

Status F2 izoprostana, malondialdehida, vitamina E i superoksid-dismutaze u folikularnoj tekućini ispitanica s idiopatskom neplodnosti

Zec, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:263361>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-28**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Zec

**Status F2 izoprostana, malondialdehida,
vitamina E i superoksid-dismutaze u
folikularnoj tekućini ispitanica s
idiopatskom neplodnosti**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Zec

**Status F2 izoprostana, malondialdehida,
vitamina E i superoksid-dismutaze u
folikularnoj tekućini ispitanica s
idiopatskom neplodnosti**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Doktorski rad je izrađen u Odjelu za endokrinološku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog zavoda za kemiju te Zavodu za humanu reprodukciju i ginekološku endokrinologiju Klinike za ženske bolesti i porodništvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice i Zavodu za humanu reprodukciju Klinike za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Rad je financiran stipendijom Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu pod nazivom: „Program poticanja znanstveno – istraživačke aktivnosti članova HDMBLM „Prof. dr. sc. Elizabeta Topić“.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marina Šprem Goldštajn, dr. med.

Suvoditelj rada: prof.dr. sc. Krunoslav Kuna, dr. med.

ZAHVALA

mojim mentorima prof.dr.sc. Marini Šprem Goldštajn i prof.dr.sc. Krunoslavu Kuni na svim savjetima i sveukupnoj pomoći u organizaciji prilikom istraživanja i izrade ovog doktorskog rada, svim suradnicima iz humane reprodukcije na podršci i savjetima, mojim kolegama za motivaciju i pomoć u analitičkim izazovima i mojoj obitelji na podršci i strpljenju.

POPIS KRATICA

Kratika:	Značenje:
AGE	uznapredovali krajnji produkti glikacije (engl. advanced glycation endproducts)
AMH	anti-Müllerov hormon
ATP	adenozin-trifosfat (engl. adenosine triphosphate)
BHT	2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (butilirani hidroksitoluen)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. body mass index)
DHEAS	dehidroepiandrosteron-sulfat
ELISA	enzimski povezana imunoapsorpcijska analiza (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
ER	endoplazmatski retikulum
ESHRE	Europsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (engl. European society of human reproduction and embryology)
ET	embriotransfer
FADH₂	flavin-adenin-dinukleotid (engl. flavin adenine dinucleotide)
15-F_{2t}-IsoP	15-F _{2t} -izoprostan
FSH	hormon koji stimulira folikule
FT	folikularna tekućina
GnRH	hormon koji oslobađa gonadotropin (engl. gonadotropin-releasing hormone)
GT	tjedan gestacije
GV	germinativni vezikul
hCG	humani korionski gonadotropin (engl. human chorionic gonadotropin)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. high performance liquid chromatography)
HRP	peroksidaza hrena (engl. horseradish peroxidase)

ICSI	intracitoplazmatsko injektiranje spermija (engl. intracytoplasmic sperm injection)
IUI	intrauterina inseminacija (engl. intrauterine insemination)
IVF	izvantjelesna oplodnja (engl. in-vitro fertilization)
LH	luteinizirajući hormon
LOOH	lipidni hidroperoksidi
MDA	malondialdehid
miRNA	mikroRNA
MOSI	muška neplodnost uzrokovana oksidacijskim stresom (engl. male oxidative stress infertility)
mPC	modificirani prirodni ciklus
MPO	medicinski pomognuta oplodnja
mtDNA	mitohondrijska DNA
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
OS	ovarijska stimulacija
PB	polarno tijelo (engl. polar body)
PC	prirodni ciklus
PCOS	sindrom policističnih jajnika (engl. polycystic ovary syndrome)
PGS	preimplantacijski genetski probir (engl. preimplantation genetic screening)
PUFA	višestruko nezasićene masne kiseline (engl. polyunsaturated fatty acids)
PVS	perivitelini prostor (engl. perivitelline space)
RNS	reaktivni dušikovi spojevi (engl. reactive nitrogen species)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. reactive oxygen species)
SOD	superoksid-dismutaza
TBA	tiobarbiturna kiselina (engl. thiobarbituric acid),

TBARS	derivati tiobarbiturne kiseline (engl. thiobarbituric acid-reactive substances)
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidin
TSH	stimulirajući hormon štitnjače
UPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. ultra-performance liquid chromatography)

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1 Neplodnost.....	1
1.2 Idiopatska neplodnost	2
1.3 Dijagnostika idiopatske neplodnosti.....	3
1.4 Liječenje idiopatske neplodnosti.....	5
1.4.1 Prirodni ciklus i modificirani prirodni ciklus.....	5
1.4.2 Stimulacija ovulacije	6
1.4.3 Intrauterina inseminacija	6
1.4.4 Aspiracija jajne stanice.....	7
1.4.5 Izvantjelesna oplodnja.....	7
1.4.6 Procjena kvalitete zametka	7
1.5 Promjene u redoks homeostazi.....	9
1.5.1 Reaktivni spojevi	9
1.5.2 Mikrookoliš jajne stanice	11
1.5.3 Promjene u redoks homeostazi u folikularnoj tekućini	12
1.5.4 Promjene u redoks homeostazi sjemene tekućine.....	16
1.6 Biljezi redoks homeostaze.....	17
1.6.1 Lipidna peroksidacija.....	17
1.6.2 Malondialdehid.....	18
1.6.3 Izoprostani	20
1.6.4 Antioksidacijski mehanizmi.....	21
1.6.5 Superoksid-dismutaza.....	21
1.6.6 Vitamin E.....	23
2. HIPOTEZA	24
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	25
4. MATERIJALI I METODE	26
4.1 Ispitanice.....	26
4.2 Ustroj istraživanja.....	27
4.3 Embriološka obrada	28
4.3.1 Oplodnja in vitro fertilizacijom i oplodnja intracitoplazmatskom spermatskom injekcijom	29
4.3.2 Provjera oplodnje	29
4.3.3 Provjera kvalitete zametka	30

4.3.4	Potvrda trudnoće.....	30
4.4	Obrada folikularne tekućine.....	31
4.4.1	Metode određivanja biljega oksidacijskog stresa u folikularnoj tekućini	33
4.4.1.1	Određivanje koncentracije 15-F _{2t} -izoprostana ELISA metodom.....	33
4.4.1.2	Određivanje koncentracije malondialdehida metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti, UPLC	35
4.4.1.3	Određivanje koncentracije vitamina E metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, HPLC	37
4.4.1.4	Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze.....	38
4.4.1.5	Određivanje koncentracije ukupnih proteina.....	40
4.4.2	Statistička analiza	41
5.	REZULTATI.....	42
5.1	Opće karakteristike ispitanica s idiopatskom neplodnosti	42
5.2	Morfološka procjena jajne stanice i zametka u MPO postupku	44
5.3	Morfološka procjena jajne stanice	45
5.4	Morfološka procjena embrija drugi ili treći dan nakon oplodnje.....	45
5.5	Određivanje ishoda MPO postupka.....	46
5.6	Usporedba općih karakteristika ispitanica s biljezima redoks homeostaze određenima u folikularnoj tekućini.....	46
5.6.1	Ispitivanje razlika u razinama biljega redoks homeostaze prema dobnim skupinama ispitanica	46
5.6.2	Ispitivanje razlika u razinama biljega redoks homeostaze prema indeksu tjelesne mase ispitanica	47
5.6.3	Ispitivanje razlika u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na status pušenja cigareta ispitanica	50
5.6.4	Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze u modificiranom prirodnom ciklusu i ciklusu ovarijske stimulacije	51
5.6.5	Ispitivanje razlika u razinama biljega redoks homeostaze u folikularnoj tekućini prema embriološkim i kliničkim parametrima	53
5.6.5.1	Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na zrelost jajne stanice	53
5.6.5.2	Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na uspješnost fertilizacije	54
5.6.5.3	Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na kvalitetu embrija.....	55
5.6.5.4	Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na ishod trudnoće	58

5.6.6	Regresijski model za predviđanje ishoda MPO postupka	60
6.	RASPRAVA.....	63
7.	ZAKLJUČCI.....	76
8.	SAŽETAK.....	78
9.	ABSTRACT	79
10.	LITERATURA.....	80
11.	ŽIVOTOPIS.....	91

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1 Neplodnost

Neplodnost se definira nemogućnošću zanošenja nakon 12 mjeseci redovitih nezaštićenih spolnih odnosa. Prevalencija neplodnih parova u svijetu varira između 12,6 % i 17,5 % (1). Uzroci mogu biti muški, ženski, zajednički ili idiopatski. Najčešći uzroci ženske neplodnosti su anovulacija, oštećenje jajovoda, endometrioza i prijevremeno starenje jajnika, a često mogu biti nepoznati. Uzroci muške neplodnosti su prirodne genetske abnormalnosti, endokrinološki poremećaji, varikokela, traume testisa, infekcije i sl. (2). U obradi neplodnosti važna je ciljana detaljna anamneza i klinički pregled oba partnera. U postupku obrade se primjenjuju jednostavne i neinvazivne metode te se prema potrebi može koristiti složeniji i invazivniji pristup otkrivanja i liječenja uzroka neplodnosti. Standardna rutinska obrada partnera obuhvaća sljedeće postupke (3):

- Uzimanje anamnestičkih podataka uključuje dob, indeks tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*), obiteljsku i osobnu anamnezu (endokrinološki poremećaji, kardiovaskularne bolesti, trombofilije i maligne bolesti), alergije, ginekološku anamnezu (podaci o menstrualnom ciklusu, trajanje neplodnosti, paritet, prethodne operacije, spolno prenosive bolesti), lijekove i socijalnu anamnezu (vrsta posla, životne navike poput pušenja ili konzumacije alkohola i način prehrane).
- Ginekološki pregled koji uključuje ultrazvučni pregled za utvrđivanje normalnog spolnog sustava žene. Prema potrebi dijagnostika se proširuje na postupke sonohisterosalpingografije, laparoskopije i histeroskopije koje ujedno mogu biti terapijske metode uterinih ili tubarnih uzroka neplodnosti.
- Endokrinološku obradu pri čemu se za određivanje hormonskog statusa žene određuju koncentracije hormona koji stimulira folikule (FSH), luteinizirajućeg hormona (LH), estradiola, progesterona, testosterona, slobodnog testosterona, androstendiona, dehidroepiandrosteron-sulfata (DHEAS), prolaktina i stimulirajućeg hormona štitnjače (TSH).
- Određivanje rezerve jajnika koja se temelji na određivanju koncentracije FSH i estradiola treći dan menstrualnog ciklusa te koncentracije anti-Müllerovog hormona (AMH) i/ili broja antralnih folikula.
- Probir na infektivne bolesti koje utječu na opće i reproduktivno zdravlje žena. U postupku se uzima obrisak cerviksa i uretre te se provode serološki testovi na virus humane imunodeficijencije, hepatitis B, hepatitis C i na uzročnike *Toxoplasma gondii*, Rubella virus, Citomegalovirus i Herpes simplex virus 1 i 2.

- Rutinska obrada muškog partnera podrazumijeva pregled urologa, jednu do dvije analize ejakulata, mikrobiološku obradu, određivanje hormonskog statusa FSH i testosterona te probir na infektivne bolesti.

1.2 Idiopatska neplodnost

U opisivanju neplodnosti nepoznatog uzroka vrlo često se u literaturi istoznačno upotrebljavaju termini „idiopatska“ ili „neobjašnjiva“ neplodnost, a koji se ipak prema definiciji razlikuju. Pojam „idiopatski“ ima različita značenja s aspekta andrologije i ginekologije. Muška idiopatska neplodnost predstavlja dijagnostički neprepoznato stanje gdje se nakon standardne dijagnostičke obrade oba partnera ne može utvrditi etiološki čimbenik neplodnosti, ali se kod muškaraca evidentira smanjena kvaliteta sjemena bez dokaza koji objašnjavaju uzrok takvog nalaza. Najčešće abnormalnosti spermograma su azospermija, oligozoospermija, teratozoospermija i astenozoospermija. Pritom, smanjena kvaliteta sjemena ne znači u potpunosti neplodnost muškarca, osim ako nije riječ o azospermiji. S ginekološkog aspekta, upotreba pojmova „idiopatska“ ili „neobjašnjiva“ ženska neplodnost imaju isto značenje, prema kojem se nakon obrade ženskog partnera ne mogu utvrditi patološke promjene koje bi mogle utjecati na plodnost para (4–6).

Prema nedavno objavljenim smjernicama Europskog društva za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE, engl. *European society of human reproduction and embryology*), „neobjašnjiva neplodnost“ parova je definirana redovitim spolnim odnosima, urednom funkcijom ženskog spolnog sustava; jajnika, jajovoda, maternice, cerviksa i zdjelice. Također je uveden novi kriterij gdje se uzima u obzir dob ženskog partnera, navodeći 40 godina kao granicu. Kriteriji za muškog partnera su uredna funkcija testisa i anatomija genitourinarnog trakta i normalan spermogram (7).

Ukupna prevalencija neobjašnjive neplodnosti se kreće od 6 do 30 %. Neplodnost koja se pripisuje muškom faktoru, 33 % smatra se idiopatskom, a 11 % je neobjašnjivi uzrok (8). U obradi ženskog partnera govorimo samo o prevalenciji neobjašnjive neplodnosti koja iznosi 40 % (9). Postoji niz čimbenika koji utječu na ostvarivanje trudnoće, ali se trenutačno ne mogu detektirati i kvantificirati standardnom obradom. Razlog tako velikoj varijabilnosti u ukupnoj prevalenciji leži u tehničkim mogućnostima odnosno dostupnosti metoda za dijagnostičku obradu koja se pruža u okviru zdravstvene zaštite. Ključne karike važne u procesu oplodnje poput građe kromosoma jajne stanice, sitne abnormalnosti u spermogramu, transporta i implantacije embrija te receptivnosti endometrija u fokusu su znanstveno istraživačke-aktivnosti humane reprodukcije (2,10). U eri tehnološkog razvoja i primjeni novih osjetljivijih dijagnostičkih metoda, veliki interes usmjeren je na otkrivanju

poremećaja s ciljem rasvjetljavanja idiopatske neplodnosti.

1.3 Dijagnostika idiopatske neplodnosti

Ako se prema prethodno navedenim osnovnim pretragama ne uspije dijagnosticirati uzrok neplodnosti, a metodama pomognute oplodnje se ne postiže uspjeh u određenom razdoblju ovisno o karakteristikama para, moguće je proširiti dijagnostičku obradu u oba partnera.

U rutinskoj obradi muškog partnera analiza spermograma obuhvaća analizu ejakulata (izgled, količina, boja), spermija (broj, pokretljivost, vitalnost, morfologija te prisutnost patoloških oblika) i ostalih staničnih elemenata (leukociti, eritrociti, bakterije). Parametri spermograma izvan referentnih vrijednosti odnosno ispod 5 percentile isključuju dijagnozu neobjašnjive neplodnosti i zahtijevaju proširenu obradu muškog partnera (7,11). Ona prema potrebi uključuje ponavljanje spermograma nakon 3 mjeseca, kariogram, kromosomsku analizu mikrolelecija na Y kromosomu te primjenu invazivnih metoda poput punkcije ili biopsije testisa. Jedan od novijih pristupa dodatne obrade ejakulata je određivanje integriteta genoma analizom fragmentacije deoksiribonukleinske kiseline. Veći stupanj fragmentacije DNA spermija povezan je sa slabim oplodnim potencijalom te usporenom i nepravilnom embriogenezom. Prema meta analizama, u ejakulatu muškaraca s idiopatskom neplodnosti prisutan je veći stupanj DNA fragmentacije i oksidacijskog stresa u odnosu na kontrolnu skupinu (12–14). Međutim, nedostatak standardizacije testa s definiranim graničnim vrijednostima onemogućuje njegovu primjenu u rutinskoj obradi. Suvremene metode poput sekvenciranja metodama nove generacije, analiza malih nekodirajućih molekula ribonukleinske kiseline (miRNA, engl. microRNA) te određivanje metaboloma u ejakulatu, pronalaze sve veću primjenu u istraživanjima interakcije gena s okolišnim čimbenicima posebno kod muškaraca s normozoospermijom. Osim promjena na razini gena, u idiopatskoj neplodnosti prepoznate su reakcije autoimune etiologije. Izloženost spermalnih antigena imunološkom sustavu uslijed ozljede, upale ili infekcije može potaknuti stvaranje imunoglobulina usmjerenih na proteine spermija. Imunološka reakcija antigena s antitijelima može utjecati na pokretljivost i funkciju spermija i na proces fertilizacije. Međutim, pozitivan titar antispermalnih antitijela je dokazan i kod fertilnih muškaraca, prema tome njihova prisutnost ne mora nužno imati štetno djelovanje (10).

U obradi ženskog partnera kvalitetu jajnih stanica nije moguće unaprijed odrediti dijagnostičkom obradom pa se kompetentnost jajne stanice procjenjuje u samom postupku medicinski pomognute oplodnje (MPO). Starenjem raste rizik za bolesti reproduktivnog sustava te se drastično smanjuje broj raspoloživih folikula i kvaliteta jajnih stanica. Stoga se

biološka dob smatra najpouzdanijim prediktivnim biljekom kvalitete jajnih stanica. Prema dosadašnjim saznanjima plodnost žene opada već nakon 32. godine, a značajni pad događa se oko 38. godine. Shodno tome, nalazimo lažni porast incidencije neobjašnjive neplodnosti uslijed iscrpljivanja ovarijske rezerve žena starije dobi; upravo zbog toga je uvedena dobna granica od 40 godina, prema nedavno objavljenim smjernicama (7, 15). Neobjašnjiva neplodnost u žena često u podlozi krije trenutačno nedokazani blaži klinički oblik bolesti, a potencijalni uzroci koje je teško kvantificirati mogu biti sljedeći (16–18):

- Poremećaj u folikulogenezi, a koji se odnosi na prsnuće folikula bez otpuštanja oocite. Sazrijevanje praznog folikula ili atrezija folikula bez potpunog sazrijevanja također može biti uzrok neplodnosti. Nadalje, ovulacija s nedostatnom luteinizacijom ili preuranjena luteinizacija s izostankom prsnuća folikula također smanjuju izgled za trudnoćom.
- Poremećaji jajovoda i peritonealne šupljine najčešće se odnose na neprepoznavanje ranijeg stadija endometrioze. Blaga endometrioza sa žarištima na mikroskopskoj razini nepovoljno djeluje na sve faze koje se odvijaju tijekom oplodnje.
- Neodgovarajuća fertilizacija dokazuje se neuspjehom u više navrata tijekom MPO postupaka. Parovi s idiopatskom neplodnosti imaju oko 5 – 15 % neuspjelih fertilizacija s urednom kvalitetom sjemena. U tom se slučaju najčešće primjenjuje ICSI metoda.
- Nepravilan razvoj embrija zbog kromosomskih aneuploidija može biti razlog ponavljanih neuspjelih implantacija. Pojedina istraživanja povezala su smanjenu kvalitetu sjemena i primjenu intracitoplazmatske injekcije spermija (ICSI, engl. *intracytoplasmic sperm injection*) s većim rizikom pojave kromosomskih anomalija nastalih *de novo*. U takvim slučajevima, preimplantacijski genetski probir (PGS, engl. *preimplantation genetic screening*) pruža mogućnost otkrivanja kromosomskih anomalija, aneuploidija i mutacija.
- Neadekvatna receptivnost endometrija može biti posljedica ovarijske stimulacije i negativnog djelovanja visokih vrijednosti steroidnih hormona na sazrijevanje endometrija. Prema podacima iz literature, receptivnost se može poboljšati postupkom lokalne ozljede endometrija (engl. *endometrial scratching*). Pozitivan učinak povezuje se s provociranjem upalnog i imunološkog odgovora na mjestu ozljede tkiva. Međutim, taj postupak nije preporučen kod žena s neutvrđenim uzrokom neplodnosti (7).
- Disfunkcija peristaltike maternice također može biti prikriveni razlog neplodnosti žene. Zona spajanja (engl. *junctional zone*) endometrija i miometrija pokazuje hormonski uvjetovanu peristaltičku aktivnost tijekom menstruacijskog ciklusa. Promjene u

peristaltici mogu utjecati na kretanje spermija u maternici i na implantaciju embrija. Upravo se ponavljajući neuspjesi u implantaciji embrija smatraju mogućim „krivcem“ u u skupini žena s idiopatskom neplodnosti.

1.4 Liječenje idiopatske neplodnosti

Postupci liječenja neplodnosti neobjašnjiva uzroka se provode MPO postupkom u prirodnom ili modificiranom prirodnom ciklusu i ciklusu uz kontroliranu ovarijsku stimulaciju nakon koje slijedi intrauterina inseminacija ili izvantjelesna oplodnja (7). Liječenjem se zaobilaze moguće skrivene prepreke koje još nismo u mogućnosti odrediti s ciljem ostvarivanja trudnoće u što prirodnijem i manje invazivnom postupku. Katkad je dovoljna promjena životnih navika da bi se ostvarila trudnoća. Jedan potencijalno štetni čimbenik upravo leži u poremećaju ravnoteže između proksidansa i antioksidansa, odnosno u poremećaju redoks homeostaze, koja se često u literaturi naziva oksidacijskim stresom. Stoga je poželjno, uz standardne metode liječenja, eliminirati čimbenike s prooksidacijskim djelovanjem (cigarete, alkohol) i/ili dodatno unositi antioksidanse kao dodatak prehrani.

Učinkovitost liječenja ili ispitivanje utjecaja nepoznatih čimbenika na tijek MPO postupka može se kvantificirati na više načina. Svakako je najučinkovitiji ishod rođenje živog djeteta. Međutim, ako se želi promatrati utjecaj nekih čimbenika u ranijim fazama liječenja, tada koristimo druge indikatore kvalitete. Primjerice, broj zrelih oocita dobar je pokazatelj učinkovitosti stimulacije jajnika, broj zigota i broj te kvaliteta embrija pokazatelji su uspješnosti same oplodnje, dok je implantacija pokazatelj uspješnosti prijenosa zametka. Kasnije se prate klinički pokazatelji poput ostvarenja biokemijske trudnoće, kliničke trudnoće te rjeđe, rođenje djeteta (19).

1.4.1 Prirodni ciklus i modificirani prirodni ciklus

U prirodnom ciklusu (PC) dobiva se jedna jajna stanica bez upotrebe lijekova za ovarijsku stimulaciju. Rast folikula se prati transvaginalnim ultrazvukom i hormonskim određivanjem luteinizirajućeg hormona i estradiola. Nekontrolirani porast LH najčešće uzrokuje nekontroliranu ovulaciju i smanjenu uspješnost postupka. Modificirani prirodni ciklus (mPC) koristi egzogenu primjenu lijekova kako bi se potaknuo rast i razvoj prirodno izdvojenog dominantnog folikula. U postupku se primjenjuje humani korionski gonadotropin (hCG, engl. *human chorionic gonadotropin*). Zbog visokog stupnja strukturne homologije hCG-a s LH, isti se veže na njegove receptore i oponaša njegovo fiziološko djelovanje. Međutim, to ne isključuje mogućnost spontanog porasta LH i preuranjenu ovulaciju. S ciljem bolje kontrole nad endogenom aktivacijom hipofize, dodatno se primjenjuju antagonisti

hormona koji oslobađa gonadotropin (GnRH, engl. *gonadotropin-releasing hormone*) i male doze FSH-a u kasnoj folikularnoj fazi, a koji će potpomognuti porast 1 - 2 folikula. Oba postupka značajno reduciraju troškove liječenja, isključuju rizik od sindroma hiperstimulacije jajnika te fizički najmanje opterećuju ženu (20).

1.4.2 Stimulacija ovulacije

Stimulacijom jajnika potiče se rast folikula s ciljem dobivanja većeg broja jajnih stanica što naposljetku omogućuje selekciju kvalitetnijih embrija i povećava izgleda za ostvarenje trudnoće. Stimulacija jajnika ima nekoliko terapijskih pristupa: antiestrogenima, inhibitorima aromataze, gonadotropinima. Uz lijekove za stimulaciju jajnika primjenjuju se agonisti i antagonisti GnRH s ciljem supresije endogenog lučenja gonadotropina iz hipofize. U odnosu na agoniste, protokoli s GnRH antagonistima zbog svojih svojstava imaju širu primjenu te predstavljaju prvi izbor za žene koje su prvi put pod terapijskom stimulacijom. Njihova superiornost očituje se u bržem vremenu djelovanja (unutar 4 - 8 sati), izostanku trenutnog porasta gonadotropina (engl. „*flare up*“ učinak), povoljnijem odgovoru na stimulaciju gonadotropinima, boljoj receptivnosti endometrija, a oporavak hipofize nakon prekida terapije puno je brži. U prirodnom ciklusu, sazrijevanju jajne stanice i ovulaciji prethodi nagli porast LH iz hipofize, dok se u stimuliranom ciklusu konačno dozrijevanje jajne stanice postiže primjenom hCG-a. Isti učinak također je moguće ostvariti agonistima GnRH koji izravno djeluju na otpuštanje gonadotropina, LH i FSH („*flare up*“ učinak) ili se prema potrebi primjenjuje kombinacija GnRH agonista i hCG-a (21).

