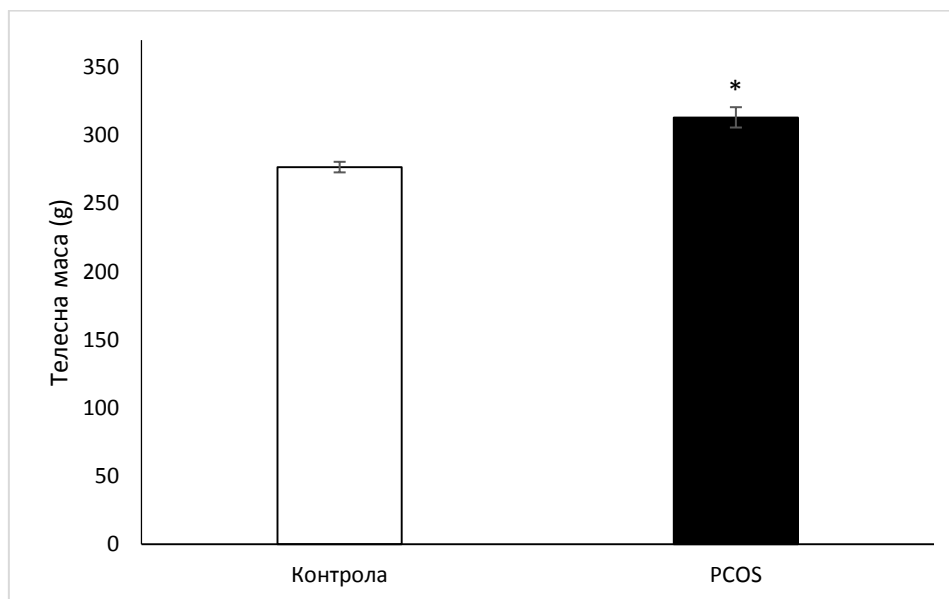
## 4.1. ПОТВРДА УСПЕШНОСТИ ИНДУКЦИЈЕ МОДЕЛА PCOS КОД ПАЦОВА

У првој фази експерименталног протокола, предвиђено је да се провера успешности индукције PCOS изврши тако што ће се пацови из контролне групе као и идентичан број животиња насумично одређених из PCOS групе, жртвовати након адекватно спроведене анестезије. Параметри који су регистровани код тих животиња у циљу потврде успешно индукованог PCOS су следећи: промена у телесној маси животиња као промена масе њихових јајника, абнормалност еструсног циклуса, ниво полних хормона (тестостерона, естрадиола и прогестерона) у серуму, хистолошки потврђена појава цистичних фоликула и редукција броја жутих тела.

### 4.1.1. Соматометријски параметри код пацова након индукције PCOS

#### 4.1.1.1. Телесна маса пацова

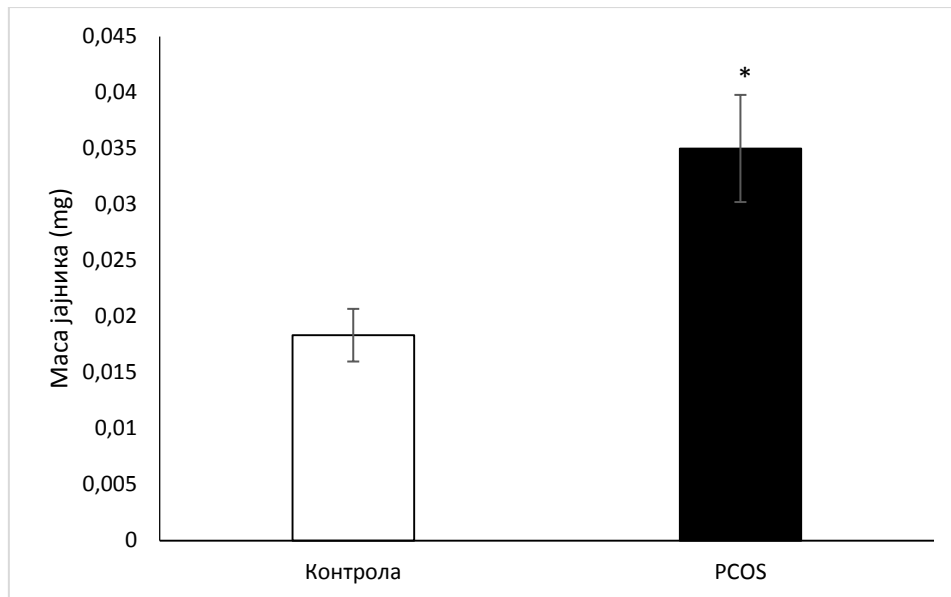
Као што је приказано на графикону 1., телесна маса животиња се значајно повећала након спроведеног протокола за индукцију PCOS, који је подразумевао једнократну примену естрадиол-валерата и исхрану богату мастима током 60 дана. Животиње су мерене два пута недељно. На графикону је приказана и крајња телесна маса непосредно пре жртвовања пацова насумично изабраних из PCOS групе, пацови су жртвовани након адекватно спроведене анестезије.



Графикон 1. Телесна маса животиња након индукције PCOS. Вредности су представљене као средње вредности  $\pm$  SEM. \* означава статистички значајну разлику ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.1.2. Тежина јајника пацова код којих је индукован PCOS

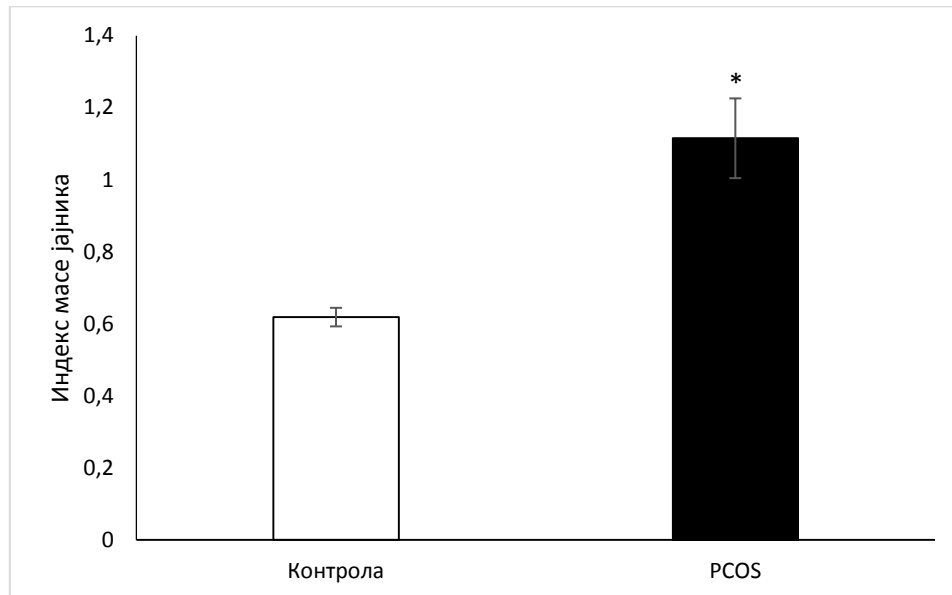
Као што је приказано на графикону 2 маса јајника пацова код којих је изазван PCOS се статистички значајно повећала у односу на масу јајника контролне групе.



Графикону 2. Маса јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. \* статистичка значајност на нивоу  $p < 0.05$ , у поређењу са контролном групом.

#### 4.1.1.3. Индекс масе јајника пацова код којих је индукован PCOS

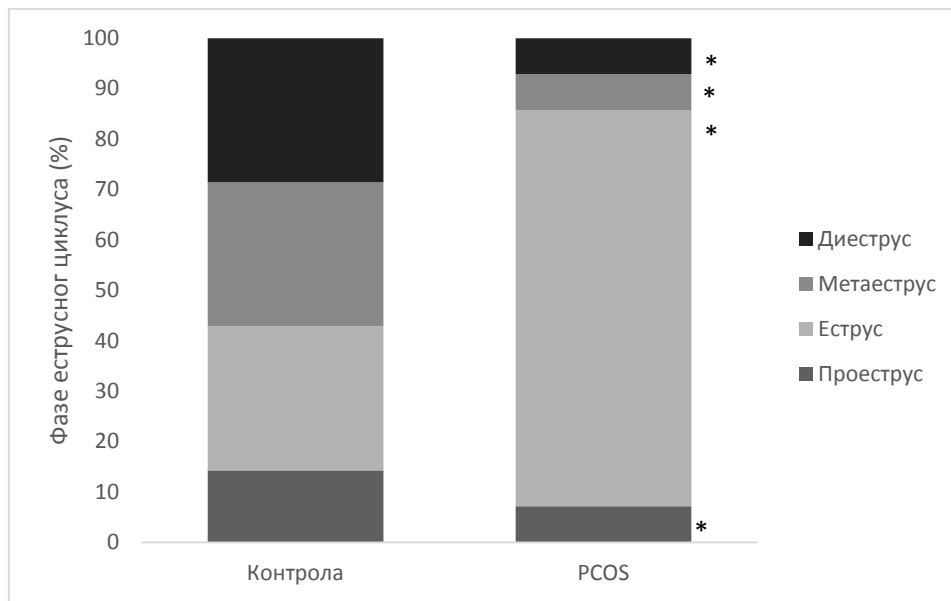
Индекс масе јајника пацова након успешно изазваног PCOS се статистички значајно повећао као што је и приказано на графикону 3.



Графикон 3. Индекс масе јајника. Стубићи представљају средње вредности ± SEM. \* статистичка значајност на нивоу  $p < 0,05$ , у поређењу са контролном групом.

#### 4.1.2. Утицај индукције PCOS код женки пацова на еструсни циклус

Пацови из контролне групе су имали редован еструсни циклус (смењивао се пролазећи редом кроз фазе: проеструс, еструс, метаеструс и диеструс). Циклус је код сваке животиње трајао уобичајених 4-5 дана. Код пацова код којих је индукован PCOS дошло је до појаве ирегуларног менструалног циклуса, испољен је изостанак циклуса у последњих 12 дана спроведеног протокола. Циклус је заустављен доминантно у фази еструса, што је показано перзистентним вагиналним корнификацијама при анализи вагиналног размаза. Доминантна заустављеност у фази еструса може се уочити на графикону 4 .

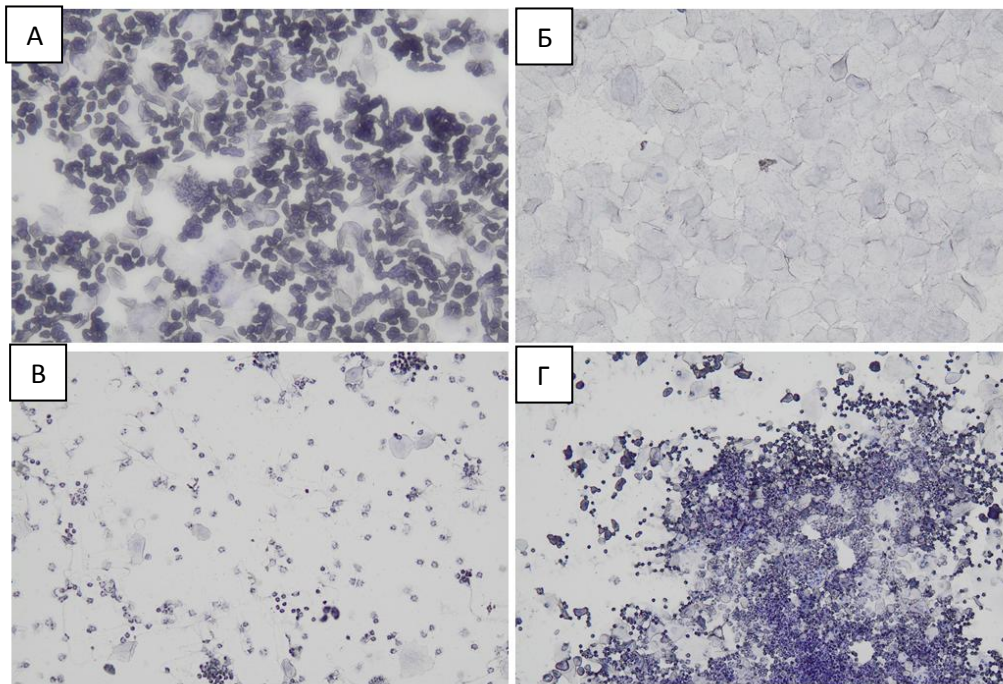


Графикон 4. Фазе еструсног циклуса. Пропорција заступљености различитих фаза еструсног циклуса у три групе је анализирана помоћу Хи-квадрат теста. \*  $p < 0,05$  у односу на контролу.



#### 4.1.2.2. Испитивање карактеристика фаза циклуса код пацова након индукције PCOS

Пацови из контролне групе имали су регуларан естусни циклус узастопних 4-5 дана док пацови из групе индукваног PCOS нису мењали фазе циклуса регуларно и испољили су изостанак циклуса последњих 12 дана спроведеног протокола. Циклус је доминантно био заустављен у еструсној фази циклуса што је показано перзистентно вагиналном корнификацијом у анализи вагиналних брисева на слици 5.



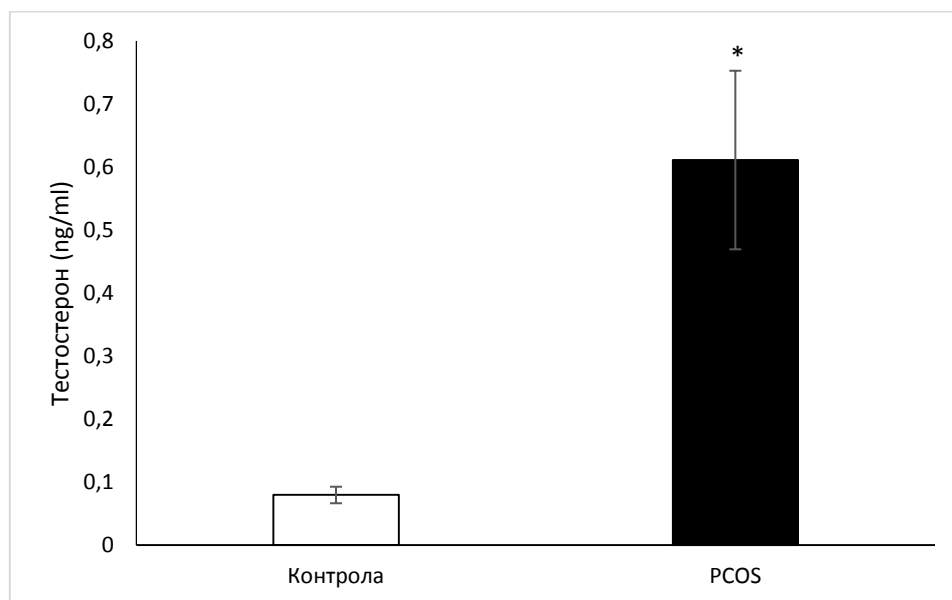
Слика 1. Фаза циклуса на вагиналним брисевима. Приказане су различите фазе циклуса еструса код пацова ((А) – проеструс; (Б) – еструс; (Б) – метаеструс; (Г) – диеструс).

#### 4.1.3. Хормонски статус пацова након изазваног PCOS

Након 60 дана од једнократне апликације естрадиол валерата и након свакодневне исхране богате мастима дошло је до промена у вредностима полних хормона.

##### 4.1.3.1. Ниво тестостерона у серуму

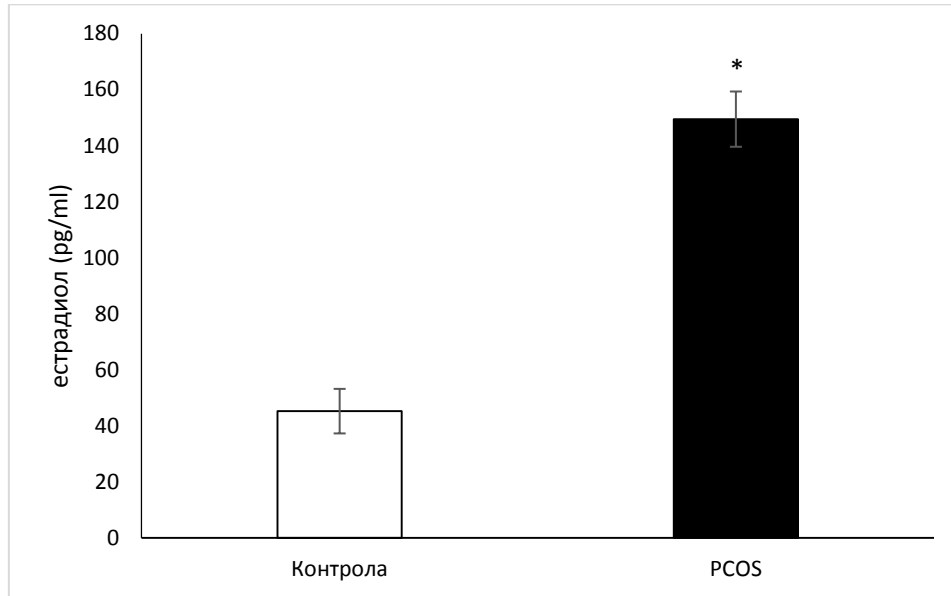
Ниво тестостерона у серуму био је значајно виши у PCOS групи ( $p < 0,05$ ) у поређењу са контролном групом (графикон 5).



Графикон 5. Вредност тестостерона у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. \* Статистичка значајност на нивоу  $p < 0,05$ , у поређењу са контролном групом.

#### 4.1.3.2 Ниво естрадиола у серуму

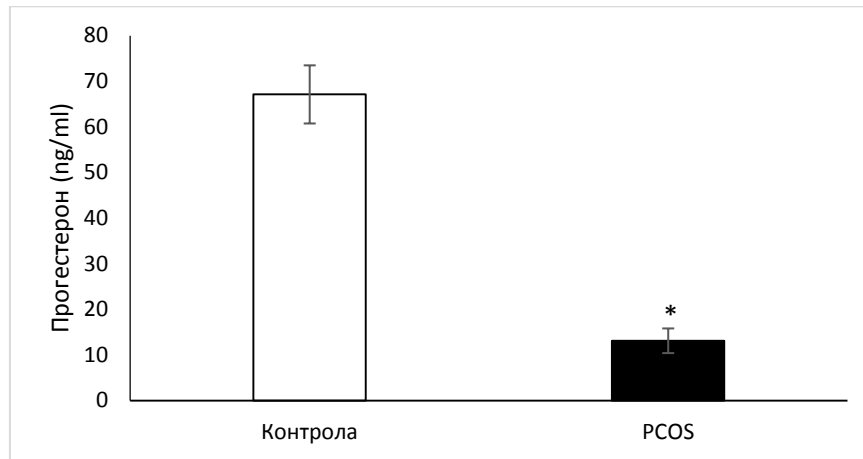
Ниво естрадиола у серуму био је статистички значајно виши у PCOS групи ( $p < 0,05$ ) у поређењу са контролном групом. (графикон 6.)



Графикон 6. Вредност естрадиола у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. \* Статистичка значајност на нивоу  $p < 0,05$ , у поређењу са контролном групом.

#### 4.1.3.3. Ниво прогестерона у серуму

Ниво прогестерона у серуму се статистички сигнификантно смањио у PCOS групи ( $p < 0,05$ ), као што је приказано на графикону 7.

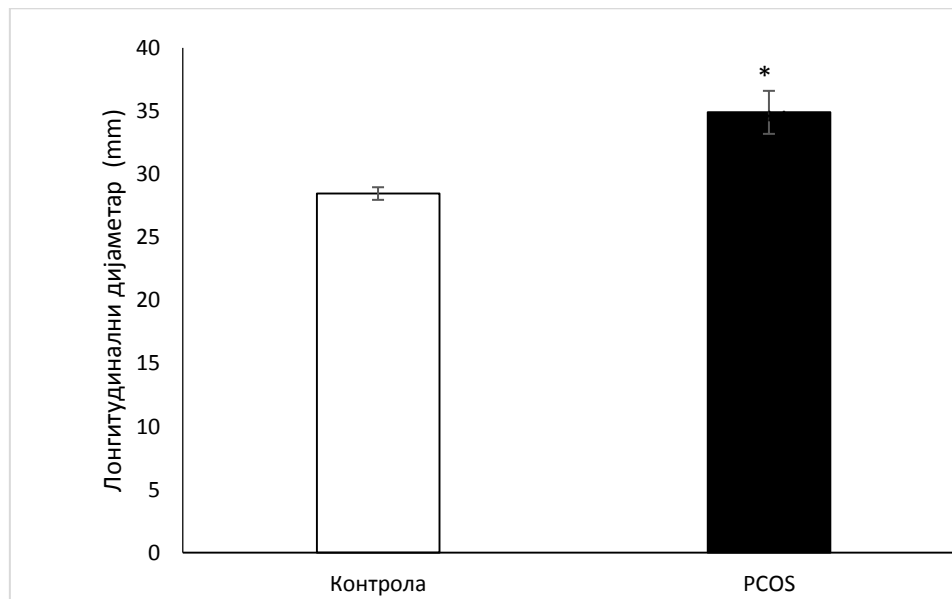


Графикон 7. Ниво прогестерона у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. \* Статистичка значајност на нивоу  $p < 0,05$ , у поређењу са контролном групом.

#### 4.1.4. Ултразвучни преглед јајника пацова након индукције PCOS

##### 4.1.4.1. Лонгитудинални пресек јајника

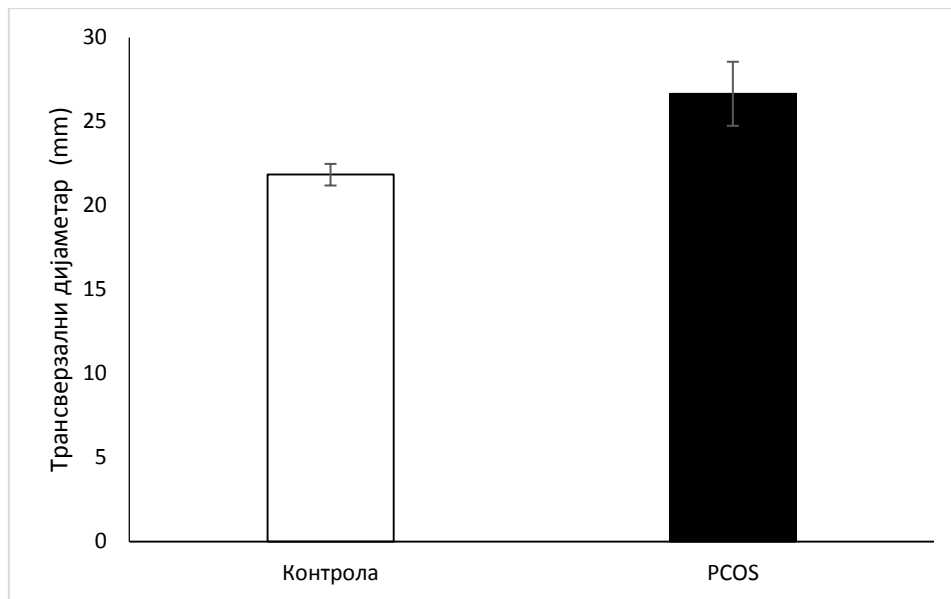
Као што је приказано на графикону 8. лонгитудинални пресек јајника је био значајно већи у PCOS групи ( $p < 0,05$ ), у поређењу са контролном групом.



Графикон 8. Ултразвучни преглед јајника пацова– лонгитудинални дијаметар јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM . \* статистичка значајност на нивоу  $p < 0,05$ , у поређењу са контролном групом.

#### 4.1.4.2. Трансверзални дијаметар јајника

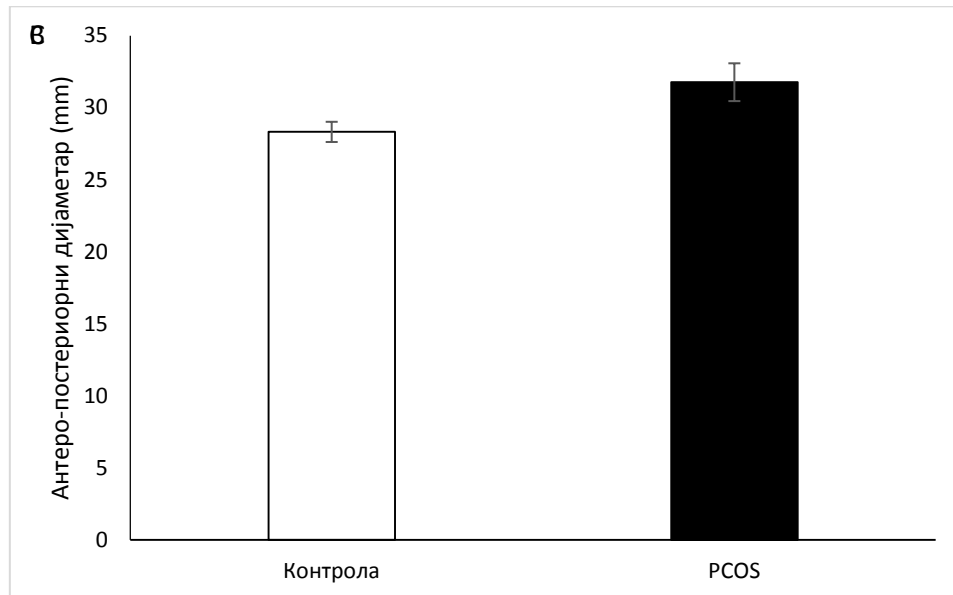
Трансверзални дијаметар јајника није статистички значајно измењен у PCOS групи у поређењу са контролном групом као што је приказано на графикону 9.



Графикон 9. Ултразвучни преглед јајника пацова. Трансверзални пресек јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM .

#### 4.1.4.3. Антеро-постериорни дијаметар јајника

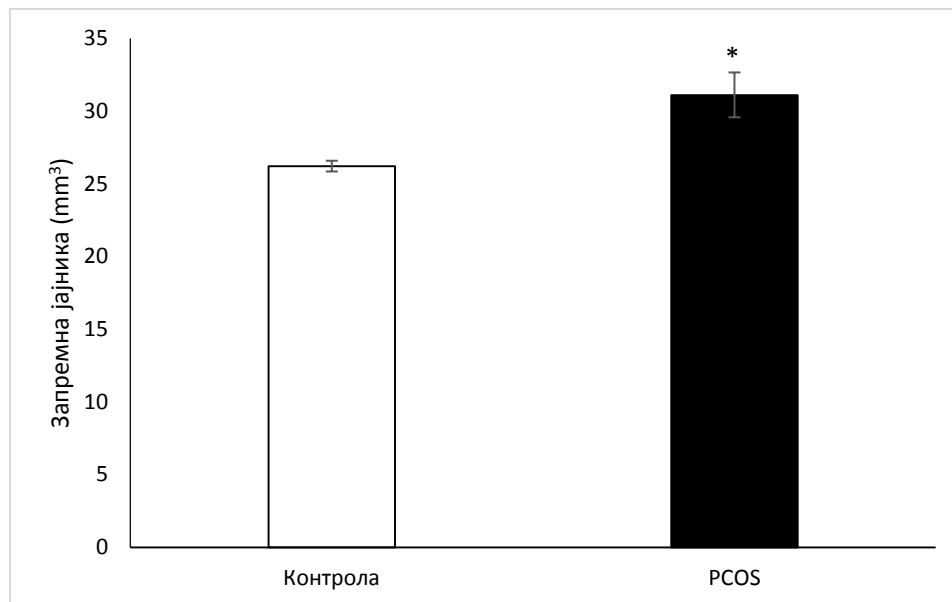
Антеро-постериорни дијаметар јајника није статистички значајно измењен у PCOS групи у поређењу са контролном групом као што је приказано на графикон 10.



Графикон 10. Ултразвучни преглед јајника пацова антеро-постериорни дијаметар јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM .

#### 4.1.4.4. Запремина јајника пацова

Запремина јајника је била значајно већа у PCOS групи ( $p < 0,05$ ) у поређењу са контролним вредностима што се може видети на графикону 11.

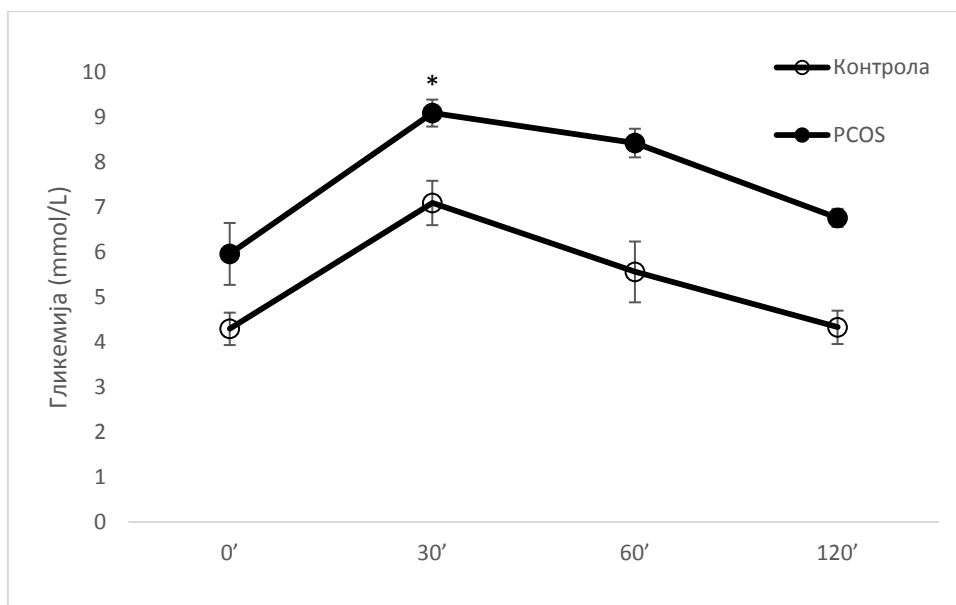


Графикон 11. Ултразвучни преглед јајника пацова – запремина јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM . \* статистичка значајност на нивоу  $p < 0,05$ , у поређењу са контролном групом.



#### 4.1.5. Ниво глукозе у крви пацова након изазваног PCOS

Примењени протокол није утицао на ниво глукозе у крви у базалним условима (ниво глукозе у крви наташте). Регистровали смо виши ниво глукозе у крви након 30 минута OGTT у групи PCOS у поређењу са контролним вредностима. Након 60 минута као и након 120 минута, ниво глукозе и у PCOS групи и у контролној групи били су приближно истих вредности . Графикон 12.



Графикон 12. Ниво глукозе у крви током теста оралног оптерећења глукозом. \* статистичка значајност на нивоу  $p < 0,05$ , у поређењу са контролном групом.

#### 4.1.6. Параметри оксидационог стреса код пацова након изазваног PCOS

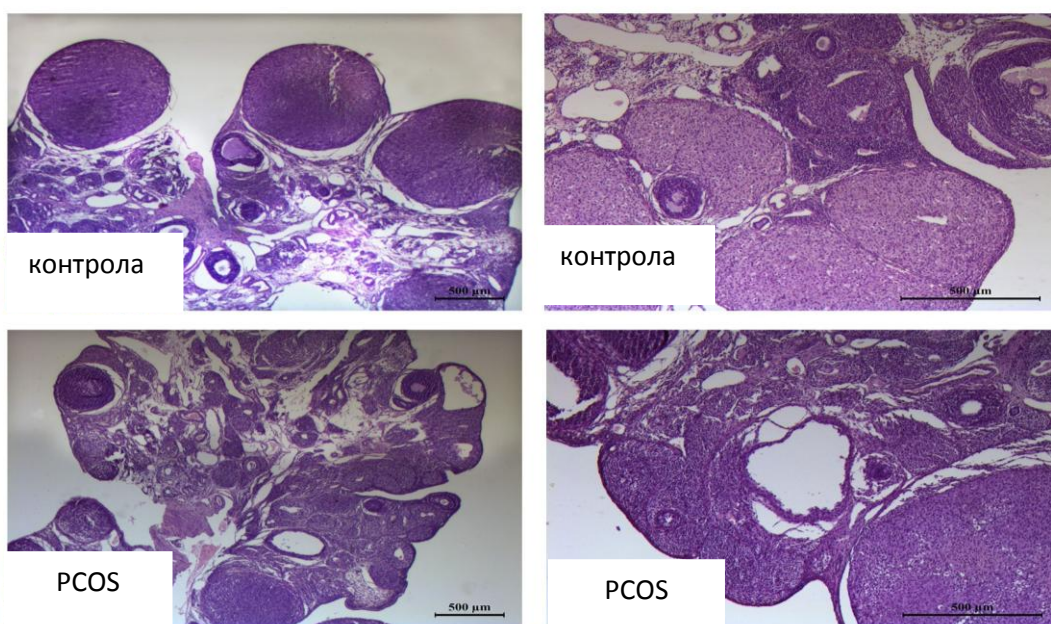
Вредности параметара оксидационог стреса су измењене након што је PCOS индукован код пацова. Као што је приказано у Табели 3, индекс липидне пероксидације и ниво  $O_2^-$  су значајно већи у PCOS групи ( $p < 0,01$  у поређењу са контролном групом). Ниво нитрита био је значајно већи у PCOS групи у поређењу са контролном групом ( $p < 0,01$ ). Ниво  $H_2O_2$  био је значајно нижи у PCOS групи ( $p < 0,01$  у поређењу са контролном групом). Када говоримо о антиоксидативном капацитету, наши резултати су показали смањење активности SOD са сигнификантно нижим вредностима у PCOS групи ( $p < 0,05$  у поређењу са контролном групом). Активност CAT је била нижа у PCOS групи у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ). С друге стране, нивои GSH су били сличних вредности у обе групе.