1.4.3 Intrauterina inseminacija

Intrauterina inseminacija (IUI) provodi se u prirodnom ili stimuliranom ciklusu. Predstavlja najjednostavniji oblik MPO postupka kojim se nastoji zaobići cervikalni uzrok neplodnosti. Postupak se sastoji u ispiranju ejakulata od prostaglandina, leukocita, nepokretnih spermija i drugih faktora te ukoncentriravanju spermatozoida u kulturi medija kako bi se poboljšala kapacitacija i reakcija akrosoma. Pripremljeno se sjeme neposredno prije ovulacije kateterom unosi u maternicu. Metoda je financijski najjeftinija, ali je i manje uspješna od klasične izvantjelesne oplodnje (IVF, engl. *in vitro fertilization*). Klasičnom stimulacijom jajnika povećava se vjerojatnost trudnoće kroz dobivanje većeg broja jajnih stanica koji je popraćen većim rizikom hiperstimulacije ili pojave višestrukih trudnoća. S druge strane, blaga stimulacija prosječno ostvaruje 2 do 6 jajnih stanica te se smatra metodom izbora u liječenju parova s idiopatskom neplodnosti. Podaci meta analize pokazuju da blaga stimulacija jajnika koja prethodi intrauterinoj inseminaciji ne povećava rizik od

višeplodnih trudnoća. Hormonskom stimulacijom jajnika povećava se vjerojatnost trudnoće kroz dobivanje većeg broja jajnih stanica. Međutim, potonje nosi veći rizik razvoja sindroma hiperstimulacije jajnika ili višestrukih trudnoća. Prema stopi živorođene djece, u parova s neobjašnjivom neplodnosti intrauterina inseminacija u stimuliranom ciklusu je dva puta uspješnija u odnosu na IUI bez stimulacije (omjer izgleda: 2,07; 95 % CI: 1,22 – 3,50) (7, 21, 22).

1.4.4 Aspiracija jajne stanice

U slučaju izvantjelesne oplodnje provodi se aspiracija jajne stanice iz vodećih folikula 34 do 36 sati nakon primjene hCG-a. Nakon aspiracije može se procijeniti njena prisutnost i zrelost. Sazrijevanje je složen proces koji prati sazrijevanje jezgre, citoplazme i razvoj folikula u kojima se jajna stanica nalazi. Prema morfološkim obilježjima, optimalna zrela jajna stanica okruglog je oblika i ravnomjerno okružena zonom pelucidom. Citoplazma je prozirna i jednolična bez inkluzija te ima vidljivo polarno tjelešce prikladne veličine. Kompetentnost se očituje sposobnošću završavanja mejotičke diobe i oplodnjom kako bi se omogućio razvitak embrija (20).

1.4.5 Izvantjelesna oplodnja

Izvantjelesna oplodnja obuhvaća dva pristupa; klasičnu izvantjelesnu oplodnju i intracitoplazmatsku injekciju spermija. Najčešće indikacije njihove primjene u liječenju idiopatske neplodnosti su neuspjeli postupci IUI-em nakon stimulacije jajnika ili povećan rizik višeplodnih trudnoća. Klasičnim IVF-om u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, u volumenu kapljice 25 000 do 50 000 obrađenih spermija okružuju jajnu stanicu povećavajući izgleda za uspješnu fertilizaciju. Alternativni izbor, ICSI-a ostvaruje veći postotak fertilizacije u odnosu na IVF i intrauterinu inseminaciju nakon stimulacije jajnika. Međutim, prema stopi živorođene djece u parova s neobjašnjivom neplodnošću ne postoje značajne razlike između IVF i ICSI metode. Pristup liječenju temelji se na ginekološkoj procjeni koja ovisi o karakteristikama para poput dobi, trajanja neplodnosti, prethodnim trudnoćama i prethodnom pristupu liječenja (16, 23, 24).

1.4.6 Procjena kvalitete zametka

U slučaju prestanka diobe ili degeneracije stanica, zametak se smatra nevijabilnim. Suprotno tome, nakon uspješne fertilizacije slijedi procjena kvalitete zametaka drugi ili treći dan odnosno četvrti ili peti dan nakon inseminacije ili intracitoplazmatske injekcije. Jednoznačni kriteriji za procjenu oplodnje i kvalitete zametka u istim vremenskim intervalima omogućuju

lakšu usporedivost rezultata između studija. Zbog toga je donesen konsenzus za ocjenu zametka (Tablica 1) (25). Uz morfološke karakteristike promatra se kinetika diobe stanica, pri čemu presporo i prebrzo dijeljenje imaju podjednako negativne učinke na implantaciju. Kultivacija zametaka do 5. dana svojevrsan je probir izdvajanja uspješnih zametaka koji naposljetku završavaju oslobađanjem blastociste iz zone pelucide. Blastocista po građi ima čvrsti sloj vanjskih stanica (trofoektoderm), a unutar blastocela nalazimo čvrstu nakupinu stanica (embrionalni čvorić). U procjeni kvalitete blastociste prije embriotransfera (ET) uzimaju se u obzir stupanj ekspaniranosti blastociste i morfološki izgled (26).

Tablica 1. Sažeti prikaz embriološke procjene kvalitete zametka

Dan procjene	Kriteriji
16 do 20 sati	<ul style="list-style-type: none"> • Zigota s dva pronukleusa smještena u sredini stanice i dva polarna tjelešca
2. i 3. dan	<ul style="list-style-type: none"> • Broj blastomera (4 do 8) smatra se najvažnijim kriterijem • Jednakost blastomera • Fragmentacija citoplazme; blaga ($\leq 10\%$), umjerena (10-25 %) i teška ($\geq 25\%$) • Prisutnost multinukleacije (>1 jezgra po blastomeri)
4. dan	<ul style="list-style-type: none"> • Stadij morule ima 16 do 32 blastomere • Nestaju jasne granice između blastomera • Procjenjuje se zastupljenost kompakcije
5. dan	<ul style="list-style-type: none"> • Ekspaniranost blastociste: rana, razvijena, ekspanirana, u izlijeganju • Embrionalni čvorić • Trofoektoderm

1.5 Promjene u redoks homeostazi

Pojam „oksidacijskog stresa“ podrazumijeva poremećaj u ravnoteži između oksidansa i antioksidansa, a u korist oksidansa, pri čemu može doći do promjena u kontroli i signalizaciji redoks reakcija te oštećenja makromolekula (27). Stoga oksidacijski stres možemo promatrati s aspekta porasta reaktivnih spojeva i/ili nastalih produkata (oksidiranih makromolekula), a najčešće ih povezujemo s negativnim učincima na zdravlje čovjeka. Postoje tri glavna puta oštećenja makromolekula:

- A. Oksidacija proteina, pri čemu se mijenja njegova struktura i funkcija.
- B. Oksidacija lipida, koja se očituje promjenom u strukturi te gubitkom fluidnosti i permeabilnosti membrane. Na ovu vrstu oksidacije posebno su osjetljivi mitohondriji i endoplazmatski retikulum.
- C. Oksidacija DNA, koja uzrokuje mutacije i nestabilnost genoma.

U održavanju redoks homeostaze uključeni su brojni mehanizmi zbog čega ponekad nije moguće utvrditi stanje oksidacijskog stresa prema gore navedenoj definiciji. Istraživanja nam često pokazuju da stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*) ili reaktivnih dušikovih spojeva (RNS, engl. *reactive nitrogen species*) nužno ne znači pojačano stvaranje oksidiranih makromolekula. Konkretno, promjene određenih biljega mogu ukazivati na stanje povećanog oksidacijskog stresa, a promjene drugih na stanje smanjenog oksidacijskog stresa pa tada govorimo o reduktivnom stresu. Stoga Nikolaidis i sur. (28) predlažu korištenje alternativnog pojma: „promjene u redoks homeostazi“ koje pokazuju značajne promjene u porastu, odnosno padu koncentracije ili aktivnosti ROS-a, oksidiranih makromolekula i antioksidansa. U području humane reprodukcije te promjene možemo proučavati iz više izvora: sistemski u cirkulaciji ili u mikrokolišu gameta, spermatozoa i jajne stanice.

1.5.1 Reaktivni spojevi

Reaktivni spojevi nastaju uslijed prijenosa elektrona i to najčešće na molekulu kisika (ROS) ili dušika (RNS). Najčešći slobodni radikali i njihovi reaktivni intermedijeri prikazani su u tablici 2. Uglavnom nastaju u enzimskim reakcijama u mitohondrijima, peroksisomima i endoplazmatskom retikulumu. Prema kemijskim svojstvima, ROS i RNS nestabilni su spojevi, male specifičnosti za reaktante i kratkog poluživota (29). Isprva su oksidansi prepoznati kao štetne molekule koje zbog svoje reaktivnosti teže stvaranju elektronskog para te spontano stupaju u reakciju s drugim molekulama. To su najčešće antioksidansi koji čine heterogenu skupinu spojeva odgovornu za preuzimanje nesparenog elektrona i stabilizaciju molekule.

Daljnja istraživanja su pokazala da reaktivni spojevi imaju ulogu signalnih molekula koje sudjeluju u procesima poput diferencijacije i regeneracije stanica, sazrijevanja jajne stanice i steroidogenezi. Tu se posebno izdvaja molekula vodikovog peroksida, koja zbog slabije reaktivnosti i lagane difuzije kroz membranu sudjeluje u signalnom putu. Nadalje, prisutnost ROS-a ima fiziološku ulogu u izdvajanju dominantnog folikula i apoptozi ostalih rastućih folikula. Intezitet i duljina izloženosti stanica, odnosno tkiva reaktivnim spojevima uvjetuje kakav će biti stanični odgovor, a koji može biti u vidu stanične komunikacije ili toksičnog djelovanja na makromolekule (lipide, proteine, nukleinske kiseline) (27, 30, 31). Djelovanje vanjskih čimbenika poput pušenja, alkohola, malnutricije, debljine, psihoaktivnih supstanci ili UV zračenja mogu uzrokovati pojačano stvaranje ROS-a ili RNS-a. Štetne promjene u redoks homeostazi zamijećene su i kod bolesti reproduktivnog sustava i komplikacija u trudnoći (32). Nadalje, povećana razina ROS-a, povezana je sa slabijim ishodima MPO postupaka u vidu slabije kvalitete embrija ili s manjim postotkom ostvarenih trudnoća (33–35).

Zbog svojih kemijskih svojstava, kratkog poluživota i reaktivnosti direktno određivanje ROS-a ili RNS-a predstavlja veliki analitički izazov. Upravo zbog toga je zastupljeniji indirektni pristup određivanja krajnjih produkata koji su posljedica njihovog djelovanja. Isto tako, da bi se stekao bolji uvid u ravnotežu redoks reakcija, poželjno je određivati i komponente antioksidacijskog sustava koji sudjeluju u neutralizaciji reaktivnih spojeva.

Tablica 2. Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi

Reaktivni kisikovi spojevi		Reaktivni dušikovi spojevi	
Superoksidni anion	$O_2^{\cdot-}$	Dušikov(II) oksid	NO^{\cdot}
Hidroksil	HO^{\cdot}	Dušikov(IV) oksid	NO_2^{\cdot}
Peroksil, alkoksil	RO_2^{\cdot}, RO^{\cdot}	Nitritna kiselina	HNO_2
Hidroperoksil	HO_2^{\cdot}	Peroksinitrit	NO_3^{\cdot}
Vodikov peroksid	H_2O_2	Nitrozilni kation	NO^+
Singlet kisik	1O_2	Nitrosilni anion	NO^-
Ozon	O_3	Dušikov(III) oksid	N_2O_3

1.5.2 Mikrookoliš jajne stanice

Folikul predstavlja funkcionalnu jedinicu složenu od somatskih stanica i folikularne tekućine (FT) koje okružuju jednu gametu, oocitu. Slojevi stanica i folikularne tekućine čine prirodnu barijeru koja štiti oocitu od sistemskih promjena u cirkulaciji. Prisutnost odjeljka folikularne tekućine zapažena je već u preantralnom stadiju folikulogeneze u obliku praznih prostora između granulosa stanica. Progresijom rasta folikula, granulosa stanice diferenciraju se u stanice kumulusa koje okružuju jajnu stanicu i muralne stanice koje su povezane sa stijenkom folikula. Uz stijenku rastućeg folikula nalaze se i teka stanice, odvojene od muralnih bazalnom membranom.

U svom sastavu, folikularna tekućina sadrži eksudat plazme te sekretorne produkte svih okolnih stanica. Biokemijske promjene unutar folikula mogu biti uvjetovane sistemskim promjenama ili su rezultat endokrine, parakrine ili autokrine signalne komunikacije okolnih stanica, a koja se odvija tijekom folikulogeneze. Stanična signalizacija između oocite i stanica kumulusa odvija se putem membranskih kanalića (engl. *gap junctions*) ili parakrino preko receptora. Dakle, folikularna tekućina predstavlja medij sa smjesom molekula poput proteina, polisaharida, steroidnih hormona, metabolita, uključujući reaktivne kisikove spojeve i antioksidanse (36–39).

Očekivano narušavanje dinamike u mikrookolišu može negativno utjecati na kvalitetu jajne stanice. Tako naprimjer, sama oocita ima mali kapacitet metaboliziranja glukoze i sinteze kolesterola potrebnog u steroidogenezi pa tu ulogu preuzimaju stanice kumulusa. U njima se odvija i metabolizam glukoze. U tim stanicama postoje četiri metabolička puta razgradnje glukoze: glikoliza, pentoza fosfatni put, put biosinteze heksozamina i put poliola. Glikoliza predstavlja glavni put razgradnje glukoze do piruvata, koji se prenosi u oocitu kao izvor energije. Stoga veće koncentracije tih metabolita nalazimo u folikularnoj tekućini. Pentoza fosfatni put smatra se ključnim u procesu sazrijevanja jajne stanice, sinteze purina i održavanja redoks ravnoteže. Treći alternativni put, biosinteza heksozamina pridonosi stvaranju hijaluronske kiseline i ekspanzije kumulusa. Zadnji put biosinteze poliola iz glukoze aktivan je u stanjima hiperglikemije kada redukcijom glukoze nastaju produkti sorbitol i fruktoza, a koji imaju negativan učinak na zrelost jajne stanice. Očekivano, povećana koncentracija glukoze povezana je s promjenama u redoks homeostazi, povećanim stvaranjem ROS-a te smanjenom koncentracijom reduciranog glutaciona. Iz navedenog možemo zaključiti da sistemski metabolički poremećaji poput dijabetesa ili pretilosti mogu imati negativan utjecaj na mikrookoliš jajne stanice (39).

Uslijed porasta LH neposredno prije ovulacije, unutar mitohondrija stanica kumulusa prisutna je intenzivnija β -oksidacija slobodnih masnih kiselina, glavnog izvora adenosin-trifosfata (ATP, engl. *adenosine triphosphate*). Osim energetske uloge, lipidi su sastavni dio bioloških

membrana koje su najčešća meta napada ROS-a nastalih u suvišku. Nadalje, prisutne lipidne sastavnice čine prekursore u sintezi steroidnih hormona i prostanglandina te posreduju u staničnoj komunikaciji tijekom folikulogeneze.

Dozrijevanjem oocite mijenja se i proteinski sastav folikularne tekućine. Sama indukcija ovulacije, bilo s hCG-om ili GnRH agonistom, značajno mijenja ekspresiju gena u granulosa stanicama (40). Koncentracija ukupnih proteina nešto je manja u odnosu na sistemsku cirkulaciju. Otprilike 56 % sastavom odgovara proteinima plazme. Endogena sinteza proteina porijeklom je iz stanica kumulusa, muralnih stanica i oocite. Oko 11 – 28 % identificiranih proteina reaktanti su akutne faze dok metabolički aktivnih proteina ima 13 – 19 %, a pripadaju skupini enzima, veznih proteina i receptora koji funkcionalno imaju ulogu enzima. Prisutnost različitih antioksidacijskih enzima u folikularnoj tekućini ukazuje na važnost zaštite oocite od štetnih utjecaja induciranih oksidacijskim stresom (40, 41).

1.5.3 Promjene u redoks homeostazi u folikularnoj tekućini

Kratak domet i poluživot generiranih reaktivnih kisikovih spojeva ograničavaju njihovo djelovanje na lokalnoj razini. Promjene *in situ* često je teško otkriti na sistemskoj razini zbog prisutnih antioksidacijskih mehanizama koji postoje u cirkulaciji. U MPO postupcima pod utjecajem hormonske terapije rast, sazrijevanje i metabolizam stanica unutar jajnika postaje sve intenzivniji. Teoretski, istovremeni rast većeg broja folikula može postati izvor pojačanog stvaranja ROS-a i uzrok promjena u redoks homeostazi. Tome u prilog govore istraživanja koja su uspoređivala biljege redoks homeostaze u FT-i prirodnog ciklusa i ciklusa ovarijske stimulacije. Prema njihovim zapažanjima, tijekom stimulacije jajnika u folikularnoj tekućini reducirani su antioksidacijski kapaciteti i povećano je stvaranje modificiranih proteina N^ε-karboksietil-lizina i zasićenih masnih kiselina (42, 43).

Pojačano stvaranje ROS-a u mikrookolišu jajne stanice može potjecati iz više izvora (Slika 1); mitohondrija jajnih stanica te mitohondrija stanica koje je okružuju, leukocita, zbog loših životnih navika (pretilost, pušenje, konzumacija alkohola), zbog veće starosne dobi žene ili zbog lokalno prisutnih patofizioloških procesa poput endometrioze ili sindroma policističnih jajnika (PCOS, engl. *polycystic ovary syndrome*). Nastala promjena u redoks homeostazi povezana je s nepravilnim razdvajanjem kromosoma tijekom mejoze, indukcijom apoptoze granulosa stanica te neuspješnim oplodnjama i kvalitetom embrija (44, 45).

Kao i kod spermija, najznačajnije stvaranje ROS-a odvija se u mitohondrijima jajne stanice tijekom sinteze ATP-a. Naspram ostalih stanica, jajna stanica i spermiji po sadržaju su bogate mitohondrijima. Na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani u nizu redoks reakcija odvija se lančani prijenos elektrona s molekula bogatih energijom, nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH, engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) i flavin-

adenin-dinukleotida (FADH_2 , engl. *flavin adenine dinucleotide*) na kisik, preko četiri transportna proteinska kompleksa, pri čemu se oslobađa slobodna energija potrebna za sintezu ATP-a. U normalnim fiziološkim uvjetima mala količina ROS-a nastaje uslijed ispuštanja elektrona iz transportnog lanca pri čemu nastaje superoksidni anion. Ovaj visokoreaktivni radikal generira se u matriksu ili u međumembranskom prostoru mitohondrija otkuda može dalje migrirati u stanični citosol. S obje strane membrane prisutni su zaštitni antioksidacijski enzimski sustavi superoksid-dismutaze, katalaze, glutation-peroksidaze i reduciranog glutationa kojima je glavna zadaća brza neutralizacija superoksidnog aniona preko vodikovog peroksida do krajnjeg produkta, vode. Alternativno, nastali vodikov peroksid može stupiti u reakciju s ionima željeza stvarajući pri tome nepoželjne visokoreaktivne hidroksil i hidroperoksil radikale koji napadaju mitohondrijsku ili staničnu DNA, RNA, lipide i proteine. Prema tome, u procesima staničnog disanja reaktivni kisikovi spojevi se normalno kontinuirano oslobađaju, ali se promptno neutraliziraju kako bi se održala redoks homeostaza. U suprotnom, smanjeni antioksidacijski kapacitet ili pak smanjena funkcija mitohondrija vode ka izloženosti stanica intenzivnijem napadu ROS-a, što može imati negativan učinak na kvalitetu jajne stanice. Pritom je mitohondrijska DNA (mtDNA) podložnija oštećenju od stanične DNA iz dva razloga; blizina generiranja ROS-a čini je prvom metom napada, a smanjeni enzimski kapacitet popravka mtDNA u odnosu na DNA u jezgri onemogućuje njenu reparaciju. Oštećenjem mtDNA reducira se izvor energije i općenito funkcionalnost cijelog organela. S obzirom na to da mitohondriji spermija nakon oplodnje brzo degradiraju, izvor energije potreban za razvoj embrija pripada isključivo mitohondrijima oocite. Slijedom toga, možemo reći da funkcionalnost mitohondrija oocite uvjetuje daljnji razvitak i kvalitetu embrija (44, 46, 47). Prijenos elektrona i oksidacija odvija se unutar stanične membrane i endoplazmatskog retikuluma gdje enzimske oksidaze i oksigenaze poput NADPH-oksidaza, ksantin-oksidaza, citokroma P_{450} , ciklooksigenaza svojim katalitičkim djelovanjem doprinose endogenom stvaranju ROS-a (39, 45).

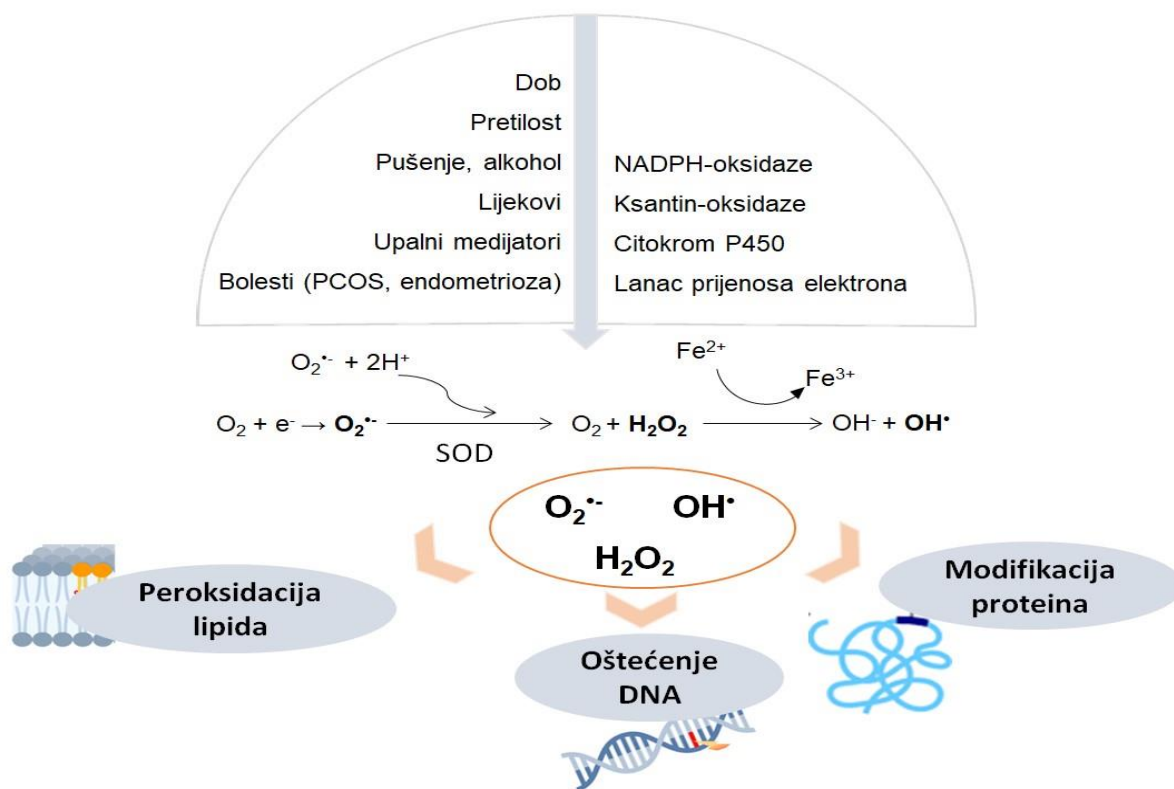
Porastom biološke dobi mijenja se sastav folikularne tekućine te se smanjuje sposobnost fertilizacije oocite. Promjene su vidljive na razini; steroidogeneze kroz pojačano stvaranje progesterona u folikularnoj tekućini, pojačanog stvaranja upalnih medijatora (interleukin 6, čimbenik tumorske nekroze α), smanjenja antioksidacijskog kapaciteta i funkcije mitohondrija. Nadalje, tijekom starenja dolazi do nakupljanja uznapredovalih krajnjih produkata glikacije (AGE, engl. *advanced glycation endproducts*), koji doprinose pojačanom stvaranju ROS-a (30, 44, 48).

Infiltracija leukocita i stvaranje ROS-a normalno se odvija u fiziološkim uvjetima pred ovulaciju i tijekom luteolize, iz čega možemo zaključiti da je ovulacija slična upalnom procesu. Leukociti, prvenstveno neutrofili i makrofazi, svojim metabolizmom generiraju značajne količine ROS-a koji se u funkciji signalnih molekula uključuju u proces ekspanzije

kumulusa, sinteze progesterona i aktivacije signalnog puta u ovulaciji. S jedne strane leukociti su glavni izvor štetnih metabolita koji se brzo moraju neutralizirati, a s druge strane pojačano antioksidacijsko djelovanje enzima može negativno djelovati na ovulaciju. Prema tome, narušavanje redoks homeostaze u smjeru oksidacijskog ili reduktivnog stresa može nepovoljno djelovati na jajnu stanicu (30, 47).

Negativan utjecaj prekomjerne tjelesne mase žena na sazrijevanje i kvalitetu jajne stanice možemo sagledati sistemski i lokalno. Adipozno tkivo možemo promatrati kao metabolički aktivan organ koji sudjeluje u steroidogenezi, predstavlja mjesto gdje se odvija aromatizacija androgena u estrogene koji pak djeluju na sekreciju gonadotropina. Debljinu također prati inzulinska rezistencija s hiperglikemijom koja utječe na folikulogenezu. Negativan učinak inzulina se ispoljava kroz povećano izlučivanje LH iz hipofize, aktivaciju LH receptora na teka stanicama i posljedično kroz hiperandrogenemiju. Na lokalnoj razini, u folikularnoj tekućini adipoznih žena pronađene su veće koncentracije slobodnih zasićenih masnih kiselina koje se normalno metaboliziraju β -oksidacijom u mitohondrijima jajnih stanica. Međutim u visokim koncentracijama slobodne zasićene masne kiseline pokazuju lipotoksičnost usljed nakupljanja u neadipoznom tkivu, pri čemu dolazi do oštećivanja mitohondrija, glavnih generatora ROS-a, koji dalje oštećuju makromolekule (49, 50).

Pušenje se također smatra rizičnim čimbenikom uspješnosti MPO postupaka. Duhanski dim je izvor brojnih toksina: policikličkih aromatskih ugljikovodika, nitrozamina, teških metala i alkaloida. Prooksidacijsko djelovanje tih spojeva smatra se glavnim mehanizmom štetnog djelovanja na spermatozou, ali i na jajnu stanicu. Zbog povećanog stvaranja ROS-a mijenja se redoks homeostaza u smjeru povećane aktivacije antioksidacijskih mehanizama (51, 52). Zbog toga se preporučuje promjena životnih navika oba partnera.



Slika 1. Potencijalni izvori i put nastanka reaktivnih kisikovih spojeva u oociti. NADPH-oksidade - nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat-oksidade; PCOS - sindrom policističnih jajnika; SOD - superoksid-dismutaza.

Promjena ravnoteže redoks homeostaze u prooksidacijskom smjeru prisutna je u pozadini nekih bolesti reproduktivnog sustava. Sindrom policističnih jajnika je najčešća endokrinološka bolest reproduktivne dobi. Karakterizira ju velika heterogenost fenotipova eksponiranih u obliku debljine, dislipidemije, inzulinske rezistencije, hiperandrogenemije i metaboličkog sindroma. Tim stanjima možemo pridodati i promjene u redoks homeostazi kao posljedica pojačanog stvaranja ROS-a, pri čemu su zamijećene povišene koncentracije oksidiranih lipida te smanjeni antioksidacijski kapaciteti. Zastoj u folikulogenezi te navedene promjene u sastavu FT-e djeluju i na proces sazrijevanja jajne stanice i njezin metabolizam. Druga vrlo česta bolest povezana s oksidacijskim stresom je endometrioza koju prati kronična upala obilježena rastom i promjenama endometrija izvan uterusa. Postoji nekoliko prihvaćenih teorija o nastanku endometrioze. Najviše prihvaćene teorije uključuju retrogradne menstruacije, neprikladan imunološki odgovor i genetsku predispoziciju. Upalna stanja zajedno s proinflamatornim citokinima prate promjene u redoks homeostazi. Međutim, istraživanja kronične upale i oksidacijskog stresa u endometriozi na uzorku peritonealne i

folikularne tekućine daju oprečne rezultate. S jedne strane nema zamjetnih promjena u redoks homeostazi, dok druga istraživanja bilježe porast upalnih biljega i produkata nastalih oksidacijom kao i smanjenje antioksidacijskih biljega (30,53–55). Patološke promjene unutar reproduktivnog sustava povezuju se s pomacima u redoks homeostazi prema stvaranju modificiranih makromolekula. U tom slučaju, uvođenje terapije s antioksidacijskim djelovanjem predstavlja logičan slijed u liječenju neplodnosti. Ipak, prije same primjene terapije antioksidansima potrebno je razjasniti imaju li stvoreni ROS-i ključnu ulogu u nastanku patofizioloških procesa ili su samo posljedica upalne reakcije.

1.5.4 Promjene u redoks homeostazi sjemenne tekućine

U sjemenjnoj tekućini endogena sinteza ROS-a potječe iz leukocita; makrofaga i neutrofilnih granulocita te nezrelih spermatozoa. Na staničnoj razini, ROS-i stvaraju se u metaboličkom putu djelovanjem membranskih i citosolnih oksidaza. Najveći udio ROS-a proizlazi iz vrata spermija, područja bogatog mitohondrijima u kojima se oksidativnom fosforilacijom stvara energija nužna za njihovu pokretljivost. Niske koncentracije ROS-a djeluju kao prijenosnici signalnog puta u regulaciji steroidogeneze i spermatogeneze u testisima. Nadalje, smatraju se modulatorima u procesima maturacije, kapacitacije, akrosomske reakcije spermija i njihove fuzije s oocitom.

Stanična membrana spermija sadrži visoki udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acid*) koje daju membrani fluidnosti prijeko potrebnu za spajanje spermija s oocitom. Izloženost vanjskim čimbenicima poput pušenja, konzumacije alkohola, kemoterapije i toksina iz okoline može pridonijeti prekomjernom nastajanju ROS-a u sjemenjnoj tekućini. Upravo su dvostruke veze u višestruko nezasićenim masnim kiselinama meta napada reaktivnih spojeva što naposljetku može dovesti do reakcije lipidne peroksidacije i smanjenja fluidnosti membrane. Smanjena fluidnost i neselektivna permeabilnost membrane, inaktivacija membranskih receptora i enzima u spermatozoi vodi prema neodgovarajućoj fertilizaciji oocite. U stanju oksidacijskog stresa uz oštećenje membrane spermija, narušava se i integritet DNA. Kada oštećenja postaju ireverzibilna bez mogućnosti popravka, proces završava apoptozom. Oplodnjom jajnih stanica sa spermijima u kojima je uočen visok stupanj DNA fragmentacije zamci pokazuju sporiju dinamiku dijeljenja te manju vjerojatnost razvoja do stadija blastociste (11, 57). Upravo se subfertilnost muškaraca nepoznatog uzroka vrlo često povezuje s oksidacijskim stresom. Iz svega navedenog, skupina autora Agarwal i sur. (57) predlažu određivanje statusa oksidacijskog stresa u sjemenjnoj tekućini muškaraca s idiopatskom neplodnošću i

upotrebu termina „muške neplodnosti uzrokovane oksidacijskim stresom“ (MOSI, engl. *male oxidative stress infertility*).

1.6 Biljezi redoks homeostaze

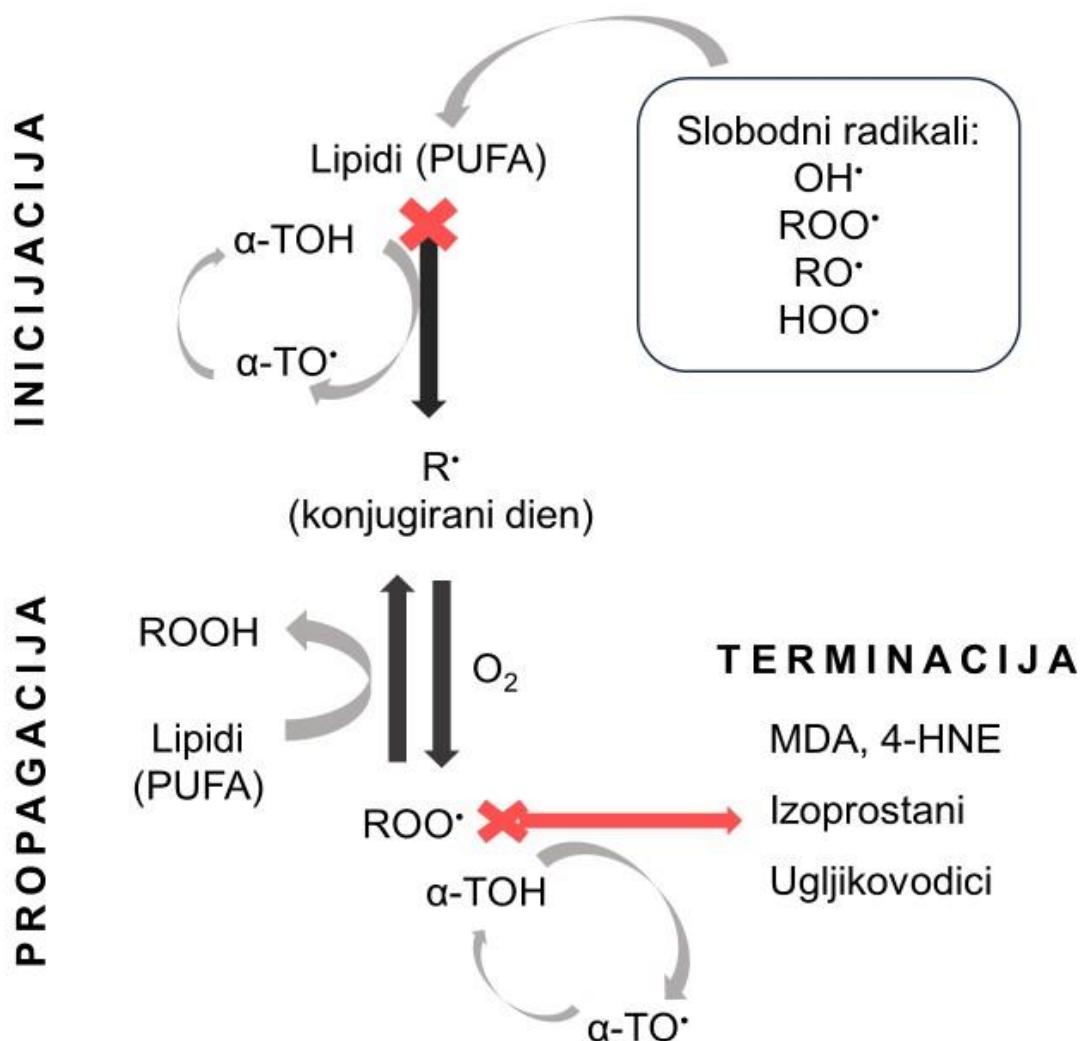
Postoji cijeli spektar metoda kojima se nastoje otkriti i kvantificirati promjene redoks homeostaze u biološkim uzorcima. Kako je već spomenuto, direktno mjerenje ROS-a je vrlo zahtjevno zbog bioloških i analitičkih svojstava tih molekula. Stoga se promjene u redoks homeostazi najčešće temelje na određivanju produkata nastalih oštećenjem makromolekula lipida, proteina i DNA. Najčešće se istovremeno određuju i antioksidacijske komponente koje su odgovorne za sprečavanje nastanka istih.

1.6.1 Lipidna peroksidacija

Zasićene masne kiseline te nezasićene masne kiseline s jednom dvostrukom vezom su stabilnije i manje podložne kemijskim reakcijama od PUFA. Višestruko nezasićene masne kiseline u membranskim fosfolipidima utječu na fluidnost i propusnost membrana te svaka promjena poput primjerice oksidacije PUFA utječe na strukturu i funkciju membrana. Podložnost oksidaciji se povećava sa porastom broja dvostrukih veza. Lipidna peroksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina u membranskim fosfolipidima se odvija mehanizmom lančanih reakcija, a sastoji se od tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Slika 2).

Prisutnost dvostrukih veza oslabljuje C-H veze na susjednom C atomu unutar metilenske skupine i čini ih podložnima za spontanu reakciju s radikalima (hidroksilni, hidroperoksilni, alkoksilni ili peroksilni radikal). Za razliku od ostalih radikala, negativan naboj superoksidnog aniona onemogućava prolazak kroz membranu. Stoga je djelovanje superoksidnog aniona ograničeno na mjesto njegova stvaranja. Dakle, inicijacija lipidne peroksidacije započinje s radikalom koji oduzima vodikov atom s metilenske skupine PUFA-e. Nastali slobodni lipidni radikali nastoje postići stabilnu konfiguraciju pregradnjom u konjugirane diene (R^*). Već u fazi inicijacije vitamin E (α -tokoferol) inhibira ovaj korak i pri tome se sam oksidira, ali može se ponovo reducirati uz vitamin C. U fazi propagacije, adicijom kisika na radikal (R^*) nastaje peroksilni radikal (RO_2^*) nakon čega slijedi lančana reakcija oduzimanja vodika drugim nezasićenim organskim molekulama, uključujući PUFA pri čemu nastaju lipidni hidroperoksidi i novi reaktivni ugljikovi radikali. Lipidni hidroperoksidi u prisutnosti hemskog i nehemskog željeza reinicijaliziraju peroksidaciju disocijacijom na lipidni alkoksilni i lipidni peroksilni radikal koji se također mogu neutralizirati uz vitamin E. U fazi terminacije lipidni hidroperoksidi disociraju na konačne produkte nezasićene aldehide

(malondialdehid, 4-hidroksinonenal), ugljikovodike (etan, eten, pentan) i oksidirane fosfolipide (izoprostani) (58, 59).



Slika 2. Shematski prikaz mehanizma lipidne peroksidacije. PUFA - višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA, engl. polyunsaturated fatty acid); MDA - malondialdehid; 4-HNE - hidroksinonenal; $\alpha\text{-TOH}$ - α -tokoferol (vitamin E); $\alpha\text{-TO}\cdot$ - α -tokoferil radikal (oksidirani vitamin E); ROOH - lipidni hidroperoksidi; $\text{ROO}\cdot$ - peroksilni radikal; $\text{OH}\cdot$ - hidroksilni radikal; $\text{RO}\cdot$ – alkoksilni radikal; $\text{HOO}\cdot$ – hidroperoksilni radikal.

1.6.2 Malondialdehid

Postoje dva puta nastanka malondialdehida (MDA); spontano peroksidacijom PUFA ili enzimski prilikom sinteze tromboksana A_2 . Od spontane oksidacije lipida, dominira

peroksidacija arahidonske kiseline (20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$). Pri tome nastali peroksilni radikali sa svojim *cis*-dvostrukim vezama u reakcijama ciklizacije, stvaraju bicikličke endoperoksidge. Njihovim cijepanjem nastaje malondialdehid. Metabolizam nastalog MDA slijedi dva puta. Može se nastaviti oksidacijom u mitohondrijima s aldehyd-dehidrogenazama uz dekarboksilaciju pri čemu nastaje acetaldehyd koji se dalje oksidira preko acetata do ugljikovog(IV) oksida i vode. Drugi put metabolizma MDA je neenzimski. Obzirom da je vrlo reaktivan aldehyd, MDA može brzo stupiti u reakciju s drugim makromolekulama. Reaktivnost malondialdehida uvjetovana je dvjema karbonilnim skupinama i pH vrijednošću medija u kojem se nalazi. U fiziološkim uvjetima MDA nalazi se u obliku enolat aniona te ima afinitet prema stvaranju štetnih kovalentnih adukata s proteinima i nukleinskim kiselinama zbog čega mu se pripisuju citotoksična i mutagena svojstva (60, 61).

Koncentracija MDA u folikularnoj tekućini je oko 10 - 50 % manja u odnosu na vrijednosti u cirkulaciji (54, 62–66). Prethodno provedena istraživanja utvrdila su podjednake koncentracije MDA između ispitanica s endometriozom, PCOS-om i debljinom u odnosu na kontrolne skupine (62–65,67–74). Moguće pojašnjenje leži u nedostatku analitičke specifičnosti spektrofotometrijske metode određivanja MDA koja se uglavnom koristila u istraživanjima. Zanimljivo, prema rezultatima Collodel i sur. (75) ispitanice s idiopatskom neplodnosti imaju manju koncentraciju MDA u folikularnoj tekućini naspram ispitanica s endometriozom i smanjenom ovarijskom rezervom. Promatranjem ishoda MPO-a, veća koncentracija MDA povezana je s lošijom kvalitetom embrija i neostvarenim trudnoćama (33, 35, 74, 76 – 78).

Metode određivanja MDA najčešće se temelje na spektrofotometrijskim ili fluorimetrijskim mjerenjima, uz prethodnu derivatizaciju s tiobarbiturnom kiselinom (TBA, engl. *thiobarbituric acid*) poznate kao TBARS test (engl. *thiobarbituric acid-reactive substances*). Robusnost metode i ekonomski prihvatljivi mali troškovi čine tu metodu najčešćim izborom kvantificiranja lipidne peroksidacije. Nedostatak TBARS testa je manjak analitičke specifičnosti zbog reakcije TBA s ostalim reaktivnim spojevima koji sadrže karbonilne skupine. Alternativno, korištenje kromatografskih metoda omogućuje značajno veću osjetljivost i specifičnost mjerenja MDA. Način skladištenja uzoraka također je važan preduvjet točnog određivanja MDA, posebno kada se radi o dugotrajnoj pohrani uzoraka koja zahtijeva pohranu na temperaturi od -80°C. Dodatno se prilikom skladištenja uzoraka mogu dodati konzervansi u svrhu sprečavanja oksidacije *in vitro*. Deoksigenacija uzorka u plinu argonu smatra se najučinkovitijom metodom inhibicije oksidacije *in vitro*. Alternativno se u uzorke mogu dodati antioksidansi poput butiliranog hidroksitoluena (BHT) (61).

1.6.3 Izoprostani

F2 izoprostani predstavljaju još jednu toksičnu skupinu spojeva koji se sintetiziraju djelovanjem ROS-a neenzimskim reakcijama iz PUFA-e, najčešće arahidonske kiseline. Smatraju se autentičnim biljezima peroksidacije fosfolipida u pouzdanoj procjeni statusa redoks homeostaze.

Napadom ROS-a dolazi do izdvajanja nestabilnog bis-alilnog vodika i nastajanja pentadienilnog radikala koji u reakciji s kisikom stvara peroksilni radikal. U reakcijama ciklizacije, iz peroksil radikala, uz vezanje još jednog kisika, nastaju nestabilni međuproducti, biciklički endoperoksidi. Međuproducti se u konačnici reduciraju prisustvom glutaciona u F2 izoprostane ili preuređuju u E2- i D2-regioizomere prostaglandina. Izoprostani strukturno su vrlo slični prostaglandinima. Postoje četiri (5-, 8-, 12- i 15-) skupine regioizomera F2 izoprostana, ovisno o ugljikovom atomu na kojem je vezana hidroksilna skupina. Svaki od njih se sastoji od 8 racemičnih diastereoizomera. Regioizomeri iz serije 5- i 15- nalaze se u nešto većim koncentracijama u organizmu od ostalih jer predstavljaju krajnje produkte oksidacije PUFA-e. Izoprostani se formiraju *in situ* u esterificiranom obliku na mjestu membranskih fosfolipida. Djelovanjem enzima fosfolipaze A2 i acetilhidrolaze čimbenika aktivacije trombocita može doći do oslobađanja izoprostana koji su onda u slobodnom kiselom obliku prisutni u stanici (79). Dugo se smatralo kako su F2 izoprostani isključivo produkt spontane oksidacije PUFA zbog djelovanja ROS-a, međutim nekoliko istraživanja utvrdilo je mogućnost nastajanja izoprostana mehanizmima neovisnim o ROS-a (61). Metabolizam slobodnih F2 izoprostana uključuje β -oksidaciju hidroksilne skupine, nakon koje slijedi redukcija dvostruke veze. Glavni metaboliti se potom izlučuju mokraćom. Najistraživaniji izomer je 15-F_{2t}-izoprostan (15-F_{2t}-IsoP), a u literaturi ga se često nalazi pod sinonimom 8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α ili iPF_{2 α} -III) (79).

Izoprostani se mogu detektirati u raznim tkivima i tjelesnim tekućinama poput plazme, mokraće, bronhoalveolarnog lavata i u slini (80). Samo par istraživanja pokušalo je kvantificirati F2 izoprostane u folikularnoj tekućini. Određivanjem profila prostaglandina u FT-i ispitanica s različitim etiologijom neplodnosti, izmjerena je prosječna koncentracija izomera 15-F_{2t}-IsoP oko 50 pg/mL bez značajnih razlika između skupina (75, 81). Suprotno tome, kod ispitanica s PCOS-om određene su značajno veće koncentracije 15-F_{2t}-IsoP nego kod ispitanica s tubarnom neplodnošću (82). Međutim, niti jedno istraživanje nije uspjelo pronaći povezanost 15-F_{2t}-IsoP s ishodom MPO postupka (75, 82–84). Zaključno prema dosadašnjim istraživanjima, postoje indikacije o prisutnosti izraženijeg puta lipidne peroksidacije unutar miljea jajne stanice.

Točna kvantifikacija F2 izoprostana zahtijeva pravilnu pohranu uzoraka kako bi se izbjegla oksidacija lipida *in vitro* koja nužno mora uključivati pohranu na -80°C. Analitičke tehnike određivanja uključuju kromatografske i imunokemijske metode. Stoga, izmjerena koncentracija F2 izoprostana ovisi o odabranom analitičkom pristupu što treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata (85, 86). Kromatografska analiza, kojoj prethodi priprema uzoraka omogućuje detekciju i kvantifikaciju mnogobrojnih izomera F2 izoprostana. Metoda omogućuje visoku osjetljivost i specifičnost istovremenog prepoznavanja pojedinih vrsta prostanglandina i F2 izoprostana. S druge strane, imunokemijske metode su manje specifične s mogućnošću određivanja pojedinačnog izomera. Odlikuju se robusnošću i manjim financijskim troškovima u izvedbi. Valja naglasiti kako se ovisno o metodi mogu odrediti ukupni izoprostani; esterificirani i slobodni F2 izoprostani. Esterificirani F2 izoprostani pokazatelj su mjesta dugotrajne izloženosti lipida prooksidansima, dok slobodni F2 izoprostani mogu biti porijeklom iz cirkulacije ili su stvoreni *in situ*.

1.6.4 Antioksidacijski mehanizmi

Ljudski organizam posjeduje široku paletu zaštitnih antioksidacijskih mehanizama koji smanjuju rizik od nastanka oksidacijskih oštećenja tijekom stvaranja ROS-a ili RNS-a. Antioksidansi su heterogena skupina spojeva koji primarno reagiraju s prooksidansima kako bi spriječili oksidaciju makromolekula poput DNA, proteina i lipida. Slijedom toga, postoje antioksidacijski sustavi koji štite jajnu stanicu od oksidacijskog oštećenja tijekom folikulogeneze. Dijelimo ih na enzimске (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-reduktaza i glutation-peroksidaza) i neenzimске antioksidanse. Neenzimski antioksidansi mogu biti endogenog porijekla (glutacion i melatonin) i egzogenog porijekla (vitamin C, vitamin E, β-karoten, selen, cink i sl.) (87)

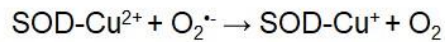
1.6.5 Superoksid-dismutaza

Evolucijski gledano, superoksid-dismutaza (SOD) je endogeni enzimski antioksidans koji nespecifičnim djelovanjem predstavlja prvu liniju obrane u neutralizaciji ROS-a. Svrstava se u skupinu redoks aktivnih metaloenzima, koji katalizira jednu od najbržih enzimskih reakcija u ljudskom organizmu s brzinom pretvorbe $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ i na taj način održavaju vrlo niske koncentracije superoksidnog aniona.

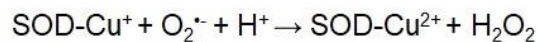
Enzimska reakcija SOD-a se temelji na reakciji metala u aktivnom centru enzima sa superoksidnim anionom. Disproporciranje superoksidnog aniona se provodi u dva koraka ping-pong mehanizmom do kisika u prvom koraku i do vodikovog peroksida u drugom koraku (Slika 3). U prvoj reakciji se vezanjem superoksidnog aniona reduciraju ioni metala u enzimu

SOD-a pri čemu se otpušta molekularni kisik. U drugoj reakciji se veže novi superoksidni anion pri čemu se ion metala u enzimu oksidira, a superoksidni anion se reducira u vodikov peroksid. Shematski primjer reakcije disproporcioniranja superoksidnog aniona djelovanjem superoksid-dismutaze s metalnim ionom bakra u aktivnom centru prikazan je na slici 3.