Параметри	Контролна група	PCOS група
<b>TBARS</b>	0.90±0.00	1.00±0.02 <sup>**</sup>
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	2091.63±65.64	2418.95±8.75 <sup>**</sup>
<b>O<sub>2</sub></b>	2.14±0.46	4.61±0.80 <sup>**</sup>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	8468.85±459.89	4263.38±54.26 <sup>**</sup>
<b>SOD</b>	25.78±3.27	12.21±2.78 <sup>*</sup>
<b>CAT</b>	338.71±14.22	249.79±25.81 <sup>*</sup>
<b>GSH</b>	65706.28±1412.98	62903.11±7800.83

Табела 3. Параметри оксидативног стреса у плазми пацова и лизату еритроцита. (n = 6). Вредности су представљене као средња вредност ± SEM. \* представља значајну разлику у поређењу са контролном групом на нивоу  $p < 0,05$ , \*\* представља значајну разлику у поређењу са контролном групом на нивоу  $p < 0,01$ .

#### 4.1.7. Хистологија јајника пацова након индукованог PCOS

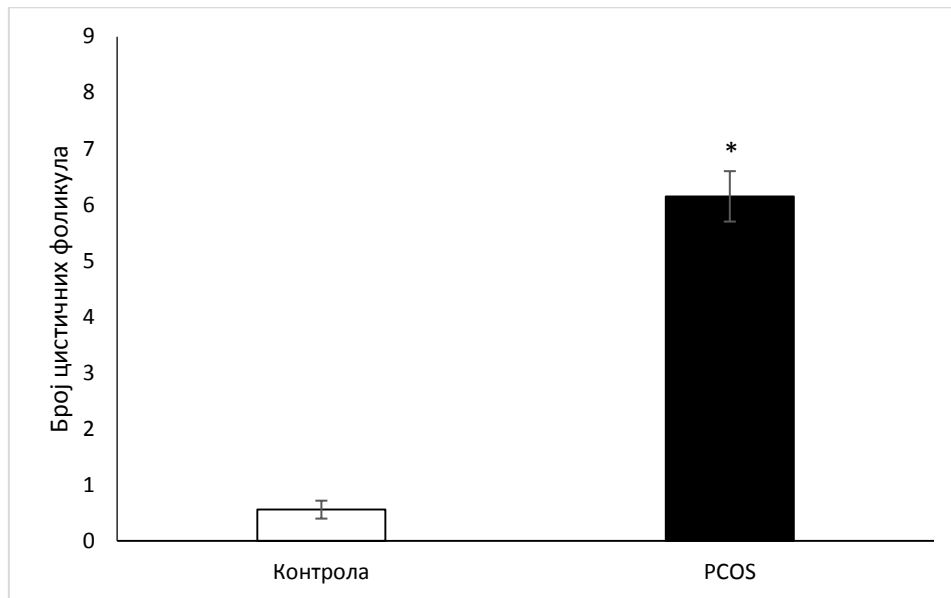
Као што је приказано на Слици 2., постоје разлике у морфологији и хистологији јајника код контроле и PCOS групе. Јајници из контролне групе су нормалне морфологије са различитим фазама развоја фоликула (примодријални, примарни, секундарни, терцијарни фоликули). У контролној групи нису примећене цистичне формације, док су жута тела присутна као показатељи да је у претходним циклусима долазило до овулације. С друге стране, PCOS група је имала значајно већи број цистичних фоликула, увећану строму и мањи број жутих тела у поређењу са контролном групом. На пресецима јајника из PCOS групе доминантно су присутни цистични фоликули. Особине цистичних фоликула су танак зид, са 4 или још мање слојева гранулоза ћелија, који приликом увида у серијске пресеке јајника не испољавају другачије карактеристике (као што је више слојева гранулоза ћелија), без присуства кумулуса и без видљивих ооцита. Штавише, видљиви атретични фоликули су били присутни у већој количини у PCOS групи, док је контролна група показала атрезију у јајницима у оквиру опсега физиолошког процеса.



Слика 2. Микрофотографије централних пресека јајника. Контролна група; PCOS група, Лева колона—увећање 2,5×; Десна колона—увећање 5×

#### 4.1.7.2. Број цистичних фоликула јајника пацова након изазваног PCOS

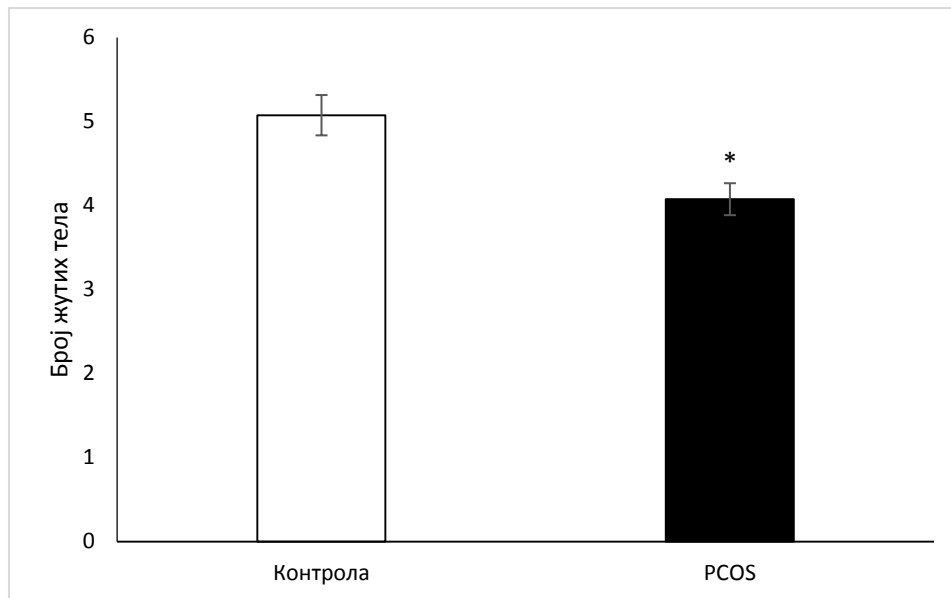
Број цистичних фоликула се значајно повећао након примењеног протокола ( $p < 0,01$ ) у поређењу са контролном групом што се може видети на графикону 13.



Графикон 13. Број цистичних фоликула. Стубићи представљају средње вредности ± SEM.; \* статистичка значајност на нивоу  $p < 0,05$ , у поређењу са контролном групом.

#### 4.1.7.3. Број жутих тела јајника пацова након индукције PCOS

Као што је приказано на графикону 14, у PCOS групи забележено је смањење ових формација у поређењу са контролом. ( $p < 0,05$ ).



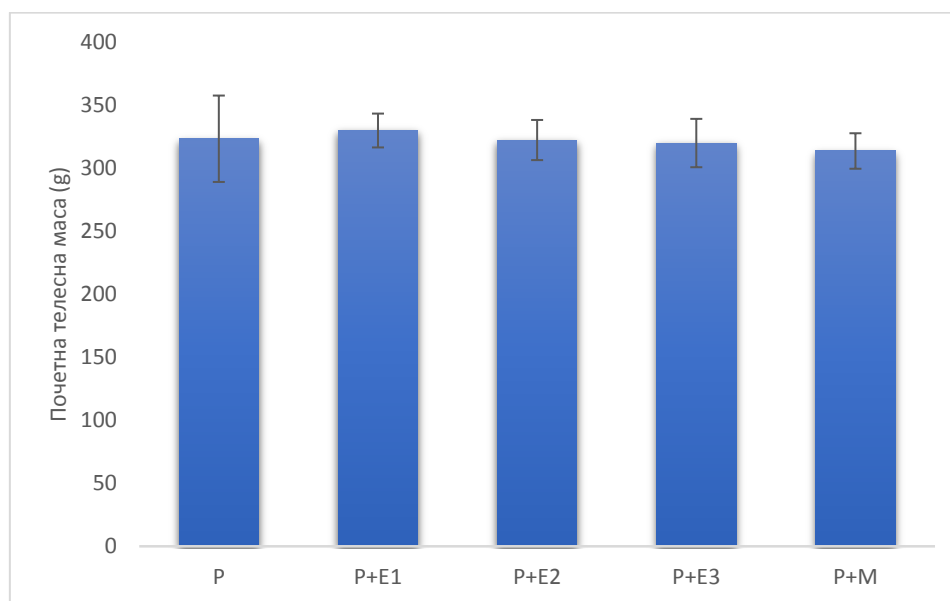
Графикон 14. Број жутих тела. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  СЕМ. \* статистичка значајност на нивоу  $p < 0,05$ , у поређењу са контролном групом.

## 4.2. ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПРИМЕНЕ ЕМПАГЛИФЛОЗИНА НА КАРАКТЕРИСТИКЕ PCOS КОД ПАЦОВА И ПОРЕЂЕЊЕ СА ПРИМЕНОМ МЕТФОРМИНА

4.2.1. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина у поређењу са применом метформина на морфометријске параметре

4.2.1.1. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина у поређењу са применом метформина на телесну масу

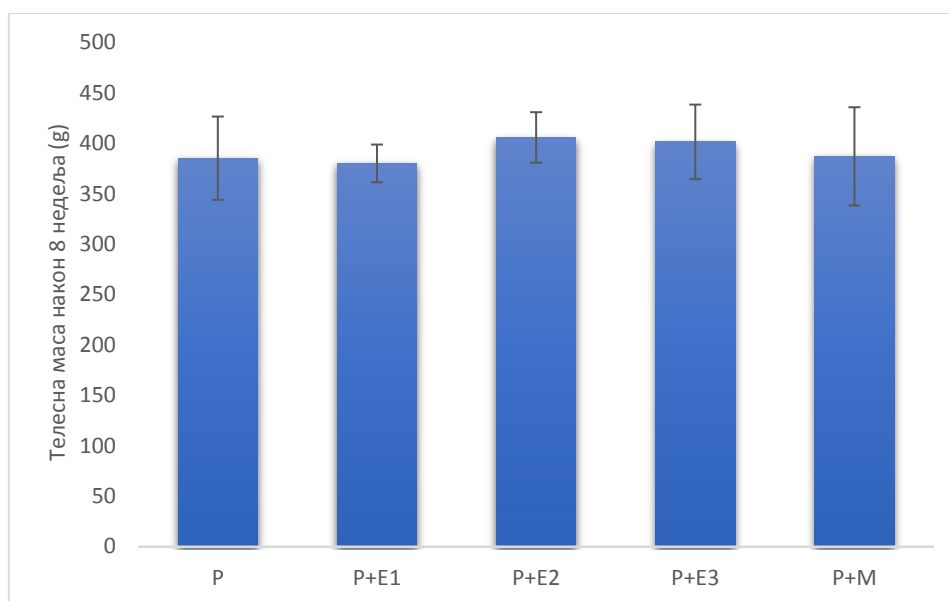
Мерење телесне масе пацова вршено је два пута недељно, током четири недеље третмана. На графикону 15 је приказана почетна телесна маса, која је приближно иста у свим испитиваним групама. Као што је приказано, нема статистички значајне разлике у почетној телесној маси група које су касније биле третиране емпаглифлозином у поређењу са Р групом, такође разлика није примећена ни у групама које су у даљем третману примале различите дозе емпаглифлозина у поређењу са Р групом као ни у групи која је преопредељења за терапију метформином у поређењу са Р групом. Такође не постоји ни значајна разлика ни у групама су потом биле третиране различитим дозама емпаглифлозина и метформина.



Графикон 15. Почетна телесна маса. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. Нема статистички значајне разлике ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2. Испитивање утицаја примене епаглифлозина у поређењу са применом метформина на телесну масу након 8 недеља третмана

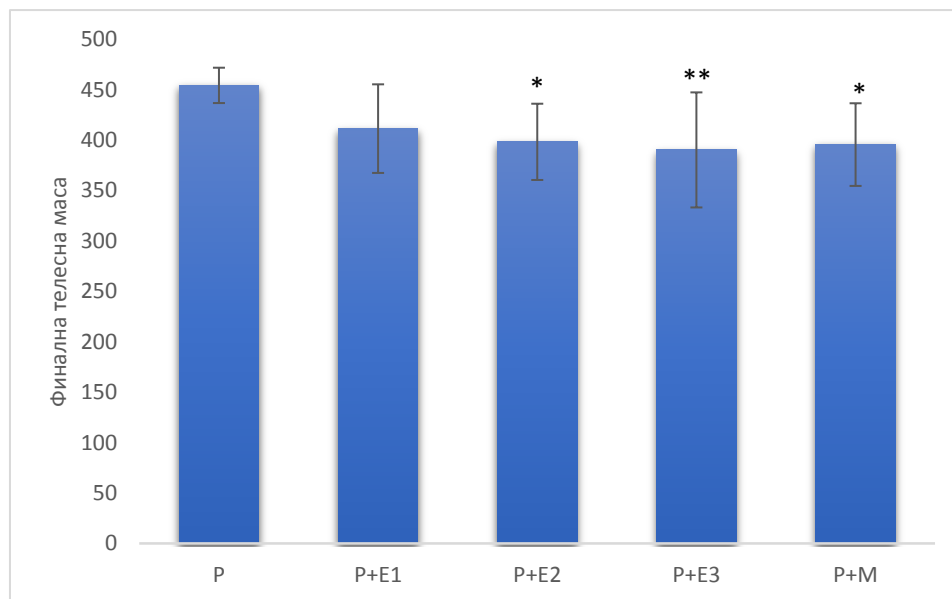
На графикону 16 је приказана телесна маса након 8 недеља третмана, након рандомизације животиња а пре започињања третмана епаглифлозином и метформиним. Телесна маса је била приближно иста у свим испитиваним групама. Као што је приказано на графикону 16 нема статистички значајне разлике у телесној маси група које су третиране епаглифлозином у поређењу са Р групом, као ни у примени метформина у поређењу са Р групом.



Графикон 16. Телесне масе након 8 недеља протокола третмана. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. Нема статистички значајне разлике ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.3. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина у поређењу са применом метформина на финалну телесну масу

На графикону 17. је приказана финална телесна маса. Постоји разлика у телесној маси у групама P+E2, P+E3 и P+M у поређењу са P групом, значајно је нижа телесна маса након примене емпаглифлозина у средњој и највећој дози као и након примене метформина у односу на P групу.

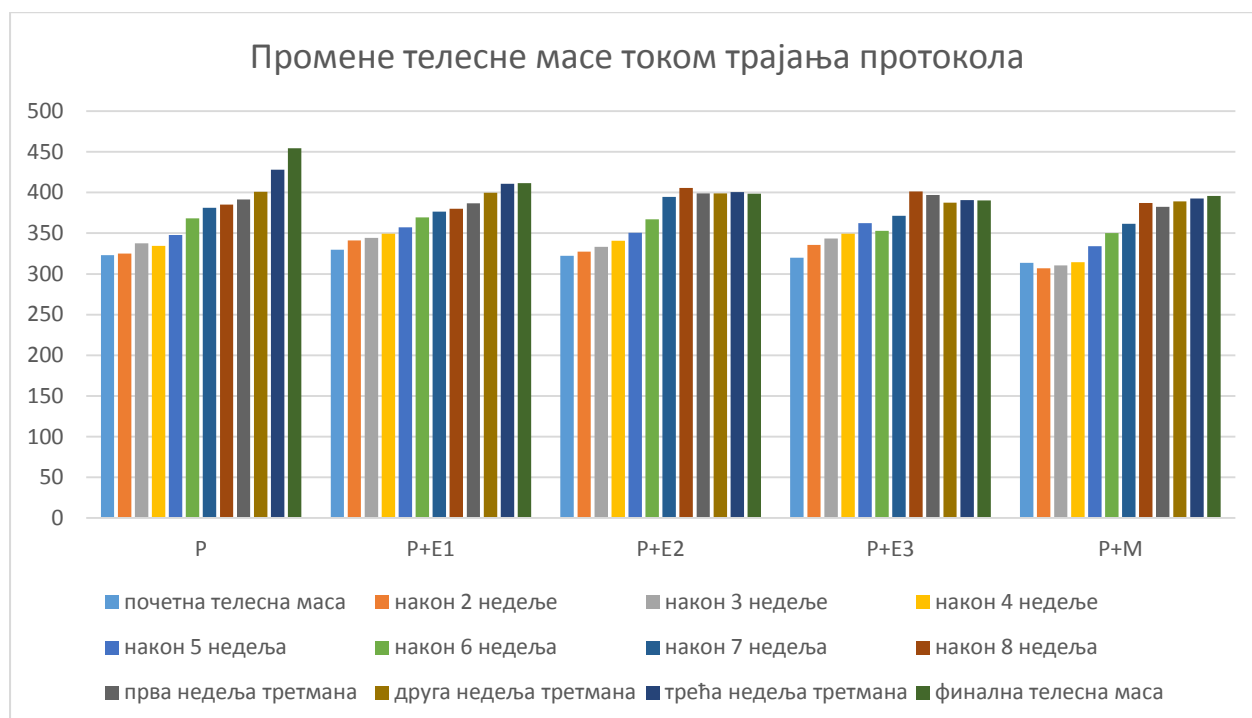


Графикону 17. Финална телесна маса пацова којима је индукован PCOS. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Статистички значајна разлика у односу на P групу ( $p < 0.05$ ). \*\* Статистички значајна разлика у односу на P групу ( $p < 0.01$ ).



#### 4.2.4. Промена телесне масе пацова током трајања протокола

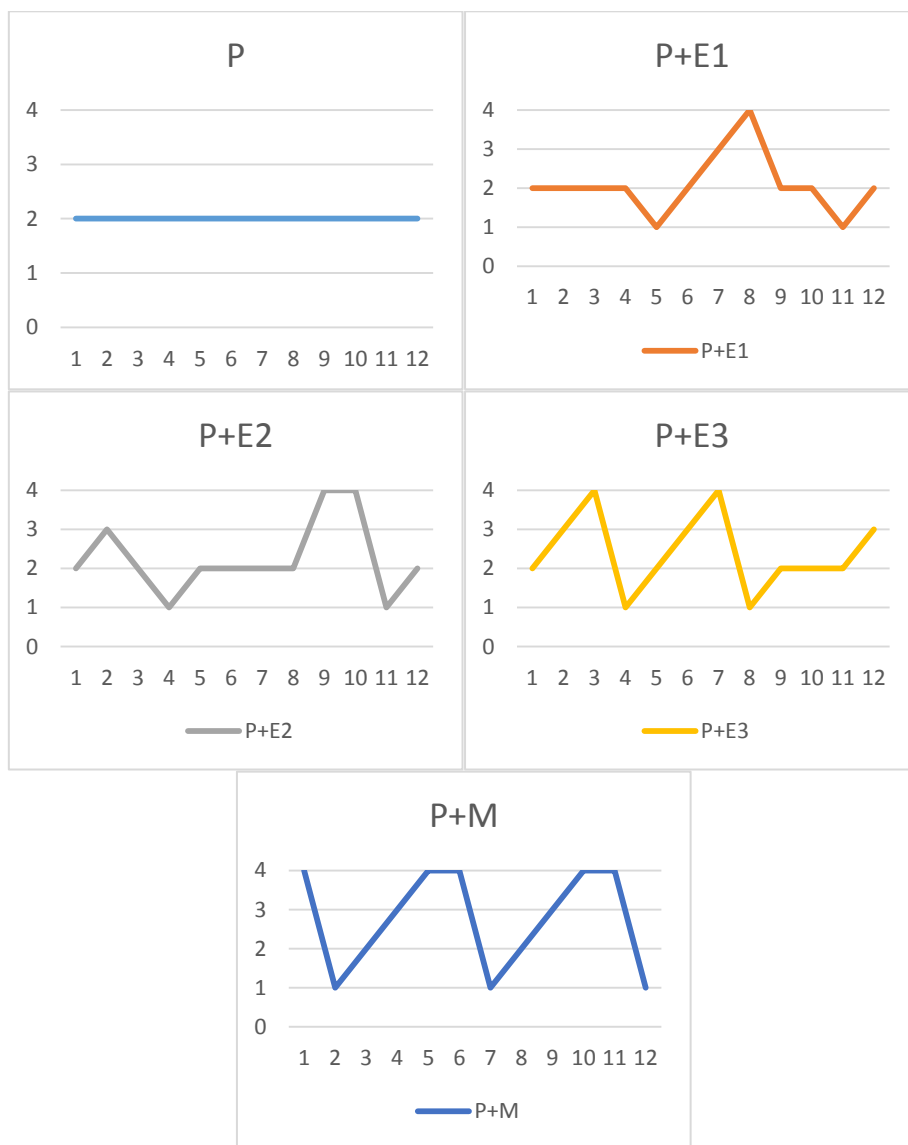
Током трајања експерименталног протокола није регистрована статистички значајна разлика у вредностима телесне масе када посматрамо појединачну групу. На графикону 18 је приказана телесна маса пацова и представљен је тренд повећана телесне масе током трајања протокола. У групи Р тренд повећања телесне масе је био највећи док су остале третиране групе такође имале позитиван тренд повећања телесне масе али је статистички значајно био мањи тренд повећања телесне масе.



Графикон 18. Промена телесне масе током трајања протокола у свим испитиваним групама.

#### 4.2.2. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина и метформина на еструсни циклус

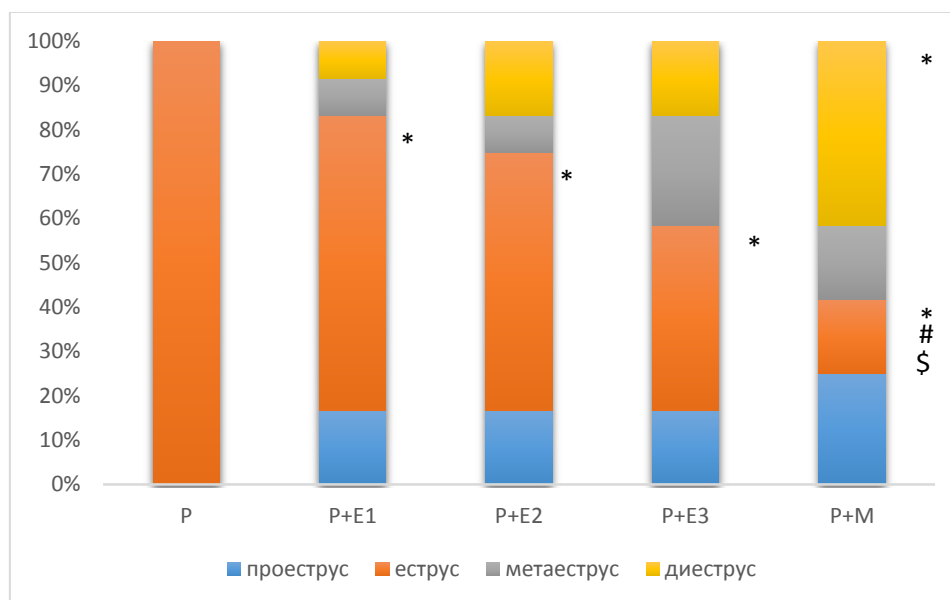
Као што је приказано на графикаон 19. пет репрезентативних животиња из сваке групе су након индукције PCOS биле иницијално све у еструсној фази циклуса. Р група је последњих 12 дана била у перзистентом еструсу док животиње третиране емпаглифлозином испољиле су тенденцију као успостављању регуларне цикличности еструса као и животиње третиране метформином.



Графикон 19. Промене у еструсном циклусу код 5 пацова са индукованим PCOS и након примењених третмана. 1- проеструс 2-еструс 3- метаеструс 4- диеструс.

Као што је приказано на графикону 20, фазе циклуса еструса су одређене и анализирание Хи-квадрат тестом. На дијаграму је приказана процентуална расподела. Статистичка анализа је показала да се дистрибуција фаза проеструса и метаеструса није разликовала међу испитиваним групама. Међутим, фаза еструса је била значајно више распоређена у Р групи у односу на све остале групе. Поред тога, постојао је већи удео фазе еструса у Р+Е1 и Р+Е2 у поређењу са Р+М групом, док је Р+Е3 показао сличну дистрибуцију као Р+М група. Штавише, фаза диеструса је била значајно више распоређена у Р+М фази, док су групе третиране ЕМРА показале сличну дистрибуцију дијаструса као Р+М група.

Графикон 20 приказује да је само контролна група имала све дане у диеструсној фази циклуса (100%), док су и остале животиње у одрђеном периоду имале диеструсну фазу циклуса али знатно мање. Група Р+Е1 је имала 60% дана у диеструсној фази циклуса, Р+Е2 је имала 55% дана у диеструсној фази циклуса Р+Е3 је имала 40% дана у диеструсној фази циклуса Р+М је имала 15% дана у диеструсној фази циклуса током дванаестдневне анализе.



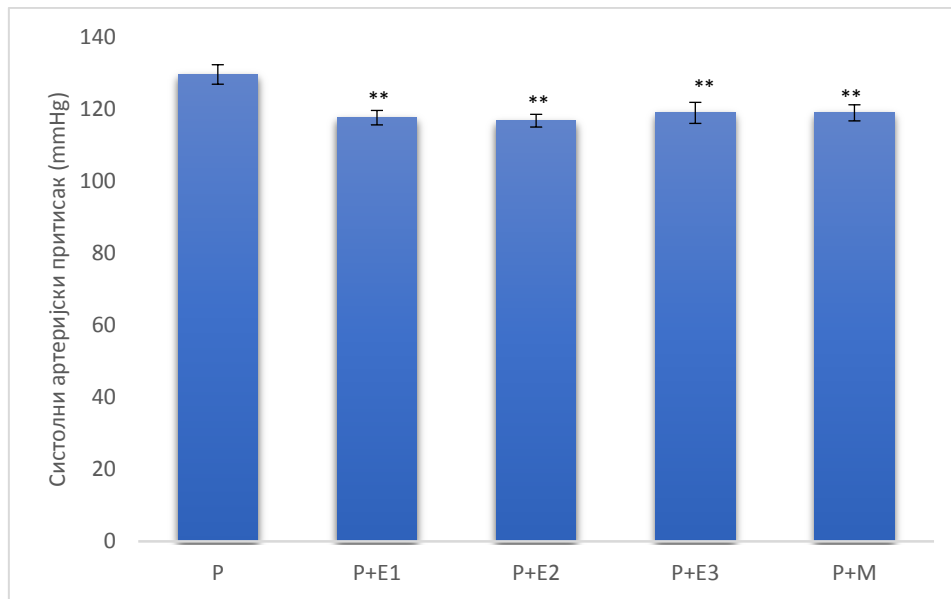
Графикон 20. Процентуална заступљеност трајања различитих фаза циклуса у испитиваним групама. \* статистички значајна разлика у односу на Р групу ( $p < 0.05$ ), # статистички значајна разлика у односу на Р+Е1 групу ( $p < 0.05$ ), \$ статистички значајна разлика у односу на Р+Е2 групу ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.3. Утицај примене емпглифлозина и примене метформина на крвни притисак

На крају екперименталног протокола мерен је крви притисак плетизмографијом из репне вене.

##### 4.2.3.1. Вредности систолног притиска

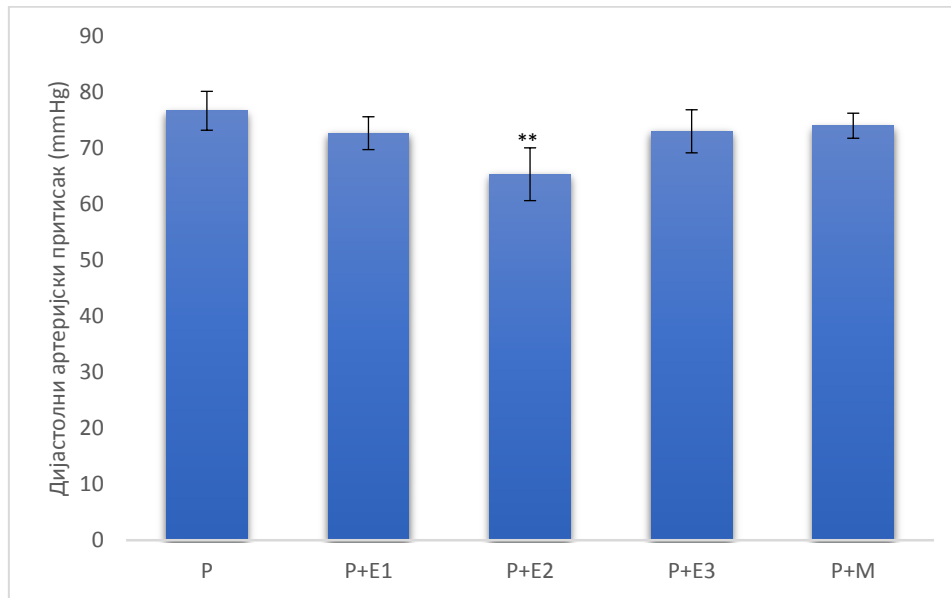
Све групе које су биле третиране емпглифлозином као и група третирана метформином забележиле су статистички значајно нижу вредност систолног притиска у поређењу са Р групом.



Графикон 21. Систолни притисак. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM . \*\* Постоји статитички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.3.2 Вредности дијастолног притиска

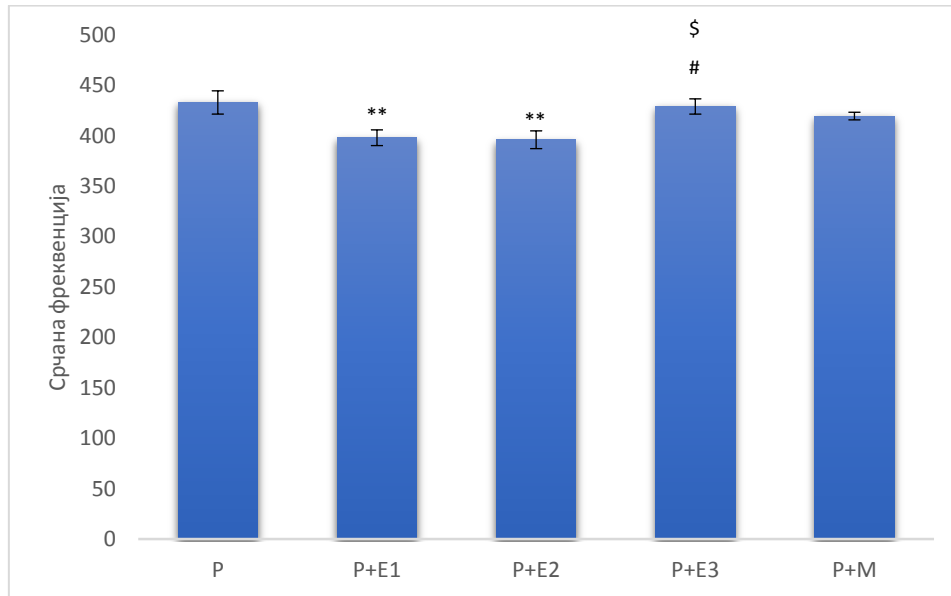
Постоји статитички значајна разлика између P+E2 групе у поређењу са P групом. У осталим групама које су примале емпаглифлозин као и у групи која је примала метформин није дошло до значајне промене вредности дијастолног притиска у односу на P групу.



Графикон 22. Дијастолни притисак. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM .  
\*\* Статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.3.4. Срчана фреквенција

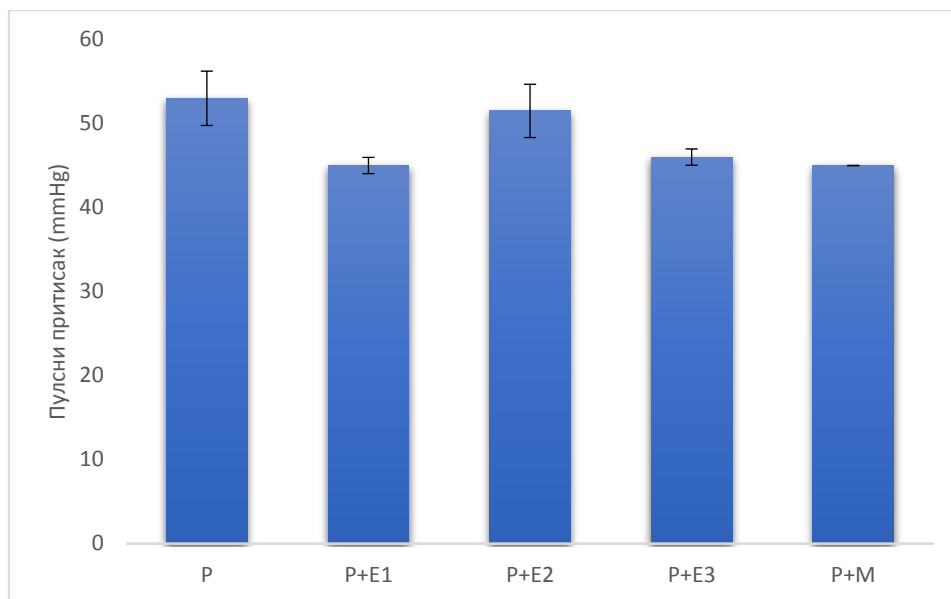
Као што је представљено на графикану 23, срчана фреквенција је нижа у групама у којима је примењена најнижа и средња доза емраглифлозина у односу на Р групу. Иако се група која је примила највећу дозу емпаглифлозина није значајно разликовала од Р групе када је у питању срчана фреквенција, ова група је показала значајно веће вредности срчане фреквенције у односу на обе ниже примењене дозе.