1. reakcija:



2. reakcija:



Slika 3. Primjer reakcije disproporcioniranja superoksidnog aniona djelovanjem superoksid-dismutaze koja sadrži metalni ion bakra u aktivnom centru. Prva reakcija prikazuje redukciju iona bakra i oksidaciju superoksidnog aniona, a druga reakcija oksidaciju iona bakra i redukciju superoksidnog aniona.

Nastali vodikov peroksid također je reaktivan i ima svojstva oksidansa te se daljnjom enzimskom pregradnjom uz enzim katalazu vrlo brzo razgrađuje na vodu i kisik, štiteći na taj način stanicu od oštećenja. Iz toga možemo zaključiti da izolirano djelovanje SOD-a bez katalaze može imati prooksidacijski učinak. Ukoliko reducirani oblik SOD-a reagira s nastalim vodikovim peroksidom, dolazi do njegove redukcije pri čemu nastaje visokoreaktivni hidroksilni radikal koji potom reagira s aminokiselinskim ostacima u blizini uzrokujući ireverzibilnu inhibiciju enzima. Postoje tri izoforme ovog metaloenzima u ljudskom organizmu, a dijelimo ih prema vrsti kofaktora (metalnog iona) i prema smještaju u stanici. U citosolu (SOD1) i izvanstaničnom prostoru (SOD3) nalaze se izoforme koje u svom aktivnom centru sadrže bakar i cink (Cu/Zn-SOD) dok mitohondrijalna izoforma (SOD2) u aktivnom centru ima mangan (Mn-SOD). Njihova aktivnost temelji se na zalihama navedenih metalnih iona u stanici. Folikularna tekućina predstavlja izvanstanični prostor u kojem se nalazi izoforma SOD3, Cu/Zn-SOD (88).

Prema istraživanjima, aktivnost enzima u patofiziološkim stanjima poput endometrioze i PCOS-a smanjena je ili bez promjene u odnosu na kontrolne skupine (54, 65, 66, 68, 69, 72, 89–91). Razlog heterogenosti u zapažanjima između studija možda leži u slaboj kategorizaciji ispitanica obzirom na različite fenotipove PCOS-a i stadije endometrioze. Rezultati istraživanja ustanovili su negativan trend aktivnosti enzima s porastom biološke dobi što također treba uzeti u obzir tijekom analize podataka (92, 93)

1.6.6 Vitamin E

Otkriće vitamina E temelji se na istraživanju iz 1922. godine u kojem su Bishop H. i Evans K. uočili povezanost smanjene plodnosti štakora s nedostatkom do tada nepoznatog sastojka iz hrane (94). Iz te spoznaje proizašla su brojna istraživanja usmjerena na ispitivanje oksidacije lipida u mikrookolišu jajne stanice koja vrlo često uključuju i određivanje njihovog protektivnog čimbenika. Vitamin E neenzimski je esencijalni mikronutrijent koji štiti nezasićene masne kiseline u membranama i lipoproteinima od nekontrolirane lipidne peroksidacije. Prisutan je u svim tkivima pa tako i u folikularnoj tekućini. Antioksidacijsko djelovanje vitamina E uvjetovano je brojem i položajem metilnih skupina na aromatskom prstenu. Postoji osam izomera vitamina E, a najzastupljeniji i biološki najaktivniji je izomer α -tokoferol koji sadrži tri metilne skupine. α -tokoferol veže radikale četiri puta brže od njihove spontane reakcije s nezasićenim vezama masnih kiselina. Nastali α -tokoferoksil radikal (Slika 2) može dalje reagirati s drugim peroksil radikalima stvarajući slabo reaktivne adukte ili se može ponovno uz vitamin C ili retinol reducirati u α -tokoferol (95).

Vitamin E egzogeni je antioksidans, stoga na njegovu koncentraciju utječe način prehrane i uzimanje vitaminskih pripravaka. Općenito, kod ispitanica s ostvarenom trudnoćom zabilježene su veće koncentracije vitamina E (96, 97). Pozitivan učinak s većim brojem zrelih jajnih stanica (MII) primijećen je kod ispitanica s PCOS-om koje su uzimale vitaminske pripravke koje sadrže vitamin E (91).

2. HIPOTEZA

Razina oksidacijskog stresa u folikularnoj tekućini ispitanica s idiopatskom neplodnosti veća je tijekom stimulacije ovulacije u usporedbi s modificiranim prirodnim ciklusom u postupcima izvantjelesne oplodnje te je povezana s manjom kvalitetom jajne stanice i zametka te s manjom stopom trudnoće.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJ:

Utvrđiti mijenja li stimulacija ovulacije parametre oksidacijskog stresa i mogućnost trudnoće u postupcima medicinski pomognute oplodnje.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Utvrđiti postoje li razlike u koncentraciji F2 izoprostana, malondialdehida, vitamina E te aktivnosti superoksid-dismutaze s obzirom na opće karakteristike ispitivane populacije: dob, vrijednosti indeksa tjelesne mase i pušenje cigareta.
2. Utvrđiti pokazuju li koncentracije F2 izoprostana, malondialdehida, vitamina E i aktivnost superoksid-dismutaze u folikularnoj tekućini stanje oksidacijskog stresa tijekom hormonske stimulacije jajnika u odnosu na modificirani prirodni ciklus.
3. Ispitati postoje li razlike u koncentraciji F2 izoprostana, malondialdehida, vitamina E te aktivnosti superoksid-dismutaze s obzirom na sljedeće kliničke i embriološke parametre:
 - a) stupanj zrelosti jajne stanice i kvalitetu zametka
 - b) potvrdu trudnoće u 12. tjednu gestacije.
4. Odrediti može li koncentracija F2 izoprostana biti prediktor ishoda postupka medicinski pomognute oplodnje.

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Ispitanice

Istraživanje je uključivalo ispitanice koje se liječe zbog idiopatske neplodnosti medicinski pomognutom oplodnjom na Zavodu za humanu reprodukciju i ginekološku endokrinologiju, Klinike za ženske bolesti i porodništvo, Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ i Zavodu za humanu reprodukciju, Klinike za ženske bolesti i porode, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 60 ispitanica prosječne dobi 36 godina, koje su podijeljene u dvije skupine: 30 ispitanica koje su u MPO postupku u prirodnom modificiranom ciklusu i 30 ispitanica koje su podvrgnute ovarijskoj stimulaciji. Na temelju podataka ranije objavljenog istraživanja, potrebno je najmanje 28 ispitanica kako bi se postigla snaga testa od 80 % za detektiranje razlike u aritmetičkim sredinama uz 5 % razinu značajnosti (97).

Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom. Ispitanice su bile upoznate s ciljevima istraživanja i zdravstvenim rizicima te su svoj pristanak potvrdile potpisivanjem informiranog pristanka. Također su obaviještene o tajnosti osobnih podataka sukladno Općoj uredbi o zaštiti podataka. Svi uzorci su šifrirani, a osobni podaci poznati isključivo voditeljima studije te nigdje nisu objavljeni niti će se moći povezati s korištenim uzorcima. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice (broj odobrenja EP-19438/19-16 od 5. prosinca 2019.) i Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb (broj odobrenja 02/21 AG od 25. studenog 2019.).

Dijagnoza idiopatske neplodnosti utvrđena je nakon provođenja standardnih postupaka za obradu neplodnosti od strane liječnika specijaliste ginekologije i opstetricije te kliničkog embriologa. Rutinska obrada uključivala je uzimanje anamnestičkih podataka uključujući ginekološku anamnezu (trajanje neplodnosti, trajanje menstruacijskog ciklusa, paritet), uzimanje lijekova te životne navike poput pušenja. Uzimanje acetilsalicilne kiseline i suplementa koji sadrže vitamin E smatralo se isključnim kriterijem u regrutiranju ispitanica zbog utjecaja lijeka na metabolički put prostanglandina, a time i na stvaranje F2 izoprostana. Postupak obrade također je uključivao ginekološki i ultrazvučni pregled te transfuziološku i mikrobiološku obradu žena. Tijekom endokrinološke obrade bilježili su se sljedeći parametri: hormon koji stimulira folikule (FSH), luteinizirajući hormon (LH) i estradiol 3. do 5. dan menstruacijskog ciklusa te stimulirajući hormon štitnjače (TSH) i anti-Müllerov hormon (AMH).

Odgovor na stimulaciju jajnika pratio se određivanjem koncentracije estradiola ili ultrazvučnim pregledom jajnika do 17 ili 18 mm, nakon čega se primijenio hCG u dozi od 10000 IJ. Aspiracija jajne stanice provodila se 34 do 36 sati nakon primjene hCG-a.

Aspiracijom jajne stanice odvojena je folikularna tekućina (FT) za pohranu. Klasičnom izvantjelesnom oplodnjom (IVF, engl. *in-vitro fertilization*) ili intracitoplazmatskim injektiranjem spermija (ICSI, engl. *intracytoplasmic sperm injection*) određivao se ishod postupka kroz sljedeće parametre:

- uspješnom fertilizacijom
- procjenom zrelosti jajne stanice
- procjenom kvalitete embrija na dan transfera
- ultrazvučno potvrđenom trudnoćom u 12. tjednu gestacije.

4.3 Embriološka obrada

Postupak aspiracije jajne stanice učinjen je pod kontrolom ultrazvuka, transvaginalno s ultrazvučnom sondom, sondom za aspiraciju i iglom za punkciju folikula. Folikularna tekućina izvučena je kroz šuplju iglu za punkciju pomoću aspiracijske pumpe u epruvetu nakon čega je prebačena u sterilnu Petrijevu posudicu na grijanoj radnoj površini.

Oocite su izolirane finim pokretima pod lupom i premještene u Petrijeve posudice s medijem za inkubaciju oocita (Universal IVF, CooperSurgical, Danska). Dva sata nakon izolacije oocita iz folikularne tekućine uslijedilo je kratko ispiranje u mediju koji sadrži hijaluronidazu (ICSI Cumulase, CooperSurgical, Danska). Oocite su provlačene striper pipetom s najmanjim nastavkom u više pokušaja kako bi se ogolile (denudirale) od ostatka granulosa stanica. Denudirane oocite premještene su u zaseban medij (Origio Sequential FERT, CooperSurgical, Danska). Petrijeve posudice s oocitama obilježene su prezimenom i imenom ispitanice te jedinstvenim identifikacijskim brojem para. Pod stereomikroskopom (Olympus SX9) pridržavajućom pipetom analizirane su denudirane oocite, pri čemu je prema morfološkim obilježjima određen stadij zrelosti oocite. Na temelju morfoloških karakteristika oocite su podijeljene u kategorije prema kriterijima prikazanim u tablici 3. Uzorci u kojima nije izolirana oocita isključeni su iz istraživanja.

Analiza ejakulata uključivala je procjenu pokretljivosti, građe i koncentraciju spermija prema trenutačno važećim preporukama i smjernicama (11). Prikupljanje i obrada sjemene tekućine provedena je neposredno prije IVF-a ili ICSI-a, metodom diskontinuiranog gradijenta gustoće (SupraSperm, Origio). Gradijent gustoće pripremio se nanošenjem redom 80-postotne i 40-postotne otopine, nakon čega je stavljen uzorak ejakulata. Primjenom koloidne otopine kroz gradijent gustoće razdvajaju se pokretni spermiji od staničnih

elemenata i ostatka sjemene tekućine. Nakon centrifugiranja odbacuje se supernatant, a talog se resuspendirao u 0,5 mL inseminacijskog medija i koristio za oplodnju.

Tablica 3. Procjena oocite prema morfološkim obilježjima

Kategorija	Morfološki izgled oocite
0	Stanice u atreziji ili nezrele stanice (bez prvog PB, bez GV, vidljiva GV, prisutnost diskova ER, razgrađena tamna citoplazma ili citoplazma s vakuolama.
1	Oocita u metafazi II, vidljivo prvo PB prikladne veličine u PVS.

GV - germinativni vezikul, PB - polarno tijelo engl. *polar body*, PVS - perivitelini prostor, ER - endoplazmatski retikulum. Kategorija 0 - nezrele stanice, manje kvalitete; Kategorija 1 - zrele stanice u metafazi II.

4.3.1 Oplodnja in vitro fertilizacijom i oplodnja intracitoplazmatskom spermialnom injekcijom

Unutar tri sata nakon izolacije, oocite iz folikularne tekućine premještene su u kapi medija (Origio Sequential FERT, CooperSurgical, Danska) nadslojenih parafinskim uljem. U jednoj kapi nalazi se jedna oocita te se dodaje oko 5000-10000 dobro pokretnih spermija dobivenih nakon obrade sjemena. Pomoću striper pipete pod lupom potrebno je ukloniti višak spermija te ih premjestiti u svjež i čisti medij za kulturu embrija.

ICSI metoda provodila se u ispitanica s prethodno neuspjelim oplodnjama klasičnom IVF metodom. Oplodnja oocite ostvarena je unošenjem spermija mikropipetom u citoplazmu oocite pomoću mikromanipulatora pod invertnim mikroskopom (Olympus IX71). Na jedan dio iste posude u određene medije nanesen je uzorak pročišćenog sjemena, a u drugi dio posude denudirane oocite. Imobilizacija spermija učinjena je uz pomoć ICSI pipete. Spermiji su injicirani u citoplazmu oocita, koje se nalaze u metafazi II (MII) ili metafazi I (MI), koje su sazrijevanjem *in vitro* prešle u MII. Nakon ICSI postupka oocite su premještene, u dan prije pripremljene i inkubirane medije, gdje su stavljene na daljnju inkubaciju.

4.3.2 Provjera oplodnje

Prvi dan nakon oplodnje provjeravana je uspješnost fertilizacije. Oocita s dva polarna tjelešca i dva centralno smještena pronukleusa odvojenih membranom smatrala se uspješno fertiliziranom oocitom.

4.3.3 Provjera kvalitete zametka

Drugi do treći dan nakon oplodnje bilježila se jednakost i veličina blastomera te stupanj fragmentacije citoplazme. Prema morfološkim karakteristikama embriji su podijeljeni u kategorije kako bi se ispitala povezanost kvalitete zametka s biokemijskim biljezima (Tablica 4)

Tablica 4. Procjena kvalitete embrija prema morfološkim obilježjima drugi do treći dan nakon oplodnje

Kategorija	Kriteriji za ocjenu embrija
0	Više od 25 % prisutna fragmentacija citoplazme, neodgovarajući broj i veličina blastomera, prisutna multinukleacija.
1	Do 25 % prisutna fragmentacija citoplazme, 4 blastomere na 2. dan odnosno 7 do 8 blastomera na 3. dan, bez multinukleacije.

Kategorija 0 - embrij manje kvalitete odnosno suboptimalno ocijenjen embrij;
kategorija 1 - embrij optimalne kvalitete

Stupanj razvoja blastociste ocijenjen je peti do šesti dan nakon oplodnje. Na temelju morfoloških karakteristika blastociste dodijeljene su kategorije kako bi se ispitala povezanost kvalitete zametka s biokemijskim biljezima (Tablica 5).

Tablica 5. Procjena kvalitete embrija prema morfološkim obilježjima peti do šesti dan nakon oplodnje

Kategorija	Stupanj razvoja blastociste
0	Nevijabilni zametak, loša ili rana blastocista
1	Razvijena i ekspanzirana blastocista i blastocista u izlijevanju

Kategorija 0 - embrij manje kvalitete odnosno suboptimalno ocijenjen embrij;
kategorija 1 - embrij optimalne kvalitete

4.3.4 Potvrda trudnoće

Ultrazvukom potvrđena trudnoća s vijabilnim plodom i pozitivnim otkucajima srca u 12. tjednu gestacije smatrala se pozitivnim ishodom MPO postupka.

4.4 Obrada folikularne tekućine

U istraživanju su sakupljeni uzorci suvišne folikularne tekućine dobivene tijekom aspiracije jajne stanice prosječnog volumena 2,0 mL. U stimuliranom ciklusu prikupljeni su uzorci folikularne tekućine najvećeg folikula. Folikularna tekućina predstavlja suvišni dio koji nastaje tijekom punkcije folikula te se odbacuje u postupku izolacije jajne stanice. Prikupljanje folikularne tekućine nije imalo utjecaja na postupak liječenja. Radi odvajanja od staničnih elemenata, uzorci su bili zaštićeni od svjetla te centrifugirani na 1900 g, 10 minuta. Uzorci s vidljivom hemolizom isključeni su iz istraživanja. Neposredno nakon centrifugiranja, odvojeni supernatant pohranio se u mikroeprovete u 4 alikvota. Kako bi se inhibirala oksidacija *in vitro*, u dva alikvota volumena 500 μ L dodan je konzervans, 0,005 % BHT volumena 10 μ L. Alikvoti su bili pohranjeni na -80°C do analize. Koncentracije 15-F_{2t}-izoprostana i malondialdehida (MDA) određivane su iz alikvota s konzervansom, a koncentracije vitamina E, ukupnih proteina te aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) analizirane su iz alikvota bez konzervansa.

Materijali

Za biokemijske analize korišteni su materijali prikazani u tablici (Tablica 6).

Tablica 6. Popis reagensa i kemikalija korištenih za provođenje analitičkih metoda

Kemikalije

- Etil-acetat (Merck, Njemačka)
- Heksan (Merck, Njemačka)
- Kloridna kiselina, min. 36,5 %-tna (Kemika, Hrvatska)
- Metanol (Merck, Njemačka)
- Sumporna kiselina, 96 %-tna, T. T. T., Hrvatska
- 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol, BHT (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Komercijalni reagensi i kompleti („kitovi“)

- 15-Isoprostane F_{2t} ELISA kit (Oxford Biomedical Research, SAD)
- Oasis HLB 10 mg kit sačinjen od 30 µm SPE kolona, (Waters corporation, SAD)
- Malondialdehyde in plasma/serum (Chromsystems instruments & chemicals GmbH, Njemačka)
- Malondialdehyde plasma calibration standard (Chromsystems instruments & chemicals GmbH, Njemačka)
- Malondialdehyde plasma control level I (Chromsystems instruments & chemicals GmbH, Njemačka)
- Vitamins A and E serum calibration standard (Chromsystems instruments & chemicals GmbH, Njemačka)
- Vitamins A and E serum controls (Chromsystems instruments & chemicals GmbH, Njemačka)
- α-tokoferol acetat (Merck, Njemačka)
- Superoxide dismutase assay kit (Cayman chemical company, SAD)
- Alinity total protein 2 reagent kit (Abbott, SAD)

4.4.1 Metode određivanja biljega oksidacijskog stresa u folikularnoj tekućini

4.4.1.1 Određivanje koncentracije 15-F_{2t}-izoprostana ELISA metodom

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) metoda zahtjeva prethodnu ekstrakciju iz uzorka folikularne tekućine korištenjem kolona *Oasis HLB* kit. Postupak ekstrakcije izoprostana iz uzorka provodi se zbog visoke koncentracije proteina i drugih tvari koje interferiraju u imunokemijskim metodama. Nakon odvajanja analita od matriksa folikularne tekućine dobiva se ukoncentrirani i pročišćeni uzorak za imunokemijsko određivanje koncentracije slobodnih 15-F_{2t}-izoprostana (15-F_{2t}-IsoP) ELISA metodom.

Priprema uzoraka folikularne tekućine ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE, engl. *solid-phase extraction*) temelji se na selektivnom vezanju 15-F_{2t}-IsoP na sorbens koji je smješten u maloj koloni (SPE kolona, Waters Corporation, SAD). Vezani analit potom se ispire od ostalih primjesa s odgovarajućom smjesom otapala.

Ekstrakcija je provedena prema sljedećem protokolu:

- Iz odleđenih alikvota FT-e s BHT konzervansom pripremljeni su volumeni od 100 µL
- Uzorci su potom razrijeđeni deioniziranom vodom do ukupnog volumena od 5 mL i zakiseljeni do pH=3 s 1M kloridnom kiselinom (5 µL)
- Kolone s čvrstom fazom (*Oasis HLB* kit, Waters, Milford, MA, SAD) prethodno su prekondicionirane s 0,5 mL metanola i 0,5 mL 1 mM kloridnom kiselinom
- Stanica za ekstrakciju (Multi-well Plate Vacuum Manifold, Thermo Fischer Scientific) i vakuumska aparatura (Vacuubrand vacuum pump, Merck) postavljene su prema uputama proizvođača s odgovarajućim epruvetama za prikupljanje otpada ispod kolona
- Uzorci su aplicirani na kolone *Oasis HLB* kit-a i pušteni da prođu brzinom protoka od 1 mL u minuti
- Kolone s uzorcima su isprane s 0,5 mL 1mM kloridnom kiselinom i 0,5 mL heksana
- Nakon završenog ispiranja postavljene su epruvete za prikupljanje konačnih uzoraka
- Analit je eluiran s kolone propuštanjem 1 mL otopine etil-acetata koja sadrži 1 % metanola
- Nakon što se kolona u potpunosti osušila, sakupljeni eluat evaporiran je primjenom vakum koncentratora (SpeedVac, Thermo Fischer Scientific). Upareni uzorak pojavljivao se kao uljni ostatak na dnu epruvete koji se za daljnju analizu ELISA metodom rekonstituirao u 100 µL 5x pufera za razrjeđenje (komponenta iz ELISA kita)

Određivanje koncentracije 15-F_{2t}-izoprostana ELISA metodom

Koncentracija slobodnih 15-F_{2t}-IsoP u folikularnoj tekućini određena je korištenjem 15-Isoprostane F_{2t} ELISA kita (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, SAD) prema uputama proizvođača uz upotrebu sustava za ispiranje mikropločica HydroFlex (Tecan Trading AG, Švicarska) i spektrofotometrijskog čitača apsorbancija Infinite F50 (Tecan Trading AG, Švicarska).

Kvantificiranje slobodnih 15-F_{2t}-IsoP nakon ekstrakcije iz uzorka folikularne tekućine temelji se na principu kompetitivne ELISA-e. Mikrotitarska ploča obložena je s poliklonskim antitijelima visoko specifičnima za 15-F_{2t}-IsoP. Prema podacima proizvođača, korištena protutijela pokazuju slabu križnu reaktivnost s 9 α ,11 β -prostaglandin-F_{2 α} (4,1 %) i 13,14-dihidro-15-keto-F_{2 α} (3 %). Kompetitivna ELISA temelji se kompeticiji antigena 15-F_{2t}-IsoP iz uzorka s 15-F_{2t}-IsoP iz kita konjugiranim enzimom peroksidaze hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) za vezna mjesta na poliklonskim antitijelima na mikrotitarskoj ploči. Dodatkom substrata za HRP enzim, reakcija rezultira promjenom boje u uzorku. Intenzitet absorbancije je obrnuto proporcionalan koncentraciji 15-F_{2t}-IsoP u uzorku. Reakcija kompeticije i kvantifikacije 15-F_{2t}-IsoP odvijala se prema slijedećem protokolu:

- Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja standarda 15-F_{2t}-IsoP koji je dio ELISA kita. Originalni standard od 1 μ g/mL korišten je za izradu sedam uzastopnih razrjeđenja, stoga je kalibracijska krivulja sadržavala 7 kalibracijskih točaka u duplikatu (100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 1 ng/mL, 0,1 ng/mL i 0,05 ng/mL).
- Na mikrotitarsku ploču obloženu poliklonskim antitijelima dodano je 100 μ L standarda u 7 koncentracijskih razina i pripremljenih uzoraka prema prethodno opisanom protokolu.
- Nakon dodavanja konjugata HRP-15-F_{2t}-IsoP uslijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi u kojoj su se metodom kompeticije 15-F_{2t}-IsoP iz uzorka i konjugat HRP-15-F_{2t}-IsoP vezali za poliklonska antitijela na mikrotitarskoj ploči.
- Postupak ispiranja nevezanog dijela uslijedio je 2 sata nakon inkubacije (ispirać HydroFlex, Tecan Trading).
- U isprane ploče dodano je 200 μ L supstrata za HRP enzim 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Intenzitet plavog obojenja u jažicama ovisio je o količini vezanog HRP-15-F_{2t}-IsoP konjugata.

- Reakcija između TMB supstrata i HRP enzima je zaustavljena dodatkom sumporne kiseline. Zakiseljavanje je rezultiralo promjenom boje reakcijske smjese iz plave u žutu boju.
- Intenzitet obojenja izmjeren je na 450 nm uz diferencijalni filter od 650 nm (čitač Infinite F50, Tecan Trading).
- Kalibracijska krivulja izrađena je nanošenjem koncentracije kalibratora na apscisu i srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora (podijeljenih s apsorbancijom nultog kalibratora koji sadrži pufer za razrjeđivanje) na ordinatu grafa. Koncentracija 15-F_{2t}-IsoP (ng/mL) u uzorku izračunata je iz očitanih apsorbancija prema kalibracijskoj krivulji. Krajnji rezultat izražen je kao koncentracija 15-F_{2t}-IsoP u jedinicama ng/mL. Intenzitet apsorbancije je obrnuto proporcionalan koncentraciji 15-F_{2t}-IsoP u uzorku folikularne tekućine.

4.4.1.2 Određivanje koncentracije malondialdehida metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti, UPLC

Određivanje koncentracije malondialdehida se temelji na prethodnoj pripremi uzoraka, kromatografskom razdvajanju, detekciji i kvantifikaciji analita na UPLC (engl. *ultra-performance liquid chromatography*) uređaju (Shimadzu Prominence, Shimadzu Europa GmbH, Kyoto, Japan).

Priprema uzoraka folikularne tekućine

Priprema uzoraka se temeljila na precipitaciji proteina iz uzoraka koji mogu interferirati pri određivanju analita. Nakon toga provedena je derivatizacija malondialdehida s fluoroformom čime je omogućena detekcija analita s fluorescentnim detektorom. Priprema uzoraka izvedena je korištenjem komercijalnog kita (Malondialdehyde in plasma/serum, Chromsystems) prema sljedećem protokolu:

- Pripremljeno je 100 µl uzoraka folikularne tekućine s konzervansom butiliranim hidrositoluenom, kalibratora i kontrole (sastavni dio kita) u smeđim mikroepruvetama, zaštićeno od svjetla kako bi se spriječilo nastajanje MDA *in vitro*.
- Uzorcima je dodano 500 µl reagensa za precipitaciju nakon čega su 10 sekundi uzorci snažno miješani na vibracijskoj mješalici (vortex)
- Uzorci su centrifugirani 5 min na 16000 g
- Nakon centrifugiranja supernatant (500 µL) je prebačen u tamne staklene bočice (engl. *amber colour reaction vials*), te je dodano 100 µl reagensa za derivatizaciju (sastavni dio kita).

- Uzorci u zatvorenim bočicama kratko su promiješani i inkubirani u vodenoj kupelji 60 minuta na 95°C
- Nakon inkubacije uzorci su naglo ohlađeni kako bi se zaustavila reakcija derivatizacije nakon čega je u uzorke dodano 500 µL pufera za neutralizaciju (sastavni dio kita).

Kromatografsko razdvajanje i kvantifikacija na UPLC uređaju

Neposredno prije analize uzorci su kratko promiješani. Malondialdehid određivan je metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UPLC, engl. *ultra-performance liquid chromatography*) na instrumentu UPLC-NEXERA LC-30AD (Shimadzu GmbH, Kyoto, Japan) s fluorescentnim detektorom (RF-20A xs, Shimadzu GmbH, Kyoto, Japan). Za kromatografsko razdvajanje MDA koristio se komercijalni kit Malondialdehyde in Plasma/Serum (Chromsystems) prema uputama proizvođača. Prije propuštanja uzoraka folikularne tekućine i kontrolnog uzorka (Plasma Control Level I, Chromsystems), kolona (sastavni dio kita) se, postavljena na sobnu temperaturu (25°C), prethodno kondicionirala s 20 mL mobilne faze i kalibrirala sa standardom (Plasma calibration standard, Chromsystems). Kalibracija je provedena u jednoj točki s prethodno otopljenim standardom u 0,5 mL destilirane vode konačne koncentracije 27 ng/mL. Na kromatogramu se površini ispod pika pridružila deklarirana koncentracija standarda. Volumen injektiranog uzorka bio je 20 µL. Protok mobilne faze je bio postavljen na 1 mL/min s prosječnim zadržavanjem uzorka oko 2,8 minuta. Ukupno vrijeme analize po jednom uzorku je prosječno trajalo 4 minute.

Nakon izlaska s kolone, MDA je u uzorku detektiran na kromatogramu fluorescentnim detektorom valne duljine za ekscitaciju na $\lambda_{ex}=515$ nm i $\lambda_{em}=553$ za emisiju usporedbom retencijskog vremena pika ispitivanog uzorka s retencijskim vremenom standarda prethodno dobivenog kalibracijom u jednoj točki. Koncentracija analita izračunavala se na temelju usporedbe površine ispod pika MDA u uzorku s površinom standarda (Plasma calibration standard, Chromsystems). Kromatogrami su inicijalno obrađeni automatskom metodom integriranja pomoću programa LabSolutions version 5.42 SP5 (Shimadzu GmbH, Kyoto, Japan), nakon čega je svaki kromatogram ručno ispravljen kako bi svi uzorci bili jednako integrirani. Krajnji rezultat izražen je kao koncentracija malondialdehida u jedinicama ng/mL.

4.4.1.3 Određivanje koncentracije vitamina E metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, HPLC

Određivanje koncentracije vitamina E se temelji na prethodnoj pripremi uzoraka, kromatografskom razdvajanju, detekciji i kvantifikaciji analita vitamina E (α -tokoferola) na HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) uređaju (Shimadzu Prominence, Shimadzu Europa GmbH, Kyoto, Japan).

Priprema uzoraka folikularne tekućine

- U 250 μ L uzorka folikularne tekućine i kontrole Vitamins A and E serum controls E (Chromsystems) dodano je 250 μ L etanola i 500 μ L radne otopine internog standarda α -tokoferol acetata (Merck).
- U smjesu je nakon kratkog i snažnog miješanja (*vortex*) dodano 2,5 mL heksana
- Uzorci su postavljeni na miješalicu 15 minuta, a zatim centrifugirani 5 minuta na 2000 g.
- Slojevi su razdvojeni centrifugiranjem gdje se iz gornjeg organskog sloja odvojilo 2 mL uzorka u staklenu epruvetu. Odvojeni gornji sloj uparen je do suhog ostatka u vodenoj kupelji na 37°C u zamračenoj prostoriji kako bi se spriječila degradacija vitamina E u organskom otapalu.
- Suhi ostatak otopljen je snažnim miješanjem (*vortex*) u 200 μ L metanola.
- Nakon otapanja, uzorci su prebačeni u mikroeprevete i centrifugirani na 6700 g u 5 minuta.
- Supernatant se potom odvojio od sitnog taloga u staklene epruvete spremne za kromatografsku analizu.

Kromatografsko razdvajanje i kvantifikacija na HPLC uređaju

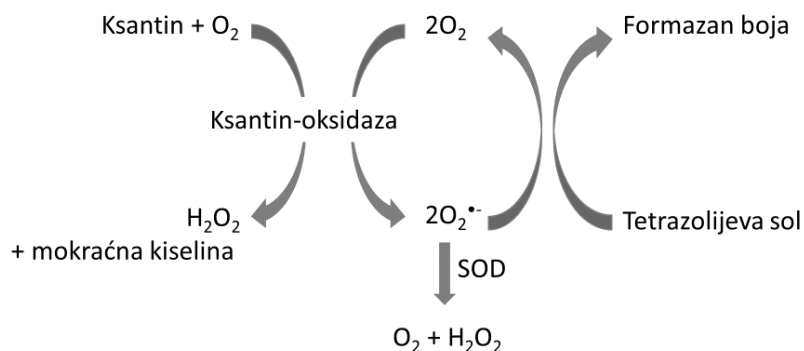
Vitamin E određivan je HPLC metodom s reverznom fazom na instrumentu HPLC-Prominence LC-20AD (Shimadzu GmbH, Kyoto, Japan) s detektorom DAD (engl. *diode array detector*) SPD-M20A (Shimadzu GmbH, Kyoto, Japan). Za kromatografsko razdvajanje vitamina E korištena je kolona, dimenzija 250 x 4,6 mm, punjena česticama veličine 3 μ m (Dr Maisch GmbH, Njemačka), postavljena na temperaturu od 45°C. Volumen injektiranog uzorka bio je 30 μ L. Za mobilnu fazu korišten je metanol s protokom od 1.0 mililitar u minuti tijekom 16 minuta. Sustav je umjeren korištenjem kalibratora Vitamins A and E serum calibration standard (Chromsystems) koncentracije 29,5 μ mol/L.

Nakon izlaska s kolone, vitamin E je detektiran UV detektorom na valnoj duljini $\lambda = 292$ nm usporedbom retencijskog vremena pika ispitivanog uzorka s retencijskim vremenom standarda dobivenog kalibracijom u jednoj točki. Koncentracija vitamina E izračunavala se na

temelju usporedbe površine ispod pika detektiranog vitamina E u uzorku s površinom standarda (Vitamins A and E serum calibration standard, Chromsystems). Kromatogrami su inicijalno obrađeni automatskom metodom integriranja pomoću programa LabSolutions version 5.42 SP5 (Shimadzu GmbH, Kyoto, Japan), nakon čega je svaki kromatogram ručno ispravljen kako bi svi uzorci bili jednako integrirani. Koncentracija analita je na kraju pomnožena s faktorom 2 zbog predilucije uzorka etanolom na početku ekstrakcije. Krajnji rezultat izražen je kao koncentracija vitamina E izražena u jedinicama $\mu\text{mol/L}$.

4.4.1.4 Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze

Katalitička aktivnost SOD u folikularnoj tekućini određena je spektrofotometrijskom metodom na mikrotitarskim pločama korištenjem reagensa Superoxide dismutase assay kit (Cayman chemical company) prema uputama proizvođača. Metoda obuhvaća mjerenje ukupne aktivnosti sva tri izoenzima. Određivanje aktivnosti SOD temelji se na činjenici da se u reakciji disproporcioniranja superoksidnog radikala sam enzim SOD istodobno oksidira i reducira. Princip reakcije je shematski prikazan na slici 5.



Slika 5. Princip određivanja katalitičke aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD). Superoksidni radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) nastaju djelovanjem ksantin-oksidaze na ksantin. Nastali superoksidni anioni reagiraju s kromogenom, tetrazolijevom soli koja se koristi za njihovu detekciju, pri čemu nastaje obojeni produkt (formazan). Istovremeno, aktivnost enzima SOD iz uzorka katalizira reakciju disproporcioniranja superoksidnih radikala zbog čega je inhibirana njihova reakcija s tetrazolijevom soli.

Određivanje katalitičke aktivnosti SOD odvijala se prema sljedećem protokolu:

- Alkvoti folikularne tekućine pripremljeni su u razrijeđenju 1:5 s puferom Sample buffer (sastavni dio kita). Sve otopine su unaprijed pripremljene prema uputama proizvođača.

- Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja SOD standarda (sastavni dio kita) u 7 točaka (0,0 U/mL, 0,005 U/mL, 0,01 U/mL, 0,02 U/mL, 0,03 U/mL, 0,04 U/mL i 0,05 U/mL).
- Na mikrotitarsku ploču dodano je 200 μL kromogena terazolijeve soli (sastavni dio kita), a zatim 10 μL standarda u 7 točaka i 10 μL uzoraka folikularne tekućine.
- Reakcija nastanka superoksidnih aniona pokrenuta je dodatkom 20 μL ksantin-oksidge (sastavni dio kita).
- Nakon inkubacije od 30 minuta očitana je apsorbancija na valnoj duljini $\lambda = 450$ nm na spektrofotometru Infinite F50 (Tecan Trading AG, Švicarska).

Izračun katalitičke aktivnosti:

- Svim apsorbancijama oduzeta je pozadinska apsorbancija (engl. *background*)
- Linearizirani omjer (LR, engl. *linearized ratio*) je dobiven iz omjera apsorbancije nultog standarda (aktivnost enzima 0 U/mL) i svih izmjerenih apsorbancija standarda i uzoraka folikularnih tekućina. Naprimjer, LR za standard A = apsorbancija standarda A/apsorbancija standarda A; LR za standard B (20 U/mL) = apsorbancija standarda A/apsorbancija standarda B, za uzorak 1 = apsorbancija standarda A/apsorbancija uzorka 1 itd.
- Kalibracijski pravac izrađen je nanošenjem aktivnosti (U/mL) na apscisu i lineariziranog omjera standarda na ordinatu grafa.
- Aktivnost enzima superoksid-dismutaze u uzorku FT izračunata je iz formule prema uputama proizvođača (Slika 6). Pri izračunavanju katalitičke aktivnosti SOD iz kalibracijskog pravca uzeta je u obzir predilucija uzorka (1:5).

$$\text{SOD (U/mL)} = \left[\left[\frac{\text{LR-uzorka} - \text{y-odsječak}}{\text{nagib pravca}} \times \frac{0,23 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} \right] \right] \times \text{dilucija uzorka}$$

Slika 6. Prikaz izračuna katalitičke aktivnosti enzima iz očitanih apsorbancija. LR – linearizirani omjer (engl. *linearized ratio*), SOD – superoksid-dismutaza

- U svakom uzorku folikularne tekućine izmjerena je koncentracija ukupnih proteina (mg/mL). Izračunata aktivnost enzima izražena je prema koncentraciji proteina

izmjerenih u uzorcima folikularnih tekućina tako da se aktivnost enzima podijelila s koncentracijom proteina izmjerenima u uzorku prema formuli:

$$\text{aktivnost SOD (U/mL) / koncentracija proteina (mg/mL)}$$

Dobivena je aktivnost enzima SOD u jedinicama U/mL koja je na kraju izražena kao mU/mg proteina.

4.4.1.5 Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina u uzorku određena je fotometrijskom metodom na automatskom analizatoru Alinity c (*Abbott Laboratories*, SAD) prema specifikacijama proizvođača. Prilikom određivanja koristio se biuret reagens Alinity total protein 2 reagent kit koji predstavlja otopinu bakrovog(II) sulfata i natrijevog hidroksida. U alkalnom mediju ioni bakra iz reagensa reagiraju s peptidnim vezama u proteinima, pri čemu nastaje ljubičasto obojeni kompleks. Apsorpcija nastalog kompleksa proporcionalna je koncentraciji proteina u uzorku. Koncentracija proteina u uzorku folikularne tekućine izražena je u jedinicama mg/mL.

4.4.2 Statistička analiza

Dob ispitanica je prikazana medijanom i rasponom (minimum - maksimum). Kvalitativni podaci prikazani su kao broj (N), udio ili postotak. Raspodjela kvantitativnih podataka ispitana je Shapiro-Wilk testom. S obzirom na nenormalnu raspodjelu podataka dobivenu Shapiro-Wilk testom, podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (IQR), u slučaju malog broja ispitanica u skupini (N = 2 ili 3) rezultati su prikazani medijanom i rasponom od najmanje do najveće vrijednosti. Za usporedbu podataka između skupina koristili su se neparametrijski testovi. Statistički značajna razlika nezavisnih mjerenja između dvije skupine procijenjena je Mann-Whitney testom. Statistički značajna razlika između četiri skupine nezavisnih podataka procijenjena je Kruskal-Wallis testom. Fisherov egzaktni test koristio se za ispitivanje razlika između skupina s kategoričkim podacima. Logistička regresijska analiza napravljena je kako bi se otkrili mogući čimbenici koji mogu predvidjeti uspješnu fertilizaciju, kvalitetu embrija i ishod MPO postupka.

Statistička obrada podataka učinjena je programom MedCalc® Statistical Software version 20.218 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023 <https://www.medcalc.org>; 2019). Rezultati su prikazani tablicama i slikama. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1 Opće karakteristike ispitanica s idiopatskom neplodnosti

U Tablici 7. prikazane su opće karakteristike obje skupine ispitanica liječenih od idiopatske neplodnosti u modificiranom prirodnom ciklusu i ciklusu s ovarijskom stimulacijom. Prikazani su parametri za dob, indeks tjelesne mase (BMI, engl. *body mass indeks*), paritet, pušenje cigareta te koncentracije hormona koji stimulira folikule (FSH), luteinizirajućeg hormona (LH), estradiola, prolaktina, stimulirajućeg hormona štitnjače (TSH) i antimüllerskog hormona (AMH) izmjerenih u serumu između trećeg i petog dana menstruacijskog ciklusa tijekom dijagnostičke obrade neplodnosti. Ispitivanje značajne razlike kvantitativnih varijabli provedeno je Mann-Whitney testom, a kategoričkih varijabli Fisherovim egzaktnim testom.

U skupini ispitanica liječenih u modificiranom prirodnim ciklusu potvrđena je značajno niža koncentracija AMH, dok je koncentracija TSH značajno veća. U obje skupine, koncentracije hormona bile su unutar granica referentnog intervala za zdravu populaciju. Vrijednosti ostalih parametara nisu se značajno razlikovale između skupina ispitanica.

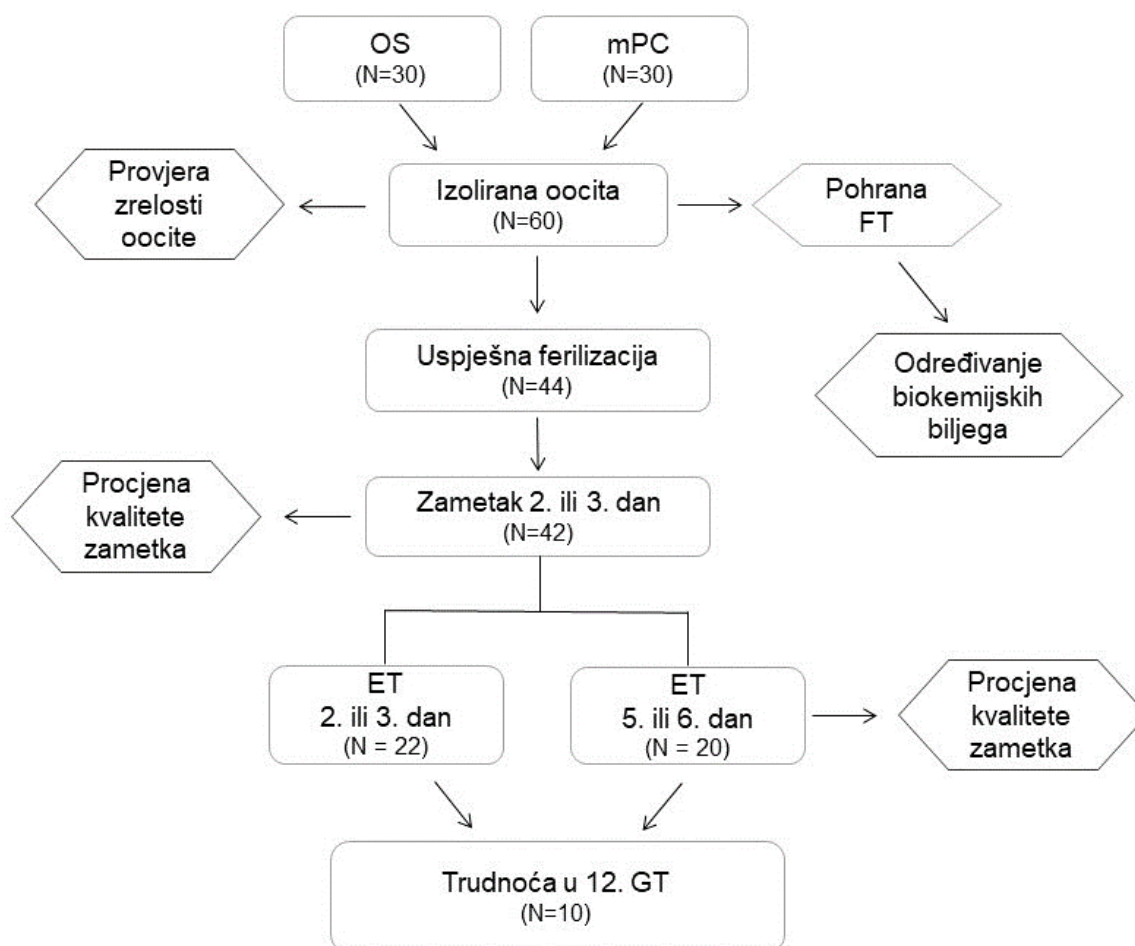
Tablica 7. Opći podaci ispitanica liječenih u modificiranom prirodnom ciklusu i ciklusu s ovarijskom stimulacijom

Parametar	mPC (N = 30)	OS (N = 30)	p[#]
Dob (godine)	38 (28 - 42)	36 (29 - 42)	0,177
BMI (kg/m ²)	22,5 (20,6 - 26,2)	23 (21,2 - 26,0)	0,438
Pušenje cigareta	6/30	1/30	0,103
Paritet	2/30	5/30	0,423
FSH (IU/L)	7,6 (6,4 - 9,4)	6,8 (5,6 - 8,6)	0,104
LH (IU/L)	5,1 (4,8 - 6,5)	7,15 (4,8 - 8,5)	0,107
Estradiol (pmol/L)	220 (162 - 299)	231 (149 - 299)	0,934
AMH (pmol/L)	4,8 (3,5 - 12,4)	16,7 (8,1 - 32,5)	<0,005*
Prolaktin (mIU/L)	397 (283 - 487)	322 (266 - 384)	0,077
TSH (mIU/L)	1,86 (1,59 - 2,48)	1,49 (0,95 - 2,18)	0.020*

Koncentracije hormona i BMI-a prikazane medijanom i interkvartilnim rasponom. Dob ispitanica prikazana je medijanom i rasponom od minimuma do maksimuma, a paritet i pušenje cigareta kao udio. mPC - modificirani prirodni ciklus; OS - ovarijska stimulacija; BMI - indeks tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*); FSH - hormon koji stimulira folikule; LH - luteinizirajući hormon; AMH - antimüllerski hormon; TSH - stimulirajući hormon štitnjače; *statistički značajna razlika između skupina p < 0,05; #Mann Whitney ili Fisherov egzaktni test

5.2 Morfološka procjena jajne stanice i zametka u MPO postupku

Nakon potvrde prisutnosti jajne stanice aspirirane iz vodećeg folikula, uzorak folikularne tekućine obradio se za pohranu. Istovremeno je zabilježena zrelost stanice, a poslije i procjena kvalitete pripadajućeg zametka. Hodogram prikupljanja podataka prikazan je na slici 7.



Slika 7. Hodogram prikupljanja uzoraka folikularne tekućine i podataka embrioloških i kliničkih parametara. OS - stimulacija jajnika; mPC - modificirani prirodni ciklus; GT - gestacijski tjedan; ET - embriotransfer; FT - folikularna tekućina

5.3 Morfološka procjena jajne stanice

Embriološka obrada uključivala je procjenu zrelosti ukupno 60 prikupljenih jajnih stanica. Na temelju morfoloških karakteristika većina stanica, njih 53 (88 %), označena je kao MII, njih 5 (8 %) kao MI i 2 (4 %) kao GV. Nakon procijenjene zrelosti, stanice su svrstane u dvije kategorije; stanice označene statusom MI i GV svrstane su kao nezrele u kategoriju 0, a označene kao MII svrstane su kao zrele u kategoriju 1. Dobivena raspodjela stanica prikazana je u tablici 8. Postupak oplodnje proveden je na 58 jajnih stanica označenih s MII i MI. Od toga ih je 47 stanica bilo u postupku s ICSI metodom, a 11 ih je bilo u klasičnom IVF postupku.

Prvi dan nakon provedenih postupaka izvantjelesne oplodnje (IVF, engl. *in-vitro fertilization*) ili intracitoplazmatskog injektiranja spermija (ICSI, engl. *intracytoplasmic sperm injection*) procijenjena je uspješnost oplodnje. Ukupno je provedeno 44 (76 %) uspješne oplodnje, a kod 14 (24 %) slučajeva stanice nisu uspješno oplodene ili su imale nepravilan broj pronukleusa.

5.4 Morfološka procjena embrija drugi ili treći dan nakon oplodnje

Embriotransfer (ET) se provodio drugi ili treći dan nakon oplodnje kada je ujedno provedena i procjena kvalitete embrija. Alternativno je ET odgođen i proveden peti ili šesti dan od oplodnje kada je procjena kvalitete embrija provedena prema drugim kriterijima. Ukupno su ocijenjena 42 embrija drugi ili treći dan nakon oplodnje. Od toga su 22 (52 %) ET provedena drugi ili treći dan, a 20 (48 %) peti ili šesti dan od oplodnje (Slika 7). Prema morfološkim karakteristikama embriji optimalne kvalitete svrstani su u kategoriju 1, a embriji suboptimalne kvalitete u kategoriju 0. Raspodjela kvalitete embrija ocijenjenih drugog ili trećeg te petog ili šestog dana prikazana je u Tablici 8.