Графикон 23. Срчана фреквенција. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статитички значајна у поређењу са Р групом ( $p < 0,01$ ). # Постоји статитички значајна разлика у поређењу Р+Е1 ( $p < 0,05$ ), \$ Постоји статитички значајна разлика у поређењу са Р+Е2 ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.5. Пулсни притисак

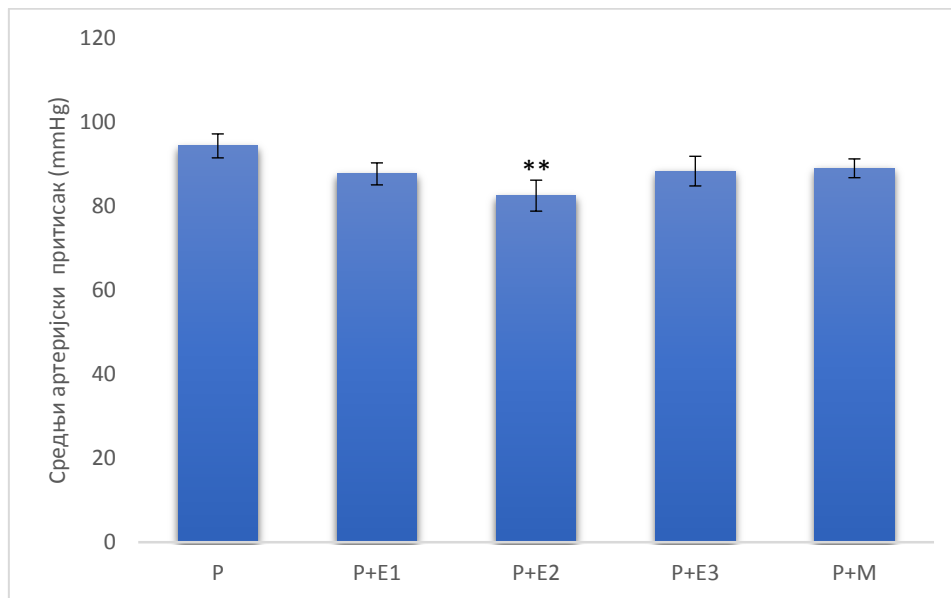
На графикону 24 је приказан пулсни притисак. Пулсни притисак се није се значајно разликовао између посматраних група.



Графикон 24. Пулсни притисак. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM . Не постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.3.6. Средњи артеријски притисак

Постоји статистички значајно снижење средњег артеријског притиска у Р+Е2 групи у поређењу са Р групом што је приказано на графикону 25. Остале групе Р+Е1, Р+Е3 и Р+М нису показале статистички значајну разлику у поређењу са Р групом као ни у међусобном поређењу.



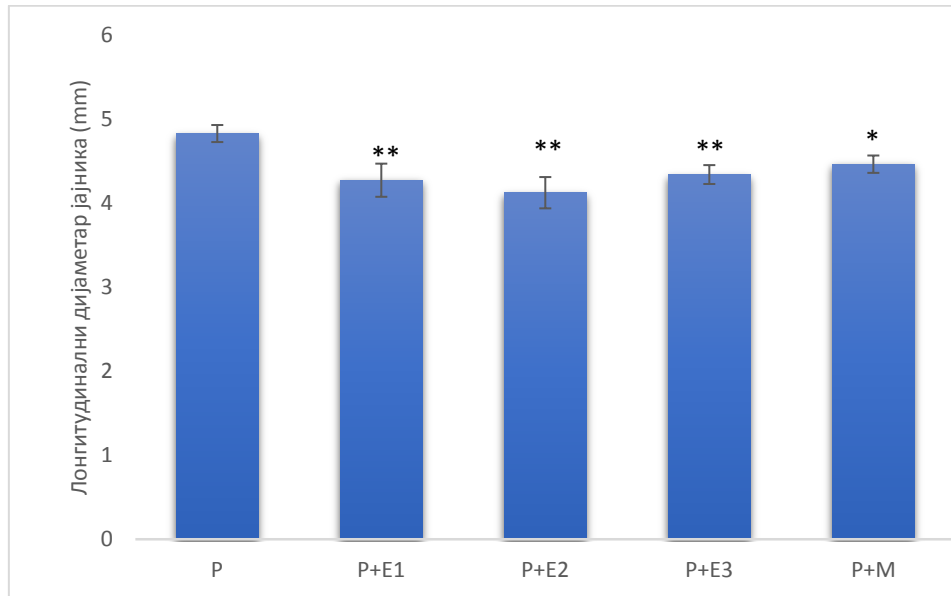
Графикон 25. Средњи артеријски притисак. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ )



#### 4.2.4. Утицај примене емпглифозина и примене метформина на ехосонографске параметре јајника

##### 4.2.4.1. Лонгитудинални дијаметар јајника

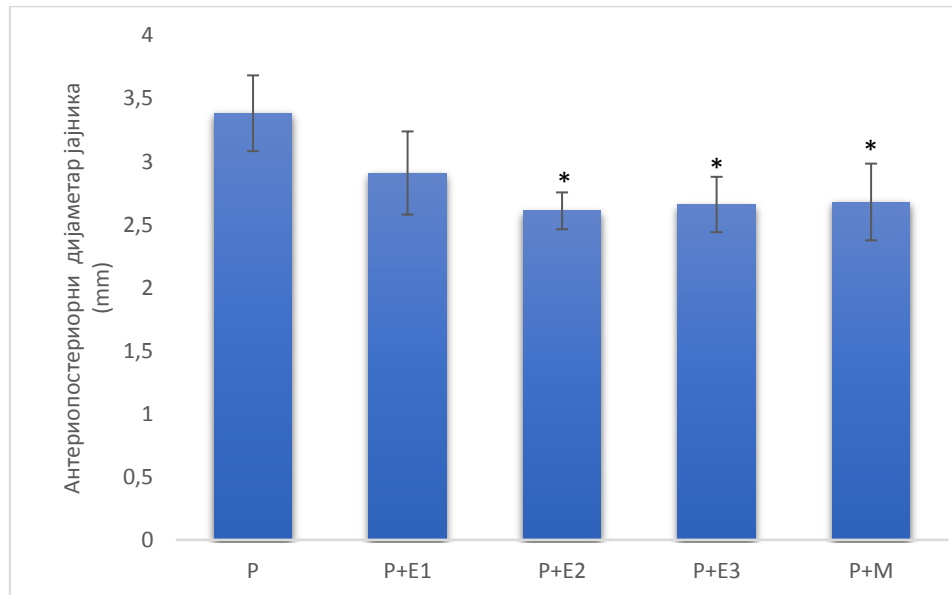
Све третиране групе забележиле су мањи лонгитудинани дијаметар јајника у поређењу са Р групом.



Графикон 26. Промена величине лонгитудиналног дијаметра јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ) \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.4.2. Антериопостериорни дијаметар јајника

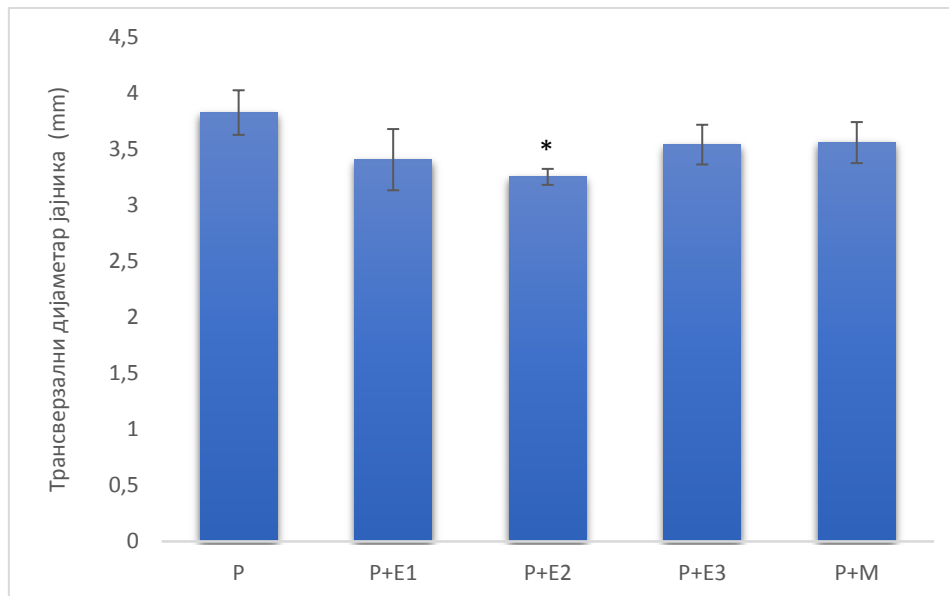
Антериопостериорни дијаметар јајника је био статистички значајно нижи у P+E2, P+E3, P+M групама у поређењу са P групом.



Графикон 27. Антериопостериорни дијаметар јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.4.3. Трансверзални дијаметар јајника

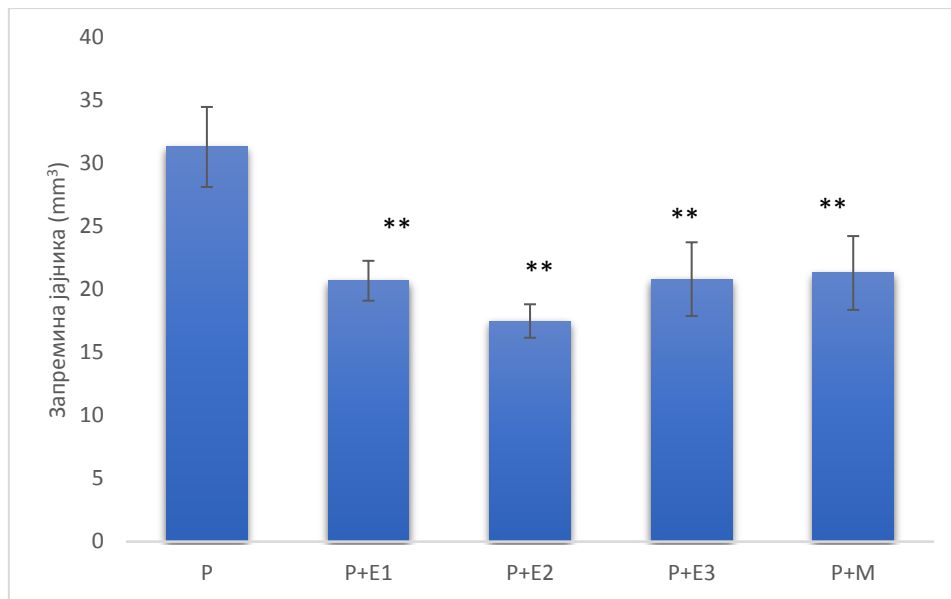
Трансверзални дијаметар јајника био је мањи у Р+Е2 групи у поређењу са Р групом. У осталим третираним групама емпаглифлозин и метформин нису имали ефекат у смањењу трансверзалног дијаметра јајника.



Графикон 28. Трансверзални дијаметар јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.4.4. Запремина јајника

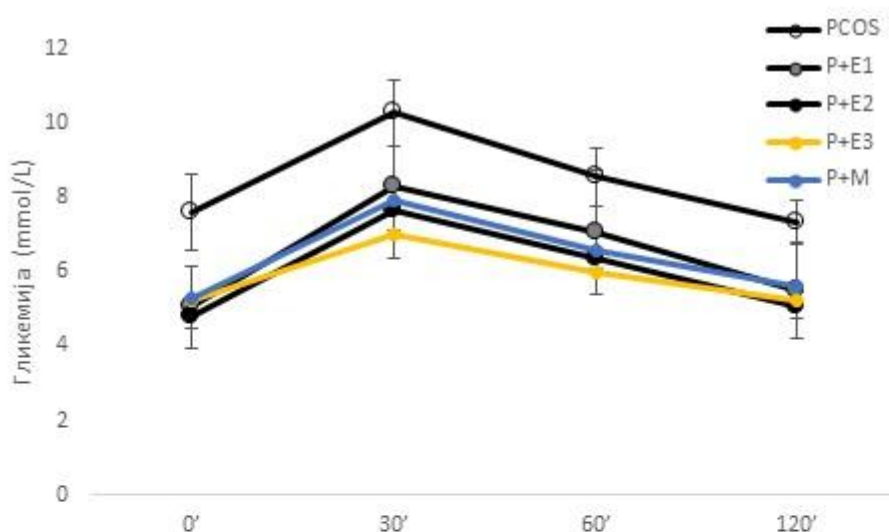
У свим третираним групама дошло је до смањења запремине јајника у поређењу са Р групом.



Графикон 29. Запремина јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.5. Испитивања утицаја примене третмана емпаглифлозина и примене метформина на регулацију гликемије

Базалне вредности гликемије у нултом минути статистички су се значајно разликовале између испитиваних група у односу на Р групу ( $p < 0.01$ ). Вредности гликемије у 30 минути су се такође статистички значајно разликовале у односу на Р групу ( $p < 0.01$ ). У 30 минути показана је и статистички значајно нижа вредност гликемије код Р+Е3 групе у односу на Р+Е1, Р+Е2, Р+М  $p < 0.05$ . Измерене вредности гликемије испитиваних група Р+Е1, Р+Е2, Р+Е3 и Р+М у 60 минути су статистички значајно разликовале у односу на Р групу  $p < 0.01$ . Поред тога, показана је статистички значајно нижа вредност гликемије у групи Р+Е3 у односу на групу Р+Е1  $p < 0.05$ . У 120 минути показана је статистички значајна разлика гликемије испитиваних група Р+Е1, Р+Е2, Р+Е3 и Р+М у односу на Р групу ( $p < 0.01$ ).



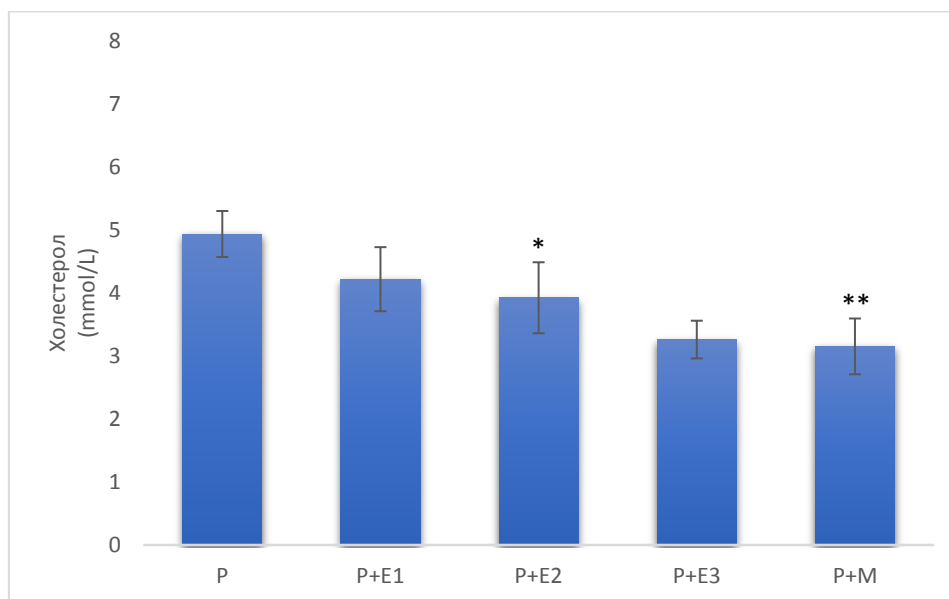
0'	30'	60'	120'
P vs P+E1 **	P vs P+E1 **	P vs P+E1 **	P vs P+E1 **
P vs P+E2 **	P vs P+E2 **	P vs P+E2 **	P vs P+E2 **
P vs P+E3 **	P vs P+E3 **	P vs P+E3 **	P vs P+E3 **
P vs P+M **	P vs P+M **	P vs P+M **	P vs P+M **
	P+E3 vs P+E1 *	P+E3 vs P+E1 *	
	P+E3 vs P+E2 *		
	P+E3 vs P+M *		

Слика 3. Промене гликемије током оралног теста оптерећења глукозом

#### 4.6.1. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на липидни статус

##### 4.6.1.1. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво холестерола у серуму

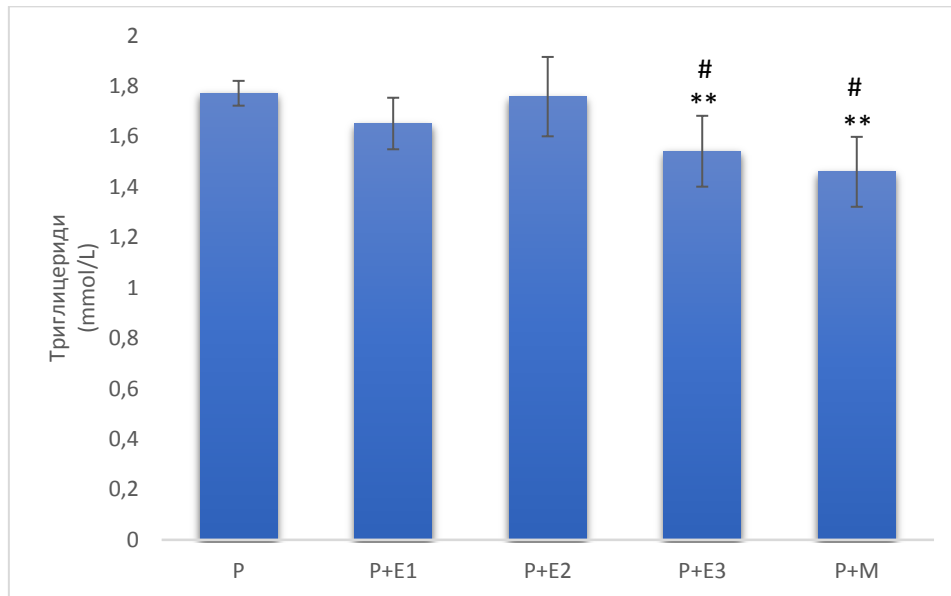
Као што је приказано на графикону 30 ниво холестерола у серуму је статистички значајно нижи код пацова који су примили средњу дозу емпаглифлозина (P+E2 група) у поређењу са P групом која није била на третману. Такође и код групе која је била на терапији метформиним забележен је нижи ниво холестерола (група P+M) у поређењу са P групом.



Графикон 30. Ниво холестерола у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ )

#### 4.6.1.2. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво триглицерида у серуму

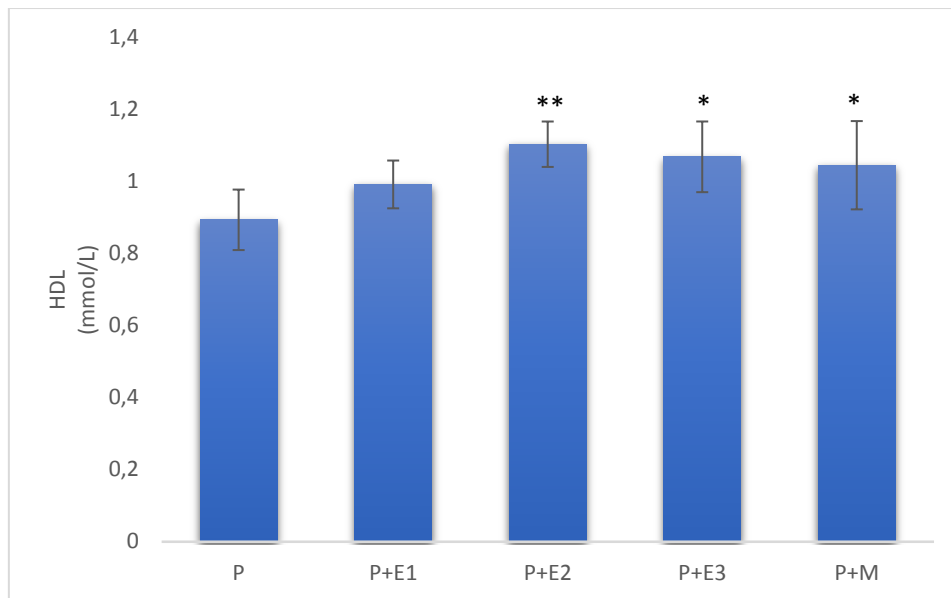
Ниво триглицерида у серуму је статистички значајно нижи код пацова који су примили највећу дозу емпаглифлозина (P+E3 група) у поређењу са P групом која није била на третману. Такође, и у групи која је била на терапији метформиним забележен је статистички значајно нижи ниво триглицерида (група P+M) у поређењу са контролном групом. Групе P+E3 и P+M имале су статистички значајно нижи ниво триглицерида у у серуму у односу на P+E1 групу.



Графикон 31. Ниво триглицерида у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ) # Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E1 групом ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6.1.3. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво липопротеина велике густине у серуму (HDL)

Сермунска концентрација HDL код пацова је била статистички значајно већа након примењене терапије емпаглифлозином у средњој и највећој дози као и након терапије метформином у поређењу са P групом која није била на третману.

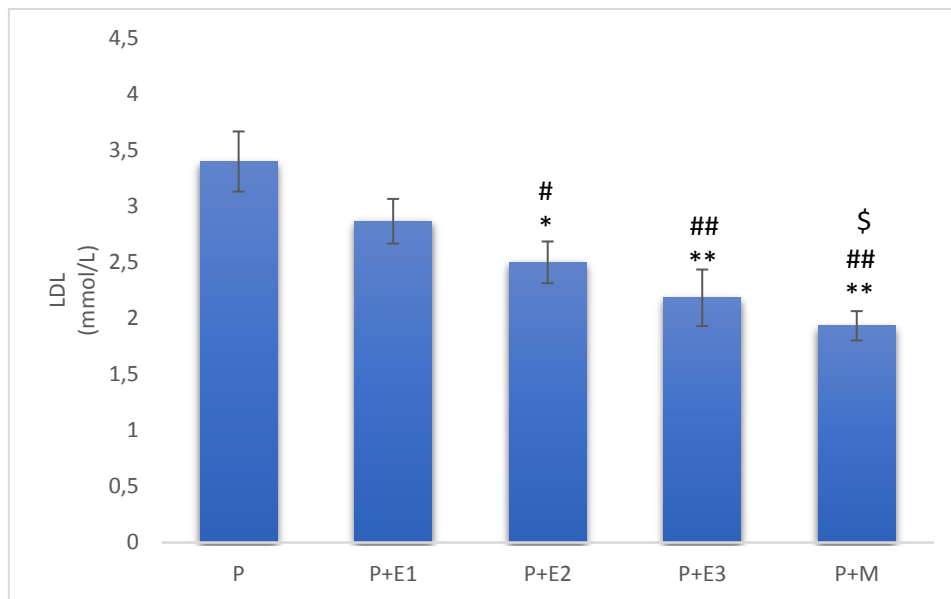


Графикон 32. Ниво липопротеина велике густине у серуму (HDL). Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ) \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.05$ ).



#### 4.6.1.4. Утицај примене емпглифлозина и метформина на ниво липопротеина мале густине у серуму (LDL)

Само група са најмањом примењеном дозом емпглифлозина P+E1 није забележила статистички знајано нижи ниво LDL у серуму у поређењу са P групом. Остале групе које су биле на третману емпглифлозином у средњој и највишој дози (P+E2, P+E3 групе) као и група третирана метформином (P+M) забележиле су статистички значајно смањење нивоа LDL у серуму у поређењу са P групом. Групе P+E2, P+E3, P+M забележиле су статистички значајно нижи ниво LDL у серуму у поређењу са P+E1 групом. Група P+M забележила је статистички значајно нижи ниво LDL у серуму у поређењу са P+E2 групом.

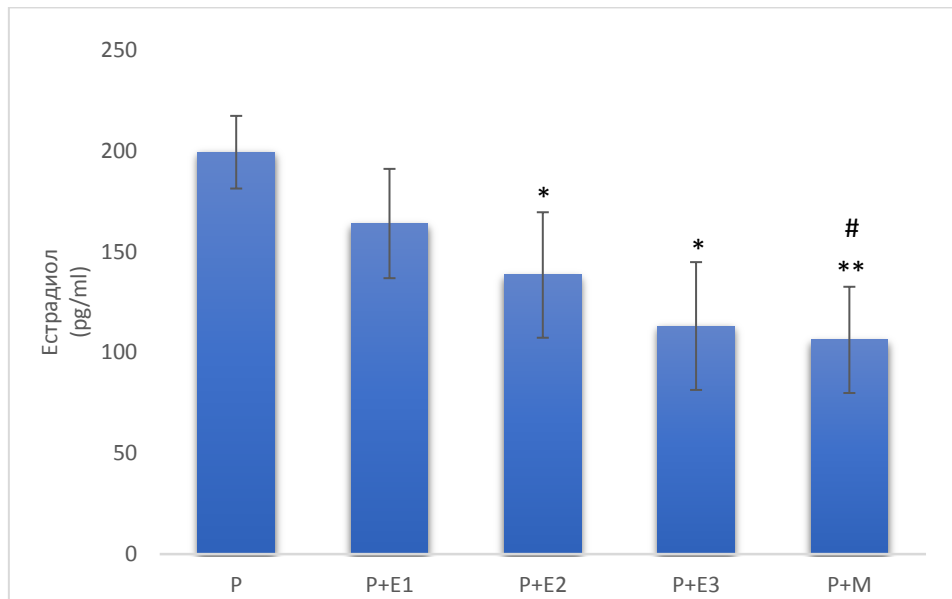


Графикон 33. Ниво липопротеина мале густине у серуму (LDL). Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ) # Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E1 групом ( $p < 0.05$ ). ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E1 групом ( $p < 0.01$ ), \$ Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E2 групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.6.2. Утицај примене емпглифлозина и метформина на хормонски статус пацова

##### 4.6.2.1 Утицај примене емпглифлозина и метформина на ниво естрадиола у серуму

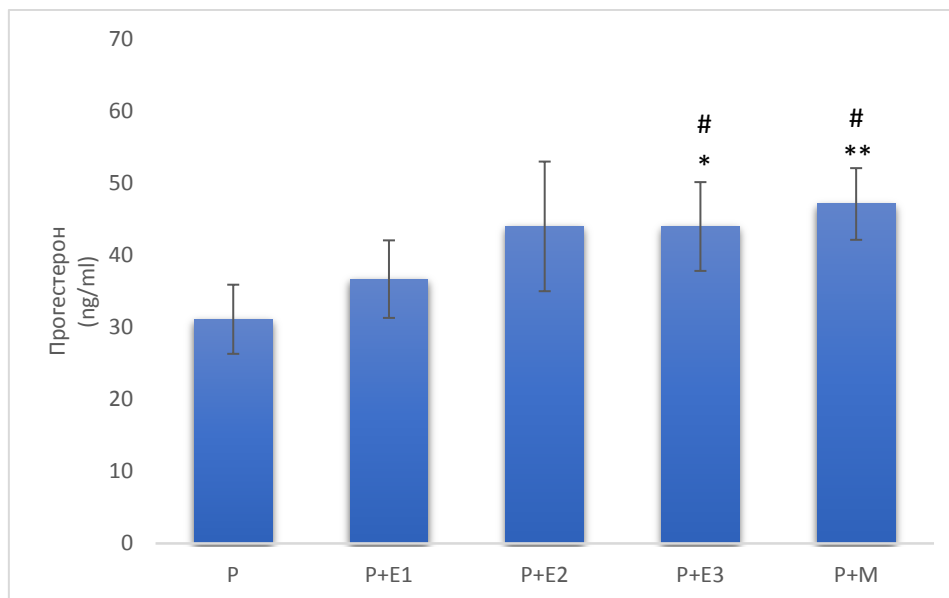
Ниво естрадиола у серуму био је статистички значајно нижи приликом терапије средњом и највећом дозом емпглифлозина као и након терапије метформином у поређењу са Р групом. Група третирана метформином забележила је статистички значајно нижи ниво естрадиола у серуму у поређењу са групом третираном најмањом дозом емпглифлозина.



Графикон 34. Ниво естрадиола у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ) # Постоји статистички значајна разлика у поређењу Р+М са Р+Е1 групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.6.2.2 Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво прогестерона у серуму

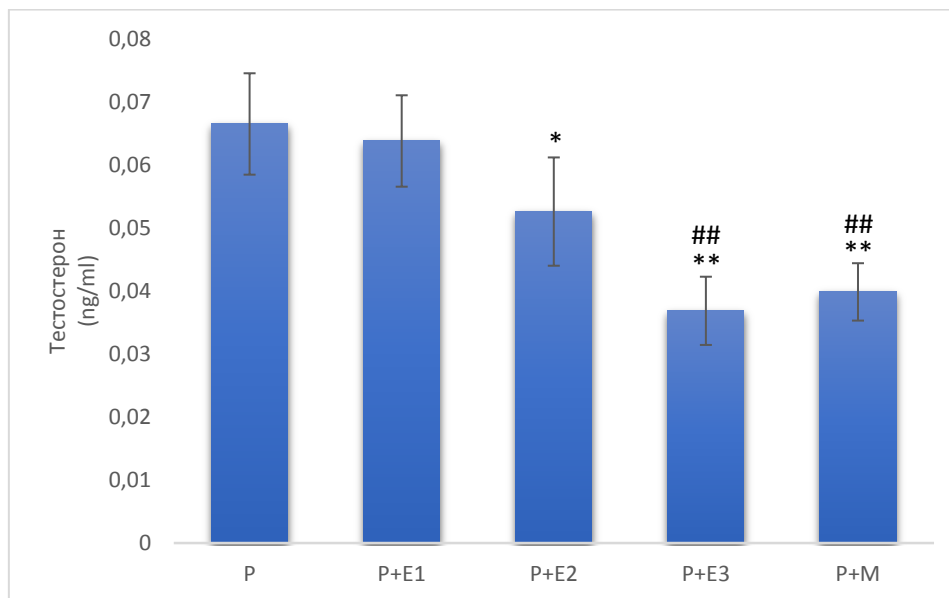
Ниво прогестерона у серуму статистички значајно је виши у Р+Е3 и Р+М групи у поређењу са Р групом. Такође, ове групе су показале статистички значајно виши ниво прогестерона у серуму у поређењу са Р+Е1 групом.



Графикон 35. Ниво прогестерона у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ) # Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е1 групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.6.2.3. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво тестостерона у серуму

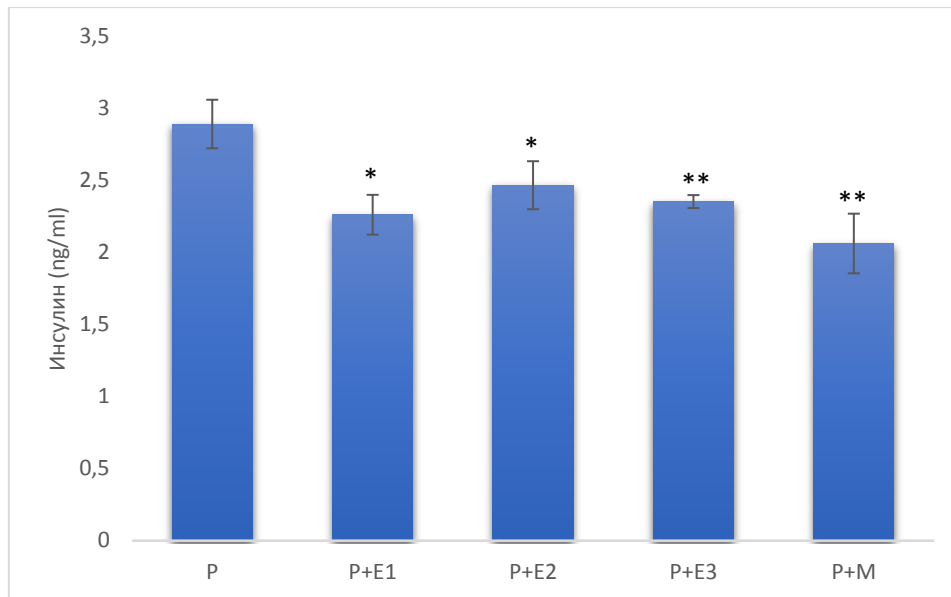
Групе третиране емпаглифлозином у средњој и највишој дози (P+E2, P+E3 групе) као и група третирана метформином (P+M група) показале су статистички значајно нижи ниво тестостерона у серуму у поређењу са P групом. Групе P+E3 и P+M забележиле су статистички значајно нижи ниво простерона у серуму у поређењу са P+E1 групом.



Графикон 36. Ниво тестостерона у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ) ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E1 групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.6.2.4. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво инсулина у серуму

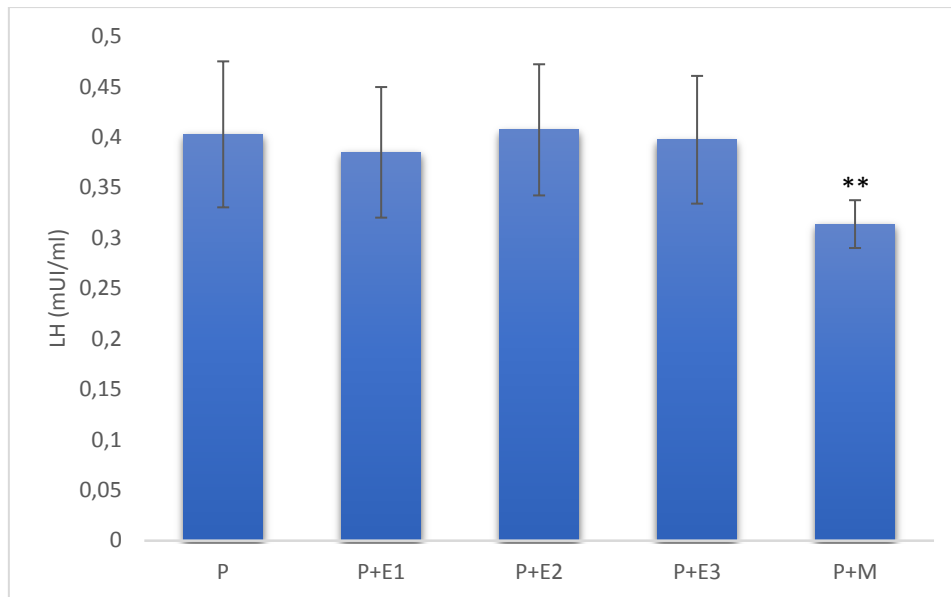
Све групе третиране емпаглифлозином као и група третирана метформином, показале су статистички значајно нижи ниво инсулина у серуму у поређењу са Р групом.