Tablica 8. Raspodjela oocita, ocijenjenih embrija drugi ili treći dan te embrija peti ili šesti dan na temelju morfoloških karakteristika

Kategorija	Oocita N (%)	Embrij 2. ili 3.dan N (%)	Embrij 5. ili 6.dan N (%)
0	7 (12)	15 (36)	3 (15)
1	53 (88)	27 (64)	17 (85)

Podaci su prikazani kao ukupan broj i postotak. Kategorija 0 - oocite i embriji manje kvalitete; kategorija 1 - oocite i embriji optimalne kvalitete

5.5 Određivanje ishoda MPO postupka

Trudnoća potvrđena ultrazvukom u 12. tjednu gestacije smatrala se pozitivnim ishodom MPO postupka. Zaključno, od ukupno 60 ispitanica s uspješno izoliranim jajnim stanicama, provedena su 42 embriotransfera. Na kraju je potvrđeno 10 trudnoća u prvom tromjesečju, dvije iz modificiranog prirodnog ciklusa i osam iz stimuliranog ciklusa.

5.6 Usporedba općih karakteristika ispitanica s biljezima redoks homeostaze određenima u folikularnoj tekućini

Starenje, pretilost i pušenje cigareta najčešće se u literaturi povezuju s poremećajima redoks homeostaze. Prema tome ispitan je utjecaj općih karakteristika u svih 60 ispitanica s razinom biljega oksidacijskog stresa; 15-F_{2t}-izoprostana (15-F_{2t}-IsoP) i malondialdehida (MDA) te biljega antioksidacijskog statusa; vitamina E i superoksid-dismutaze (SOD). Osim biljega redoks homeostaze određena je koncentracija ukupnih proteina kako bi se dalje u rezultatima aktivnost enzima SOD izrazila po miligramu izmjerenih proteina u folikularnoj tekućini (mU/mg). Prosječna koncentracija ukupnih proteina izmjerenih u svih 60 uzoraka folikularne tekućine iznosi 40,0 mg/mL (SD ± 8,9).

5.6.1 Ispitivanje razlika u razinama biljega redoks homeostaze prema dobnim skupinama ispitanica

S obzirom na biološku dob ispitanica, sve ispitanice (N = 60) su podijeljene u četiri dobne skupine (kvartile): ≥28 do ≤33 godina, >33 do ≤37 godina, >37 do ≤40 godina i >40 do ≤42 godina. U folikularnoj tekućini svih ispitanica izmjerene su koncentracije biljega redoks homeostaze, MDA, 15-F_{2t}-IsoP, vitamina E i aktivnosti enzima superoksid-dismutaze. Razine biljega redoks homeostaze uspoređivane su prema dobnim skupinama (kvartilama).

Prema rezultatima (Tablica 9), porastom biološke dobi ispitanica koncentracije MDA i 15-F_{2t}-IsoP značajno se ne mijenjaju. U skupini biljega antioksidacijskog statusa, aktivnost enzima SOD također ima podjednake vrijednosti. Post-hoc testom prema Conoveru utvrđena je statistički značajno niža koncentracija vitamina E kod ispitanica dobne skupine od 37 do 40 godina (4,4 μmol/L) u odnosu na dobne skupine ispitanica od 28 do 33 godina (6,1 μmol/L) i od 40 do 42 (5,6 μmol/L) godine.

Tablica 9. Razine biljega redoks homeostaze u folikularnoj tekućini prema dobnim skupinama

Analit	Dobne skupine (godine)				p [#]
	≥28 do ≤33 (N=15)	>33 do ≤37 (N=15)	>37 do ≤40 (N=15)	>40 do ≤42 (N=15)	
MDA (ng/mL)	7,20 (5,83 - 9,76)	6,48 (5,24 - 8,88)	7,27 (5,12 - 8,14)	6,62 4,75 - 8,73	0,851
15-F_{2t}-IsoP (ng/mL)	1,32 (0,56 - 2,66)	1,48 (0,70 - 1,77)	1,31 (0,84 - 1,73)	1,75 (1,31 - 2,12)	0,453
Vitamin E (μmol/L)	6,1 (5,1 - 7,4)	5,5 (4,3 - 7,1)	4,4* (3,6 - 5,5)	5,6 (4,9 - 8,2)	0,054*
SOD (mU/mg)	1,5 (1,3 - 1,8)	1,4 (1,2 - 1,6)	1,6 (1,2 - 1,7)	1,3 (1,1 - 1,6)	0,702

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza; *statistički značajna razlika između skupina p < 0,05; #Kruskal Wallis test.

5.6.2 Ispitivanje razlika u razinama biljega redoks homeostaze prema indeksu tjelesne mase ispitanica

S obzirom na tjelesnu masu ispitanica, svih 60 ispitanica je prema vrijednostima indeksa tjelesne mase (BMI) podijeljeno u četiri kategorije (kvartile) BMI < 18,5 kg/m², BMI 18,5 - 24,9 kg/m², BMI 25,0 - 29,9 kg/m² i BMI > 30,0 kg/m². U folikularnoj tekućini svih ispitanica izmjerene su koncentracije biljega redoks homeostaze, MDA, 15-F_{2t}-IsoP, vitamina E i aktivnosti enzima superoksid-dismutaze. Razine biljega redoks homeostaze uspoređivane su između BMI kategorija (kvartila) kako je prikazano u Tablici 10.

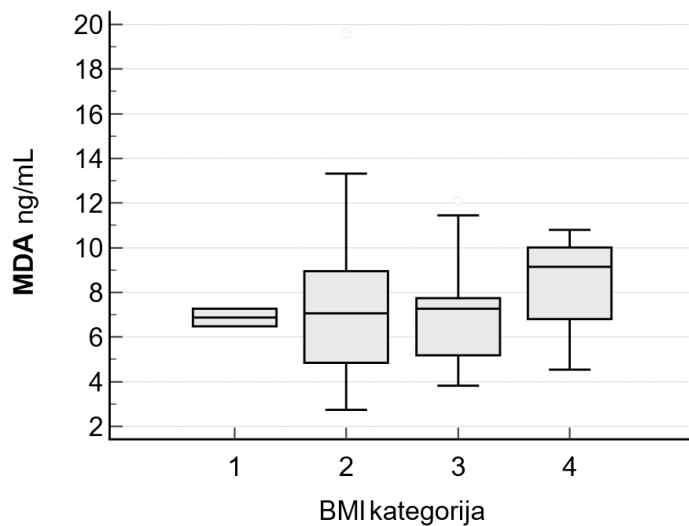
Koncentracije biljega lipidne peroksidacije, 15-F_{2t}-IsoP i MDA nisu pokazale statistički značajne razlike s obzirom na BMI iako je koncentracija MDA u skupini ispitanica s najvećim BMI indeksom zamjetno veća u odnosu na ostale skupine (Slika 8). Nadalje, u skupini ispitanica s najvećom BMI vrijednosti zabilježena je i veća koncentracija vitamina E (7,1 μmol/L), ali razlika nije statistički značajna prema ostalim BMI kategorijama. Vrijednosti aktivnosti enzima SOD podjednake su u svim kategorijama.

Tablica 10. Usporedba biljega redoks homeostaze obzirom na vrijednosti indeksa tjelesne mase

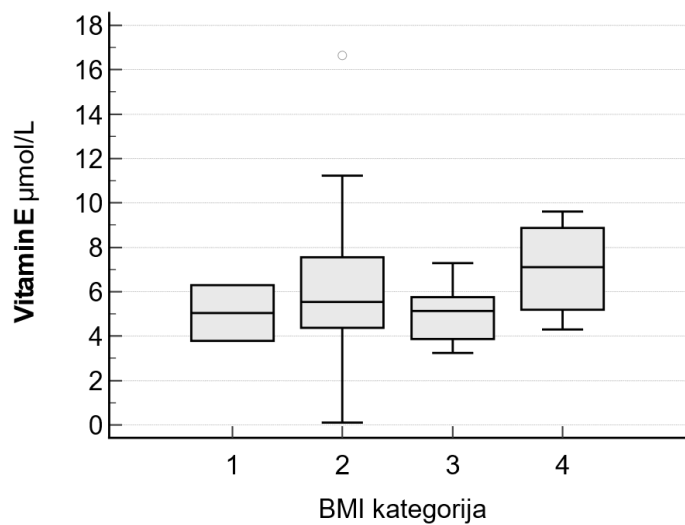
Analit	BMI (kg/m ²)				p [#]
	< 18,5 (N = 2)	18,5 - 24,9 (N = 41)	25,0 - 29,9 (N = 13)	> 30,0 (N = 4)	
MDA (ng/mL)	6,88* (6,48 - 7,27)	7,06 (4,85 - 8,95)	7,27 (5,18 - 7,74)	9,15 (6,81 - 10,01)	0,751
15-F_{2t}-IsoP (ng/mL)	1,34* (0,59 - 2,08)	1,53 (0,77 - 2,01)	1,56 (1,24 - 2,15)	1,11 (0,48 - 1,54)	0,678
Vitamin E (μmol/L)	5,0* (3,8 - 6,3)	5,5 (4,4 - 7,6)	5,1 (3,9 - 5,8)	7,1 (5,2 - 8,9)	0,270
SOD (mU/mg)	1,7* (1,3 - 2,2)	1,5 (1,2 - 1,7)	1,4 (1,2 - 1,5)	1,4 (1,2 - 1,7)	0,685

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. BMI - indeks tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*); MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza; [#]Kruskal Wallis test; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti.

A.



B.



Slika 8. Koncentracije malondialdehida (A.) i vitamina E (B.) po kategorijama indeksa tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*). BMI kategorija 1: <18,5 kg/m²; BMI kategorija 2; 18,5 - 24,9 kg/m²; BMI kategorija 3: 25,0-29,9 kg/m²; BMI kategorija 4: >30,0 kg/m²; MDA – malondialdehid. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikom okvira s ručicama. Bijeli kružići iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta.

5.6.3 Ispitivanje razlika u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na status pušenja cigareta ispitanica

Utjecaj pušenja cigareta na biljege redoks homeostaze razmatrao se podjelom ispitanica u skupinu ispitanica koja puši cigarete i skupinu ispitanica koja ne puši cigarete. U folikularnoj tekućini svih ispitanica izmjerene su koncentracije biljega redoks homeostaze, MDA, 15-F_{2t}-IsoP, vitamina E i aktivnosti enzima superoksid-dismutaze. Razine biljega uspoređivane su između obje skupine (Tablica 11).

Od ukupno 60 ispitanica, njih 7 potvrdilo je da puše cigarete. Koncentracije oba biljega oksidacijskog stresa, MDA i 15-F_{2t}-IsoP, nisu značajno različite između skupine ispitanica koje puše cigarete i skupine ispitanica koje ne puše cigarete. Antioksidacijski status aktivnosti enzima SOD i koncentracija vitamina E također se nisu značajno mijenjali s obzirom na pušenje cigareta.

Tablica 11. Utjecaj pušenja cigareta na koncentracije biljega redoks homeostaze u folikularnoj tekućini

Pušenje cigareta			
Analit	NE (N = 53)	DA (N = 7)	p [#]
MDA (ng/mL)	7,27 (5,35 - 8,91)	5,18 (4,75 - 9,07)	0,468
15-F_{2t}-IsoP (ng/mL)	1,50 (1,24 - 1,70)	1,68 (0,35 - 1,91)	0,899
Vitamin E (μmol/L)	5,4 (4,3 - 7,4)	5,5 (4,0 - 7,1)	0,756
SOD (mU/mg)	1,4 (1,2 - 1,7)	1,4 (1,1 - 1,7)	0,773

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD – superoksid-dismutaza; #Mann Whitney test.

5.6.4 Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze u modificiranom prirodnom ciklusu i ciklusu ovarijske stimulacije

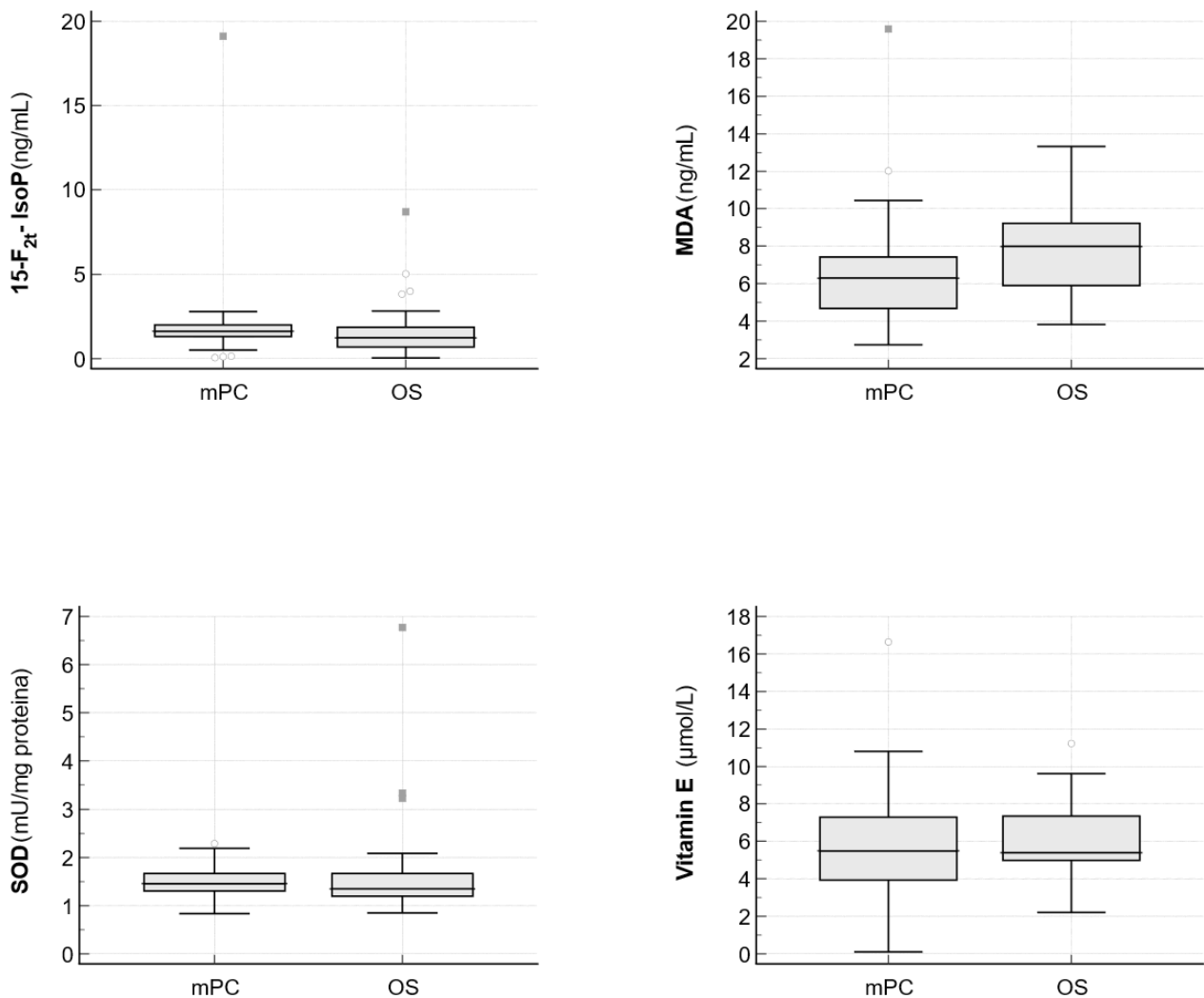
Kako bi se utvrdilo postojanje razlike u redoks homeostazi s obzirom na pristup liječenja, ispitanice su podijeljene u dvije skupine: skupina ispitanica liječenih u prirodnom modificiranom ciklusu (mPC) te skupina ispitanica koje su bile u ciklusu ovarijske stimulacije (OS). Određivani su biljezi oksidacijskog statusa 15-F_{2t}-IsoP i MDA te biljezi antioksidacijskog statusa vitamina E i enzima SOD u folikularnim tekućinama svih ispitanica te su uspoređivani između te dvije skupine (Slika 9).

U skupini ispitanica liječenih u ciklusu ovarijske stimulacije postoji značajno veća koncentracija MDA. S druge strane, koncentracija 15-F_{2t}-IsoP nije pokazala značajne razlike između skupina s obzirom na protokol liječenja. Razine biljega antioksidacijskog statusa također nisu značajno različite između skupina (Tablica 12).

Tablica 12. Koncentracije biljega redoks homeostaze u folikularnoj tekućini ispitanica liječenih u modificiranom prirodnom ciklusu i ciklusu ovarijske stimulacije

Analit	mPC (N = 30)	OS (N = 30)	p[#]
MDA (ng/mL)	6,30 (4,68 - 7,42)	8,00 (5,90 - 9,22)	0,024*
15-F_{2t}-IsoP (ng/mL)	1,62 (1,31 - 2,00)	1,24 (0,72 - 2,20)	0,237
Vitamin E (μmol/L)	5,5 (3,9 - 7,3)	5,4 (5,1 - 6,5)	0,595
SOD (mU/mg)	1,5 (1,3 - 1,7)	1,3 (1,2 - 1,7)	0,584

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. mPC - modificirani prirodni ciklus; OS - stimulacija jajnika; MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza; *statistički značajna razlika između skupina p < 0,05; #Mann Whitney test



Slika 9. Razlike u koncentracijama biljega 15-F_{2t}-izoprostana, malondialdehida, vitamina E te aktivnosti enzima superoksid-dismutaze izmjerenih u folikularnoj tekućini između skupina ispitanica liječenih u mPC ili OS ciklusu. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Bijeli kružići iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta. Sivi kvadratići predstavljaju stršeće vrijednosti. mPC - modificirani prirodni ciklus; OS - stimulacija jajnika; MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza.

5.6.5 Ispitivanje razlika u razinama biljega redoks homeostaze u folikularnoj tekućini prema embriološkim i kliničkim parametrima

Kako bi se ispitalo postoje li promjene u redoks homeostazi s obzirom na embriološke i kliničke parametre, uspoređivane su razine biljega redoks homeostaze prema zrelosti jajne stanice, uspješnosti fertilizacije, kvaliteti embrija, a ispitalo se i postoji li razlika na ishod MPO postupka, odnosno na ostvarenje trudnoće neovisno o načinu liječenja neplodnosti.

5.6.5.1 Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na zrelost jajne stanice

Nakon aspiracije i izolacije jajne stanice određen je stadij zrelosti jajne stanice prema njenim morfološkim obilježjima. S obzirom na stupanj zrelosti jajne stanice ispitanice su podijeljene u dvije skupine: skupina ispitanica s zreloom jajnom stanicom i skupina ispitanica s nezreloom jajnom stanicom. U folikularnoj tekućini u kojoj se prethodno nalazila aspirirana jajna stanica izmjerene su koncentracije 15-F_{2t}-IsoP, MDA, vitamina E i aktivnost superoksid-dismutaze. Na kraju su uspoređene razine biljega izmjerenih u folikularnoj tekućini iz koje potječu jajne stanice označene kao zrele ili nezrele oocite (Tablica 13).

S obzirom na zrelost jajne stanice nema značajnih razlika u biljezima lipidne peroksidacije, MDA i 15-F_{2t}-IsoP niti u biljezima antioksidacijskog statusa, vitamina E i SOD između skupina ispitanica s zreloom i nezreloom jajnom stanicom.

Tablica 13. Razine biljega redoks homeostaze s obzirom na zrelost jajne stanice.

Analit	Nezrela jajna stanica (N = 7)	Zrela jajna stanica (N = 53)	p[#]
MDA (ng/mL)	7,27 (5,60 - 12,03)	7,13 (4,95 - 8,91)	0,381
15-F_{2t}-IsoP (ng/mL)	1,24 (0,59 - 1,47)	1,56 (0,91 - 2,09)	0,182
Vitamin E (μmol/L)	5,2 (3,6 to 7,3)	5,5 (4,3 to 7,3)	0,670
SOD (mU/mg)	1,3 (1,2 - 1,5)	1,5 (1,2 - 1,7)	0,311

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza; [#]Mann Whitney test.

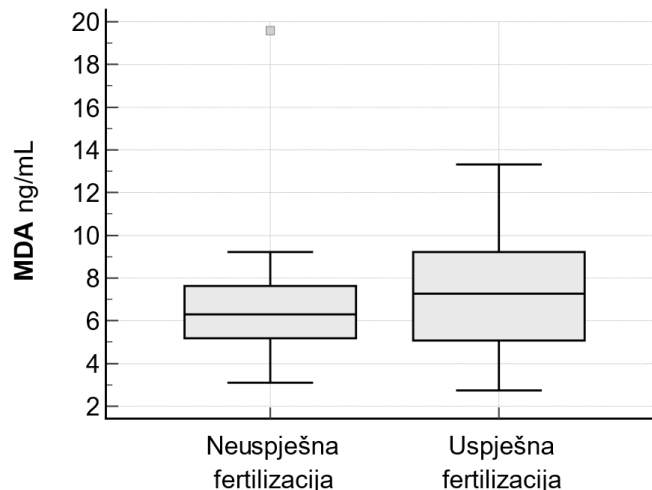
5.6.5.2 Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na uspješnost fertilizacije

Nakon aspiracije i procijene zrelosti jajne stanice uslijedio je postupak oplodnje klasičnim IVF ili ICSI postupkom. Kako bi se ustanovilo postoji li razlika u redoks homeostazi unutar folikularne tekućine s obzirom na uspješnost fertilizacije jajne stanice, uspoređene su razine biljega 15-F_{2t}-IsoP, MDA, vitamina E i SOD između skupina prema ishodu fertilizacije. Ispitanice su podijeljene u dvije skupine: ispitanice kod kojih je postignuta uspješna fertilizacija jajne stanice te ispitanice s neuspješnom fertilizacijom jajne stanice (Tablica 14). Prema rezultatima, u skupini ispitanica s uspješnom fertilizacijom prisutna je veća koncentracija MDA (Slika 10), premda se razlika nije pokazala statistički značajnom. Koncentracija 15-F_{2t}-IsoP te biljezi antioksidacijskog statusa nisu značajno promjenjeni između uspješno i neuspješno fertilizirane jajne stanice.

Tablica 14. Razine biljega redoks homeostaze prema uspješnosti fertilizacije.

Analit	Neuspješna fertilizacija (N = 14)	Uspješna fertilizacija (N = 44)	p[#]
MDA (ng/mL)	6,30 (5,18 - 7,63)	7,27 (5,08 - 9,22)	0,300
15-F_{2t}-IsoP (ng/mL)	1,41 (0,59 - 1,56)	1,61 (0,90 - 2,18)	0,141
Vitamin E (μmol/L)	5,2 (4,0 - 6,3)	5,6 (4,3 - 7,5)	0,268
SOD (mU/mg)	1,5 (1,2 - 1,7)	1,4 (1,2 - 1,7)	1,000

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza; [#]Mann Whitney test.



Slika 10. Koncentracija malondialdehida između skupina s uspješnom i neuspješnom fertilizacijom jajne stanice. MDA – malondialdehid; Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Sivi kvadratić predstavlja stršeću vrijednost.

5.6.5.3 Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na kvalitetu embrija

Morfologija embrija ocjenjivana je drugi ili treći dan te alternativno peti ili šesti dan nakon oplodnje. Embriji s optimalnim morfološkim karakteristikama bili su bez prisutnih nedostataka prema prethodno opisanim kriterijima, dok su embriji manje kvalitete imali barem jedan ili više nedostataka u opisanoj morfologiji. Do drugog ili trećeg dana nakon oplodnje došla su 42 embrija, od kojih je 28 bilo optimalne kvalitete. Za 22 embrija učinjen je ET, a do petog, odnosno šestog dana došlo je 20 embrija, od kojih je 17 bilo optimalne kvalitete. U svrhu istraživanja uspoređivane su razine biljega redoks homeostaze izmjerene u folikularnoj tekućini između kvalitetnih (optimalnih) i manje kvalitetnih (suboptimalno) ocijenjenih embrija.

Ocjenjivanjem embrija drugi ili treći dan nakon oplodnje postoji trend prema višim koncentracijama MDA i vitamina E u skupini ispitanica sa suboptimalno ocijenjenim embrijima (Slika 11), pritom razlike između skupina nisu statistički značajne. Koncentracija 15-F_{2t}-IsoP i aktivnost SOD nisu se značajno razlikovale između skupina (Tablica 15).

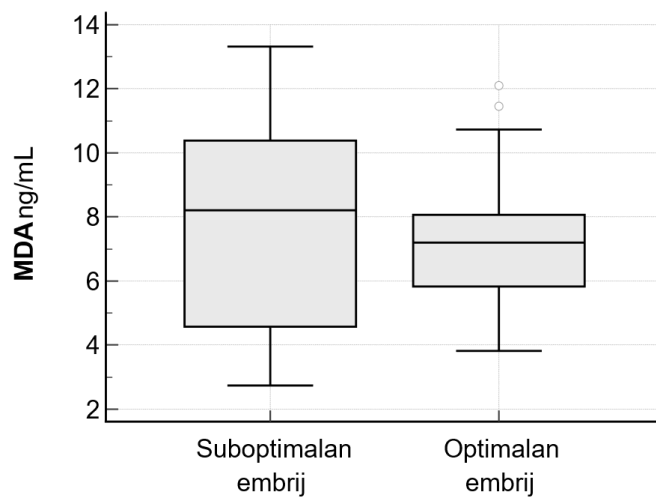
Ocjenjivanjem embrija peti ili šesti dan nakon oplodnje i dalje je prisutna viša koncentracija MDA u manje kvalitetnom (suboptimalno) ocijenjenom embriju, dok se razine 15-F_{2t}-IsoP, vitamina E i SOD nisu značajno razlikovale između skupina. Razine svih biljega između skupina ocjenjivanih embrija na 5. ili 6. dan također se nisu statistički značajno razlikovale. (Tablica 16).

Tablica 15. Razine biljega redoks homeostaze s obzirom na kvalitetu embrija ocijenjenih drugi ili treći dan nakon oplodnje.

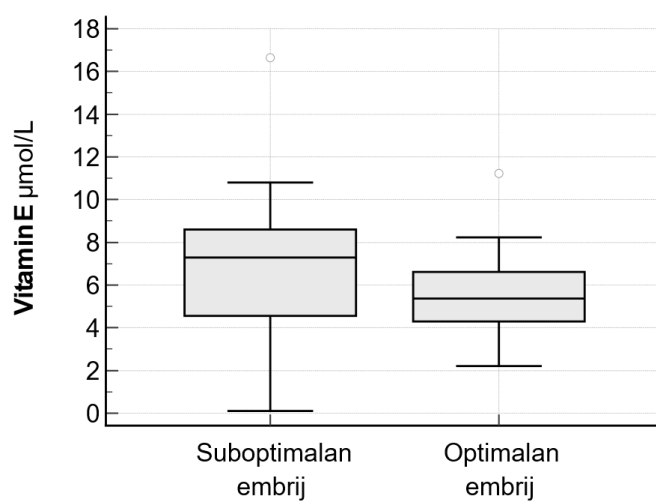
Analit	Ocjena embrija 2. ili 3. dan		p [#]
	Suboptimalan (N = 15)	Optimalan (N = 27)	
MDA (ng/mL)	8,21 (4,58 - 10,39)	7,20 (5,83 - 8,07)	0,637
15-F_{2t}-IsoP (ng/mL)	1,63 (0,86 - 1,94)	1,81 (1,07 - 2,7)	0,365
Vitamin E (μmol/L)	7,3 (4,6 - 8,6)	5,4 (4,3 - 6,6)	0,131
SOD (mU/mg)	1,3 (1,2 - 1,6)	1,5 (1,2 - 2,0)	0,081

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza; [#]Mann Whitney test

A.



B.



Slika 11. Razine biljega (A) MDA i (B) vitamina E prema kvaliteti ocijenjenih embrija drugi ili treći dan. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Bijeli kružići iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta. MDA – malondialdehid.

Tablica 16. Razine biljega redoks homeostaze s obzirom na kvalitetu embrija ocijenjenih peti ili šesti dan nakon oplodnje.

Analit	Ocjena embrija 5. ili 6. dan		p [#]
	Suboptimalan (N = 3)	Optimalan (N = 17)	
MDA (ng/mL)	11,45 (6,62 - 13,32)*	7,34 (5,72 - 8,46)	0,216
15-F_{2t}-IsoP (ng/mL)	1,23 (0,09 - 1,63)*	1,59 (0,96 - 2,47)	0,179
Vitamin E (μ mol/L)	5,0 (3,1 - 5,3)*	5,5 (4,6 - 7,5)	0,179
SOD (mU/mg)	1,2 (1,1 - 1,9)*	1,3 (1,2 - 2,1)	0,671

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza; #Mann Whitney test; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti.

5.6.5.4 Ispitivanje razlike u razinama biljega redoks homeostaze s obzirom na ishod trudnoće

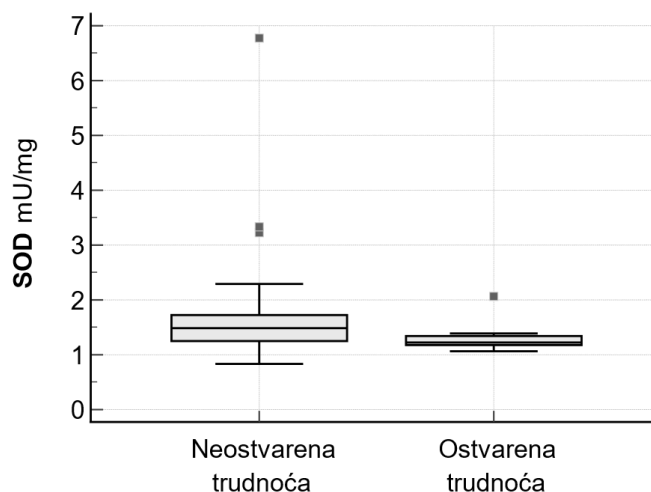
Obzirom na krajnji ishod MPO postupka, uspoređivane su razine biljega u folikularnim tekućinama svih 60 ispitanica, uključujući i ispitanice koje nisu postigle trudnoću neovisno o uzroku (nezrela jajna stanica, neuspješna fertilizacija, nevijabilan embrij, neuspjela implantacija) te onih kod kojih je trudnoća potvrđena u 12. tjednu gestacije.

Prema rezultatima (Tablica 17) biljezi MDA i 15-F_{2t}-IsoP, ne pokazuju značajne razlike u koncentraciji obzirom na krajnji ishod MPO postupka. Od biljega antioksidacijskog statusa, aktivnost SOD u folikularnoj tekućini pokazala se statistički značajno većom kod ispitanica koje nisu ostvarile trudnoću (Slika 12). S druge strane, koncentracija vitamina E bila je podjednaka u obje skupine.

Tablica 17. Razine biljega redoks homeostaze s obzirom na ostvarenu trudnoću.

Analit	Neostvorena trudnoća	Ostvarena trudnoća	p [#]
	(N = 50)	(N = 10)	
MDA (ng/mL)	6,80 (4,90 - 8,86)	7,60 (7,06 - 9,22)	0,104
15-F_{2t}-IsoP (ng/mL)	1,48 (0,773 - 1,828)	1,94 (1,24 - 2,44)	0,166
Vitamin E (μmol/L)	5,5 (4,3 - 7,3)	5,5 (4,3 - 7,5)	0,921
SOD (mU/mg)	1,5 (1,3 - 1,7)	1,2 (1,2 - 1,3)	0,038*

Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza; *statistički značajna razlika između skupina p < 0,05; #Mann Whitney test.



Slika 12. Aktivnost superoksid-dismutaze obzirom na uspjeh postupka medicinski pomognute oplodnje. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Sivi kvadratići predstavljaju stršeće vrijednosti.

SOD - superoksid-dismutaza.

5.6.6 Regresijski model za predviđanje ishoda MPO postupka

Radi jasnijeg razumijevanja odnosa između biljega redoks homeostaze i uspješnosti fertilizacije, kvalitete zametka te ostvarene trudnoće napravljena je regresijska analiza. U prvom koraku načinjena je univarijatna regresijska analiza kako bi se utvrdili parametri koji bi mogli predvidjeti zrelost oocite, uspješnost fertilizacije, kvalitetu embrija i krajnji ishod MPO postupka - trudnoću. Osim biljega redoks homeostaze uzeti su u obzir čimbenici koji mogu utjecati na ishod analize, a to su biološka dob, BMI i pušenje.

Univarijatnom regresijskom analizom, razmatrali su se potencijalni prediktori uspješne fertilizacije prikazani u Tablici 18. Na temelju rezultata, niti jedan ispitivani parametar nije se pokazao statistički značajnim prediktorom stoga nije napravljena multivarijatna logistička regresija.

Univarijatnom regresijskom analizom predviđanja kvalitete embrija samo su se godine i aktivnost superoksid-dismutaze pokazali kao statistički značajni prediktori kod predviđanja kvalitete embrija drugi ili treći dan nakon oplodnje (Tablica 19). S obzirom na interval pouzdanosti omjera izgleda da navedeni parametri nisu statistički značajni za uvrštavanje u model multivarijatne logističke regresije. U predviđanju kvalitete embrija peti ili šesti dan niti jedan ispitivani parametar nije bio statistički značajan (Tablica 20). Čimbenik pušenja nije uzet u izračun s obzirom na to da u ispitivanoj skupini nije bilo pušača.

Univarijatna regresijska analiza za predviđanje ostvarivanja trudnoće nakon MPO postupka nije otkrila niti jedan parametar koji bi se pokazao statistički snažnim prediktorom (Tablica 21). Čimbenik pušenja nije uzet u izračun s obzirom na to da u ispitivanoj skupini nije bilo pušača.

Tablica 18. Univarijatna regresijska analiza za predviđanje uspješnosti fertilizacije.

Parametri	OR (95 % CI)	p
MDA	1,04 (0,84 - 1,28)	0,729
15-F _{2t} -IsoP	1,63 (0,81 - 3,27)	0,079
Vitamin E	1,19 (0,89 - 1,60)	0,213
SOD	1,05 (1,00 - 1,12)	0,509
BMI	1,07 (0,89 - 1,28)	0,452
Godine	0,94 (0,80 - 1,09)	0,381
Pušenje	2,05 (0,23 - 18,69)	0,495

95 % CI - 95 % interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*); OR - omjer izgleda (engl. *odds ratio*); MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD – superoksid-dismutaza.

Tablica 19. Univarijatna regresijska analiza za predviđanje kvalitete embrija drugi ili treći dan nakon oplodnje.

Parametri	OR (95 % CI)	p
MDA	0,92 (0,73 - 1,17)	0,514
15-F _{2t} -IsoP	0,98 (0,91 - 1,06)	0,566
Vitamin E	0,79 (0,60 - 1,04)	0,066
SOD	5,34 (0,78 - 36,6)	0,025*
BMI	0,84 (0,70 - 1,02)	0,058
Godine	0,85 (0,72 - 1,00)	0,033*
Pušenje	0,22 (0,04 - 1,39)	0,095

95 % CI - 95 % interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*); OR - omjer izgleda (engl. *odds ratio*); . MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza; *statistički značajna razlika između skupina p < 0,05.

Tablica 20. Univarijatna regresijska analiza za predviđanje kvalitete embrija peti ili šesti dan nakon oplodnje.

Parametri	OR (95 % CI)	p
MDA	0,60 (0,34 - 1,09)	0,056
15-F_{2t}-IsoP	0,35 (0,06 - 2,04)	0,140
Vitamin E	1,68 (0,71 - 3,98)	0,171
SOD	1,73 (0,23 - 12,86)	0,481
BMI	1,02 (0,70 to 1,49)	0,906
Godine	1,11 (0,82 - 1,51)	0,493

95 % CI - 95 % interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*); OR - omjer izgleda (engl. *odds ratio*); MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza.

Tablica 21. Univarijatna regresijska analiza za predviđanje ostvarivanja trudnoće u 12. tjednu gestacije.

Parametri	OR (95 % CI)	p
MDA	1,12 (0,91 - 1,39)	0,305
15-F_{2t}-IsoP	1,08 (0,88 - 1,32)	0,486
Vitamin E	1,00 (0,76 - 1,32)	0,980
SOD	0,17 (0,02 - 1,70)	0,066
BMI	1,16 (0,97 - 1,37)	0,096
Godine	1,01 (0,85 - 1,19)	0,940

95 % CI - 95 % interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*); OR - omjer izgleda (engl. *odds ratio*); MDA - malondialdehid; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostan; SOD - superoksid-dismutaza.

6. RASPRAVA

Folikularna tekućina predstavlja mikrookoliš koji okružuje jajnu stanicu, a sastoji se od proteina, lipida, polisaharida, steroida i raznih metabolita. Ona predstavlja medij stanične komunikacije između oocite i okolnih stanica koje ju okružuju, a ujedno je izvor informacija za *in vitro* ispitivanje uvjeta u kojima se stanica nalazi. Staničnim metabolizmom ili djelovanjem egzogenih čimbenika u folikularnoj tekućini nastaju reaktivni kisikovi (ROS, engl. *reactive oxygen species*) i dušikovi spojevi (RNS, engl. *reactive nitrogen species*) koji mogu djelovati korisno u smislu stanične signalizacije ili štetno, reagirajući s prisutnim makromolekulama. Pri visokim koncentracijama ROS i RNS mogu reagirati sa svim komponentama DNA te uzrokovati oštećenje genetičkog materijala. Peroksidacijom lipida slobodni radikali utječu na stanične strukture poput bioloških membrana mijenjajući njihovu cjelovitost i fluidnost dok oksidacijskom modifikacijom proteina mogu utjecati na njihovu funkciju. Sazrijevanje jajne stanice složen je proces te svako narušavanje ravnoteže između molekula prooksidansa i antioksidacijskog kapaciteta potencijalno može imati posljedice na plodnost žene. Postoji impozantan broj studija koje ukazuju na štetan utjecaj oksidacijskog stresa u sjemenoj tekućini. Slijedom toga predložena je kategorizacija subfertilnih muškaraca nepoznatog uzroka neplodnosti (57). Međutim, broj istraživanja povezanih s poremećajima redoks homeostaze u folikularnoj tekućini je znatno oskudniji, a rezultati istraživanja često su neusklađeni što ostavlja otvorena pitanja o utjecaju oksidacijskog stresa na reproduktivno zdravlje žena.

Ovim se istraživanjem, kroz određivanje statusa redoks homeostaze u folikularnoj tekućini, nastojao dobiti uvid u kakvim se uvjetima na molekularnoj razini nalazi jajna stanica u ispitanica s dijagnozom nepoznatog uzroka neplodnosti. Pritom su istovremeno određivana dva biljega oksidacije lipida, malondialdehida (MDA) i 15-F_{2t}-izoprostan (15-F_{2t}-IsoP) kako bi se povećala osjetljivost u detekciji lipidne peroksidacije. U redoks biologiji 15-F_{2t}-IsoP smatra se "zlatnim standardom" u dijagnostici lipidne peroksidacije *in vivo* i danas su najčešće određivan biljeg oksidacijskog stresa. Malondialdehid se najčešće određuje za dokazivanje lipidne peroksidacije. Razlog tome je metoda spektrofotometričkog određivanja spojeva koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS), engl. *thiobarbituric acid-reactive substances*), koja je često korištena zbog robusne izvedbe i ekonomski prihvatljive cijene. Međutim, TBARS metoda nema dovoljnu specifičnost te je podložna interferencijama s ostalim molekulama prisutnim u uzorku. Prednost ovog istraživanja je u korištenju tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti koja na temelju kromatografskog razdvajanja i kvantifikacije ima značajno veću specifičnost i reproducibilnost. Zbog toga su koncentracije MDA značajno niže i nije ih moguće uspoređivati s rezultatima ostalih istraživanja. S druge

strane se paralelnim određivanjem koncentracije vitamina E i aktivnosti enzima SOD ispitalo mijenja li se antioksidacijski kapacitet paralelno s promjenom biljega lipidne peroksidacije.

Tijekom istraživanja bilježeni su opći podaci ispitanica: biološka dob žene, indeks tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*) i pušenje kako bi se analizirale promjene biljega redoks homeostaze prema navedenim parametrima.

Ispitivanjem razlika u razinama biljega s obzirom na dob, ispitanice su bile razvrstane u četiri dobne skupine. Koncentracije MDA i 15-F_{2t}-IsoP nisu se značajno razlikovale između dobnih skupina ispitanica. Od biljega antioksidacijskog statusa samo je utvrđena značajno niža koncentracija vitamina E u dobnoj skupini ispitanica od 37 do 40 godina. Poznato je da se porastom biološke dobi smanjuje kvantiteta i kvaliteta jajne stanice. Stoga je moguće da se starenjem mijenja i njezin mikrokoliš. Jedan od uzroka smanjene kvalitete jajne stanice pripisuje se disfunkciji mitohondrija zbog čega se dodatno generiraju reaktivni kisikovi radikali. Nekontroliranim otpuštanjem ROS-a u okolinu oštećuju se obližnje makromolekulske strukture uključujući mitohondrijsku DNA (99, 100). Prema tome, izvjesno bi bilo očekivati porast MDA i 15-F_{2t}-IsoP biljega koji nastaju kao posljedica peroksidacije lipida. Postojeća istraživanja pokazala su neusklađenost u rezultatima, a samo su dvije studije ispitivale povezanost dobi s koncentracijom 15-F_{2t}-IsoP u folikularnoj tekućini. Tako su Pier i sur. (81) utvrdili negativnu povezanost dobi s koncentracijom 15-F_{2t}-IsoP, dok je nedavno istraživanje Collodel i sur. (75) utvrdilo da su koncentracije 15-F_{2t}-IsoP podjednake u obje skupine uzimajući 38 godina kao dobnu granicu, što je slično našim zaključcima. Proturječnost rezultata također je opažena uspoređivanjem koncentracije MDA s biološkom dobi ispitanica. S jedne strane, dvije studije zabilježile su veću koncentraciju MDA ovisno o postavljenoj dobnoj skupini od 38 (75) odnosno 35 godina (101), nakon čega slijedi blagi pad koncentracije MDA. S druge strane Debarh i sur. (93) utvrdili su značajno veću koncentraciju MDA u skupini ispitanica starijih od 37 godina. Dakle, usporedivost koncentracije biljega lipidne peroksidacije pokazala se gotovo nemogućom. Neki od razloga su velika heterogenost ispitivanih populacija, različiti protokoli stimulacija u postupcima medicinski pomognute oplodnje (MPO) i različite metode određivanja koncentracije analita. Zbog svega navedenoga i prema dosadašnjim saznanjima nije moguće iznijeti zaključak dolazi li starenjem do pojačane izloženosti gameta lipidnoj peroksidaciji. Istovremenim određivanjem biljega antioksidacijskog statusa pokušalo se ustanoviti mijenja li se s godinama kapacitet zaštitnih mehanizama usmjerenih na sprečavanje oksidacije lipida. U ovom istraživanju utvrđene su najniže vrijednosti vitamina E od 4,4 μmol/L u dobnoj skupini ispitanica od 37 do 40 godina; pritom se razlika pokazala statistički značajnom u odnosu na najmlađu (6,1 μmol/L) i najstariju dobnu skupinu (5,6 μmol/L) ispitanica. Uzroci niže koncentracije vitamina E mogli bi se povezati s većom potrošnjom vitamina E uslijed

pojačanog stvaranja ROS-a budući da je djelovanje vitamina E specifično usmjereno na sprečavanje nastanka lipidne peroksidacije. Vitamin E je antioksidans egzogenog porijekla, zbog čega se tijekom regrutacije ispitanica uzimanje suplemenata vitamina E smatralo isključnim kriterijem. Drugi mogući uzrok razlike u koncentraciji vitamina E s obzirom na dob ispitanica je način prehrane koji nije uzet u obzir prilikom prikupljanja podataka. S obzirom na to da su koncentracije oba biljega oksidacijskog stresa bile podjednake između skupina, te se aktivnost superoksid-dismutaze također nije značajno mijenjala, možemo zaključiti da je način ishrane potencijalni uzrok razlici u koncentraciji vitamina E s obzirom na dob ispitanica. Enzim superoksid-dismutaza predstavlja snažan neselektivan mehanizam uklanjanja slobodnih radikala. Izolacijom granulosa stanica iz folikularne tekućine zamijećena je smanjena ekspresija gena unutarstaničnog izoenzima SOD1 i SOD2 kod žena starije dobi, što može uzrokovati veću izloženost reaktivnim kisikovim spojevima tijekom steroidogeneze (102). Nažalost, nije istovremeno određivana i katalitička aktivnost enzima u folikularnoj tekućini pa se rezultati ne mogu usporediti s ovim istraživanjem. Izravnim mjerenjem aktivnosti SOD-a u folikularnoj tekućini istraživanje Debbarh i sur. (93) utvrdilo je značajno smanjenje aktivnosti superoksid-dismutaze nakon 37. godine života. Oba istraživanja kroz smanjenu aktivnost enzima SOD-a u folikularnoj tekućini te smanjenu ekspresiju gena unutarstaničnih izoenzima SOD1 i SOD2 navode na zaključak kako se porastom biološke dobi povećava izloženost ROS-u, a time i riziku od oštećenja obližnjih makromolekula (93,102). Međutim istraživanje Carbone i sur. (92) utvrdilo je proturiječne rezultate s obzirom na prethodno navedene studije (93, 102) Istovremenom se kvalitativnom Western blot analizom određivala prisutnost izvanstaničnog izoenzima SOD3 te katalitička aktivnost izoenzima SOD3 u folikularnoj tekućini između ispitanica mlađe (27 do 32 godina) i starije (39 do 45 godina) dobne skupine (92). Rezultati Western blota pokazali su podjednake koncentracije enzima SOD3 u obje dobne skupine ispitanica. Suprotno tome katalitička aktivnost enzima SOD3 je bila 25 % veća u ispitanica starije dobne skupine. Prema autorima, veća katalitička aktivnost enzima SOD3 nastala je uslijed promjene u izloženosti ROS-u s ciljem povećanja antioksidacijske zaštite unutar folikula (92). Neusklađenost rezultata može se pojasniti u regrutaciji ispitanica. Prvo istraživanje provedeno je na ispitanicama kod kojih je isključen sindrom policističnih jajnika (PCOS, engl. *polycystic ovary syndrome*), pušenje i endometrioza, a u potonjem su nejasno opisane ispitivane skupine (92, 93, 102). Naše istraživanje se sastoji od homogene skupine ispitanica s idiopatskom neplodnosti te nisu zabilježene značajne promjene u katalitičkoj aktivnosti superoksid-dismutaze između dobni skupina. Uz pretpostavku da je način prehrane uzrok razlikama u koncentraciji vitamina E, rezultati ovog istraživanja navode na zaključak kako antioksidacijski kapaciteti vitamina E i SOD-a održavaju redoks homeostazu unutar folikula tijekom godina.

Osim ispitivanja razlike u razini biljega redoks homeostaze prema dobi, ispitana je i prema indeksu tjelesne mase. Iz rezultata je vidljivo kako su najveće razlike zamijećene u skupini ispitanica s najvišim BMI ($> 30 \text{ kg/m}^2$). Od biljega oksidacijskog stresa u skupini ispitanica s najvišim BMI prisutna je zamjetno viša koncentracija MDA, dok se koncentracija 15-F_{2t}-IsoP nije mijenjala. Iako nisu utvrđene statistički značajne razlike, vitamin E u istoj skupini također bilježi veće koncentracije, dok se aktivnost enzima SOD-a nije značajno mijenjala. Trenutačno nema jakog dokaza o povezanosti BMI-a s dijagnozom idiopatske neplodnosti, međutim općepoznat je negativan utjecaj visokog i niskog indeksa tjelesne mase na ishod MPO postupka (103 – 105). Na sistemskoj razini, pretilost se povezuje s indukcijom oksidacijskog stresa koji se očituje višim koncentracijama biljega lipidne peroksidacije te sniženom koncentracijom vitamina E (53, 106, 107). Ispitivanja na lokalnoj razini nisu pokazala značajne razlike u koncentraciji MDA u folikularnoj tekućini s obzirom na BMI vrijednosti (67, 68, 108). Međutim, istraživanje Nasiri i sur. (64) pokazalo je značajno višu koncentraciju MDA u ispitanica s abdominalnom debljinom sa ili bez PCOS-a u usporedbi s kontrolnim skupinama u kojima nije prisutna abdominalna debljina. U utvrđivanju antioksidacijskog statusa, ostala istraživanja nisu pronašla povezanost koncentracije vitamina E i aktivnosti enzima SOD s vrijednostima BMI-a (90, 96). Pritom su Ashraf i sur. (96) određivali samo koncentraciju vitamina E, a nisu određivali ostale biljege koji su biokemijski povezani s tom molekulom i s oksidacijskim stresom. Povišena koncentracija MDA upućuje na pojačano generiranje ROS-a u mikrookolišu gameta. Razmatrajući oba biljega lipidne peroksidacije u skupini ispitanica s ekstremno visokim vrijednostima BMI-a navodi nas na zaključak da se oksidacija lipida odvija u smjeru intenzivnijeg nastanka MDA. Sveobuhvatno gledajući, uz povišenu razinu MDA, povišena koncentracija vitamina E može se razjasniti kao akutni adaptivni mehanizam na prisutnu lipidnu peroksidaciju *in situ*. Nepromijenjena aktivnost superoksid-dismutaze nas navodi na zaključak kako je mehanizam neutralizacije stvorenih lipidnih peroksida specifično usmjeren neenzimskim djelovanjem vitamina E.