Графикон 37. Ниво инсулина у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.6.2.5. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво ЛН у серуму

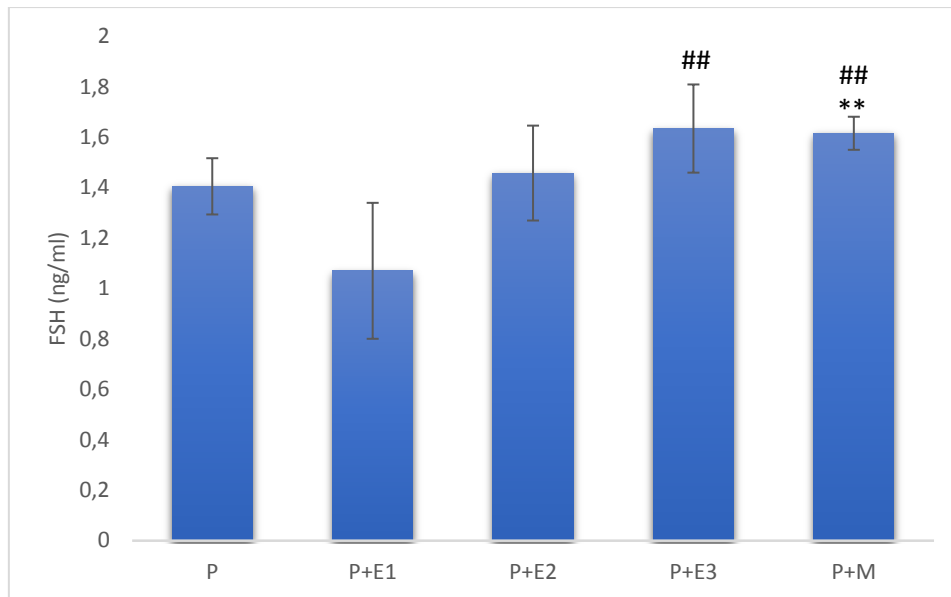
Вредности ЛН у серуму нису се статистички значајно разликовале у групама које су биле третиране емпаглифлозином, само примена метформина довела је до статистички сигнификантног снижења вредности ЛН у серуму у поређењу са Р групом.



Графикон 38. Ниво ЛН у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ )

#### 4.6.2.6. Утицај примене емпаглифлозина и метформина на ниво FSH у серуму

Примена метформина довела је до статистички сигнификантног повећања вредности FSH у серуму у поређењу са P групом. Поред тога, групе P+E3 и P+M забележиле су статистички већи ниво FSH у серуму у поређењу са P+E1 групом.

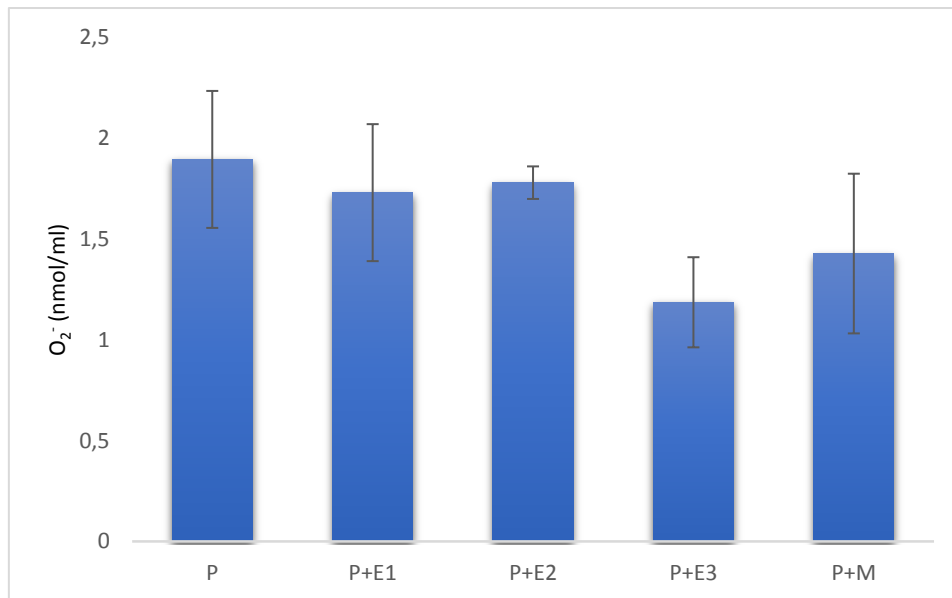


Графикон 39. Ниво FSH у серуму. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ). ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу P+E3 као и P+M са P+E1 групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.6.3. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на оксидациони стрес из крви

##### 4.2.6.3.1. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на концентрацију $O_2^-$

Као што је приказано на графикону 40, ниво  $O_2^-$  нису се разликовали између група.

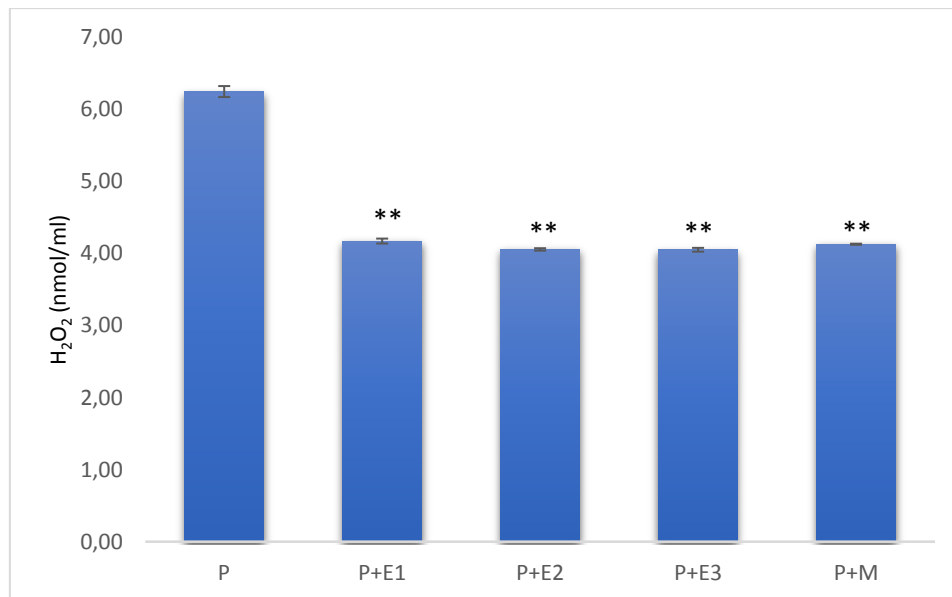


Графикон 40. Ниво  $O_2^-$ . Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. Не постоји статистички значајна разлика у испитиваним групама ( $p > 0,05$ ).



#### 4.2.6.3.2. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на концентрацију $H_2O_2$

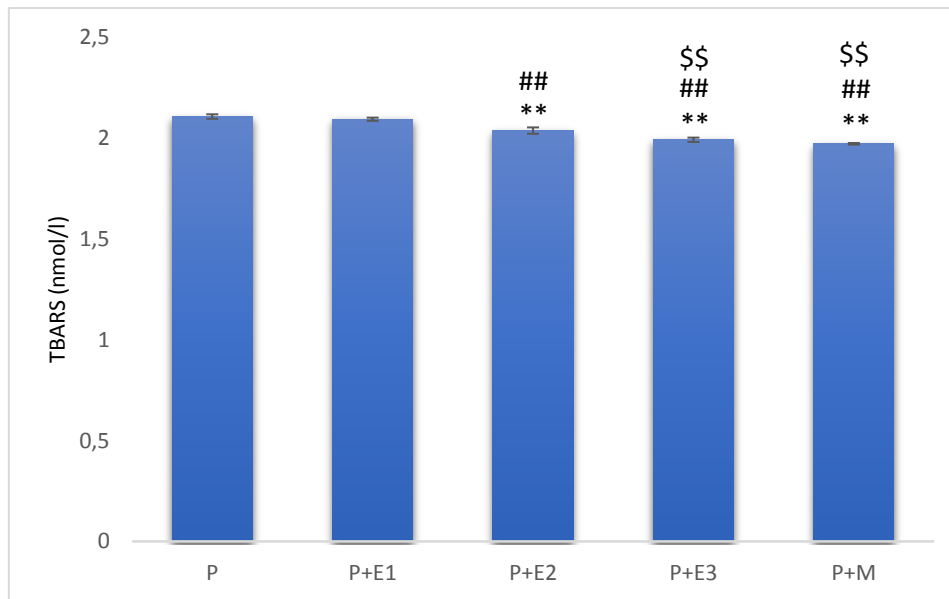
На графикану 41 је приказана концентрација  $H_2O_2$  која је била статистички значајно већа у Р групи у поређењу са свим третираним групама. Није постојала статистички сигнификантна разлика између група које су примале различите дозе емпаглифлиозина у међусобном поређењу као ни у поређењу са групом која је била третирана са метформином.



Графикон 41. Концентрација  $H_2O_2$ . Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\*. Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.6.3.3. Утицај примене емпглифлозина и примене метформина на концентрацију TBARS

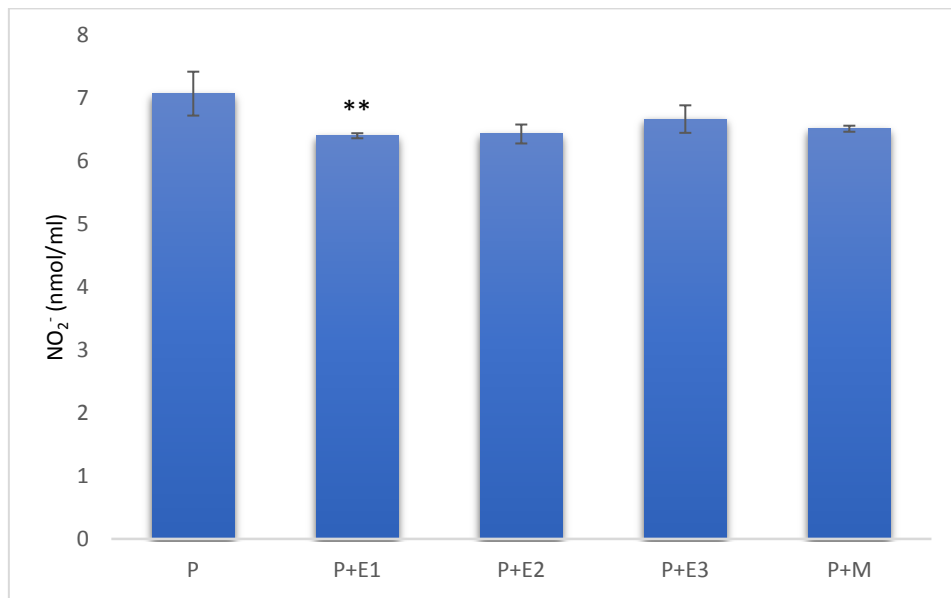
Ниво TBARS је био значајно нижи у средњој и највишој дози емпглифлозина, као и у групи третираној метформином у поређењу са Р групом, и у поређењу са најнижом дозом емпглифлозина. Штавише, највећа доза група које су третиране емпглифлозином и метформином показале су нижи ниво TBARS у поређењу са средњом дозом емпглифлозина.



Графикон 42. Концентрација TBARS. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM  
\*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ). ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е1 групом ( $p < 0.01$ ). \$\$ Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е2 групом ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2.6.3.4. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на концентрацију $\text{NO}_2^-$

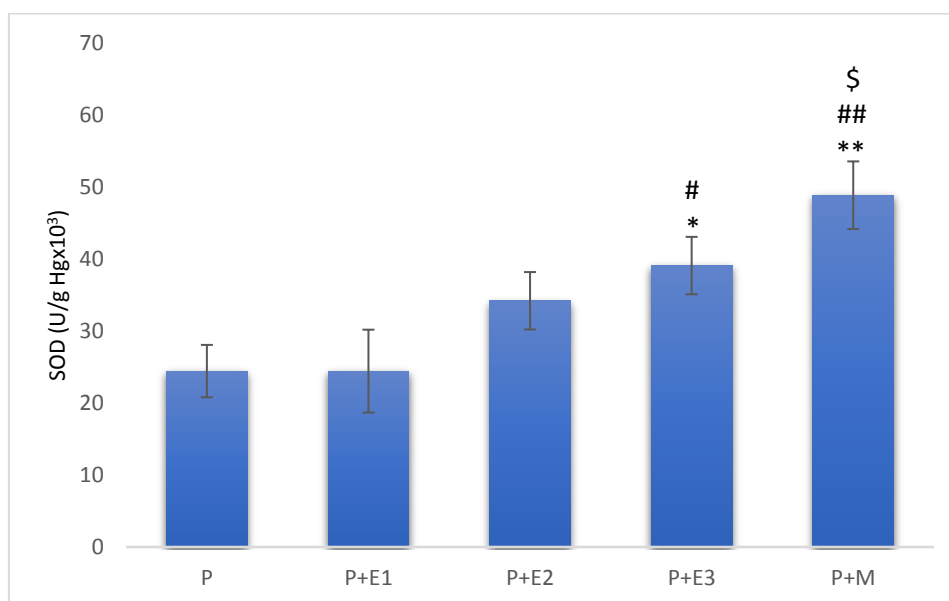
Ниво нитрита је значајно смањен само код групе третиране најнижом дозом емпаглифлозина у поређењу са Р групом . Веће дозе емпаглифлозина као и метформин нису довеле до статистички сигнификантног снижења нитрата у крви.



Графикон 43. Ниво  $\text{NO}_2^-$  Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.6.3.5. Утицај примене емпглифлозина и примене метформина на активност SOD

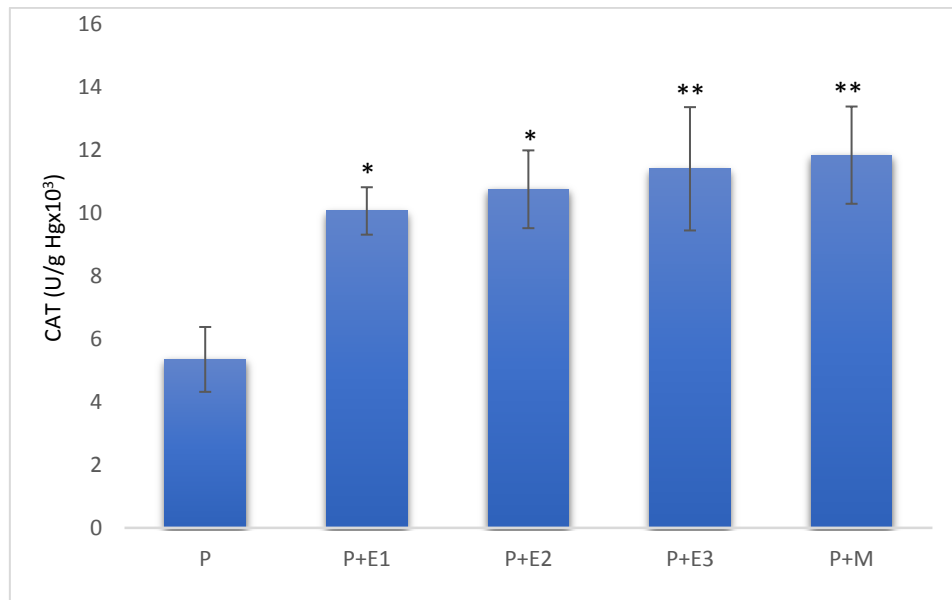
Антиоксидативни одбрамбени систем је био измењен након примењених третмана. Активност SOD је била значајно већа у групама које су третиране највећом дозом емпглифлозина и метформиним у поређењу са Р групом, као и у групи која је третирана најнижом дозом емпглифлозина. Штавише, активност SOD је била значајно виша у групи која је третирана метформиним у поређењу са највишом дозом групе третиране емпглифлозином ( $p < 0,05$ ).



Графикон 44. Промена активности SOD након примењених третмана. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0,05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0,01$ ) # Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е1 групом ( $p < 0,05$ ). ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е1 групом ( $p < 0,01$ ). \$ Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е3 групом ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.6.3.6. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на активност САТ

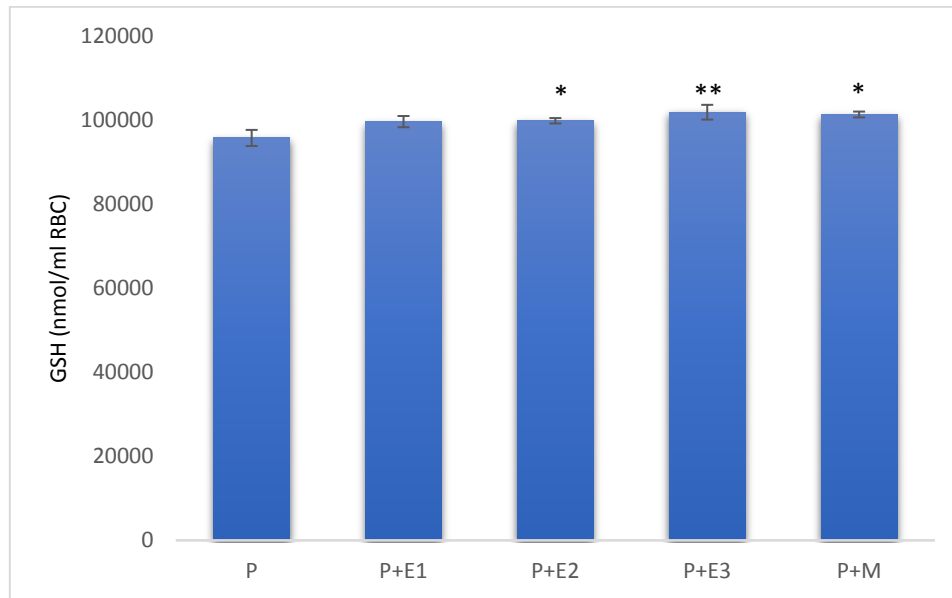
Активност САТ је била значајно већа у свим третираним групама у поређењу са Р групом.



Графикон 45. Активност САТ. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ )

#### 4.2.6.3.7. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на активност GSH

Концентрација GSH је била статистички значајно виша у средњој и највишој дози групе која је третирана емпаглифлозином и као и метформином у поређењу са Р групом, што је и приказано на графикону 46.

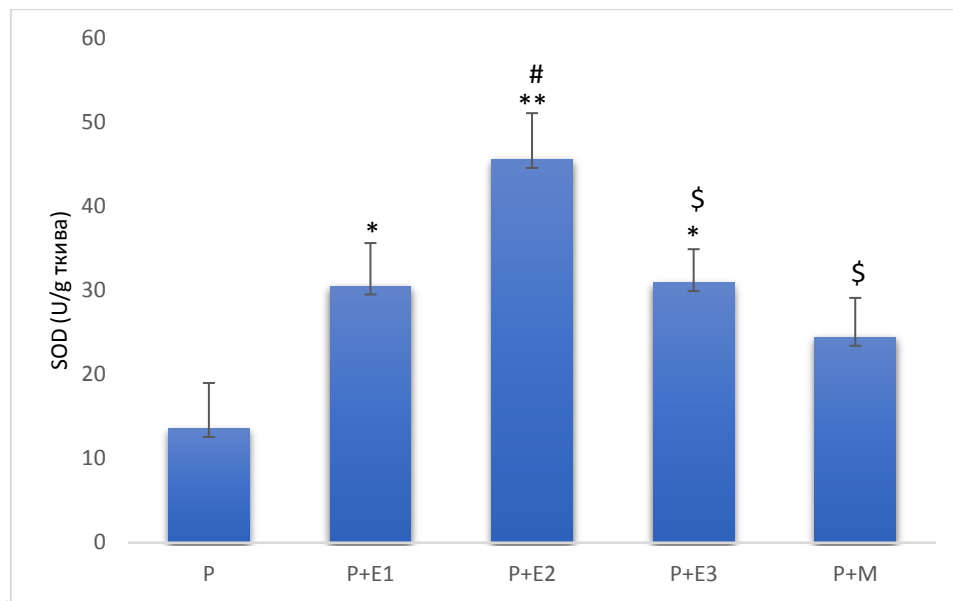


Графикон 46. Концентрација GSH. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ )

#### 4.2.6.4. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на оксидациони стрес у ткиву јајника

##### 4.2.6.4.1. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на активност SOD у ткиву јајника

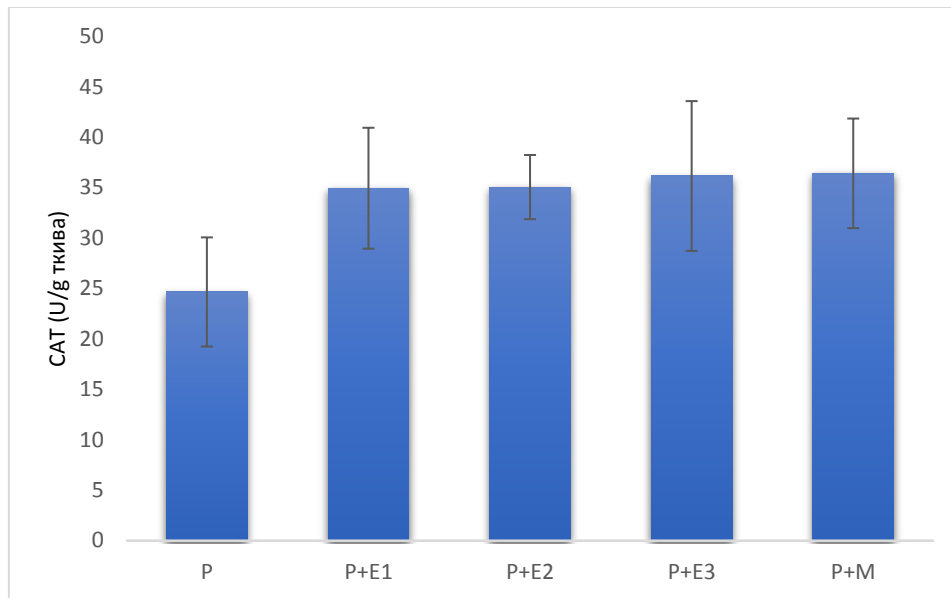
Активност SOD јајника била је статистички значајно већа у свим групама које су третиране емпаглифлиозином у поређењу са P групом, док је средња доза емпаглифлозина показала статистички значајну активност у поређењу са P+E1 групом, групе P+E3 као и P+M показале су статистички значајну разлику у поређењу са P+E2 групом.



Графикон 47. Активност SOD у ткиву јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ) # Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E1 групом ( $p < 0.05$ ). \$ Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E2 групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.6.4.2. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на активност САТ у ткиву јајника

Активност САТ у ткиву јајника није се статистички значајно разликовала између третираних група. ( $p > 0,5$ )

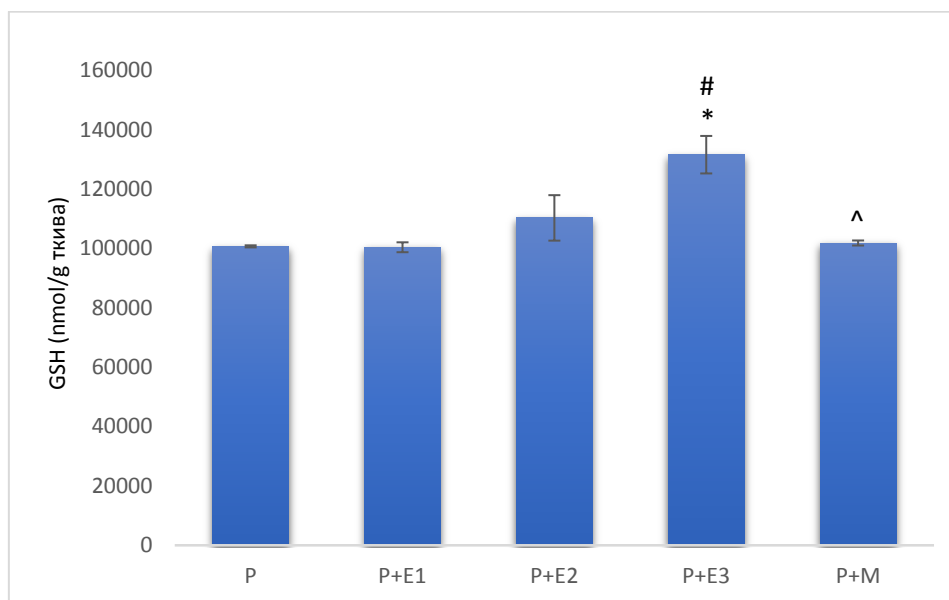


Графикон 48. Активност САТ у ткиву јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. Не постоји статистички значајна разлика у испитиваним групама ( $p > 0,05$ ).



#### 4.2.6.4.3. Утицај примене емпаглифлозина и примене метформина на концентрацију GSH у ткиву јајника

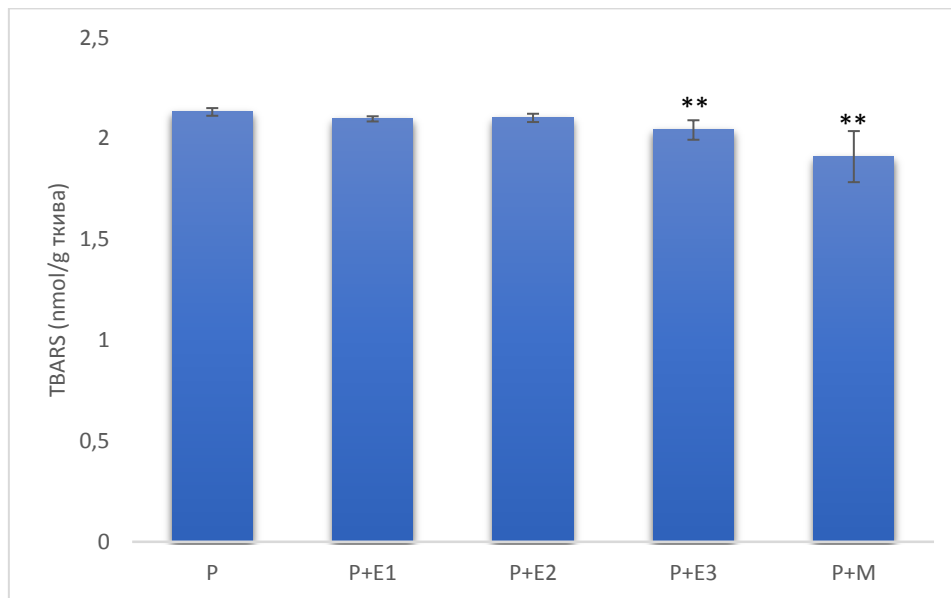
Концентрација GSH је била значајно већа у групи која је примала највећу дозу емпаглифлозина у поређењу са Р групом ( $p < 0,05$ ), као и у поређењу са групом која је третирана најнижом дозом емпаглифлозина ( $p < 0,05$ ) и групом која је третирана метформином ( $p < 0,05$ ).



Графикон 49. Концентрација GSH у ткиву јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM. \* статистички значајна разлика у односу на Р групу ( $p < 0,05$ ), # статистички значајна разлика у односу на P+E1 групу ( $p < 0,05$ ), ^ статистички значајна разлика у односу на P+M групу ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.6.4.4. Утицај примене емпаглифлозина и метофрмина на ниво TBARS у ткиву јајника

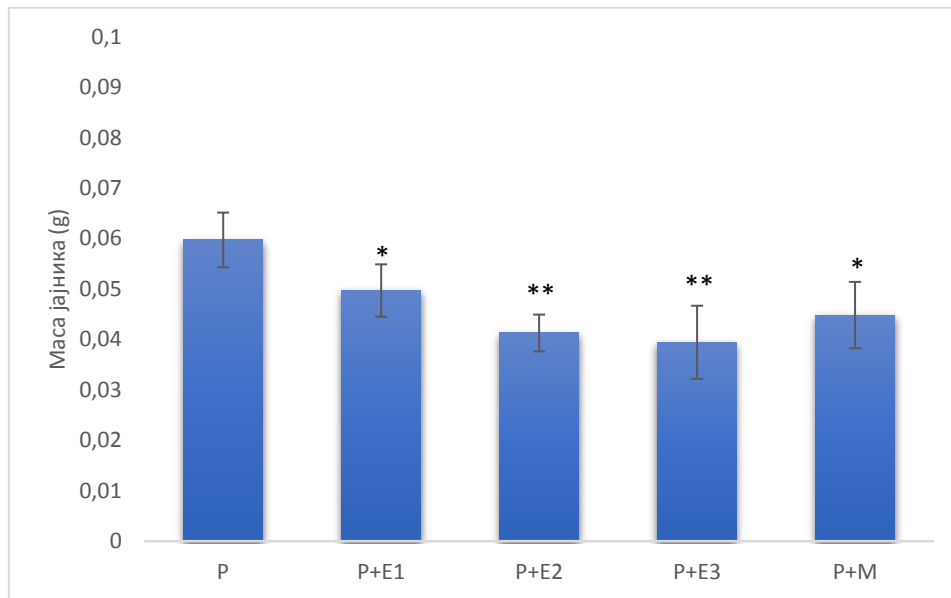
Концентрација TBARS била је статистички значајно мања након примене емпаглифлозина у највећој дози (група P+E3) и у групи којој је ординирао метформин (P+M група) у поређењу са P групом.



Графикон 50. Концентрација TBARS у ткиву јајника (TBARS). Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.7.1.1. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина и метформина на масу јајника

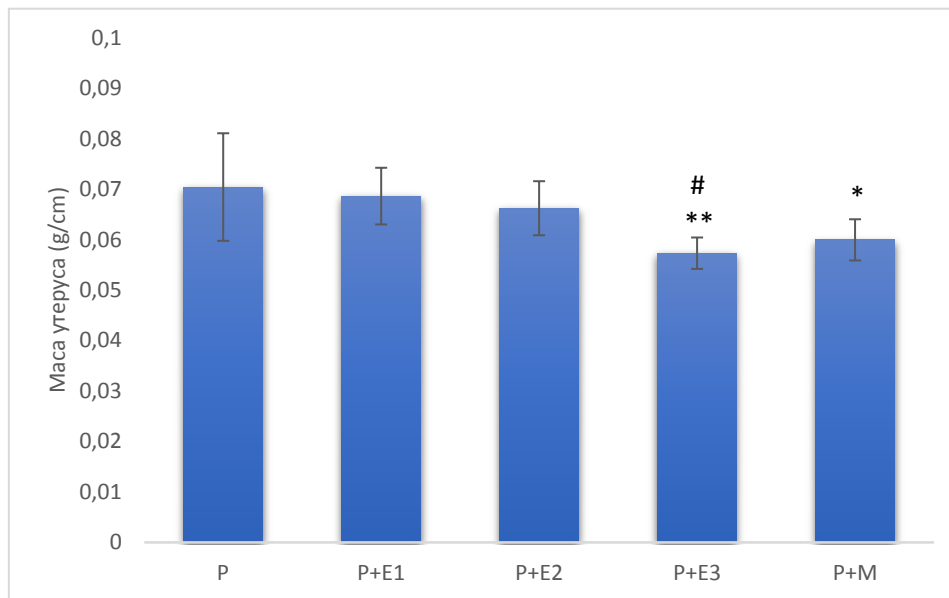
Маса оваријума је смањена у свим третираним групама. Групе P+E1 и P+M показале су статистички значајну разлику у смањењу оваријалне масе  $p < 0.05$ , док групе P+E2 и P+E3 су показале статистички значајно још веће снижење оваријалне масе ( $p < 0.01$ ).



Графикон 51. Маса јајника. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ )

#### 4.2.7.1.2. Испитивање утицаја емпаглифлозина и примене метформина на масу утеруса

Као што је приказано на графикону 52, маса утеруса мерена у 1 cm дисецираног тикива је статистички значајно снижена само у групама P+E3 и P+M у поређењу са P групом ( $p < 0.01$  и  $p < 0.05$ ). Међутим P+E3 група је показала статистички значајно снижење величине утеруса у поређењу са P+E1 групом ( $p < 0.05$ ).

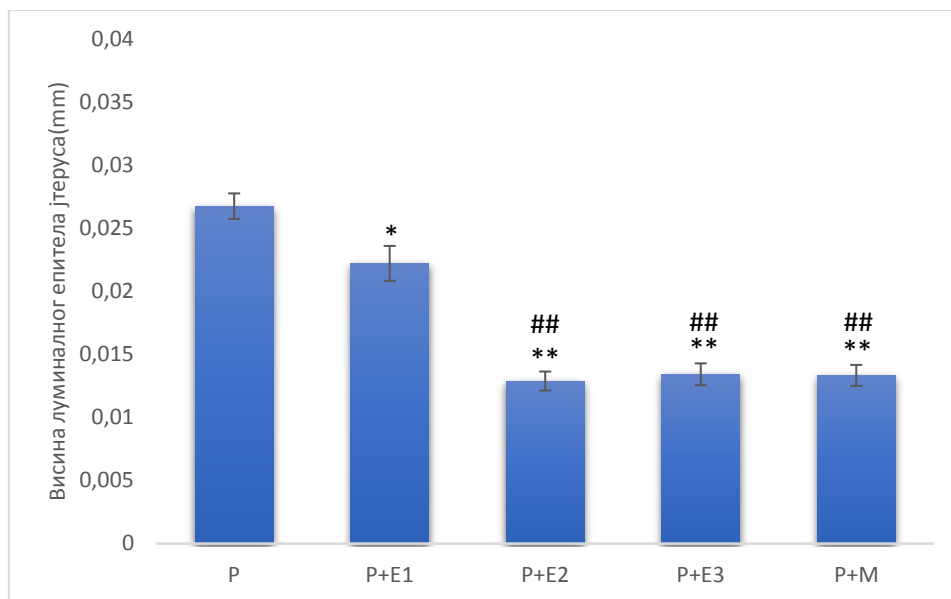


Графикон 52. Маса утеруса. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ). # Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E1 групом ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.7.2. Испитивање утицаја емпаглифлозина и метформина на хистолошке промене у ткиву утеруса

##### 4.2.7.2.1. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина и метформина на висину луминалног епитела утеруса

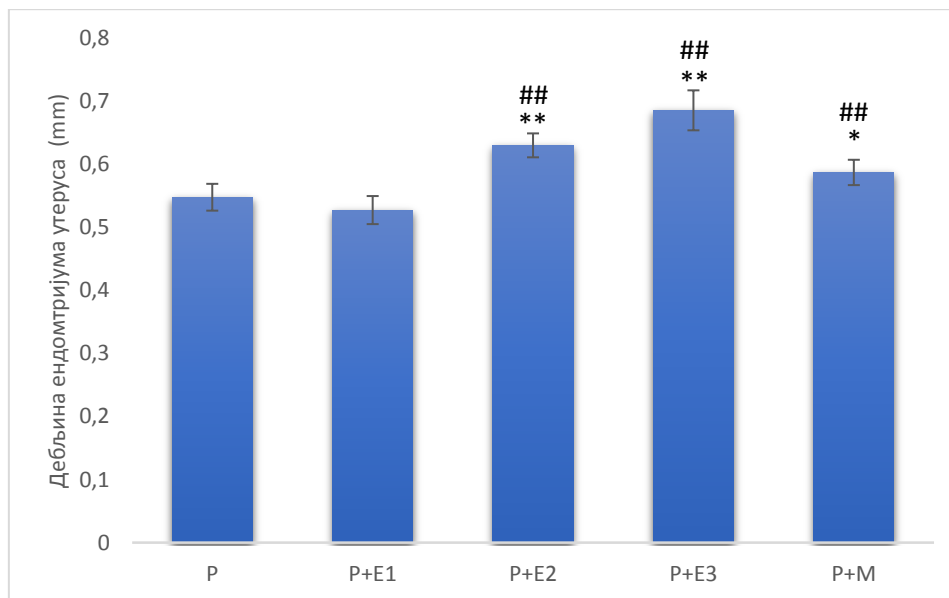
Као што је приказано на графикону 53, постоји статистички значајно нижи луминални епител у свим третираним групама у поређењу са Р групом. У свим третираним групама постоји статистички значајно нижи луминални епител утеруса у поређењу са Р+Е1 групом.



Графикон 53. Висина луминалног епитела утеруса. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ). ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е1 групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.7.2.2. Испитивање утицаја примене емпглифлозина и метформина на дебљину ендометријума утеруса

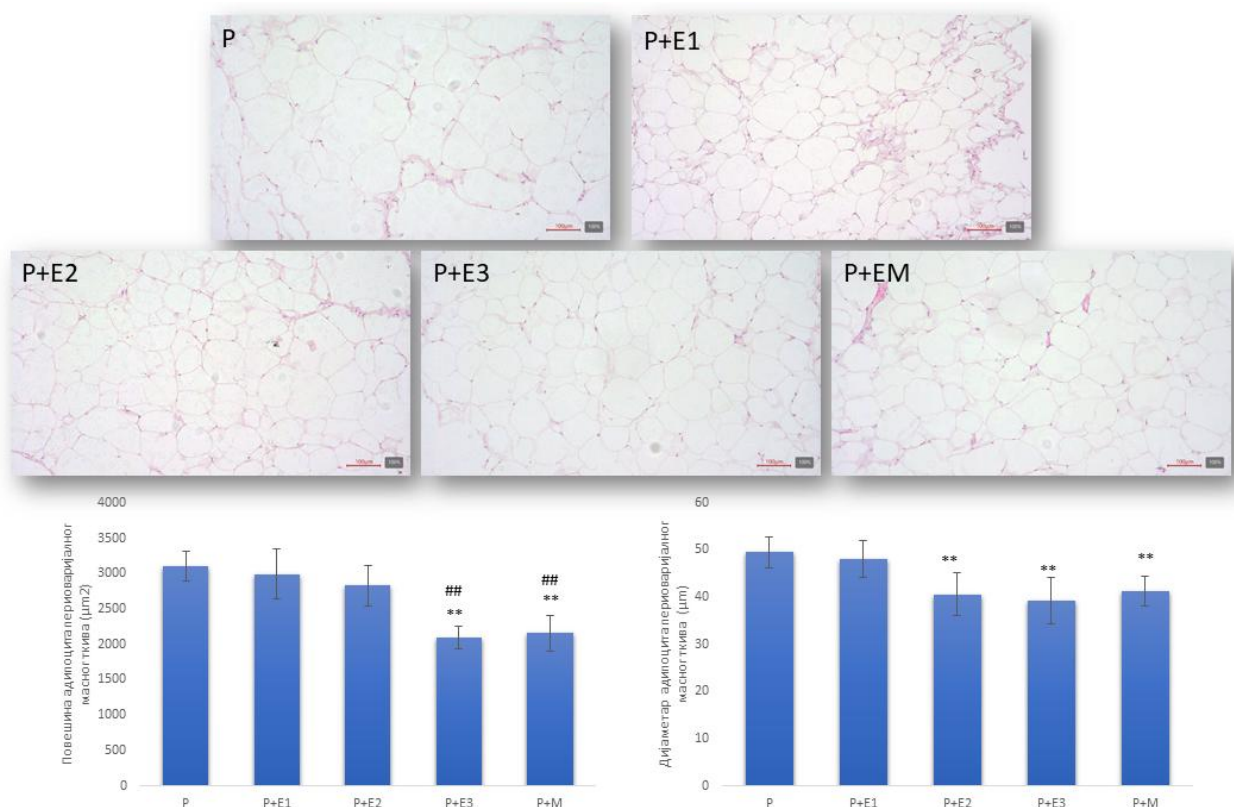
Само у групи третираној најмањом дозом емпглифлозина није дошло до статистички значајног повећања дебљине ендометријума утеруса. Групе P+E2, P+E3 и P+M забележине су статистички значајно дебљи ендометријум у поређењу са P и са P+E1 групом.



Графикон 54. Дебљина ендометријума. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ). ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E1 групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.7.3.1. Испитивање утиција примене емпглифлосина и метформина на хистопатолошку анализу периваријалног масног ткива

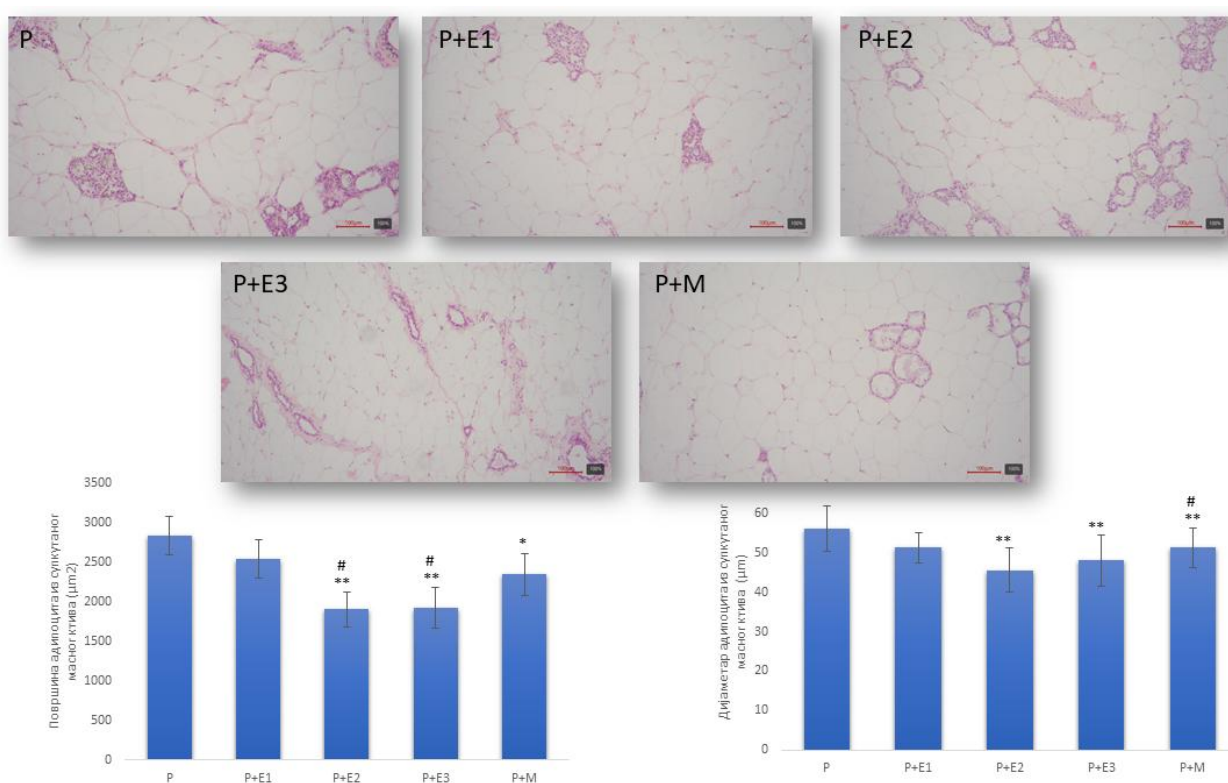
Као што је приказано на Слици 4, након примене емпглифлосина у највећој дози као и након примене метформина дошло је до статистички значајне редукције површине висцералног масног ткива у поређењу са Р групом као и са Р+Е1 групом. Такође у групама које су примиле средњу и највећу дозу емпглифлосина као и метформин дошло је до смањења дијаметра висцералног масног ткива у поређењу са Р групом. На горњем делу Слика 5 представљени су репрезентативних пресеци периваријалног масног ткива животиња.



Слика 4. Површина и дијаметар адипоцита периваријаног масног ткива. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ). ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е3, Р+М са Р+Е1 групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.7.3.2. Испитивање utиција примене емпаглифлозина и метформина на хистопатолошку анализу субкутаног масног ткива

Као што је приказано на Слика 5, након примене емпаглифлозина у средњој и највећој дози као и након примене метформина дошло је до статистички значајне редукције површине субкутаног масног ткива у поређењу са Р групом, такође групе Р+Е2 као и Р+3 показале су статистички значајну разлику у поређењу са Р+Е1 групом. Дијаметар субкутаног масног ткива статистички се није разликовао са Р групом само у Р+Е1 групи. Такође Р+М статистички се значајно разликује са Р+Е1 групом што је и приказано на Слици 5. На горњем делу представљени су репрезентативних пресеци субкутаног масног ткива животиња.



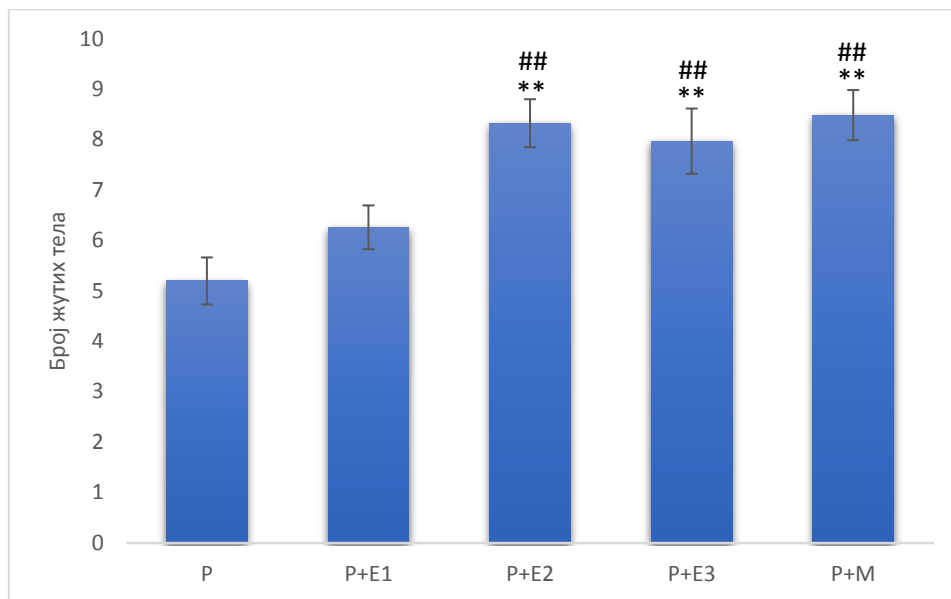
Слика 5. Површина и дијаметар субкутаног масног ткива. Стубићи представљају средње вредности  $\pm$  SEM \* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.05$ ). \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ). # Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е2, Р+Е3 са Р+Е1 групом ( $p < 0.05$ ).



#### 4.2.7.4. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина и метформина на хистолошке промене у ткиву јајника

##### 4.2.7.4.1. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина и метформина на број жутих тела јајника

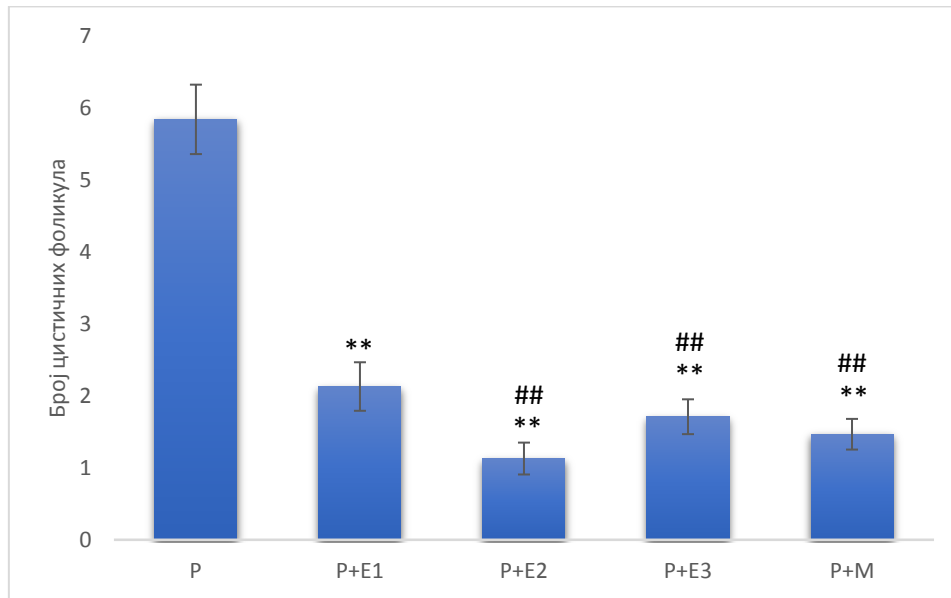
Број жутих тела се статистички значајно повећао у P+E2, P+E3 и P+M групи у поређењу са P групом. Такође, исте групе имају статистички значајну већи број жутих тела у поређењу са P+E1 групом.



Графикон 55. Број жутих тела. . Стубићи представљају средње вредности ± SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P групом ( $p < 0.01$ ). ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу са P+E1 групом ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2.7.4.2. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина и метформина на број цистичних фоликула јајника

Број цистичних фоликула статистички се значајно смањено у свим третираним групама у поређењу са Р групом, такође Р+Е2, Р+Е3 и Р+М група показале су статистички значајно мањи број цистичних фоликула у поређењу са Р+Е1 групом.



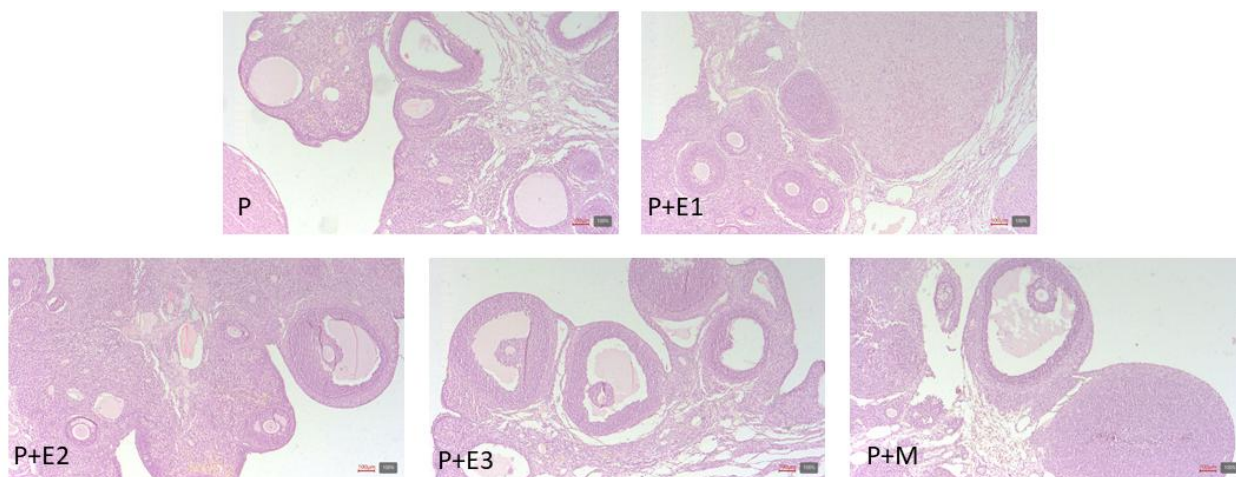
Графикон 56. Број цистичних фоликула. Стубићи представљају средње вредности ± SEM \*\* Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р групом ( $p < 0.01$ ). ## Постоји статистички значајна разлика у поређењу са Р+Е1 групом ( $p < 0.01$ ).

4.2.7.4.3. Испитивање утицаја примене емпаглифлозина и метформина на број различитих врста фоликула на пресецима ткива јајника

Врста фоликула	P	P+E1	P+E2	P+E3	P+M
Примарни	10,67±5,1 3	12,33±3,21	15,33±1,1 5	16±2,64	21±5
Секундарни	7,33±0,57	12,67±2,08 *	16±1**	20,67±3,79**,# #	21,67±3,05**,# #
Терцијарни	3±1,00	3,67±1,53	5±1*	5,33±1,15*	5,67±2,08**
Атретични	13,33±1,5 3	11±1	7,67±0,58 *	5,67±2,08**,###	6,67±2,3**,###

Табела 4. Број различитих врста фоликула на пресецима ткива јајника. Вредности су изражене као средња вредност ± SEM. \* статистички значајна разлика у односу на P групу (p<0,05), \*\* статистички значајна разлика у односу на P групу (p<0,01), ## статистички значајна разлика у односу на P+E1 групу (p<0,05).

У табели 4 представљене су вредности након квантификације фоликула са пресека јајника. Број примарних фоликула се није значајно разликовао између група. Све три примењене дозе ЕМРА су довеле до значајног повећања броја секундарних фоликула у односу на P групу, слично метформину. Поред тога, група третирана највећом дозом ЕМПА као и метформином показала је значајно већи број секундарних фоликула и у односу на групу третирану најнижом дозом ЕМРА (p<0,01). Број терцијарних фоликула је био значајно већи у групама третираним највећом дозом ЕМРА као и метформином у односу на P групу, слично као и у случају третмана метформином. Средња и највећа примењена доза ЕМРА су довеле до значајног смањења броја атретичних фоликула у односу на P групу, слично метформину. Поред тога, група третирана највећом дозом ЕМРА као и група третирана метформином показала је значајно мањи број атретичних фоликула и у односу на групу третирану најнижом дозом ЕМРА (p<0,01).



Слика 6. Репрезентативни прикази твика јајника испитиваних група.

Животиње из Р групе су имале промењену структуру ткива јајника, са мноштвом цистично дилатираних фоликула. Ооците нису регистроване у већем броју фоликула, а број жутих тела, која представљају индикаторе претходне овулације, је био мањи него у осталим групама. Цистични фоликули су имали истањен зид, са мањим бројем гранулоза ћелија (3-4 слоја). У групама које су биле третиране различитим дозама емпаглифлозина и метформином, запажено је да је постоје фоликули у различитим фазама развоја, са већим бројем присутних жутих тела. Фоликули у развоју су показивали регуларан распоред ћелија гранулозе, постављене у више слојева (око 10 слојева) које су сачињавале дебљи зид фоликула.

# **5. ДИСКУСИЈА**

Истраживање примене нових лекова као и примена постојећих лекова за нове индикације представљају теме које су стално у фокусу научне јавности. Ово је посебно значајно обзиром на то да нека стања и болести још увек крију комплексне патофизиолошке механизме који нису у потпуности разјашњени. Недостатак разумевања тих механизма представља препреку у развоју ефикасних терапијских приступа. Проучавање нових лекова и примена постојећих за нове индикације играју кључну улогу у разоткривању механизма који леже у основи различитих здравствених проблема. Осветљавање ових патофизиолошких основа може не само допринети нашем разумевању болести, већ и отворити врата за развој нових терапијских приступа који могу бити значајни за пацијенте. У складу са тим, научна заједница наставља да истражује нове могућности лечења и примену постојећих лекова за различите здравствене проблеме. Оваква истраживања не само да откривају потенцијалне нове терапијске могућности, већ такође омогућавају индивидуализоване терапијске приступе који могу бити прилагођени потребама сваког појединца. Укратко, истраживање примене нових лекова и примена постојећих за нове индикације остају у фокусу научне јавности због њиховог потенцијала да разоткрију комплексне патофизиолошке основе, унапреде терапијске приступе и побољшају здравље пацијената. Обзиром на постојање интересантних података о примени ЕМРА код PCOS пацијената у новијој литератури које воде порекло из клиничких студија, и ограничене податке који се односе на примену ЕМРА у анималним експерименталним PCOS, идеја водиља за ово истраживање је била да употпунимо слику о ефектима примене различитих доза ЕМРА у анималном експерименталном моделу.

Резултати наше студије показују да примена ЕМРА испољава значајне корисне ефекте како на репродуктивне тако и на метаболичке поремећаје у моделу PCOS код пацова, слично као и третман метформинем, за који је већ познато да испољава корисне ефекте у регулацији различитих патофизиолошких карактеристика везаних за PCOS. Групе које су третиране ЕМРА имале боље соматометријске параметре на крају третмана у поређењу са нетретираном групом, бољу хистоморфологију јајника и утеруса, при чему су средње и високе дозе ЕМРА показале израженије ефекте. У групама које су третиране ЕМРА уочено је смањење запремине јајника, као и успостављање нормалног еструсног циклуса уз нормализацију хормонског статуса, што свеукупно значи да ЕМРА остварује позитиван утицај на репродуктивно здравље. Штавише, наше истраживање се бавило проценом метаболичких и хемодинамских аспеката PCOS, откривајући да примена ЕМРА испољава сличне ефекте као и метформин, поткрепљујући доказе о потенцијалној улози ЕМРА за ублажавање кардиоваскуларних компликација повезаних са PCOS. Обзиром да је примена ЕМРА ублажила оксидациони стрес у крви и ткиву јајника који је настао након индукције PCOS у овом истраживању, наши резултати наглашавају да постоји вишеструки терапеутски потенцијал ЕМРА у решавању сложене интеракције репродуктивних и метаболичких дисрегулација у PCOS.

## 5.1. ПРИМЕНА КОМБИНОВАНОГ ПРОТОКОЛА (ЕСТРАДИОЛ-ВАЛЕРАТ И РЕЖИМ ИСХРАНЕ БОГАТЕ МАСТИМА) НА ИНДУКЦИЈУ PCOS

Пре свега, неопходно је било потврдити успешност индукције модела PCOS, који је у овој студији изазван применом проктокла које је подразумевао једнократну примену естрадиол-валерата уз режим исхране богате мастима, током 60 дана, па се први део дискусије односи на коментарисање примене новог модела за индукцију PCOS. Наша студија је доказала да су се применом оваквог протокола испољила и метаболичка и репродуктивна својства PCOS. Иницијална студија, којом смо промовисали примену новог, до сада непознатог, протокола за индукцију модела PCOS код пацова је била основ за даље истраживање примене различитих доза ЕМРА у третману PCOS. Овај унапређени модел довео је до промена соматометријских параметара и погоршања хормонског статуса, заједно са поремећајем еструсног циклуса, што све указује да је на такав начин изазван гојазни фенотип PCOS. Штавише, метаболизам глукозе је био поремећен након додавања режима масне хране у EV протокол. Хистолошка анализа је потврдила бројне цистичне фоликуле након примењеног протокола. Промене на нивоу биомаркера оксидационог стреса маркера могу бити повезане са регистрованим морфо-функционалним променама и послужити као механичка основа за развој ендокриних, репродуктивних и метаболичких својстава повезаних са PCOS. Адитивни ефекат EV и масне хране био је очигледан у већини посматраних параметара. У доступној литератури су описани бројни протоколи за индукцију PCOS код глодара: од пренаталне андрогенизације, примене хормона код препуберталних и постпуберталних животиња, па до измене услова животне средине и промене режима исхране (149). Иако сви поменути експериментални протоколи имају неке предности у поређењу са PCOS постоји у хуманој популацији (контролисани услови, могућност понављања експеримента, сакупљање ткива за даљу анализу), недостаје им патофизиолошка еквивалентност са хуманим, па анимални модели за PCOS опонашају само симптоме и одређене аспекте овог комплексног поремећаја. Механизам којим EV индукује особине сличне PCOS на животињским моделима је претходно детаљно описан (150). Једна висока доза EV индуковала је модел PCOS код пацова које је верификован више пута у разним студијама (151). Ипак, постоје и студије које подржавају супротан став, где примена EV код пацова не представља адекватан анимални модел за представљање промена повезаних са PCOS код људи, нити експримира поуздане патофизиолошке механизме погодне за истраживање различитих терапијских режима (152). Међутим, садашњи резултати су потврдили благе промене везане за PCOS, које су биле појачане додавањем исхране богате мастима током 60 дана протокола. Претходно спроведено истраживање је, такође, потврдило да летрозол у комбинацији са исхраном богатом мастима доводи до промена ендокриних, метаболичких и репродуктивних параметара у моделу PCOS пацова (153). Као и у нашој студији, додавање масне хране добро успостављеном протоколу за индукцију PCOS довело је до продубљивања патофизиолошких механизма које опонашају PCOS код људи. Међутим, наш протокол је имао предност у односу на сваковневне медикаментозну администрацију описану у претходно наведеној студији, јер једнократно примењена инјекција EV доноси мање стреса животињи у поређењу са дневном применом летрозола оралним путем, смањујући стрес изазван манипулацијом животињама, за које се зна да утиче на хормонске промене и могуће узастопне неправилности еструсног циклуса. Једнократно примењен EV је широко коришћен протокол за изазивање PCOS манифестација код пацова, изазивајући морфологију полицистичних јајника, неправилне естртусне циклусе, промене базалних и

пулсатилних концентрација LH и FSH и повећан одговор андрогена на стимулацију хуманим хорионским гонадотропином (154). С друге стране, протокол примене масне хране је и сам могао довести до промена повезаних са PCOS код женки пацова (136), као и протокол примене исхране са високим садржајем масти и шећера (155), што је резултирало и метаболичким и репродуктивним карактеристикама PCOS, али код препуберталних пацова. Међутим, истраживачи су даље открили да протоколи примене режима масне исхране и у постпуберталном периоду, такође, погоршавају функцију јајника, посебно у комбинацији са летрозолом или DHEA (153,156). По први пут, наша студија је показала употребу комбинације EV и режима исхране богате мастима за изазивања манифестација PCOS код пацова, наглашавајући репродуктивне и метаболичке аспекте PCOS, уз минимално руковање животињама које би проузроковало стрес.

Докази из литературе и клиничке праксе указују на повезаност PCOS и гојазности. Постоји неколико заједничких карактеристика код гојазности и PCOS . Инсулинска резистенција и хиперандрогенија могу бити присутне и код гојазног и код негојазног фенотипа PCOS. Још увек се у научној литератури полемиче око тога да ли примарно настаје PCOS или гојазност у овој комплексној вези између репродуктивних и метаболичких поремећаја. Инсулинска резистенција и комензаторно настала хиперинсулинемија доприносе хиперандрогенизму и повећању телесних масти. С друге стране, гојазност утиче на репродуктивне функције (157). Промена телесне масе након EV протокола за индукцију PCOS код пацова је контроверзна у досада спроведеним студијама. Сличан протокол као у нашој студији, спроведен код одраслих пацова, резултирао је смањењем телесне масе у поређењу са контролном групом (158), активацијом симпатичког нервног система и повећањем брзине метаболизма и потрошње масти. Међутим, у нашој студији, комбиновани протокол додатно је повећао телесну масу у поређењу са контролном групом. Ипак, и раније је показано да је EV протокол код женки пацова довео до повећања телесне масе (159). Штавише, већи унос калорија током 60 дана такође је допринео повећању телесне масе у PCOS групи у поређењу са контролном групом, као што се и очекивало. Познато је да гојазност и PCOS имају неколико заједничких коморбидитета, и да гојазност је у позитивној корелацији са озбиљношћу симптома PCOS (160). Описано је неколико механизма којима повећање телесне тежине и гојазност доприносе развоју PCOS и обрнуто (161). Штавише, сама исхрана игра важну улогу у патогенези PCOS (162), док су експериментални модели PCOS на глодарима потврдили да ановулација и формирање цистичних фоликула које је повезано са високим нивоима андрогена, могу регистровати након режима исхране као што су примена масне хране или исхрана са високим садржајем масти и шећера (136,155).

Инсулинска резистенција, која постоји код 50-70% пацијената са PCOS, сама утиче на производњу андрогена у јајницима позитивном повратном спрегомом са гонадотропним ефектима, LH стимулише синтезу андрогена у јајницима и ослобађање андрогена из тека ћелија. Гојазност и повећање телесне тежине су повезани са PCOS симптомима, повећање телесне тежине испољава ефекат на инсулинску резистенцију и хиперинсулинемију, као и дисметаболичким и стероидогеним ефектима поремећених путева PI3-киназе и MAP киназе пострецепторских инсулинских сигналних путева (161). На овај начин, ефикасан губитак тежине код гојазних и гојазних пацијената са PCOS утиче на метаболичко здравље и репродуктивну функцију повећањем инсулинске осетљивости и регулацијом нивоа инсулина у крви (161).



Дијета са садржајем угљених хидрата од 45% у укупном дневном калоријском уносу показује ефикасност у регулацији гојазности и липидног статуса код PCOS пацијената. (163). Осим тога сличне дијете (редукција угљених хидрата) у дугорочном периоду доприносе повећању FSH и SHBG. (164). Постоје докази о корисним ефектима модификације исхране и ефеката комбинације дијете и примене метформина који указују да модификована исхрана смањује инсулинску резистенцију и повећава нивое глобулина који везује полне hormone у серуму у поређењу са метформином (165). Иако се сматра да је EV модел неприкладан за проучавање осовине хипоталамус–хипофиза–јајник, због прогресивне дегенерације хипоталамуса и поремећеног одговора хипофизе, анатомија и функционалност јајника након овој протокола заиста подсећају на оне код пацијената са PCOS (166). Резултати наше студије су показали да постоји повећана маса јајника, али и оваријални индекс након примењеног комбинованог протокола, у поређењу са контролним вредностима. Слични резултати су објављени и у претходним студијама које су испитивале манифестације PCOS код пацова (167, 168), док је у поједним студијама регистрована нижу тежину јајника (169,158, 170) након самосталне примене EV протокола. Уочене разлике могу бити повезане са променом телесне масе заједно са тежином јајника: наш протокол је резултирао повећањем телесне масе и тежине јајника, док су поменути супротни резултати других аутора открили смањење телесне масе заједно са смањењем тежине јајника. Ове контроверзе су још једном потврдиле важност примене режима исхране масном храном симултано са EV протоколом да би дошло до појаве манифестација као код PCOS жена. Поремећај еструсног циклуса је једна од најистакнутијих карактеристика у животињским моделима PCOS. Престанак циклуса, као и поремећај циклуса са различитим одступањима од редовног трајања од 4 до 5 дана, примењен је у експерименталном протоколу након успешне индукције PCOS. Када говоримо о EV протоколу, показано је да је еструсни циклус заустављен доминантно у фази еструса, уз перзистентну вагинална корнификацију, уочену цитолошком микроскопском анализом (171), или у фази перзистентног проеструса/еструса (158). У последњих 12 дана протокола, регистровани смо перзистентну вагинална корнификацију код свих животиња, као што је и претходно потврђено (159). Када пацови примају EV, симпатички нервни систем се активира чак и пре него што се изазиве PCOS и долази до формирања цистичних фоликула (172,173). Показано да третмани електроакупунктуром доводе до побољшања ових абнормалности смањењем хиперактивности симпатичког нервног система (152). Истраживања су открила доказе о узрочно-последичној вези између гојазности и поремећаја овулације. У студијама на мишевима, само исхрана богата мастима довела је до промена сличних PCOS, а гојазни мишеви су показали веће абнормалности у еструсном циклусу и виши ниво тестостерона; гојазност мења експресију гена за инфламацију и стероидогене путеве јајника неповољно делујући на функцију јајника (174,175). *Lee-Boot* ефекат, који описује да се у одсуству мужјака глодара у окружењу, циклуси женки заустављају или успоравају, у нашем случају би могао бити занемарен; закључили смо да је цикличност престала по примењени наведеног протокола. Промене нивоа хормона откриле су да су и вредности тестостерона и естрадиола биле веће након примене протокола. Ови резултати су у складу са студијом *Mehraban* и сарадника (159) Ефекти већег уноса калорија на повећање нивоа естрадиола уочени су раније (176), док су у нашој студији регистровани синергистички ефекти примењених протокола, који наглашавају значај додавања исхране богате мастима протоколу EV. У погледу нивоа прогестерона уочена је супротна ситуација: значајно смањење након индукције PCOS. Напротив, у студијама на пацовима и мишевима, после 120 дана протокола примене масне хране, ниво прогестерона се значајно повећао (177). Аутори су објаснили да повећани нивои

прогестерона могу потиснути ослобађање LH. Посебна улога сигнализације прогестерона у условима исхране масном храном захтева даље проучавање. Познато је да прогестерон инхибира LH скок изазван естрадиолом током проеструса, као и импулсе GnRH/LH преко неурона који ослобађају киспептин (178). Потребне су даље студије да би се истражили инхибиторни ефекти прогестерона у протоколима исхране богате масима, док резултате наше студије треба приписати протоколу администрације EV.

PCOS представља хетерогени поремећај са различитим репродуктивним и метаболичким проблемима. Подаци из литературе показали су бројне протоколе за индукцију PCOS код глодара где су научници тежили да амплификују његов сложену експресију. Што се тиче самог EV протокола који се примењује, у литератури је описан спектар различитих резултата, од оних који сугеришу да примена EV није прикладна за успостављање метаболичког профила са поремећеном гликорегулацијом сличном PCOS (152), до оних који су показали повишен ниво глукозе у крви наташте и поремећену гликорегулацију са инсулинском резистенцијом након примене овог протокола (179). Поред тога, Данеса и сарадници су утврдили повишен ниво глукозе у крви наташте у PCOS групи али без разлике након ОГТТ између PCOS и контролне групе (180). У нашој студији, када смо EV додали и протокол примене масне хране забележен је виши ниво глукозе у крви у поређењу са контролном групом након 30 и 60 минута ОГТТ. Након 120 минута, нивои глукозе у крви су били слични у обе испитиване групе.

Ултразвучна анализа је потврдила већи лонгитудинални дијаметар и запремину јајника у PCOS групи у поређењу са контролном групом. Запремина јајника повећана за 19,2% након примењеног протокола. Микроскопском анализом утврђен је значајно већи број цистичних фоликула и мањи број жутих тела у PCOS групи у поређењу са контролним вредностима. Повећан је и број цисти жутих тела у PCOS групи у поређењу са контролом. Наши резултати у вези са EV протоколом су у складу са претходним извештајима (181,182). Протокол исхране богате масном храном и шећером довео је до сличних промена у броју цистичних фоликула и жутих тела, иако је тежина јајника била нижа (155). Наши резултати су потврдили да примењени протокол доводи до повећања запремине јајника, већег броја цистичних фоликула и мањег броја жутих тела, као што је показано код жена са PCOS (183) и у другим анималним моделима PCOS (184).

Контролисано ослобађање реактивних кисеоничних врста (ROS) је неопходно за репродукцију код сисара због процеса као што су формирање дисулфидних веза у сперматозоидима и овулација (185). Међутим, прекомерно накупљање ових једињења доводи до оксидационог стреса, који компромитује репродуктивни систем заједно са другим функцијама у организму. OS је један од најистраженијих механизма који су у основи патофизиологије PCOS код жена (186), и у експерименталним моделима код глодара (187). Штавише, у физиолошким условима током овулације и стероидогенезе у јајнику, концентрација ROS се такође повећава. Детоксикација ROS је стога кључна за сазревање ооцита, али и за развој фетуса. Због стварања MDA и пероксидације липида, ROS ремети функцију јајника (188). OS маркери су значајно промењени након примењеног протокола за индукцију PCOS. Ниво  $O_2^-$  је значајно повећан, с друге стране, активност SOD је опала као резултат неутралисања виших нивоа  $O_2^-$ . Међутим, нивои  $H_2O_2$  и CAT су значајно смањени у PCOS протоколу, што би се могло

објаснити смањењем САТ у борби против  $H_2O_2$  (187). Липидна пероксидација у PCOS моделу довела је до значајног повећања TBARS у поређењу са контролном групом. Овакво повећање пероксидације липида код PCOS протокола је било очекивано, с обзиром на претходне студије у вези са утицајем примене масне хране (189). Пероксидација липида је одговорна за оштећење гонадотропинских рецептора, што смањује стероидогенезу у жутом телу (190). Штавише, нивои нитрита су били виши, а промене су имале исти тренд као и TBARS. Ниво редукованог глутатиона је био смањен у PCOS групи у поређењу са контролном групом. Обзиром да је показано да исхрана богата мастима смањује нивое GSH у еритроцитима пацова (191), закључили смо да су хормонске промене, изазване EV, иницијатори појачане потрошње GSH која је додатно осиромашена додавањем масне хране у режим исхране током 60 дана трајања протокола. Слични резултати су потврђени у претходним извештајима на мушким пацовима (192,193), као и на моделима PCOS пацова који су испитивани у нашим претходним студијама (194,195,196). Међутим, у нашим претходним истраживањима у вези са PCOS спроденена је различита методологија за индукцију (андрогени као што су тестостерон-енантат и DHEA, самостална примена EV), док смо овде по први пут применили EV протокол у комбинацији са исхраном богатом масним храном. Резултати су потврдили импликацију OS у репродуктивним и метаболичким променама повезане са PCOS.

## **5.2. ПРИМЕНА РАЗЛИЧИТИХ ДОЗА ЕМПАГЛИФЛОЗИНА И МЕТФОРМИНА ДОВОДИ ДО ПОБОЉШАЊА РЕПРОДУКТИВНИХ И МЕТАБОЛИЧКИХ КАРАКТЕРИСТИКА PCOS**

У наставку текста биће коментарисани ефекти четворонедељне примене ЕМПА и метформина на репродуктивне и метаболичке карактеристике модела PCOS код пацова.

### **5.2.1. Ефекти примењених третмана на регулацију телесне масе**

Примена средње дозе ЕМПА и примена метформина довела је до умереног смањења финалне телесне масе, док је примена високе дозе ЕМПА узроковала израженији губитак телесне масе. Ефекти метформина на регулацију телесне масе код PCOS су претходно описани (197). Наши добијени резултати у вези са третманом ЕМПА били су у складу са претходним студијама у вези са ефектима ЕМПА на антропометријске параметре код пацијената (198). Штавише, литературни подаци су показали супериорне ефекте ЕМПА код пацијената са PCOS у поређењу са метформином у регулацији телесне масе. Наши резултати су показали да ЕМПА у највишој дози има супериоран ефекат на телесну тежину у поређењу са нижим дозама ЕМПА и применом метформина. Међутим, ефекти на хормонске и метаболичке параметре нису у поменутој студији остварени (199). Овакав резултат није у сагласности са нашом студијом спроведеној на моделу PCOS код пацова када је реч о регулацији хормонског статуса, како ће бити детаљније и објашњено у наставку текста. Употребом ЕМПА могу се побољшати соматометријски, метаболички и хормонски исходи PCOS. У нашем моделу индукованог PCOS на пацовима, забележили смо нижи ниво телесне масе, али и количине масног ткива, што је између осталог праћено и регулацијом инсулинемије и хиперандрогенемије у сколопу PCOS.

### 5.2.2. Ефекти примењених третмана на регулацију масе и запремине оваријума и утеруса

Описано је да је се тежина јајника и материце значајно повећавају код пацова са PCOS (200, 201). Тежина јајника и тежина утеруса код PCOS пацова су значајно смањене у свим третираним групама у односу на Р групу у нашем експерименту, при чему су високе дозе ЕМРА и метформина довеле до најзначајнијег смањења овог параметра. Штавише, повећање тежине јајника код PCOS пацова може бити резултат анаболичких ефеката EV, док повећање периваријалног масног ткива и формирање проширених цистичних фоликула испуњених течностима у јајницима може бити у складу са повећаном тежином јајника у PCOS групи у поређењу третираним групама. Тежина материце је значајно смањена у групама са високим дозама ЕМРА и метформина. Налази сугеришу да ЕМРА и метформин доприносе губитку телесне тежине и утичу на тежину репродуктивних органа, што имплицира потенцијалне терапеутске ефекте на метаболичке и репродуктивне дисрегулације повезане са PCOS. Ултразвучном анализом димензија јајника утврдили смо да постоје значајне промене у одговору на третмане ЕМРА и метформином у нашем моделу PCOS пацова. Уздужни пречник јајника се смањео у свим групама које су биле третиране ЕМРА, као и у групи која је примала метформин, у поређењу са групом која није третирана односно PCOS група. Слично томе, услед примене ЕМРА у средњим и високим дозама као и услед примене метформина, дошло је до смањења антеропостериорног пречника-Запремина јајника, израчуната из ових димензија, смањена је у свим третираним групама. Значајно је да су облик и ехогеност јајника у третираним групама били уредне морфологије, без хипоехогених кружних структура уочених у групи са PCOS где је суспектно формирање циста. Резултати истичу потенцијал примене ЕМРА у складу са смањењем масе и запремине јајника који је регистрован код PCOS пацова.

### 5.2.3. Ефекти примењених третмана на хормонски статус

Биохемијски хиперандрогенизам, као повећан ниво Т и/или DHEAS, један су од дијагностичких критеријума PCOS. Када говоримо о дејству SGLT2I на ниво полних хормона, 4 од 5 студија које су проучавале ефекат SGLT2I код PCOS пацијенткиња су показали присуство смањења укупног тестостерона (122, 125, 202, 203). Поремећена хипоталамус-хипофизно-оваријална осовина је карактеристика PCOS која ремети хормонску секрецију у физиолошким ритмовима, пре свега изазивајући повећану секрецију LH и тестостерона (204). Недавно је откривено додатно место експресије SGLT2I у централном нервном систему (205). Испитивани су инфламаторни механизми у хипоталамусу који су настали услед активације микроглије изазване применом масне хране, а фокус истраживања у тој студији је био механизам којим SGLT2I у побољшавају репродуктивне карактеристике (205). У нашем моделу индукције PCOS естрадиол-валерату смо додали режим исхране богате мастима јер се верује да исхрана богата мастима делује на репродуктивне неуроне међајући њихове обрасце секреције, обзиром да је пулсатилно ослобађање GnRH и LH неопходно за даљу матурацију фоликула. Недавна студија је показала да исхрана богата мастима повећава фреквенцу LH пулса у диеструсу и снижава средњи и базални ниво LH у еструсној фази циклуса код мишева (206). У нашој студији су ЕМРА у средњој и највећој дози, као и метформин снизили ниво тестостерона у серуму. Резултати студије која је испитивала утицај канаглифлозина на летрозолом изазваном моделу

PCOS, слажу се са резултатима наше студије у погледу смањења концентрација тестостерона након третмана агенсом из исте групе лекова (207). Услед примене метформина може се смањити активност ароматазе и на тај начин блокирати продукција андрогена и естрогена код PCOS (208). У нашем истраживању само најмања примењена доза ЕМРА није довела до снижења вредности естрадиола у серуму. Резултати нашег истраживања о снижењу нивоа естрадиола су у корелацији са резултатима случајне студије која је поредила ефекте ЕМРА, метформина самостало и у комбинацији (209). Резултати студије која је анализирала дејство метформина на ДНЕА моделу PCOS пацова, такође се слажу са резултатима добијеним у нашој студији у погледу снижавања вредности естрадиола након примењене терапије метформином (210), док у вредностима прогестерона постоји дискрепанца између горе наведе студије и наше студије обзиром да нису забележили промену нивоа прогестерона у серуму након примене метформина током 3 недеље. Резултати нашег истраживања показују да су највећа примењена доза ЕМРА, као и примена метформина, довели су до повећања нивоа прогестерона у серуму, што може да нас доведе до закључка да услед примене ЕМРА у највећој дози коју смо примењивали као и услед примене метформина долази до овулације и настанка жутог тела које последично продукује прогестерон. Повећана секреција LH у јајнику ствара андрогени миље поспешујући активност ензима 17- $\alpha$  хидроксилазе. Овај ензим конвертује прогестерон у андрогене. Секреција LH делује стимулативно на P13K/Akt пут (211). P13K пут регулише LH зависну Akt фосфорилацију у фоликулима јајнику, регулатор је експресије Sup17A1 гена и поспешује активност ензима 17- $\alpha$  хидроксилазе. Повишен ниво LH стимулише лучење андрогена у јајницима. Примена ЕМРА и метформина побољшава диманику фоликулогенезе у јајницима и смањује секрецију андрогена обзиром да смо дошли до резултата да се након третмана ЕМРА и метформиним смањила секреција тестостерона а повећала секреција естрадиола и прогестерона. Концентрација LH била је нижа само након примене метформина. Слично томе, студија на ДНЕА моделу PCOS такође је показала снижење вредности LH након терапије метформином (210). Примена ЕМРА није снизила LH секрецију у нашем експерименталном моделу, али и претходна студија је показала да SGLT2i секрецију андрогена снижавају не делујући на LH секрецију већ побољшавајући активност бета ћелија панкреаса са смањеном потребом за инсулином и са смањењем хипернисулинемије који су главни фактори који доприносе порасту нивоа тестостерона код PCOS (209). Повећање нивоа FSH изазвала је највећа примењена доза ЕМРА као и примена метформина. Сличне резултате побољшане секреција FSH након примене ЕМРА је добила и студија која је упоређивала ефекат ЕМРА и метформина на ендокрину функцију код PCOS пацова (209). С друге стране, на супрот нашим резултатима, студија која је примењивала метформин 30 дана постпуберталним животињама показала је да нема промене у секрецији FSH (212). У овој студији, показали смо да је третман PCOS пацова метформином или емпаглифлозином делује повољно на хормонски статус јер побољшава ендокрину функцију и инсулинску резистенцију, значајно смањујући ниво тестостерона и индукујући побољшање нивоа естрадиола, прогестерона, LH и FSH.

#### 5.2.4. Ефекти примењених третмана на регулацију крвног притиска

У погледу регулације крвног притиска, све третиране групе су показале смањење систолног крвног притиска, док је дијастолни крвни притисак смањен само у

групи са средњом дозом ЕМРА у односу на групу без третмана. Срчана фреквенција се смањила у групама са ниским и средњим дозама ЕМРА, а пулсни притисак се није значајно изменио током различитих третмана. Међутим, средњи артеријски притисак (МАР) се значајно смањило само у групи са средњом дозом ЕМРА. Овакви кардиоваскуларни ефекти сугеришу потенцијалну улогу ЕМРА у ублажавању хипертензије повезане са PCOS, доприносећи корисном дејству на кардиоваскуларне дугорочне последице које су уочене код ове популације пацијената. Уочено смањење систолног крвног притиска након примене ЕМРА одговара студијама које указују на сличне кардиоваскуларне корисне ефекте код дијабетесних и али и недијабетесних стања (213). Примена ЕМРА у дози од 30 mg/kg дневно током 6 недеља третмана побољшала је систолни крвни притисак и ендотелну дисфункцију код пацова са метаболичким синдромом (214). Више студија указује на већу инциденцу хипертензије међу женама са PCOS у поређењу са општом популацијом (215). Код жена са PCOS, крвни притисак је повишен у поређењу са контролном групом сличног узраста, што је повезано са већим обимом струка и вредностима холестерола и тестостерона (216). Поред тога, претходне студије на пацовима са PCOS изазваним EV довеле су до повећања крвног притиска (217). Штавише, наша претходна студија је показала повећан систолни притисак код PCOS изазваног андрогенима код пацова (86). У студијама које су испитивале крвни притисак код PCOS регистровано је повољно дејство ЕМРА. Конкретно, *Pruett* и сарадници су показали да третман са ЕМРА раствореном у води за пиће у дози од 10 mg/kg, током последње три недеље примене дехидротестостерона за изазивање PCOS утиче на крвни притисак. Њихова студија је открила да блокирање SGLT2 употребом ЕМРА доводи до смањења масне масе, али и вредности крвног притиска. Међутим, овај третман у поменутој студији није побољшао инсулинску резистенцију код животиња на моделу PCOS. Уочено смањење крвног притиска ЕМРА третманом код PCOS пацова аутори су приписали побољшању интратеналне ACE експресије и активности изазване андрогенима (218). Штавише, третман метформином је смањило систолни крвни притисак у нашој студији, слично ЕМРА третманима. Овакво смањење систолног крвног притиска метформином је већ познато у претклиничким истраживањима (219). Такође, показано је да метформин смањује крвни притисак код жена са PCOS (220). Узрок хипертензије код жена са PCOS остаје нејасан, јер не постоје дефинитивни докази који би га директно повезивали са андрогенима или хиперинсулинемијом. Метформин је смањило систолни крвни притисак у нашој студији, што је било у складу са претходним извештајима (221). Међутим, МАР је смањен само средњом дозом ЕМРА, док метформин није значајно променио овај параметар. Међутим, друге студије су показале да је третман метформином био у стању да смањи МАР код пацова резистентних на инсулин, што би могло бити повезано са директним утицајем на ендотел и релаксацију зависну од азотног оксида, али тачан основни механизам остаје недовољно описан (222). Смањење МАР у третману метформином може бити повезано са његовим својствима да повећа сензитивност на инсулин. Студије сугеришу да метформин побољшава васкуларну функцију путем директног механизма, а не побољшањем метаболичких абнормалности. Међутим, иако нисмо приметили промене дијастолног крвног притиска и МАР након третмана метформином у нашем моделу PCOS, примећено је значајно смањење ових параметара у групама које су третиране средњом дозом ЕМРА у поређењу са групом PCOS, као што су *Pruett* и сарадници показали (218). Међутим, у њиховој студији систолни крвни притисак код ЕМРА третмана не достиже статистички значај у поређењу са нетретираним PCOS групом. Фреквенција срца је смањена код пацова који су третирани ниским и средњим дозама ЕМРА, у поређењу са PCOS групом без третмана. У том смислу, наши резултати се разликују од других студија

које нису показале разлику у варијабилности срчане фреквенције и срчаној фреквенцији након третмана ЕМРА (223, 224). Течење високим дозама ЕМРА и метформина у нашој студији није променио срчану фреквенцију, док су ове дозе имале потенцијал да смање систолни крвни притисак, што је било у складу са претходно наведеним студијама. Подаци из литературе су показали да лечење метформином може различито утицати на срчану фреквенцију код PCOS. Неки аутори су показали повећање срчане фреквенције након терапије метформином код пацијената са PCOS (221), док су други показали смањење (225) или је овај параметар био без промене након третмана метформином (226). Последња поменута студија је истраживала улогу метформина код пацова којису били на исхрани са високим садржајем масти и третман метформином није променио број откуцаја срца који одговара нашим резултатима.

#### 5.2.5. Ефекти примењених третмана на регулацију гликемије

Иако се сматра да примена протокола за индукцију PCOS коришћењем једне дозе EV није адекватан начин за успостављање метаболичког статуса карактеристичног за PCOS пацијенткиње (227, 152, 135) , доказан је повишен ниво глукозе наше и поремећена регулације глукозе са инсулинском резистенцијом након оваквог протокола (167, 179). Поред тога, *Daneasa* и сарадници су утврдили повишен ниво глукозе у крви наташте у PCOS групи али без разлике након OGTT између PCOS и контролне групе (180). У нашој студији, протокол за индукцију PCOS коришћењем EV уз режим исхране богате мастима, резултовао је вишим нивоима глукозе у крви PCOS пацова у поређењу са контролном групом након 30 и 60 минута OGTT. Након 120 минута, нивои глукозе у крви су били слични у обе испитиване групе, као што је наведено у претходном одељку. Све примењене дозе ЕМРА, као и примена метформина изазвали су снижавање вредности глукозе. Базалне вредности гликемије биле су статистички сигнификантно веће код PCOS групе у поређењу са третираним групама. Како у 30. минуту тако и у 60. и 120. минуту током извођења OGTT вредности глкемије су биле ниже код свих група третираних ЕМРА као и код групе која је била на третману метформином, у поређењу са PCOS групом. Најниже вредности гликемије током OGTT у свим минутима је била у групи са највећом примењеном дозом ЕМРА. Интересантно је да код ниједне групе третиране ЕМРА или метформином није забележен ниво гликемије испод референтног опсега. Поред тога, анализом површине испод криве гликемије, показана је већа вредност у PCOS групи у поређењу са свим осталим групама. Овај резултат треба имати на уму када се дискутује о побољшању гликорегулације јер су поремећаји у секрецији глукозе и инсулина веома чести коморбидитети PCOS. Примарно дејство ЕМРА остварује снижавањем нивоа глукозе у крви (228), инсулин независним путем, делујући на проксималне тубуле бубрега и спречавајући реапсорпцију глукозе, док метформин, који се и даље сматра основним агенсом у третману PCOS, смањује интестиналну апсорпцију гликозе. Бројним студијама је доказано да метформин побољшава телесну композицију и ниво инсулина код негојазних жена које болују од PCOS, али не испољава утицај на ВМІ као и на базалну вредност глукозе (229) те се примена ЕМРА у те сврхе може сматрати драгоценом. Сматра се да ЕМРА снижава телесну масу (за 1,8-2,7 kg) са малом вероватноћом изазивања хипогликемије (230). За разлику од других антидијабетесних лекова, снижавање вредности глукозе у плазми применом ЕМРА је независно од функције бета ћелија панкреаса и сензитивности на инсулин. Ово инсулин независно снижавање вредности глукозе у плазми смањује потребе за инсулином и изазва пораст односа глукагона и инсулина, превodeћи метаболизам у

катаболичко стање (231). Рандомизирана, двоструко слепа студија, на пацијентима оболелим од DM2, показала је да након примене ЕМПА долази до регулације глукозе током OGTT као и до побољшања постпрандијалне вредности глукозе (232). Такође *Sinha* и сарадници су показали да је употреба SGLT2i побољшала метаболичке и антропометријске PCOS и аутори сматрају да њихова употреба има вероватно и повољни ефекат на хормоне (233). Такође, резултати наше студије доказали су повољан хормонски ефекат, обзиром да је ЕМПА, у свим примењеним дозама, снизио ниво инсулина у серуму. Ипак, највећи ниво значајности је достигнут у највишој примењеној дози ЕМПА, слично метформину. PCOS карактерише ткивно селективна инсулинска резистенција (234). Селективна инсулинска резистенција, спречава метаболизам глукозе у мишићима и масном ткиву, настаје хиперинсулинизам који погоршава стање хиперандрогенемије (235). Иако према важећим Ротердамским критеријумима, хиперинсулинемија не представља дијагностички критеријум за PCOS, важан је етиопатогенетски механизам овог поремећаја, обзиром да постоји уска повезаност хиперандрогенизма и хиперинсулинемије код пацијенткиња са инсулинском резистенцијом, PCOS и DM2 (236). Хиперинсулинемија код PCOS повећава секрецију LH и, стога, индиректним деловањем LH појачава лучење андрогена у јајницима. Такође, успед појачане секреције инсулина долази до смањене продукције SHBG у јетри, што повећава расположивост слободног тестостерона у циркулацији. Анализом резултата нашег истраживања показали смо да је инсулинемија била је нижа у свим групама третираним ЕМПА у поређењу са PCOS групом, као и резултатима сличне студије која је поредила ефекат ЕМПА и метформина код летрозолом индукованог PCOS пацова (209) Такође, инсулинемија је била значајно нижа у групи третираној метформинем, што је у корелацији са резултатима сличне студије која је поредила ефекте Diane 35 и метформина код пацова са PCOS (237). Ипак, хиперандрогенемија и хиперинсулинемија нису изражени код свих PCOS пацијенткиња, те је ради предлагања циљаних терапијских приступа важно иницијално разликовати диверзитет фенотипова овог поремећаја.

#### 5.2.6. Ефекти примењених третмана на регулацију липидног статуса и морфологије адипоцита

Поремећаји метаболизма липида често се јављају код пацијенткиња са PCOS (238). Наше истраживање је показало да ЕМПА у средњој примењеној дози као метформин снижавају ниво холестеролоа, док ниво триглицерида је снизила највећа примењена доза ЕМПА и метформин. Само најмања примењена доза ЕМПА није могла да изазове елевацију нивоа HDL у серуму и снижење нивоа LDL у серуму. ЕМПА представља обећавајући терапијски приступ у побољшању метаболичких поремећаја код жена PCOS обзиром да снижен ниво холестерола, триглицерида, LDL а повећање нивоа HDL је добијен и у студији када су PCOS пацови третирани ЕМПА и метформинем (209). Слични резултати блокаде хепатичке продукције LDL су добијени и након третмана спиронолактоном код летрозолом индукованог PCOS пацова (239). У моделу PCOS пацова индукованог летрозолом, као и у нашој студији, метформин је снизио ниво укупног холестерола, триглицерида и LDL (240).

Код пацијенткиња оболелих од PCOS постоји хронична инфламација ниског степена и дисфункција адипоцита. Гојазност и повећана количина висцералног масног ткива повезани су са хиперандрогенизмом код PCOS жена (218). Абдоминална гојазност присутна је у 50-60% пацијенткиња које болују од PCOS (241) . Претходне



студије показале су да жене оболеле од PCOS имају више и субкутаног и висцералног масног ткива у поређењу са здравом популацијом истих година старости (242). Прегледом литературе показано је да ЕМРА регулисати ниво масног ткива, енергетског метаболизма и системске инфламације. (243). Терапија ЕМРА испољава дејство на липолизу повећавајући експресију липопротеинске липазе у субкутаном и висцералном масном ткиву и смањујући садржај масти у кластеру диференцијације транспортера масних киселина 36 (CD36) (243). Узимајући у обзир да је повишена експресија овог транспортера детектована у масном ткиву код гојазних (244) ЕМРА може деловати протективно, модулишући функцију CD36, и изазивајући хомеостазу масних киселина. Откривено је да ЕМРА дози од 10 mg/kg смањује акумулацију M1 поларизованих макрофага изазивајући појачану продукцију M2 фенотипа макрофага који испољава антиинфламаторно дејство у висцералном масном ткиву, и на тај начин ублажава хроничну упалу која се јавља код гојазности (245). Доступни подаци такође указују на то да ЕМРА има регулаторни ефекат на депое масног ткива. Доказане су разлике у висцералним и субкутаном липидима масног ткива као и измена метаболизма у правцу липолизе оба депоа белог масног ткива након третмана емпаглифозином (243). Истраживања су показала да шестонедељни третман ЕМРА смањује укупну количину масног ткива са најизраженијим смањењем переиреналног масног ткива које представља део висцералног масног ткива (246) . Показано је да примена ЕМРА повећава активност ензима који метаболишу липиде у висцералном и субкутаном масном ткиву, повећавајући оксидацију фосфатидилхолина и диглицерида у висцералном масном ткиву, и смањујући ниво глицерофосфолипида у субкутаном масном ткиву (247). Губитак глукозе урином посредован применом ЕМРА доводи до метаболичких промена и изазива оксидацију масних киселина што проузрокује смањење акумулацију масти (248). Такође, бројна истраживања су показала да метформин доводи до редукције висцералног масног ткива (249). Све је већи број студија које су доказале да SGLT2i смањују количину масног ткива и доводе до губитка калорија изазивајући гликозурију и активирајући липолизу (209, 250, 251, 252, 253).

У нашој студији приказан је позитиван ефекат емпаглифозина на смањење површине и дијаметра висцералног масног ткива. Применом ЕМРА у највећој дози као и применом метформина дошло је до статистички значајне редукције површине адипоцита висцералног масног ткива и до смањења дијаметра адипоцита висцералног масног ткива. Такође, доказали смо да ЕМРА у средњој и највећој дози коју смо примењивали као и примена метформина доводе до статистички значајног смањења површине и дијаметра адипоцита субкутаног масног ткива, и тај ефекат је био сличан ефекту метформина. Слични резултати, у смислу смањења површине адипоцита, су добијени од стране истраживача који су анализирали дејство SGLT2i на митохондријалну функцију и оксидативни стрес у масном ткиву (137). Поред тога, у студији код преддијабетесних пацова третман ЕМРА значајно је повећао проценат адипоцита мањег дијаметра, док је смањено проценат адипоцита већег дијаметра у висцералном (епидидималном) масном ткиву, што указује на користан ефекат ЕМРА у смањењу хипертрофије висцералних адипоцита (254). Овај ефекат је био удружен са смањењем оксидационог стреса у висцералном, али не и у субкутаном масном ткиву. Слично, наши резултати су потврдили да средња и највиша примењена доза ЕМРА у највећој мери смањује концентрације прооксидативних параметара, уз следствено повећање маркера антиоксидационе заштите у крви и у јајнику. Поред тога, смањење концентрације тестостерона код ових животиња је у складу са смањењем величине адипоцита. Постоје докази да је управо сигнализација преко андрогеног рецептора на

нивоу масног ткива кључна за развој метаболичких аспеката (255). Интеракције на нивоу масног ткива и репродуктивних функција су објашњене сигнализацијом преко адипокина. Повишене концентрације адипокина пореклом из масног ткива у PCOS могу стимулирати кинезин неуроне у хипоталамусу, што даље доводи до појачане фреквенције ослобађања гонадотропин-рилизинг хормона. Оваква стимулација се одражава на повећање секреције андрогена, што представља кључну карику у развоју симптома PCOS. Студије на пацовима који су били изложени дијети са повећаним садржајем масти, показале су да таква интервенција може утицати на регуларност циклуса јајника, управо преко повећања фреквенције пулсатилности лутеинизирајућег хормона, али и повећањем експресије кинезина (256). На овај начин се може повезати хиперинсулинемија и хиперандрогенизам јајника са инфертилитетом и гојазношћу код PCOS (257).

### 5.2.7. Ефекти примењених третмана на морфологију јајника

Претходна истраживања су показала да естрадиол-валерат изазива промене у хистологији јајника услед хормонског дисбаланса (258). Главни регулатори развоја фоликула јајника, матурације ооците и овулације су гонадотропни хормони (259). Секретија LH диктира синтезу андрогена, омогућава започињање мејотичке деобе у ооцитима, индукује овулацију и развија жуто тело (259). FSH омогућава пролиферацију гранулозе и индукује синтезу естрогена, док на развој фоликула делује од примарног до стадијума преантралног фоликула (260). Примењено је да естрадиол-валерат спречава нормалну матурацију фоликула и повећава број цистичних фоликула, а смањује број жутих тела, што указује да се овулација не одиграва као у физиолошким условима (258). Резултати наше студије показују да је применом ЕМРА као и применом метформина дошло до смањења броја цистичних фоликула, а до повећања броја жутих тела у средњој и највећој примењеној дози ЕМРА као и услед терапије метформином, што имплифицира да услед терапије ЕМРА као и метформином, долази до повећане стопе овулаторних циклуса. Сходно резултатима нашег истраживања и студија чији је фокус истраживања био сличан нашем је показала редукован број цистичних фоликула са задебљањем слоја гранулоза ћелија након примене ЕМРА и метформина (209). Иста студија (209) је истакла да у њиховом PCOS моделу након терапије ЕМРА и метформином је повећан број де Графових фоликула, а пре терапије доминантно су били присутни преантрални, атретични фоликули са смањеним бројем антралних фоликула и жутих тела (261, 262). *Wu* и сарадници су истраживали ефекат метформина и пиоглитазона на матурацију фоликула у PCOS моделу пацова, и показали су да такође, као и у нашем истраживању метформин доводи до смањења цистичних фоликула и повећања броја антралних фоликула (261). Резултати нашег истраживања су показали да све примењене дозе ЕМРА су довеле до значајног повећања броја секундарних фоликула у односу на Р групу, слично метформину. Поред тога, група третирана највећом дозом ЕМРА као и метформином показала је значајно већи број секундарних фоликула и у односу на групу третирану најнижом дозом ЕМРА. Број терцијарних фоликула је био значајно већи у групама третираним највећом дозом ЕМРА као и метформином у односу на Р групу, слично као и у случају третмана метформином. Средња и највећа примењена доза ЕМРА су довеле до значајног смањења броја атретичних фоликула у односу на Р групу, слично метформину. Поред тога, група третирана највећом дозом ЕМРА као и група третирана метформином показала је значајно мањи број атретичних фоликула и у односу на групу третирану најнижом дозом ЕМРА. Истраживање на PCOS моделу код мишева такође је открило

да услед примене метформина долази до смањења броја примарних, атретичних и цистичних фоликула као и повећање броја жутих тела и графових фоликула (263).

### 5.2.8. Ефекти примењених третмана на морфологију утеруса

У нашој студији је дошло је до промена у морфологији утеруса након свих примењених третмана у поређењу са Р групом. Литературни подаци указују да је у ткиву материце пацова након индукције PCOS коришћењем андрогена дошло до повећања висине луминалног епитела, као и задебљања зида материце услед смањења дебљине ендометријума и повећања дебљине миометријума (264). Слично томе, у студији која је проучавала морфологију материце код PCOS изазваног EV, забележена је повећана митотска активност ћелија и у луминалном, али и у жлезданом епителу материце са повећаном стромалном инфилтацијом еозинофила у ендометријуму (200). Показано је да стимулација материце посредована естрогенима доводи до промена у типу и морфологији луминалног и glandуларног епитела (265). Подаци из литературе су такође показали да постојања луминалне хиперплазије и хиперплазије жлезданог епитела са увећањем броја појединачних тубуларних жлезда материце и са смањењем тубуларних жлезда утеруса, могу представљати факторе за критеријум постојања смањеног броја ендометријалних рецептора код пацијенткиња са PCOS. (266) У материци, жлездане епителне ћелије су главни извор секреције утеруса који је фундаменталан за успостављање и одржавање ембриона а луминалне епителне ћелије омогућавају ембрионалну имплантацију. (267) Дејство ЕМРА на морфологију утеруса код PCOS пацова до сада није проучавано. Анализом луминалног епитела, утврдили смо да све три примењене дозе ЕМРА као и примена метформина је довела до смањења његове висине. Висина луминалног епитела утеруса се најмање смањила након примењене најмање дозе ЕМРА, док су остале групе третиране вишим дозама ЕМРА, као и метформином у већем проценту довеле до смањења висине епитела. У погледу дебљине ендометријума, као и у претходно спроведеним студијама (264), и у нашој студији је регистрована најмања дебљина ендометријума у PCOS групи. Сматра се да је истањен ендометријум код PCOS последица смањене ангиогенезе у ендометријуму услед смањене експресије кавеолина 1 (CAV1) и васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF) (268). У нашој студији након третмана дебљина ендометријума је била значајно већа након примењене средње и највеће дозе ЕМРА као и након примене метформина, најмања примењена доза ЕМРА није довела до статистички значајног задебљања ендометријума. Познато је да реактивни кисеонични радикали могу модулисати раст строме ендометријума (231). Интересантно је да се наши подаци у погледу дебљине строме могу тумачити у складу са повећаном активношћу GSH (231). Групе третиране ЕМРА у средњој и највећој дози, као и група третирана метформином показале су повећану активност GSH, што може да нас доведе до закључка да услед смањења оксидационог стреса долази до боље пролиферације ендометријума. Познато је да су високи нивои естрадиола првенствено повезани са максималном пролиферацијом у жлездама материце и строме (269). Ипак, наша студија је показала повећање дебљине строме и смањење нивоа естрадиола након примењених третмана, што је вероватно последица избора модела за индукцију PCOS у нашој студији. Повећање нивоа прогестерона у серуму након свих примењених третмана је у корелацији са морфометријским налазима утеруса, поготово након највеће примењене дозе ЕМРА и метформина. Такође, повећање броја жутих тела које је у највећем броју регистровано код поменутих група, осликава корисне ефекте ЕМРА и метформина на број овулација, док се регистровано повећање дебљине ендометријума употпуњује слику о ефикасности примењених третмана. На ткиво материце утичу нивои хормона у серуму, али и њихова ткивна расположивост. Одговор циљног ткива на хормоне такође зависи од њихове доступности у том ткиву, што је делимично регулисано

активношћу ткивних стероидогених ензима. У андрогеном изазваном моделу PCOS код пацова, ниво хормона у крви није у корелацији са ткивним, и повезан са експресијом и активношћу стероидогених ензима. Дакле, код PCOS је измењена ензимска активност последица хормонских промена у ткиву материце, али и интеракције са стероидним рецепторима (270).

#### 5.2.9. Ефекти примењених третмана на редокс равнотежу у крви у ткиву јајника

У овом експерименту смо анализирали прооксидативне и антиоксидативне параметре као и антиоксидативни протективни систем системске циркулације као и хомогената ткива оваријума. Познато је да је OS један од етиопатогенетских фактора PCOS. Метформин се сматра златним стандардом у терапији PCOS, описано је да побољшава оксидативно окружење гранулоза ћелија код пацова са индукованим PCOS (271), а антиоксидативни ефекат ЕМРА је потврђен у бројним студијама (272, 273). Показано је да ЕМРА ублажава оксидативни стрес у митохондријама (274), а доказано је да су митохондрије есенцијалне у регулацији оксидативног стреса, и да код жена са PCOS постоји митохондријална дисфункција са повећаном продукцијом слободних кисеоничних радикала и смањеном продукцијом АТФ (275). *Chappell* и савременици су развили PCOS модел пацова у коме су ооците имале смањен митохондријални мембрански потенцијал и повећану продукцију слободних кисеоничних радикала (276). Прегледом литературе утврдили смо да су различите дозе метформина коришћене у циљу спречавања стварања липидне пероксидације у ћелијској мембрани. Одлучили смо да примемо дозу од 500 mg/kg јер мање примењиване дозе у сличним истраживањима попут 20 mg/kg (277) и 300 mg/kg (278) нису биле делотворне у спречавању настанка липидне пероксидације у ткиву јајника и у циркулацији, такође слична студија је са применом 500 mg/kg метформина доказала његов антиоксидантни ефекат (194). Претходно спроведене студије које су одређивале дејство ЕМРА на оксидативни стрес код пацова су доказале позитиван ефекат са дозом од 10 mg/kg (137, 209).

TBARS представља маркер липидне пероксидације у крви и осталим ткивима. У нашој студији ниво TBARS значајно је снижен након примењене средње и највеће дозе ЕМРА као и након примене метформина. Примена метформина као и ЕМРА у највећој дози довеле су до највећег снижавања TBARS у свим испитиваним групама. У ткиву јајника TBARS је снижен услед примене највеће дозе ЕМРА и метформина. Добијени резултати наше студије су у складу са резултатима сличних истраживања (279, 280). Концентрација  $O_2^-$  није се значајно мењала у свим третираним групама у односу на нетретирану Р групу. Код свих примењених доза ЕМРА, као и код примене метформина, дошло је до снижења вредности  $H_2O_2$  у плазми и алтерације у вредностима између група су биле сличне. Интересантно је да је само најмања доза ЕМРА довела до снижења вредности  $NO_2^-$  у плазми.

Интересантне разлике у резултатима су добијене анализом антиоксидативног одбрамбеног система. Само највећа примењена доза ЕМРА као и примена метформина довеле су до повећања активности SOD и повољшања антиоксидативног ефекта у крви, док у ткиву јајника је у свим третираним групама забележена повећана активност SOD. Све примењене дозе ЕМРА као и метформин су могли да повећају активност CAT,

насупротив томе у ткиву јајника ниједна третирана група није забележила повећану активност САТ. Ниво GSH је био снижен у Р групи што је у складу са већ публикованим аниманним истраживањима и узимајући у обзир чињеницу да превага прооксиданаса постоји у овом синдрому (281). Само најмања примењена доза ЕМРА није успела да повећа активност GSH док повећана GSH протекција у ткиву јајника је забележена услед примене највеће дозе ЕМРА и метформина. Из свега наведеног можемо закључити да ради побољшања антиоксидативног система одбране се може користити ЕМРА у највећој примењеној дози, као и метформин. Инсулинска резистенција, хиперандрогенизам и дислипидемија често коезгистирају са липидном пероксидацијом (194) и ЕМРА и метформин испољавају сличан ефекат на поменуте поремећаје. И обзиром да је ЕМРА повољшава митохондријалну функцију чије нормално функционисање је поремећено у PCOS, његова примена у лечењу ових поремећаја може бити обећавајуће.

## **6. ЗАКЉУЧЦИ**

## Главни закључак:

Резултати нашег истраживања су показали да примена ЕМРА повољно утиче на метаболичке и репродуктивне дисбалансе у моделу PCOS код пацова који је изазван применом естрадиол-валерата и режима исхране богате мастима. Средња и највећа примењена доза ЕМРА током 28 дана третмана (15 mg/kg и 45 mg/kg) испољавају најбољи ефекат у већини анализираних карактеристика PCOS у поређењу са најнижом дозом ЕМРА (5 mg/kg). Ови резултати могу навести на даља клиничка истраживања код пацијенткиња са PCOS, у различитим терапијским режимима.

## Остали закључци:

1. Једна доза естрадиол-валерата синергистички са применом исхране богате мастима током 60 дана доводи до развоја PCOS модела код постпуберталних пацова који испољава репродуктивне и метаболичке абнормалности сличне гојазном фенотипу PSOS код жена.
2. Модел за индукцију PCOS примењен у овој студији довео је до повећања телесне масе, масе јајника, поремећаја еструсног циклуса, повећања нивоа тестостерона, снижења нивоа прогестерона, повећања волумена јајника, појаве полицистичне морфологије јајника са повећањем броја цистичних фоликула и смањењем броја жутих тела и повећања прооксидативних молекула.
3. ЕМРА у средњој и највишој примењеној дози испољава исти ефекат као и метформин на смањење финалне телесне масе у PCOS моделу код пацова.
4. Све примењене дозе ЕМРА довеле су до ублажавања нерегуларности еструса, али у мањој мери него метформин.
5. Примена ЕМРА је супериорнија у односу на метформин у снижавању артеријског крвног притиска.
6. ЕМРА у свим примењеним дозама доводи до смањена волумена јајника као и метформин.
7. ЕМРА у свим примењеним дозама, као и метформин регулише гликемијски статус и инсулинемију.
8. ЕМРА у средњој и највишој примењеној дози испољава ефекте сличне метформину у побољшању липидног статуса.
9. ЕМРА у највећој дози је испољио исте ефекте као и метформин у регулацији нивоа тестостерона, естрадиола и прогестерона.
10. ЕМРА је испољио исте ефекте као и метформин у регулацији FSH у серуму док у регулацији LH у серуму метформин испољио бољи ефекат.
11. Третман највећом примењеном дозом ЕМРА имао је исти ефекат као и метформин у регулацији прооксидационих и антиоксидационих биомаркера молекула у крви.
12. ЕМРА у највећој примењеној дози је повећао нивое GSH и смањио TBARS у ткиву јајника, док је активност SOD повећана свим примењеним дозама ЕМРА.
13. Третман ЕМРА имао је исти ефекат у снижењу масе јајника као и метформин., док је највећој примењена доза ЕМРА имала исти ефекат у снижењу масе утеруса као и метформин.
14. На висину луминалног епитела и дебљину ендометријума исти ефекат су испољили средња и највећа примењена доза ЕМРА и метформин.
15. Средња и највећа примењена доза ЕМРА је сличнее ефекте на дијаметар и површину висцераног и субкутаног масног ткива као и метформин.
16. Средња и највећа примењена доза ЕМРА је испољила исти ефекат као метформин у регулацији броја фоликула и жутих тела као и метформин



# **7. ЛИТЕРАТУРА**

## Референце:

1. Keettel WC, Bradbury JT, Stoddard FJ. Observations on the polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1957;73: 954-962.
2. Stein I, Leventhal M. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.*1935; 29:181-191
3. Vallisneri A, 1721. Cited in Insler V, Lunesfeld B. Polycystic ovarian disease: A challenge and controversy. *Gynecol Endocrinol.* 1990; 4:51-69.
4. Chereau, Achilles. *Memoires pour Servir a l'Etude des Maladies des Ovaries.* Paris: Fortin, Masson & Cie; 1844. 3. Rokitansky C. *A Manual of Pathological Anatomy – Vol II.* Philadelphia: Blanchard & Lea; 1855, 24.
5. Bulius G, Kretschmar C. *Angiodystrophia.* Stuttgart: Verlag von Ferdinand Enke; 1897.
6. Tait L. Removal of normal ovaries. *Br Med J.* 1879; 813:284.
7. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev.* 2012; 33:981-1030.
8. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF; Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril.*2009;91:456-88.
9. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, Escobar-Morreale HF. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update.*2014;20:334-52.
10. Takeuchi T, Tsutsumi O, Taketani Y. Abnormal response of insulin to glucose loading and assessment of insulin resistance in non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2008; 24:385-91.
11. Ismayilova M, Yaya S. "I felt like she didn't take me seriously": a multi-methods study examining patient satisfaction and experiences with polycystic ovary syndrome (PCOS) in Canada. *BMC Womens Health.* 2022; 23:22-47.
12. Christ JP, Cedars MI. Current Guidelines for Diagnosing PCOS. *Diagnostics (Basel).* 2023;13:1113 .
13. 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; 35:1-3
14. 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;84:38-43

15. Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:2100-4.
16. Carey AH, Waterworth D, Patel K, White D, Little J, Novelli P, Franks S, Williamson R. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet.* 1994;3:1873-6.
17. Liu H, Zhao H, Chen ZJ. Genome-Wide Association Studies for Polycystic Ovary Syndrome. *Semin Reprod Med.* 2016;34:224-9.
18. McAllister JM, Legro RS, Modi BP, Strauss JF 3rd. Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26:118-24.
19. Day F, Karaderi T, Jones MR, Meun C, He C, Drong A, Kraft P, Lin N, Huang H, Broer L, Magi R, Saxena R, Laisk T, Urbanek M, Hayes MG, Thorleifsson G, Fernandez-Tajes J, Mahajan A, Mullin BH, Stuckey BGA, Spector TD, Wilson SG, Goodarzi MO, Davis L, Obermayer-Pietsch B, Uitterlinden AG, Anttila V, Neale BM, Jarvelin MR, Fauser B, Kowalska I, Visser JA, Andersen M, Ong K, Stener-Victorin E, Ehrmann D, Legro RS, Salumets A, McCarthy MI, Morin-Papunen L, Thorsteinsdottir U, Stefansson K; 23andMe Research Team; Styrkarsdottir U, Perry JRB, Dunaif A, Laven J, Franks S, Lindgren CM, Welt CK. Large-scale genome-wide meta-analysis of polycystic ovary syndrome suggests shared genetic architecture for different diagnosis criteria. *PLoS Genet.* 2018;14:e1007813.
20. Concha C F, Sir P T, Recabarren SE, Pérez B F. Epigenética del síndrome de ovario poliquístico [Epigenetics of polycystic ovary syndrome]. *Rev Med Chil.* 2017; 145:907-915.
21. Vázquez-Martínez ER, Gómez-Viais YI, García-Gómez E, Reyes-Mayoral C, Reyes-Muñoz E, Camacho-Arroyo I, Cerbón M. DNA methylation in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Reproduction.* 2019; 158:R27-R40
22. Legro RS, Kunesman AR, Dodson WC, 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.
23. Melo AS, Vieira CS, Barbieri MA, Rosa-E-Silva AC, Silva AA, Cardoso VC, Reis RM, Ferriani RA, Silva-de-Sá MF, Bettioli H. High prevalence of polycystic ovary syndrome in women born small for gestational age. *Hum Reprod.* 2010;25:2124-31
24. Woodruff T.J., Janssen S, Guillette Jr., L.J. Giudice L.C. Environmental impacts on reproductive health and fertility. Cambridge University Press, New York 2010
25. Merkin SS, Phy JL, Sites CK, Yang D. Environmental determinants of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2016;106:16-24.
26. Vagi SJ, Azziz-Baumgartner E, Sjödin A, Calafat AM, Dumesic D, Gonzalez L, Kato K, Silva MJ, Ye X, Azziz R. Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol A in polycystic ovary syndrome: a case-control study. *BMC Endocr Disord.* 2014;14:86.
27. Yang Q, Zhao Y, Qiu X, Zhang C, Li R, Qiao J. Association of serum levels of typical organic pollutants with polycystic ovary syndrome (PCOS): a case-control study. *Hum Reprod.* 2015; (8):1964-73.

28. Taylor AE, McCourt B, Martin KA, Anderson EJ, Adams JM, Schoenfeld D, Hall JE. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2248-56.
29. Imse V, Holzapfel G, Hinney B, Kuhn W, Wuttke W. Comparison of luteinizing hormone pulsatility in the serum of women suffering from polycystic ovarian disease using a bioassay and five different immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;74:1053-61.
30. Kazer RR, Kessel B, Yen SS, Circulating luteinizing hormone pulse frequency in women with polycystic ovary syndrome, *J Clin Endocrinol Metabol* 65:233, 1987. Imse V, Holzapfel G, Hinney B, Kuhn W, Wuttke W, Comparison of luteinizing hormone pulsatility in the serum of women suffering from polycystic ovarian disease using a bioassay and five different immunoassays, *J Clin Endocrinol Metabol.* 1992; 74:1053.
31. Hayes FJ, Taylor AE, Martin KA, Hall JE. Use of a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a physiologic probe in polycystic ovary syndrome: assessment of neuroendocrine and androgen dynamics. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2343-9.
32. Arroyo A, Laughlin GA, Morales AJ, Yen SS. Inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome: influence of adiposity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3728-33.
33. Nestler JE. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2008;358:47-54.
34. Kumar A, Woods KS, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;62:644-9.
35. Martin KA, Chang RJ, Ehrmann DA, Ibanez L, Lobo RA, Rosenfield RL, Shapiro J, Montori VM, Swiglo BA. Evaluation and treatment of hirsutism in premenopausal women: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:1105-20.
36. Almahbobi G, Anderiesz C, Hutchinson P, McFarlane JR, Wood C, Trounson AO. Functional integrity of granulosa cells from polycystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;44:571-80.
37. Hughesdon PE. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstet Gynecol Surv.* 1982;37:59-77.
38. Kinnear HM, Tomaszewski CE, Chang FL, Moravek MB, Xu M, Padmanabhan V, Shikanov A. The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction.* 2020;160:R25-R39.
39. Moller DE, Vidal-Puig A, Azziz R, Severe Insulin-Resistance Hyperandrogenic Syndromes. *Contemporary Endocrinology*, Humana Press, pp. 129–138.
40. Pandey AV, Miller WL. Regulation of 17,20 lyase activity by cytochrome b5 and by serine phosphorylation of P450c17. *J Biol Chem.* 2005;280:13265-71.
41. Unluhizarci K, Karaca Z, Kelestimur F. Role of insulin and insulin resistance in androgen excess disorders. *World J Diabetes.* 2021;12:616-629.
42. Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Mol Med.* 2006;12:324-32.

43. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;50:113-6.
44. Kahn CR, Flier JS, Bar RS, Archer JA, Gorden P, Martin MM, Roth J. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. *Insulin-receptor disorders in man. N Engl J Med.* 1976;294:739-45.
45. Tsiodras S, Mantzoros C, Hammer S, Samore M. Effects of protease inhibitors on hyperglycemia, hyperlipidemia, and lipodystrophy: a 5-year cohort study. *Arch Intern Med.* 2000;160:2050-6.
46. Musso C, Cochran E, Moran SA, Skarulis MC, Oral EA, Taylor S, Gorden P. Clinical course of genetic diseases of the insulin receptor (type A and Rabson-Mendenhall syndromes): a 30-year prospective. *Medicine (Baltimore).* 2004;83:209-222
47. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997;18:774-800.
48. McCartney ChR, Marshall JC. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med.* 2016;;375:1398-1399
49. Barbieri RL, Makris A, Ryan KJ. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of human ovarian stroma and theca. *Obstet Gynecol.* 1984;64(3 Suppl):73S-80S.
50. Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;122:42-52.
51. Veltman-Verhulst SM, van Haeften TW, Eijkemans MJ, de Valk HW, Fauser BC, Goverde AJ. Sex hormone-binding globulin concentrations before conception as a predictor for gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2010;25:3123-8.
52. Tok EC, Ertunc D, Evruke C, Dilek S. The androgenic profile of women with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Reprod Med.* 2004;49:746-52.
53. Carpentier AC. Postprandial fatty acid metabolism in the development of lipotoxicity and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2008;34:97-107.
54. Hirschberg AL. Polycystic ovary syndrome, obesity and reproductive implications. *Womens Health (Lond).* 2009;5:529-40;
55. Recabarren SE, Smith R, Rios R, Maliqueo M, Echiburú B, Codner E, Cassorla F, Rojas P, Sir-Petermann T. Metabolic profile in sons of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:1820-6.
56. Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;211:85-90.
57. Teede HJ, Tay CT, Laven JJE, Dokras A, Moran LJ, Piltonen TT, Costello MF, Boivin J, Redman LM, Boyle JA, Norman RJ, Mousa A, Joham AE. Recommendations From the 2023 International Evidence-based Guideline for the Assessment and Management of Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2023;108:2447-2469.
58. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004;19:41-7.

59. Legro RS, Myers ER, Barnhart HX, Carson SA, Diamond MP, Carr BR, Schlaff WD, Coutifaris C, McGovern PG, Cataldo NA, Steinkampf MP, Nestler JE, Gosman G, Guidice LC, Leppert PC; Reproductive Medicine Network. The Pregnancy in Polycystic Ovary Syndrome study: baseline characteristics of the randomized cohort including racial effects. *Fertil Steril*. 2006;86:914-33.
60. Ardaens Y, Robert Y, Lemaitre L, Fossati P, Dewailly D. Polycystic ovarian disease: contribution of vaginal endosonography and reassessment of ultrasonic diagnosis. *Fertil Steril*. 1991;55:1062-8.
61. Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC. PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: Change in prevalence among WHO-II anovulation and association with metabolic factors. *BJOG*. 2006;113:1210-7.
62. Reiser E, Lanbach J, Böttcher B, Toth B. Non-Hormonal Treatment Options for Regulation of Menstrual Cycle in Adolescents with PCOS. *J Clin Med*. 2022;12(1):67.
63. Peña A.S., Codner E., Witchel S. Criteria for Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome during Adolescence: Literature Review. *Diagnostics*. 2022;12:1931.
64. Harris HR, Titus LJ, Cramer DW, Terry KL. Long and irregular menstrual cycles, polycystic ovary syndrome, and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Int J Cancer*. 2017;140:285-291.
65. Rudnicka E, Suchta K, Grymowicz M, Calik-Ksepka A, Smolarczyk K, Duszewska AM, Smolarczyk R, Meczekalski B. Chronic Low Grade Inflammation in Pathogenesis of PCOS. *Int J Mol Sci*. 2021;22:3789.
66. Rostamtabar M, Esmailzadeh S, Tourani M, Rahmani A, Bae M, Shirafkan F, Saleki K, Mirzababayi SS, Ebrahimpour S, Nouri HR. Pathophysiological roles of chronic low-grade inflammation mediators in polycystic ovary syndrome. *J Cell Physiol*. 2021;236:824-838.
67. Dabravolski SA, Nikiforov NG, Eid AH, Nedosugova LV, Starodubova AV, Popkova TV, Bezsonov EE, Orekhov AN. Mitochondrial Dysfunction and Chronic Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2021;22:3923.
68. Deligeoroglou E, Vrachnis N, Athanasopoulos N, Iliodromiti Z, Sifakis S, Iliodromiti S, Siristatidis C, Creatas G. Mediators of chronic inflammation in polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2012;28:974-8.
69. 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;22:321-327.
70. Shan H, Luo R, Guo X, Li R, Ye Z, Peng T, Liu F, Yang Z. Abnormal Endometrial Receptivity and Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome. *Front Pharmacol*. 2022;13:904942.
71. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF; Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009;91:456-88.

72. Luo L, Gu F, Jie H, Ding C, Zhao Q, Wang Q, Zhou C. Early miscarriage rate in lean polycystic ovary syndrome women after euploid embryo transfer - a matched-pair study. *Reprod Biomed Online*. 2017;35:576-582.
73. Li R, Wu J, He J, Wang Y, Liu X, Chen X, Tong C, Ding Y, Su Y, Chen W, Zhang C, Gao R. Mice endometrium receptivity in early pregnancy is impaired by maternal hyperinsulinemia. *Mol Med Rep*. 2017;15:2503-2510.
74. 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;16(1):80.
75. Ashkar F, Rezaei S, Salahshornezhad S, Vahid F, Gholamalizadeh M, Dahka SM, Doaei S. The Role of medicinal herbs in treatment of insulin resistance in patients with Polycystic Ovary Syndrome: A literature review. *Biomol Concepts*. 2020;11:57-75.
76. Hardiman P, Pillay OC, Atiomo W. Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet*. 2003;361(9371):1810-2.
77. Lo JC, Feigenbaum SL, Yang J, Pressman AR, Selby JV, Go AS. Epidemiology and adverse cardiovascular risk profile of diagnosed polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1357-63
78. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Oden A. Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction. Evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1992;71:599–604.
79. Klein IH, Ligtenberg G, Oey PL, Koomans HA, Blankestijn PJ. Sympathetic activity is increased in polycystic kidney disease and is associated with hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2427–2433.
80. Supiano MA, Hogikyan RV, Sidani MA, Galecki AT, Krueger JL. Sympathetic nervous system activity and alpha-adrenergic responsiveness in older hypertensive humans. *Am J Physiol*. 1999;276:E519–28.
81. Osibogun O, Ogunmoroti O, Michos ED. Polycystic ovary syndrome and cardiometabolic risk: Opportunities for cardiovascular disease prevention. *Trends Cardiovasc Med*. 2020;30:399-404.
82. Patel SS, Truong U, King M, Ferland A, Moreau KL, Dorosz J, Hokanson JE, Wang H, Kinney GL, Maahs DM, Eckel RH, Nadeau KJ, Cree-Green M. Obese adolescents with polycystic ovarian syndrome have elevated cardiovascular disease risk markers. *Vasc Med*. 2017;22:85-95
83. Iftikhar S, Collazo-Clavell ML, Roger VL, St Sauver J, Brown RD Jr, Cha S, Rhodes DJ. Risk of cardiovascular events in patients with polycystic ovary syndrome. *Neth J Med*. 2012;70(2):74-80.
84. Vrbikova J, Cifkova R, Jirkovska A, Lanska V, Platilova H, Zamrazil V, Starka L. Cardiovascular risk factors in young Czech females with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2003;18:980–984.
85. Koricanac G, Tepavcevic S, Zakula Z, Milosavljevic T, Stojiljkovic M, Isenovic ER. Interference between insulin and estradiol signaling pathways in the regulation of cardiac eNOS and Na(+)/K(+)-ATPase. *Eur J Pharmacol*. 2011;655:23-30.

86. Joksimovic Jovic J, Sretenovic J, Jovic N, Rudic J, Zivkovic V, Srejovic I, Mihajlovic K, Draginic 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;2021:8862878.
87. Oliver-Williams C., Vassard D., Pinborg A., Schmidt L. Risk of cardiovascular disease for women with polycystic ovary syndrome: Results from a national Danish registry cohort study. *Eur. J. Prev. Cardiol*. 2020;28:e39–e41
88. Afrin S, AlAshqar A, El Sabeh M, Miyashita-Ishiwata M, Reschke L, Brennan J, et al. Diet and nutrition in gynecological disorders: a focus on clinical studies. *Nutrients*. 2021;13:1747.
89. Shang Y, Zhou H, He R, Lu W. Dietary modification for reproductive health in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol*. 2021;12:735954
90. Escobar-Morreale H. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(5):270–284.
91. Rondanelli M., Perna S., Faliva M., Monteferrario F., Repaci E., Allieri F. Focus on metabolic and nutritional correlates of polycystic ovary syndrome and update on nutritional management of these critical phenomena. *Arch. Gynecol. Obstet*. 2014;290:1079–1092.
92. Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Metformin: Current knowledge. *J Res Med Sci*. 2014;19:658-64.
93. Oróstica M, Astorga I, Plaza-Parrochia F, Poblete C, Carvajal R, García V, et al. Metformin treatment regulates the expression of molecules involved in adiponectin and insulin signaling pathways in endometria from women with obesity-associated insulin resistance and PCOS. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3922.
94. Bennett W.L., Aschmann H.E., Puhan M.A., Robbins C.W., Bayliss E.A., Wilson R., Mularski R.A., Chan W.V., Leff B., Sheehan O., et al. A benefit–harm analysis of adding basal insulin vs. sulfonylurea to metformin to manage type II diabetes mellitus in people with multiple chronic conditions. *J. Clin. Epidemiol*. 2019;113:92–100
95. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Economou FN. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2010;162:193-212.
96. Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril*. 2003;79:956-62.
97. Sharpe A., Morley L.C., Tang T., Norman R.J., Balen A.H. Metformin for ovulation induction (excluding gonadotrophins) in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2019;2019:CD013505.
98. 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;90(8):4593-8.
99. Magzoub R., Kheirelseid E.A., Perks C., Lewis S. Does metformin improve reproduction outcomes for non-obese, infertile women with polycystic ovary syndrome? Meta-analysis and systematic review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 2022;271:38–62.



100. 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 ;11:653.
101. Glueck C, Goldenberg N. Characteristics of obesity in polycystic ovary syndrome: Etiology, treatment, and genetics. *Metabolism.* 2019;92:108–20
102. Xing C, Li C, He B. Insulin sensitizers for improving the endocrine and metabolic profile in overweight women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105:2950–2963.
103. Zhao H, Xing C, Zhang J, He B. Comparative efficacy of oral insulin sensitizers metformin, thiazolidinediones, inositol, and berberine in improving endocrine and metabolic profiles in women with PCOS: a network meta-analysis. *Reprod Health.* 2021;18:171.
104. Piątkowska-Chmiel I, Herbet M, Gawrońska-Grzywacz M, Dudka J. Regulation of neuroinflammatory signaling by PPAR $\gamma$  Agonist in mouse model of diabetes. *Int J Mol Sci.* 2022;23:5502
105. Romualdi D, Giuliani M, Draisci G, Costantini B, Cristello F, Lanzone A, Guido M. Pioglitazone reduces the adrenal androgen response to corticotropin-releasing factor without changes in ACTH release in hyperinsulinemic women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2007;88:131-8.
106. Müller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular Metabolism.* 2019;30:72–130
107. Bednarz K, Kowalczyk K, Cwynar M, Czapla D, Czarkowski W, Kmita D, et al. The Role of Glp-1 receptor agonists in insulin resistance with concomitant obesity treatment in polycystic ovary syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022;23:4334
108. Xu Y, Wu Y, Huang Q. Comparison of the effect between pioglitazone and metformin in treating patients with PCOS:a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;296:661–677.
109. Croze ML, Soulage CO. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie.* 2013;95:1811-27.
110. Simi G, Genazzani A, Obino M, Papini F, Pinelli S, Cela V, et al. Inositol and in vitro fertilization with embryo transfer. *Int J Endocrinol.* 2017;2017:5469409.
111. Abdalla M.A., Deshmukh H., Atkin S., Sathyapalan T. A review of therapeutic options for managing the metabolic aspects of polycystic ovary syndrome. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 2020;11:2042018820938305
112. Samimi M, Zarezade Mehrizi M, Foroozanfard F, Akbari H, Jamilian M, Ahmadi S, et al. The effects of coenzyme Q10 supplementation on glucose metabolism and lipid profiles in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Endocrinol.* 2017;86:560–566.
113. Dey A, Dhadhal S, Maharjan R, Nagar PS, Nampoothiri L. Partially purified non-polar phytocomponents from *Aloe barbadensis* Mill. gel restores metabolic and reproductive comorbidities in letrozole-induced polycystic ovary syndrome rodent model- an “in-vivo” study. *Journal of Ethnopharmacology.* 2022;291:115161
114. Satoh H. Pleiotropic effects of SGLT2 inhibitors beyond the effect on glycemic control. *Diabetol. Int.* 2018;9:212–214.

115. Tripathy P., Sahu A., Sahu M., Nagy A. Ultrasonographic evaluation of intra-abdominal fat distribution and study of its influence on subclinical atherosclerosis in women with polycystic ovarian syndrome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2017;217:18–22.
116. Pruett, J.E.; Torres Fernandez, E.D.; Everman, S.J.; Vinson, R.M.; Davenport, K.; Logan, M.K.; Ye, S.A.; Romero, D.G.; YanesCardozo, L.L. Impact of SGLT-2 Inhibition on Cardiometabolic Abnormalities in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2576.
117. DeFronzo R.A., Hompesch M., Kasichayanula S., Liu X., Hong Y., Pfister M., Morrow L.A., Leslie B.R., Boulton D.W., Ching A., et al. Characterization of Renal Glucose Reabsorption in Response to Dapagliflozin in Healthy Subjects and Subjects with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36:3169–3176.
118. Hussein H., Zaccardi F., Khunti K., Davies M.J., Patsko E., Dhalwani N.N., Kloecker D.E., Ioannidou E., Gray L.J. Efficacy and tolerability of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors and glucagon-like peptide-1 receptor agonists: A systematic review and network meta-analysis. *Diabetes Obes. Metab.* 2020;22:1035–1046.
119. Toyama T., Neuen B.L., Jun M., Ohkuma T., Neal B., Jardine M.J., Heerspink H.L., Wong M.G., Ninomiya T., Wada T., et al. Effect of SGLT2 inhibitors on cardiovascular, renal and safety outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes. Metab.* 2019;21:1237–1250.
120. Cefalu WT, Leiter LA, Yoon KH, Arias P, Niskanen L, Xie J, Balis DA, Canovatchel W, Meininger G. Efficacy and safety of canagliflozin versus glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin (CANTATA-SU): 52 week results from a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet.* 2013;14;382(9896):941-50.
121. CANTATA-SU 52 week results from a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet.* 2013;382:941–950.
122. Cai M, Shao X, Xing F, Zhang Y, Gao X, Zeng Q, Dilimulati D, Qu S, Zhang M. Efficacy of canagliflozin versus metformin in women with polycystic ovary syndrome: A randomized, open-label, noninferiority trial. *Diabetes Obes Metab.* 2022;24:312-320.
123. Helvacı N, Yildiz BO. Current and emerging drug treatment strategies for polycystic ovary syndrome. *Expert Opin Pharmacother.* 2023;24:105-120.
124. Lundkvist P., Sjöström C.D., Amini S., Pereira M.J., Johnsson E., Eriksson J.W. Dapagliflozin once-daily and exenatide once-weekly dual therapy: A 24-week randomized, placebo-controlled, phase II study examining effects on body weight and prediabetes in obese adults without diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 2017;19:49–60.
125. Javed Z., Papageorgiou M., Deshmukh H., Rigby A.S., Qamar U., Abbas J., Khan A.Y., Kilpatrick E.S., Atkin S.L., Sathyapalan T. Effects of empagliflozin on metabolic parameters in polycystic ovary syndrome: A randomized controlled study. *Clin. Endocrinol.* 2019;90:805–813.
126. Ishibashi Y., Matsui T., Yamagishi S. Tofogliflozin, A Highly Selective Inhibitor of SGLT2 Blocks Proinflammatory and Proapoptotic Effects of Glucose Overload on Proximal Tubular Cells Partly by Suppressing Oxidative Stress Generation. *Horm Metab Res.* 2016;48:191–195

127. Dawson A.J., Sathyapalan T., Smithson J.A., Vince R.V., Coady A.M., Ajjan R., Kilpatrick E.S., Atkin S.L. A comparison of cardio-vascular risk indices in patients with polycystic ovary syndrome with and without coexisting nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Endocrinol.* 2014;80:843–849
128. Jensterle Sever M., Kocjan T., Pfeifer M., Kravos N.A., Janez A. Short-term combined treatment with liraglutide and metformin leads to significant weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome and previous poor response to metformin. *Eur. J. Endocrinol.* 2014;170:451–459.
129. Maliqueo M, Benrick A, Stener-Victorin E. Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions. *Semin Reprod Med.* 2014;32(3):183-93.
130. Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. Sheep models of polycystic ovary syndrome phenotype. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;373:8-20.
131. Abbott DH, Nicol LE, Levine JE, Xu N, Goodarzi MO, Dumesic DA. Nonhuman primate models of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;373:21-8.
132. Rakic D, Joksimovic Jovic J, Jakovljevic V, Zivkovic V, Nikolic M, Sretenovic J, Nikolic M, Jovic N, Bicanin Ilic M, Arsenijevic P, Dimitrijevic A, Vulovic T, Ristic N, Bulatovic K, Bolevich S, Stijak L, Pantovic S. High Fat Diet Exaggerate Metabolic and Reproductive PCOS Features by Promoting Oxidative Stress: An Improved EV Model in Rats. *Medicina (Kaunas).* 2023;59:1104.
133. 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;9:735.
134. Marinkovic-Radosevic J., Cigrovski Berkovic M., Kruezi E., Bilic-Curcic I., Mrzljak A. Exploring new treatment options for pol-ycystic ovary syndrome: Review of a novel antidiabetic agent SGLT2 inhibitor. *World J. Diabetes.* 2021;12:932–938.
135. Barath B, Varga A, Matrai AA, Deak-Pocsai K, Nemeth N, Deak A. Estradiol Valerate Affects Hematological and Hemorheological Parameters in Rats. *Metabolites.* 2022;12:602.
136. Patel R, Shah G. High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. *Reproduction.* 2018;155:141-151.
137. Pruet JE, Everman SJ, Hoang NH, et al. Mitochondrial function and oxidative stress in white adipose tissue in a rat model of PCOS: effect of SGLT2 inhibition. *Biol Sex Differ.* 2022;13:45.
138. Ma X, Li X, Ma L, Chen Y, He S. Soy isoflavones alleviate polycystic ovary syndrome in rats by regulating NF- κB signaling pathway. *Bioengineered.* 2021;12:7215-7223
139. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62:609-14.
140. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979, 95, 351–358.

141. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982; 126, 131.
142. 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; 123–132.
143. 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.
144. Beutler, E. Catalase. In *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*; Beutler, E., Ed.; Grune and Stratton: New York, NY, USA, 1982; 105–106
145. 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.
146. Qiu S, Wu C, Lin F, Chen L, Huang Z, Jiang Z. Exercise training improved insulin sensitivity and ovarian morphology in rats with polycystic ovary syndrome. *Horm Metab Res.* 2009;41:880-5.
147. Liu G, Shi F, Blas-Machado U, Duong Q, Davis VL, Foster WG, Hughes CL. Ovarian effects of a high lactose diet in the female rat. *Reprod Nutr Dev.* 2005;45:185-92.
148. Barzegar MH, Khazali H, Kalantar SM, Khoradmehr A. Effect of Citrullus colocynthis hydro-alcoholic extract on hormonal and folliculogenesis process in estradiol valerate-induced PCOs rats model: An experimental study. *Int J Reprod Biomed.* 2017;15:661-668.
149. Ryu Y., Kim S.W., Kim Y.Y., Ku S.Y. Animal Models for Human Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Focused on the Use of Indi-rect Hormonal Perturbations: A Review of the Literature. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:2720.
150. Venegas B., De León Gordillo L.Y., Rosas G., Espinoza J.A., Morán C., Domínguez R., Morales-Ledesma L. In rats with estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome, the acute blockade of ovarian  $\beta$ -adrenoreceptors improve ovulation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2019;17:95.
151. Sotomayor-Zarate R., Dorfman M., Paredes A., Lara H.E. Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympa-thetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol. Reprod.* 2008;78:673–680.
152. Stener-Victorin E, Padmanabhan V, Walters KA, Campbell RE, Benrick A, Giacobini P, Dumesic DA, Abbott DH. Animal Models to Understand the Etiology and Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev.* 2020;41(4):bnaa010.
153. Begum N, Manipriya K, Veeresh B. Role of high-fat diet on letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in rats. *Eur J Pharmacol.* 2022; 15;917:174746.
154. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology.* 1993;133:2696-703
155. Volk KM, Pogrebna VV, Roberts JA, Zachry JE, Blythe SN, Toporikova N. High-Fat, High-Sugar Diet Disrupts the Preovulatory Hormone Surge and Induces Cystic Ovaries in Cycling Female Rats. *J Endocr Soc.* 2017;1:1488-1505.

156. Wang X, Gu L, Zhang Y, Xiong C, Peng Y, Ding X. Effects of dehydroepiandrosterone alone or in combination with a high-fat diet and antibiotic cocktail on the heterogeneous phenotypes of PCOS mouse models by regulating gut microbiota. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:1030151.
157. Rosenberg S.L. The Relationship Between PCOS and Obesity: Which Comes First? *Sci. J. Lander Coll. Arts Sci.* 2019;13:5.
158. Manni L, Holmång A, Cajander S, Lundeberg T, Aloe L, Stener-Victorin E. Effect of anti-NGF on ovarian expression of  $\alpha 1$ - and  $\beta 2$ -adrenoceptors, TrkA, p75NTR, and tyrosine hydroxylase in rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006;290:R826–R835..
159. Mehraban M, Jelodar G, Rahmanifar F. A combination of spearmint and flaxseed extract improved endocrine and histomorphology of ovary in experimental PCOS. *J. Ovarian Res.* 2020;13:32.
160. Azziz R, Sanchez L.A, Knochenhauer E.S, Moran C, Lazenby J, Stephens K.C, Taylor K, Boots L.R. Androgen excess in women: Experience with over 1000 consecutive patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:453–462.
161. Barber T.M, Hanson P, Weickert M.O, Franks S. Obesity and Polycystic Ovary Syndrome: Implications for Pathogenesis and Novel Management Strategies. *Clin. Med. Insights Reprod. Health.* 2019;13:1179558119874042.
162. Dunaif A, Segal K.R, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 1989;38:1165–1174
163. Rodriguez Paris V, Solon-Biet SM, Senior AM, Edwards MC, Desai R, Tedla N, Cox MJ, Ledger WL, Gilchrist RB, Simpson SJ, Handelsman DJ, Walters KA. Defining the impact of dietary macronutrient balance on PCOS traits. *Nat Commun.* 2020;11:5262.
164. Farshchi H, Rane A, Love A, Kennedy RL. Diet and nutrition in polycystic ovary syndrome (PCOS): pointers for nutritional management. *J Obstet Gynaecol.* 2007;27:762-73.
165. 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;21:560-74
166. Dikmen A, Ergenoglu AM, Yeniel AO, Dilsiz OY, Ercan G, Yilmaz H. Evaluation of glycemic and oxidative/antioxidative status in the estradiol valerate-induced PCOS model of rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;160:55-9.
167. Ghafurniyan H, Azarnia M, Nabiuni M, Karimzadeh L. The Effect of Green Tea Extract on Reproductive Improvement in Estradiol Valerate-Induced Polycystic Ovarian Syndrome in Rat. *Iran J Pharm Res.* 2015;14:1215-33.
168. Karimzadeh L, Nabiuni M, Kouchesfehiani HM, Adham H, Bagheri A, Sheikholeslami A. Effect of bee venom on IL-6, COX-2 and VEGF levels in polycystic ovarian syndrome induced in Wistar rats by estradiol valerate. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2013;19(1):32.
169. Lee JC, Pak SC, Lee SH, Lim SC, Bai YH, Jin CS, Kim JS, Na CS, Bae CS, Oh KS, Choi BC. The effect of herbal medicine on nerve growth factor in estradiol valerate-induced polycystic ovaries in rats. *Am J Chin Med.* 2003;31(6):885-95

170. Stener-Victorin E, Lundeberg T, Waldenström U, Manni L, Aloe L, Gunnarsson S, Janson PO. Effects of electro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries. *Biol Reprod.* 2000;63:1497-503.
171. Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod.* 1986;35:647-55.
172. Paredes A, Gálvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler JL, Bustamante D, Lara HE. Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine.* 1998;8:309-15.
173. Espinoza JA, Alvarado W, Venegas B, Domínguez R, Morales-Ledesma L. Pharmacological sympathetic denervation prevents the development of polycystic ovarian syndrome in rats injected with estradiol valerate. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16:86.
174. Patel R, Shah G. High-fat diet exposure from pre-pubertal age induces polycystic ovary syndrome (PCOS) in rats. *Reproduction.* 2018;155:141-151.
175. Nteeba J, Ganesan S, Keating AF. Progressive obesity alters ovarian folliculogenesis with impacts on pro-inflammatory and steroidogenic signaling in female mice. *Biol Reprod.* 2014;91:86.
176. Cao JJ, Gregoire BR. A high-fat diet increases body weight and circulating estradiol concentrations but does not improve bone structural properties in ovariectomized mice. *Nutr Res.* 2016;36:320-327..
177. Akamine EH, Marçal AC, Camporez JP, Hoshida MS, Caperuto LC, Bevilacqua E, Carvalho CR. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *J Endocrinol.* 2010;206:65-74.
178. Herbison AE. A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion. *Front Neuroendocrinol.* 2020;57:100837.
179. Noroozzadeh M, Behboudi-Gandevani S, Zadeh-Vakili A, Ramezani Tehrani F. Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Life Sci.* 2017;191:259-272.
180. Dăneasă A, Cucolaş C, Lenghel LM, Olteanu D, Orăsan R, Filip GA. Letrozole vs estradiol valerate induced PCOS in rats: glycemic, oxidative and inflammatory status assessment. *Reproduction.* 2016;151:401-9
181. Alizadeh F, Ramezani M, Piravar Z. Effects of *Stachys sylvatica* hydroalcoholic extract on the ovary and hypophy-sis-gonadal axis in a rat with polycystic ovary syndrome. *Middle East Fertil. Soc. J.* 2020;25:4.
182. Komal F, Khan MK, Imran M, Ahmad MH, Anwar H, Ashfaq UA, Ahmad N, Masroor A, Ahmad RS, Nadeem M, Nisa MU. Impact of different omega-3 fatty acid sources on lipid, hormonal, blood glucose, weight gain and histopathological damages profile in PCOS rat model. *J Transl Med.* 2020;18:349.
183. Kim HJ, Adams JM, Gudmundsson JA, Arason G, Pau CT, Welt CK. Polycystic ovary morphology: age-based ultrasound criteria. *Fertil Steril.* 2017;108:548-553.
184. Wang MX, Yin Q, Xu X. A Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome with Insulin Resistance Induced by Letrozole Combined with High Fat Diet. *Med Sci Monit.* 2020;26:e922136.

185. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:43.
186. Sulaiman MA, Al-Farsi YM, Al-Khaduri MM, Saleh J, Waly MI. Polycystic ovarian syndrome is linked to increased oxidative stress in Omani women. *Int J Womens Health.* 2018;10:763-771.
187. Ghowsi M, Khazali H, Sisakhtnezhad S. The effect of resveratrol on oxidative stress in the liver and serum of a rat model of polycystic ovary syndrome: An experimental study. *Int J Reprod Biomed.* 2018;16(3):149-158.
188. Raeeszadeh M, Saleh Hosseini SM, Amiri AA. Impact of Co-Administration of N-Acetylcysteine and Vitamin E on Cyclophosphamide-Induced Ovarian Toxicity in Female Rats. *J Toxicol.* 2022;2022:9073405
189. Yuvaraj S, Ramprasath T, Saravanan B, Vasudevan V, Sasikumar S, Selvam GS. Chrysin attenuates high-fat-diet-induced myocardial oxidative stress via upregulating eNOS and Nrf2 target genes in rats. *Mol Cell Biochem.* 2021;476:2719-2727.
190. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:43.
191. Parsanathan R, Jain SK. Glutathione deficiency induces epigenetic alterations of vitamin D metabolism genes in the livers of high-fat diet-fed obese mice. *Sci Rep.* 2019;9:14784.
192. Lasker S, Rahman MM, Parvez F, Zamila M, Miah P, Nahar K, Kabir F, Sharmin SB, Subhan N, Ahsan GU, Alam MA. High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. *Sci Rep.* 2019 ;9:20026.
193. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr.* 2011;3:17.
194. 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;11(6):1099.
195. 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;163:11-21.
196. Joksimovic Jovic J, Sretenovic J, Jovic N, Rudic J, Zivkovic V, Srejovic I, Mihajlovic K, Draginic 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;2021:8862878.
197. Chen X, He S, Wang D. Effects of metformin on body weight in polycystic ovary syndrome patients: model-based meta-analysis. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2021;14:121-130.

198. Neeland IJ, McGuire DK, Chilton R, Crowe S, Lund SS, Woerle HJ, Broedl UC, Johansen OE. Empagliflozin reduces body weight and indices of adipose distribution in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2016;13:119-26.
199. Javed Z, Papageorgiou M, Deshmukh H, Rigby AS, Qamar U, Abbas J, Khan AY, Kilpatrick ES, Atkin SL, Sathyapalan T. Effects of empagliflozin on metabolic parameters in polycystic ovary syndrome: A randomized controlled study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2019;90:805-813..
200. Mirabolghasemi G, Kamyab Z. Changes of The Uterine Tissue in Rats with Polycystic Ovary Syndrome Induced by Estradiol Valerate. *Int J Fertil Steril.* 2017;11(1):47-55.
201. Rakic D, Jakovljevic V, Jovic N, Bicanin Ilic M, Dimitrijevic A, Vulovic T, Arsenijevic P, Sretenovic J, Nikolic M, Petrovich Fisenko V, Bolevich S, Zarkovic G, Joksimovic Jovic J. The Potential of SGLT-2 Inhibitors in the Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: The Current Status and Future Perspectives. *Biomedicines.* 2023;11:998.
202. Elkind-Hirsch KE, Chappell N, Seidemann E, Storment J, Bellanger D. Exenatide, Dapagliflozin, or Phentermine/Topiramate Differentially Affect Metabolic Profiles in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106:3019-3033.
203. Zhang J, Xing C, Cheng X, He B. Canagliflozin combined with metformin versus metformin monotherapy for endocrine and metabolic profiles in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: A single-center, open-labeled prospective randomized controlled trial. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 ;13:1003238.
204. Doi SA, Al-Zaid M, Towers PA, Scott CJ, Al-Shoumer KA. Irregular cycles and steroid hormones in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2005;20:2402-2408.
205. Chen X, Huang L, Cui L, Xiao Z, Xiong X, Chen C. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor ameliorates high fat diet-induced hypothalamic-pituitary-ovarian axis disorders. *J Physiol.* 2022;600:4549-4568
206. Negrón AL, Radovick S. High-Fat Diet Alters LH Secretion and Pulse Frequency in Female Mice in an Estrous Cycle-Dependent Manner. *Endocrinology.* 2020;161:bqaa146.
207. Zaheer, Akfish, et al. "Effect of canagliflozin alone and in combination with metformin on hormonal derangements and estrous cycle in a polycystic ovary syndrome rat model." *Khyber Medical University Journal* 13.2021;76-81.
208. Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, Whitehead SA, Mason HD. Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. *Endocrinology.*2009;150:4794-4801.
209. Mahmoud MM, Rashed LA, Soliman SA, Sayed SM, Kamel O, Kamar SS, Hussien RES. SGLT-2 inhibitors enhance the effect of metformin to ameliorate hormonal changes and inflammatory markers in a rat PCOS model. *Physiol Rep.* 2023;11:e15858..
210. Rababa'h AM, Matani BR, Ababneh MA. The ameliorative effects of marjoram in dehydroepiandrosterone induced polycystic ovary syndrome in rats. *Life Sci.* 2020;261:118353.
211. Gong Y, Luo S, Fan P, Zhu H, Li Y, Huang W. Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18:121.



212. 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;25:21.
213. Zinman B, Lachin JM, Inzucchi SE. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2016;374:1094.
214. Park SH, Farooq MA, Gaertner S, Bruckert C, Qureshi AW, Lee HH, Benrahla D, Pollet B, Stephan D, Ohlmann P, Lessinger JM, Mayoux E, Auger C, Morel O, Schini-Kerth VB. Empagliflozin improved systolic blood pressure, endothelial dysfunction and heart remodeling in the metabolic syndrome ZSF1 rat. *Cardiovasc Diabetol*. 2020;19:19.
215. Bentley-Lewis R, Seely E, Dunaif A. Ovarian hypertension: polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40:433-49,
216. Mellembakken JR, Mahmoudan A, Mørkrid L, Sundström-Poromaa I, Morin-Papunen L, Tapanainen JS, Piltonen TT, Hirschberg AL, Stener-Victorin E, Vanky E, Ravn P, Jensen RC, Andersen MS, Glintborg D. Higher blood pressure in normal weight women with PCOS compared to controls. *Endocr Connect*. 2021;10:154-163.
217. Stener-Victorin E, Ploj K, Larsson BM, Holmäng A. Rats with steroid-induced polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:44.
218. Pruett JE, Torres Fernandez ED, Everman SJ, Vinson RM, Davenport K, Logan MK, Ye SA, Romero DG, Yanes Cardozo LL. Impact of SGLT-2 Inhibition on Cardiometabolic Abnormalities in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2021;22:2576.
219. Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Decreased vascular reactivity in metformin-treated fructose-hypertensive rats. *Metabolism*. 1996;45:1053-5.
220. Luque-Ramírez M, Mendieta-Azcona C, Alvarez-Blasco F, Escobar-Morreale HF. Effects of metformin versus ethinyl-estradiol plus cyproterone acetate on ambulatory blood pressure monitoring and carotid intima media thickness in women with the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2009;91:2527-36.
221. Tomczyk R, Ociepka A, Kiałka M, Milewicz T, Migacz K, Kowalczyk A, Klocek M. Metformina, a zmiany ciśnienia tętniczego krwi i częstości akcji serca u szczupłych pacjentek z zespołem policystycznych jajników (PCOS)--doniesienie wstępne [Metformin and changes in blood pressure and heart rate in lean patients with polycystic ovary syndrome (PCOS)--preliminary study]. *Przegl Lek*. 2015;72:302-5.
222. Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig M, Miller AW. Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats. *Hypertension*. 2000;35:108-12.
223. Chilton R, Tikkanen I, Cannon CP, Crowe S, Woerle HJ, Broedl UC, Johansen OE. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2015;17:1180-93
224. Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Har R, Fagan N, Johansen OE, Woerle HJ, von Eynatten M, Broedl UC. The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:28.
225. Petersen JS, DiBona GF. Acute sympathoinhibitory actions of metformin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996;27:619-25.

226. Apaijai N, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardioprotective effects of metformin and vildagliptin in adult rats with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Endocrinology*. 2015;153:3878-85.
227. Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, Stener-Victorin E. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 200;148:3781-91.
228. Giaccari A. Expanding the Use of SGLT2i in Diabetes Beyond Type 2. *Diabetes Care*. 2024;47:50-51.
229. 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:CD003053
230. Fathi A, Vickneson K, Singh JS. SGLT2-inhibitors; more than just glycosuria and diuresis. *Heart Fail Rev*. 2021;26:623-642..
231. Alatrach M, Laichuthai N, Martinez R, Agyin C, Ali AM, Al-Jobori H, Lavynenko O, Adams J, Triplitt C, DeFronzo R, Cersosimo E, Abdul-Ghani M. Evidence Against an Important Role of Plasma Insulin and Glucagon Concentrations in the Increase in EGP Caused by SGLT2 Inhibitors. *Diabetes*. 2020;69:681-688.
232. Baekdal M, Nielsen SW, Hansen CP, Storkholm JH, van Hall G, Hartmann B, Holst JJ, Vilsbøll T, Lund A, Knop FK. Empagliflozin Normalizes Fasting Hyperglycemia and Improves Postprandial Glucose Tolerance in Totally Pancreatectomized Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Crossover Study. *Diabetes Care*. 2024 ;47:71-80.
233. Sinha B, Ghosal S. A Meta-Analysis of the Effect of Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibitors on Metabolic Parameters in Patients With Polycystic Ovary Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:830401.
234. Book CB, Dunaif A. Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:3110-6.
235. Book CB, Dunaif A. Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:3110-6
236. Xu Y, Qiao J. Association of Insulin Resistance and Elevated Androgen Levels with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS): A Review of Literature. *J Healthc Eng*. 2022;2022:9240569.
237. Zhang S, Tu H, Yao J, Le J, Jiang Z, Tang Q, Zhang R, Huo P, Lei X. Combined use of Diane-35 and metformin improves the ovulation in the PCOS rat model possibly via regulating glycolysis pathway. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18:58.
238. Wild RA. Dyslipidemia in PCOS. *Steroids*. 2012;77:295-9.
239. Olaniyi KS, Areloegbe SE, Areola ED, Sabinari IW, Fafure AA, Agbana RD, Atuma CL, Shah MZUH, Ajadi IO, Olatunji LA. Low-dose spironolactone combats dyslipidemia and hepatic inflammation by modulating PCSK9 in rat model of polycystic ovarian syndrome. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2023;473:116604.

240. 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;10:62.
241. Lim S.S, Davies M.J, Norman R.J, Moran L.J. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update.* 2012;18:618–637.
242. Jena D, Choudhury A.K, Mangaraj S, Singh M, Mohanty B.K, Baliarsinha A.K. 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;22:321–327.
243. Aragón-Herrera A, Moraña-Fernández S, Otero-Santiago M, Anido-Varela L, Campos-Toimil M, García-Seara J, Román A, Seijas J, García-Caballero L, Rodríguez J, Tarazón E, Roselló-Lletí E, Portolés M, Lage R, Gualillo O, González-Juanatey JR, Feijóo-Bandín S, Lago F. The lipidomic and inflammatory profiles of visceral and subcutaneous adipose tissues are distinctly regulated by the SGLT2 inhibitor empagliflozin in Zucker diabetic fatty rats. *Biomed Pharmacother.* 2023;161:114535.
244. Luo X, Li Y, Yang P, Chen Y, Wei L, Yu T, Xia J, Ruan XZ, Zhao L, Chen Y. Obesity induces preadipocyte CD36 expression promoting inflammation via the disruption of lysosomal calcium homeostasis and lysosome function. *EBioMedicine.* 2020;56:102797.
245. Xu L, Nagata N, Nagashimada M, Zhuge F, Ni Y, Chen G, Mayoux E, Kaneko S, Ota T. SGLT2 Inhibition by Empagliflozin Promotes Fat Utilization and Browning and Attenuates Inflammation and Insulin Resistance by Polarizing M2 Macrophages in Diet-induced Obese Mice. *EBioMedicine.* 2017;20:137-149.
246. Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, Yada M, Yada R, Harada N, Takayanagi R, Nakamuta M. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* 2007;20:351-8.
247. S Morana-Fernandez, A Aragon-Herrera, M Otero-Santiago, L Anido-Varela, E Tarazon, M Portoles, E Rosello-Lleti, F Comella, J R Gonzalez-Juanatey, S Feijoo-Bandin, F Lago. Empagliflozin treatment differentially modifies visceral and subcutaneous adipose tissue lipidomes and pro-inflammatory cytokines in zucker fatty diabetic rats, *European Heart Journal.* 2022; ehac544.2895.
248. Trnovska J, Svoboda P, Pelantova H, Kuzma M, Kratochvilova H, Kasperova BJ, Dvorakova I, Rosolova K, Malinska H, Huttl M, Markova I, Oliyarnyk O, Melcova M, Skop V, Mraz M, Stemberkova-Hubackova S, Haluzik M. Complex Positive Effects of SGLT-2 Inhibitor Empagliflozin in the Liver, Kidney and Adipose Tissue of Hereditary Hypertriglyceridemic Rats: Possible Contribution of Attenuation of Cell Senescence and Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2021;22:10606.
249. Tokubuchi I, Tajiri Y, Iwata S, Hara K, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Mifune H, Yamada K. Beneficial effects of metformin on energy metabolism and visceral fat volume through a possible mechanism of fatty acid oxidation in human subjects and rats. *PLoS One.* 2017;12:e0171293.
250. Obata A, Kubota N, Kubota T, Iwamoto M, Sato H, Sakurai Y, Takamoto I, Katsuyama H, Suzuki Y, Fukazawa M, Ikeda S, Iwayama K, Tokuyama K, Ueki K,

Kadowaki T. Tofogliflozin Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Accelerates Lipolysis in Adipose Tissue in Male Mice. *Endocrinology*. 2016;157(3):1029-42.

251. Osataphan S, Macchi C, Singhal G, Chimene-Weiss J, Sales V, Kozuka C, Dreyfuss JM, Pan H, Tangcharoenpaisan Y, Morningstar J, Gerszten R, Patti ME. SGLT2 inhibition reprograms systemic metabolism via FGF21-dependent and -independent mechanisms. *JCI Insight*. 2019;4(5):e123130.

252. Yokono M, Takasu T, Hayashizaki Y, Mitsuoka K, Kihara R, Muramatsu Y, Miyoshi S, Tahara A, Kurosaki E, Li Q, Tomiyama H, Sasamata M, Shibasaki M, Uchiyama Y. SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin reduces body fat mass by increasing fatty acid oxidation in high-fat diet-induced obese rats. *Eur J Pharmacol*. 2014;727:66-74

253. Bonora BM, Avogaro A, Fadini GP. Extraglycemic Effects of SGLT2 Inhibitors: A Review of the Evidence. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:161-174.

254. Kusaka H, Koibuchi N, Hasegawa Y, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Empagliflozin lessened cardiac injury and reduced visceral adipocyte hypertrophy in prediabetic rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:157.

255. Xiong T, Rodriguez Paris V, Edwards MC, Hu Y, Cochran BJ, Rye KA, Ledger WL, Padmanabhan V, Handelsman DJ, Gilchrist RB, Walters KA. Androgen signaling in adipose tissue, but less likely skeletal muscle, mediates development of metabolic traits in a PCOS mouse model. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2022;323:E145-E158..

256. Han Y, Wu H, Sun S, Zhao R, Deng Y, Zeng S, Chen J. Effect of High Fat Diet on Disease Development of Polycystic Ovary Syndrome and Lifestyle Intervention Strategies. *Nutrients*. 2023; 15:2230.

257. Wu S, Divall S, Nwaopara A, Radovick S, Wondisford F, Ko C, Wolfe A. Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. *Diabetes*. 2014;63:1270-82.

258. Kokabiyan Z, Yaghmaei P, Jameie SB, Hajebrahimi Z. Therapeutic Effects of Eugenol in Polycystic Ovarian Rats Induced by Estradiol Valerate: A Histopathological and A Biochemical Study. *Int J Fertil Steril*. 2022;16:184-191.

259. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*. 2009;30:624–712

260. Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*. 1998;13:1133–1138.

261. Wu C, Lin F, Qiu S, Jiang Z. The characterization of obese polycystic ovary syndrome rat model suitable for exercise intervention. *PLoS One*. 2014 ;9:e99155.

262. 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 ;11(1):55.

263. Rafiee B, Karbalay-Doust S, Tabei SMB, Azarpira N, Alae S, Lohrasbi P, Bahmanpour S. Effects of N-acetylcysteine and metformin treatment on the stereopathological characteristics of uterus and ovary. *Eur J Transl Myol*. 2022;32(2):10409.

264. 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;28:3074-85.
265. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod.* 2012;86:149, 1-12
266. Jiang NX, Li XL. The Disorders of Endometrial Receptivity in PCOS and Its Mechanisms. *Reprod Sci.* 2022;29:2465-2476.
267. Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod.* 2001;65:1311-23.
268. Huayun Xu, Guozeng Wang. Decreased Expression of Cav-1 Is Associated with Compromised Endometrial Angiogenesis during the Implantation Window in PCOS Rats: A Prospective Randomized Laboratory-Based Study. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2024; 51:1- 4.
269. Xiong YL, Liang XY, Yang X, Li Y, Wei LN. Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;159(1):148–150.
270. Bracho GS, Acosta MV, Altamirano GA, Alcaraz MR, Montemurro M, Culzoni MJ, Rossetti MF, Kass L, Luque EH, Bosquiazzo VL. Uterine histopathology and steroid metabolism in a polycystic ovary syndrome rat model. *Mol Cell Endocrinol.* 2024; 11;585:112198
271. Rehman R, Abidi SH, Alam F. Metformin, Oxidative Stress, and Infertility: A Way Forward. *Front Physiol.* 2018;9:1722.
272. Shi P, Zhan Z, Ye X, Lu Y, Song K, Sheng F, Shen H, Yin P. The antioxidative effects of empagliflozin on high glucose induced epithelial-mesenchymal transition in peritoneal mesothelial cells via the Nrf2/HO-1 signaling. *Ren Fail.* 2022;44:1528-1542.
273. Gohari S, Reshadmanesh T, Khodabandehloo H, Karbalaee-Hasani A, Ahangar H, Arsang-Jang S, Ismail-Beigi F, Dadashi M, Ghanbari S, Taheri H, Fathi M, Muhammadi MJ, Mahmoodian R, Asgari A, Tayaranian M, Moharrami M, Mahjani M, Ghobadian B, Chiti H, Gohari S. The effect of EMPAgliflozin on markers of inflammation in patients with concomitant type 2 diabetes mellitus and Coronary ARtery Disease: the EMPA-CARD randomized controlled trial. *Diabetol Metab Syndr.* 2022 ;14(1):170.
274. Koizumi T, Watanabe M, Yokota T, Tsuda M, Handa H, Koya J, Nishino K, Tatsuta D, Natsui H, Kadosaka T, Koya T, Nakao M, Hagiwara H, Kamada R, Temma T, Tanaka S, Anzai T. Empagliflozin suppresses mitochondrial reactive oxygen species generation and mitigates the inducibility of atrial fibrillation in diabetic rats. *Front Cardiovasc Med.* 2023;10:1005408.
275. Nicolson GL. Mitochondrial dysfunction and chronic disease: treatment with natural supplements. *Integr Med Clin J.* 2014;13:35.
276. Chappell NR, Zhou B, Schutt AK, Gibbons WE, Blesson CS. Prenatal androgen induced lean PCOS impairs mitochondria and mRNA profiles in oocytes. *Endocr Connect.* 2020;9:261–270.
277. 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;54:578-587.

278. Furat Rençber 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;11:55.
279. Lambadiari V, Thymis J, Kouretas D, Skaperda Z, Tekos F, Kousathana F, Kountouri A, Balampanis K, Parissis J, Andreadou I, Tsoumani M, Chania C, Katogiannis K, Dimitriadis G, Bamias A, Ikonomidis I. Effects of a 12-Month Treatment with Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists, Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors, and Their Combination on Oxidant and Antioxidant Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes. *Antioxidants (Basel).* 2021;10:1379.
280. D, Kihara R, Hayashizaki Y, Takasu T, Imamura M, Li Q, Tomiyama H, Kobayashi Y, Noda A, Sasamata M, Shibasaki M. Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;715:246-55.
281. Jahan S, Munir F, Razak S, Mehboob A, Ain QU, Ullah H, Afsar T, Shaheen G, Almajwal A. Ameliorative effects of rutin against metabolic, biochemical and hormonal disturbances in polycystic ovary syndrome in rats. *J Ovarian Res.* 2016;9:86

## Биографија

Дејана Ракић је рођена 14.6.1994. године у Крагујевцу, од оца Дејана Вуловића и мајке Татјане Вуловић. Основну школу "Светозар Марковић" завршила је као носилац Вукове дипломе 2009 године. Завршила Основну музичку школу "Др Милоје Милојевић" инструмент клавир. Средњу школу "Прва Крагујевачка гимназија" природно математички смер завршила је као носилац Вукове дипломе 2013. године. Факултет медицинских наука је уписала 2013. године и завршила 2019. године са просечном оценом 9,62, и стекла звање доктора медицине. Током студирања била је члан International Federation of Medical Students Association-IFMSA и боравила на размени студената у Чешкој Републици и Мексику. Током завршне године студирања била је стипендиста фонда за младе таленте "Доситеј Обрадовић". Докторске академске студије је уписала 2019. године смер Примењена и експериментална Физиологија са спортском медицином и 2021. године положила усмени докторски испит са просечном оценом на докторским студијама 10,0. Од јануара 2020. запослена на Катедри за Гинекологију и акушерство, где тренутно има звање истраживач приправник и обавља функцију Секретара катедре. Од јуна 2020. године запослена на Клиници за Гинекологију и акушерство Универзитетског Клиничког центра Крагујевац. Здравствену специјализацију из области Гинекологија и акушерство уписала у јуну 2021. и тренутно је на трећој години специјалистичких студија. Говори енглески, шпански, италијански и француски језик. Поседује сертификате курса шпанског језика и интензивног курса италијанског језика и културе школе Леонардо Да Винчи у Риму. Аутор бројних публикација у домаћим и интернационалним часописима као и поглавља у уџбенику. Удата за Јована Ракића, мајка двоје деце Наталије и Марка.

## Библиографија

1. Rakic D, Joksimovic Jovic J, Jakovljevic V, Zivkovic V, Nikolic M, Sretenovic J, Nikolic M, Jovic N, Bicanin Ilic M, Arsenijevic P, Dimitrijevic A, Vulovic T, Ristic N, Bulatovic K, Bolevich S, Stijak L, Pantovic S. High Fat Diet Exaggerate Metabolic and Reproductive PCOS Features by Promoting Oxidative Stress: An Improved EV Model in Rats. *Medicina (Kaunas)*. 2023 Jun 7;59(6):1104. doi: 10.3390/medicina59061104. PMID: 37374308; PMCID: PMC10301084.
2. Rakic D, Jakovljevic V, Jovic N, Bicanin Ilic M, Dimitrijevic A, Vulovic T, Arsenijevic P, Sretenovic J, Nikolic M, Petrovich Fisenko V, Bolevich S, Zarkovic G, Joksimovic Jovic J. The Potential of SGLT-2 Inhibitors in the Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: The Current Status and Future Perspectives. *Biomedicines*. 2023 Mar 23;11(4):998. doi: 10.3390/biomedicines11040998. PMID: 37189616; PMCID: PMC10136160.
3. 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. doi: 10.3390/antiox11061099. PMID: 35739998; PMCID: PMC9220112.

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

\_\_\_\_\_”Испитивање утицаја примене емпаглифлозина на репродуктивне и метаболичке карактеристике синдрома полицистичних јајника код пацова”\_\_\_\_\_

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, 8.11.2014 године,



\_\_\_\_\_

потпис аутора



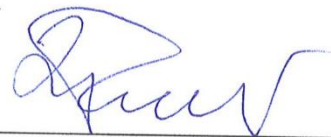
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

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

\_\_\_\_\_”Испитивање утицаја примене емпаглифлозина на репродуктивне и  
метаболичке карактеристике синдрома полицистичних јајника код  
пацова”\_\_\_\_\_

истоветне.

У \_\_\_\_\_Крагујевцу, 8.4.2024 године,



\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_ Дејана Ракић \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

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

\_\_\_\_\_”Испитивање утицаја примене емпаглифлозина на репродуктивне и метаболичке карактеристике синдрома полицистичних јајника код пацова” \_\_\_\_\_

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, 8. ч. 2019 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/>