Od općih karakteristika, zadnji parametar koji se uspoređivao s razinama biljega redoks homeostaze je pušenje cigareta. Poznato je da pušenje ispoljava štetan utjecaj na reproduktivno zdravlje zbog prooksidacijskog i proupalnog djelovanja toksičnih spojeva iz cigareta. Utjecaj izloženosti duhanskom dimu na reproduktivno zdravlje opsežno je ispitan na nekoliko razina. Ovarijska rezerva, steroidogeneza, sazrijevanje jajne stanice, proces fertilizacije te kvaliteta embrija predstavljaju ključne karike koje su se pokazale osjetljivima na pušenje (87, 109). Prema istraživanjima, pušenje je povezano s povišenim razinama biljega lipidne peroksidacije MDA i 15-F_{2t}-IsoP u plazmi (106,110–112). Međutim, istraživanja povezana s određivanjem oksidacijskog stresa u folikularnoj tekućini pokazuju neusklađenost

u rezultatima. U jednom istraživanju, Paszkowski i sur. (51) potvrdili su prisutnost lipidne peroksidacije u folikularnoj tekućini mjereći povišenu razinu MDA kod pušača. Suprotno tome, Kazemi i sur. (52) pokazali su slične rezultate s našim istraživanjem određujući isti biljeg MDA te ukupnu antioksidacijsku aktivnost u FT. Autori su zaključili da oksidacijski stres u folikularnoj tekućini nije prisutan. Uzrok neusklađenosti rezultata može se pojasniti u ekstremnim razlikama izmjerenih koncentracija kotinina koji se koristio kao mjera izloženosti duhanskom dimu. Negativan učinak pušenja zapažen je i na smanjenom kapacitetu enzimskog antioksidacijskog sustava i sniženim koncentracijama β -karotena, premda uz nepromijenjenu koncentraciju vitamina E (113, 114). U ovom istraživanju, podjelom ispitanica s obzirom na status pušenja cigareta nisu prisutne vidljive promjene u redoks homeostazi. Odsutnost lipidne peroksidacije potkrijepljena je istovremenim određivanjem dva pokazatelja lipidne peroksidacije; MDA i 15-F_{2t}-IsoP. Valja istaknuti prisutnost ograničenja u usporedivosti rezultata zbog nedostatka podataka o koncentraciji kotinina i količini konzumiranih cigareta. Također, u skupini koja ne puši cigarete bilo je samo 7 ispitanica, stoga nehomogenost skupina može biti izvor nedovoljno jake snage testa prilikom statističke obrade podataka. Obzirom na spoznaje o povezanosti štetnog učinka pušenja cigareta na gamete i embrij, možemo zaključiti kako lipidna peroksidacija vjerojatno nije dio mehanizma toksičnog djelovanja duhanskog dima.

Općenito, glavni pristup u liječenju neplodnosti je stimulacija jajnika kako bi se povećali izgledi za ostvarivanje trudnoće. Stoga je primarni cilj istraživanja bio utvrditi mijenja li ovarijska stimulacija status redoks homeostaze u odnosu na modificirani prirodni ciklus. Ono što čini ovo istraživanje posebnim jest to što se prvi puta ispitala prisutnost oksidacijskog stresa kod ispitanica u modificiranom prirodnom ciklusu (mPC) u odnosu na ispitanice koje se nalaze u ciklusu ovarijske stimulacije (OS) u kojem se primjenjuju antagonisti hormona koji oslobađa gonadotropin (GnRH, engl. *gonadotropin-releasing hormone*). Pritom se oksidacijski stres procijenio s dva pokazatelja peroksidacije lipida, MDA i 15-F_{2t}-IsoP i dva pokazatelja antioksidacijske zaštite, vitamina E i aktivnosti enzima superoksid-dismutaze. Prema rezultatima, utvrđena je statistički značajno veća koncentracija MDA, za 27 % u folikularnoj tekućini ispitanica koje se nalaze u ovarijskoj stimulaciji u odnosu na ispitanice u modificiranom prirodnom ciklusu. Međutim, koncentracija 15-F_{2t}-IsoP u FT nije se značajno razlikovala između obje skupine. Promjene nisu zapažene niti za biljege antioksidacijske zaštite, vitamin E i superoksid-dismutazu.

Većina istraživanja koja su ispitala promjene redoks homeostaze u neplodnosti imala su za cilj ispitati prisutnost oksidacijskog stresa prema etiologiji bolesti ili utvrditi povezanost s embriološkim parametrima. S druge strane, postoji jako malo podataka o utjecaju primjene terapije na redoks homeostazu unutar folikula. Pregledom literature

zamjećuje se heterogenost u populaciji ispitanica te razlike u primjeni protokola liječenja, što značajno otežava interpretaciju rezultata. Slijedom toga, jedna grupa autora uspoređivala je biljege redoks homeostaze MDA, dušikovog(II) oksida, proteinskih karbonila, hidroksiprolina, reduciranog glutationa, superoksid-dismutaze i drugih enzima antioksidacijske zaštite u folikularnoj tekućini i serumu kod ispitanica koje su liječene dugim protokolom s GnRH agonistima i ispitanica koje su liječene u protokolu s GnRH antagonistima. Prema rezultatima istraživanja, u plazmi ispitanica liječenih s GnRH antagonistima utvrđene su značajno niže koncentracije MDA i povišena aktivnost enzima SOD. Iz navedenoga, autori su zaključili da postoji akutni kompenzatorni odgovor na sistemskoj razini koji može biti rezultat prekomjernog stvaranja slobodnih radikala iz većeg broja folikula. Kod ispitanica liječenih GnRH antagonistima u folikularnoj tekućini pokazale su se značajno povišene koncentracije dušikovog(II) oksida, hidroksiprolina i proteinskih karbonila koje prati pojačana aktivnost enzima SOD-a. Očito, liječenje u protokolu s GnRH antagonistima utječe na nastanak oksidacijskog stresa unutar folikula, pri čemu su proteini ciljne molekule djelovanja ROS-a. S obzirom na stabilne vrijednosti MDA u serumu i folikularnoj tekućini u obje skupine, vjerojatno se mehanizam oksidacije unutar folikula ne odvija u smjeru nastanka lipidnih peroksida (115). Slično istraživanje uspoređivalo je biljege redoks homeostaze između protokola s GnRH antagonistima te dugim i kratkim protokolima GnRH agonistima kod ispitanica liječenih od neplodnosti različite etiologije uključujući i idiopatsku neplodnost. U ovom slučaju također je potvrđena prisutnost biljega oksidacijskog stresa u folikularnoj tekućini ispitanica liječenih GnRH antagonistima. Suprotno prethodnome istraživanju, prooksidacijsko djelovanje terapije pokazalo se kroz zamjetno višu koncentraciju MDA i nižu aktivnost enzima SOD u folikularnoj tekućini ispitanica liječenih protokolom GnRH antagonista (116). Nadalje, uspoređujući primjenu GnRH agonista u kratkom i dugom protokolu, Tamura i sur. (117) pokazali su značajno više razine proupalnih citokina i 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina, produkta nastalog djelovanjem ROS-a na molekulu DNA. Prema autorima, očigledno postoji utjecaj terapije u kratkom protokolu na stvaranje upalnih citokina i prooksidacijsko djelovanje ROS-a na molekulu DNA. Iz spomenutih istraživanja možemo zaključiti kako terapija može mijenjati status redoks homeostaze i trebala bi se uzeti u obzir prilikom regrutiranja ispitanica. Valja istaknuti da je vrlo mali broj istraživanja koja se temelje na usporedbi statusa redoks homeostaze u folikularnoj tekućini primjenom nekog protokola ovarijske stimulacije s mPC-om koji najviše odgovara stanju fiziološkog ciklusa. Analizom proteoma u folikularnoj tekućini uspoređivan je prirodni ciklus s GnRH agonistima u dugom protokolu. U ciklusu ovarijske stimulacije s GnRH agonistima primijećena je pojačana ekspresija proteina upalnog i imunološkog odgovora u odnosu na prirodni ciklus (118). Sličan trend pokazao se usporedbom mPC-a s protokolom GnRH antagonista. Prooksidacijsko djelovanje GnRH antagonista prikazano je kroz povišene koncentracije modificiranih proteina

(43). Uvažavajući činjenicu da se upravo upalni procesi temelje na redoks reakcijama te predstavljaju izvor pojačanog generiranja slobodnih radikala u okolini, mogu se očekivati promjene u redoks homeostazi na razini pojačanog stvaranja oksidiranih makromolekula DNA, lipida i proteina ili pojačanim iskorištavanjem molekula antioksidacijskog sustava. Ispitivanjem ekspresije gena iz stanica kumulusa, modificirani prirodni ciklus pokazao je izraženiju ekspresiju gena za SOD i drugih gena uključenih u redoks homeostazu. Prema autorima, pojačana ekspresija tih gena povezana je s porastom LH i pojačanim stvaranjem ROS-a za vrijeme ovulacije (119). Nažalost, nije istovremeno određivana aktivnost enzima u folikularnoj tekućini pa usporedba rezultata s našim istraživanjem nije moguća. Prema dizajnu, najsličnije istraživanje našem istraživanju provedeno je u Španjolskoj, a temelji se na usporedbi biljega antioksidacijskog statusa i lipidoma između mPC i stimuliranog ciklusa s GnRH antagonistima kod skupine fertilnih ispitanica donora oocita. Zanimljivo, koncentracija prooksidansa dušikovog(II) oksida nije se pokazala značajno različitom između skupina. Međutim, koncentracija protektivnih biljega, vitamina E i aktivnost sva tri izoenzima paraoksonaza te enzima SOD pokazala se višom u mPC-u. Ovi rezultati mogu biti indirektan dokaz pojačane potrošnje antioksidacijskih mehanizama tijekom ovarijske stimulacije. Nadalje, analiza lipidoma ustanovila je veći udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*) u mPC-u. S druge strane, u ovarijskoj stimulaciji udio zasićenih masnih kiselina bio je veći. Od nezasićenih masnih kiselina prevladavale su n-3 PUFA koje imaju više dvostrukih veza te su podložnije spontanoj oksidaciji i potencijalnom izvoru stvaranja MDA i 15-F_{2t}-IsoP (42). Očigledno je da ovarijska stimulacija mijenja sastav PUFA-e i redoks homeostazu unutar folikula u smjeru smanjenog antioksidacijskog kapaciteta. Nadovezujući se na njihovo istraživanje, možemo pretpostaviti kako je povišena koncentracija MDA zamijećena u našem istraživanju posljedica pojačane oksidacije lipida zbog većeg udjela n-3 PUFA. Uzimajući u obzir nepromijenjenu koncentraciju 15-F_{2t}-IsoP, možemo zaključiti kako primjena GnRH antagonista predstavlja akutni oksidacijski stres čiji se mehanizam odvija u smjeru nastanka MDA. Suprotno očekivanome, razine vitamina E i aktivnost superoksid-dismutaze ostale su nepromijenjene u obje skupine. Čini se kako je potrebna značajno veća izloženost prooksidansima koji bi promijenili koncentraciju vitamina E i aktivnost superoksid-dismutaze.

Razmatrajući embriološke parametre, istraživanjem se pokušalo utvrditi postoje li razlike u vrijednostima biljega redoks homeostaze izmjerenih u folikularnoj tekućini s obzirom na zrelost jajnih stanica, uspjeh fertilizacije te kvalitetu embrija nastalih iz tih jajnih stanica. S obzirom na dobivene rezultate, zrelost jajne stanice nije povezana s promjenama biljega redoks homeostaze u folikularnoj tekućini. Postojanje razlika u biljezima redoks homeostaze s obzirom na stupanj zrelosti stanica može imati dvojako značenje. S jedne strane, stvaranje

ROS-a i oksidacijskog stresa posljedica su metabolizma jajne stanice ili okoline koja ju okružuje, a koja je sastavni dio nužne međustanične signalizacije u procesu sazrijevanja. To potvrđuje istraživanje Elizur i sur. (34) koji su izravno mjereći vodikov peroksid u folikularnoj tekućini dva susjedna folikula zabilježili najnižu koncentraciju u praznim folikulima. Suprotno tome, prisutnost oksidacijskog stresa može se interpretirati kao čimbenik koji djeluje negativno na sazrijevanje jajne stanice (120–123). Tome u prilog govore rezultati istraživanja koje je pokazalo povezanost viših koncentracija ROS-a s nezrelim jajnim stanicama i lošijom kvalitetom embrija (69). Negativan utjecaj ROS-a indirektno su prikazala istraživanja povezana s primjenom antioksidansa. Veći broj zrelih jajnih stanica i očekivano viši antioksidacijski kapacitet zamijećen je u skupini ispitanica koje su koristile suplemente antioksidansa (91, 124, 125). Određivanjem 15-F_{2t}-IsoP i SOD-a, Alviggi i sur. (91) pokazali su kako primjena antioksidansa ne utječe značajno na status biljega redoks homeostaze, nego na udio zrelih MII jajnih stanica. Primjena antioksidansa očito djeluje nekim drugim mehanizmima na redoks homeostazu, a koji potom djeluju pozitivno na sazrijevanje jajne stanice. Sukladno našim rezultatima, dosadašnja istraživanja nisu utvrdila značajne razlike u koncentraciji MDA s obzirom na zrelost jajne stanice (33, 66, 121). Valja istaknuti kako dosad nije uspoređivana koncentracija 15-F_{2t}-IsoP sa stupnjem zrelosti jajne stanice. Iz rezultata našeg istraživanja, koncentracija 15-F_{2t}-IsoP također ne pokazuje značajne promjene, što dodatno potvrđuje odsutnost lipidne peroksidacije. Od antioksidacijske zaštite druga istraživanja pokazala su kako viša koncentracija vitamina E povećava izgled za dobivanje zrele jajne stanice (96, 126). Obzirom na slične vrijednosti aktivnosti superoksid-dismutaze i koncentracije vitamina E u obje skupine, iz rezultata našeg istraživanja možemo zaključiti da zrelost jajne stanice ne utječe značajno na promjene u redoks homeostazi predovulatornog folikula.

Uspjeh oplodnje može ovisiti o utjecaju oksidacijskog stresa nastalog u uvjetima *in vivo* ili *in vitro*. Status redoks homeostaze u folikularnoj tekućini jedan je od čimbenika koji mogu utjecati na rast i sazrijevanje kompetentne jajne stanice koja je ključan parametar za uspješnu oplodnju. Stoga folikularnu tekućinu promatramo kao okruženje koje stvara preduvjete za uspješnu oplodnju (53, 55). Upravo zbog toga se istraživanja usredotočuju na ispitivanje brojnih biljega redoks homeostaze s ciljem pronalaska povezanosti oksidacijskog stresa fertilizacijskog potencijala. Općenito su dosad istraživanja pokazala neujednačenost u rezultatima. Uz činjenicu da se embriološkom procjenom za fertilizaciju uzima kompetentna zrela jajna stanica, možemo pretpostaviti da je prisutnost oksidacijskog stresa u folikularnoj tekućini unutar fizioloških granica koje ne bi trebale utjecati na samu oplodnju. To potvrđuje nekoliko istraživanja koja su pokazala da koncentracija MDA nije odraz fertilizacijskog potencijala stanice (33, 121, 127). Prema rezultatima naših istraživanja, prisutan je mali

porast u koncentraciji MDA uspješno fertiliziranih jajnih stanica. Međutim, koncentracija 15-F_{2t}-IsoP ostala je nepromijenjena, sukladno rezultatima istraživanja Gongadashetti i sur. (82). Razilaženje u rezultatima prikazali su Das i sur. (33) koji su izravnim mjerenjem ROS-a u ispitanica s tubarnom neplodnosti utvrdili povezanost visokih koncentracija s neuspjelim fertilizacijama. Očito prekomjerno stvaranje ROS-a drugim mehanizmima smanjuje kompetentnost jajne stanice. Tu pretpostavku potvrđuju Revelli i sur. (128) koji su otkrili više razine 4-hidroksinonenala još jednog biljega lipidne peroksidacije te više aktivnosti enzima SOD-e i katalaze u folikularnoj tekućini nefertiliziranih jajnih stanica kod ispitanica s različitim uzrocima neplodnosti. Aktivnost enzima SOD i koncentracija vitamina E također se značajno ne razlikuju između skupina ispitanica s uspješnom i neuspješnom fertilizacijom, što su potvrdila i ostala istraživanja (66, 82, 121). U protektivnom kontekstu, veća koncentracija vitamina E povezana je s uspješnom fertilizacijom (96, 126). Iz svega navedenog, istraživanja nas navode na zaključak da oksidacijski stres može u nekom trenutku nadvladati mehanizme antioksidacijske zaštite te početi štetno djelovati na stanicu i njezin fertilizacijski potencijal. S obzirom da su u prethodno opisanim studijama prisutni različiti protokoli liječenja s heterogenim skupinama ispitanica, usporedba rezultata s ovim istraživanjem je otežana. Mali porast u koncentraciji MDA upućuje na prisutnost oksidacijskog stresa u folikularnoj tekućini jajne stanice koja se na kraju uspješno fertilizirala. S obzirom na druge biljege redoks homeostaze, očigledno intezitet prooksidacijskog djelovanja u folikularnoj tekućini nije dovoljno velik, odnosno antioksidacijski kapaciteti dovoljni su da izmjereni mali porast koncentracije MDA nema kliničkog značenja na fertilizacijski potencijal.

Uz pretpostavku da poremećaj redoks homeostaze utječe na kvalitetu jajne stanice, a isti nije moguće zamijetiti kroz morfološka obilježja na mikroskopskoj razini, uspoređivani su biljezi redoks homeostaze s obzirom na kvalitetu embrija. Cilj je bio utvrditi postoji li oksidacijski stres unutar folikula koji djeluje negativno na jajnu stanicu i kasnije na razvitak embrija. Dosadašnja istraživanja pokazuju neujednačene, a često i proturječne zaključke u rezultatima. Zanimljivo istraživanje prikazali su Elizur i sur. (34) izravnim određivanjem vodikovog peroksida u folikularnoj tekućini dva susjedna folikula. Pritom su zaključili da je značajno viša koncentracija vodikovog peroksida izmjerena u folikulima iz koje potječu embrija lošije kvalitete. Slični rezultati potvrđeni su u istraživanjima Das i sur. (33) kod ispitanica s tubarnom neplodnosti liječenih u protokolu s GnRH agonistima te Liu i sur. (68) kod ispitanica s PCOS-om također liječenih u protokolu s GnRH agonistima, gdje se osim izravnog određivanja ROS-a, utvrdila i negativna povezanost povišene koncentracije MDA sa smanjenom kvalitetom embrija. Zanimljivo, Gongadashetti i sur. (82) određivali su lipidnu peroksidaciju mjereći 15-F_{2t}-IsoP u folikularnoj tekućini ispitanica s neplodnošću iste etiologije, PCOS-a i tubarne neplodnosti te pri tome nisu utvrdili značajne razlike u

koncentraciji 15-F_{2t}-IsoP između skupine s embrijima bolje i lošije kvalitete. To je ujedno jedino istraživanje koje je razmatralo povezanost lipidne peroksidacije i kvalitete embrija kroz određivanje 15-F_{2t}-IsoP. Suprotno prethodnim istraživanjima, kod ispitanica s idiopatskom neplodnosti nije bilo značajnih razlika u koncentraciji MDA s obzirom na kvalitetu embrija (129). S obzirom na to da oksidacijski stres može biti posljedica patofiziološkog stanja, neujednačenost u rezultatima može se pojasniti heterogenošću ispitivanih skupina u kojima nalazimo ispitanice koje se liječe od neplodnosti različite etiologije (70, 75, 130). Rezultati našeg istraživanja rađenog u skupini ispitanica s idiopatskom neplodnosti ne slažu se s istraživanjem Olszak i sur. (129). Naime, u našem istraživanju zamijećen je trend prema višim koncentracijama MDA i vitamina E u skupini suboptimalno ocijenjenih embrija drugi ili treći dan nakon oplodnje u odnosu na optimalno ocijenjene embrije. Iz toga možemo zaključiti da je povišena koncentracija vitamina E kompenzatorni odgovor na povišenu koncentraciju MDA. Moguće je da lipidna peroksidacija u folikularnoj tekućini ima negativan utjecaj na jajnu stanicu iz koje potječe embrij, a da to nije povezano s njezinom zrelosti. Isti trend zapažen je i kod suboptimalno ocijenjenih embrija u stadiju blastociste, uz izostanak porasta koncentracije vitamina E. Moguće pojašnjenje leži u značajno reduciranom broju ispitanica s embrijima koji su dostigli stadij blastociste pri čemu je u skupini suboptimalno ocijenjenih embrija bilo svega 3 ispitanice što zasigurno utječe na manjak reprezentivnosti uzorka. S druge strane, koncentracija 15-F_{2t}-IsoP pokazala se stabilnom u obje skupine ispitanica s obzirom na kvalitetu embrija, sukladno rezultatima istraživanja Gongadashetti i sur. (82). Nažalost, zbog korištenja različitih metoda određivanja biljega 15-F_{2t}-IsoP, usporedivost koncentracija biljega 15-F_{2t}-IsoP nije moguća. Suprotni rezultati zamijećeni su i kod određivanja vitamina E. U jednom istraživanju veća koncentracija vitamina E povezuje se s većim udjelom embrija optimalne kvalitete. Pritom nije određivan niti jedan biljeg lipidne peroksidacije pa zato nije moguće u potpunosti dobiti uvid u status redoks homeostaze (96). Zanimljivo je istraživanje Fatemi i sur. (125) koji su zamijetili da suplementi vitamina D3 i vitamina E ne utječu na promjenu koncentracija MDA u folikularnoj tekućini niti na kvalitetu embrija (125). Slijedom toga, ostaje otvoreno pitanje o opravdanosti uzimanja antioksidansa. Razmatrajući aktivnost SOD-a, sukladno s ostalim istraživanjima nema značajnih razlika s obzirom na kvalitetu embrija (125, 129, 131). Očigledno je za izraženiju enzimsku aktivnost SOD-a potreban intenzivniji porast aktivnosti ROS-a. Sveobuhvatno gledajući, možemo zaključiti da je kompetentnost jajne stanice, koja prethodi nastanku embrija lošije kvalitete smanjena jer je bila akutno izložena oksidacijskom stresu.

Krajnji ishod MPO postupka u literaturi evidentira se na različite načine: pozitivnim testom humanog korionskog gonadotropina (hCG, engl. *human chorionic gonadotropin*) izmjenjenog u plazmi, potvrdom kliničke trudnoće ili vrlo rijetko kroz stopu živorođene djece. U

ovom istraživanju, potvrđena trudnoća u prvom tromjesečju smatrala se pozitivnim ishodom postupka. Heterogenost u prikazivanju ishoda postupka vrlo često otežava uspoređivanje rezultata istraživanja. U ispitivanju razina biljega redoks homeostaze s obzirom na ostvarenu trudnoću također je prisutna neujednačenost u rezultatima. Prisutnost oksidacijskog stresa i povišenih koncentracija MDA u neostvarenim trudnoćama dokazani su u nekoliko istraživanja (69, 76, 77, 121). Pritom se kao kriterij uzimao pozitivno izmjeren hCG, izuzev dva istraživanja koja nejasno opisuju pozitivan ishod postupka. Druga skupina istraživanja nije utvrdila značajne razlike između koncentracija MDA s obzirom na ostvarenu trudnoću (127, 129), pri čemu u istraživanju Olszak-Wąsik i sur. (129) također nije jasno naveden kriterij pozitivnog ishoda. Istraživanje Collodel i sur. (75) temeljilo se na usporedbi biljega prema etiologiji bolesti, pritom su utvrdili značajno više koncentracije MDA u endometriozii u odnosu na idiopatsku neplodnost. Dodatno autori zaključuju na temelju koncentracija MDA i 15-F_{2t}-IsoP te aktivnosti nekoliko enzima antioksidacijske zaštite kako nema povezanosti između lipidne peroksidacije i trudnoće što je u skladu s zapažanjima našeg istraživanja. Zanimljivo istraživanje određivalo je 15-F_{2t}-IsoP u folikularnoj tekućini ispitanica s PCOS-om i tubarnom neplodnosti, pri čemu se trudnoća iznad 20. tjedna gestacije smatrala pozitivnim ishodom postupka (82). Rezultati su pokazali da nema značajne razlike u koncentraciji 15-F_{2t}-IsoP između skupina s ostvarenom i neostvarenom trudnoćom. Isti autori zamjećuju značajno više koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u ispitanica s PCOS-om u odnosu na tubarnu neplodnost te značajno višu koncentraciju u skupini ispitanica s pobačajem. Osim toga, prosječni medijan 15-F_{2t}-IsoP u skupini ispitanica s pobačajem bio je značajno viši, što može upućivati na oštećenja na molekularnom nivou koja su negativno utjecala na daljnji razvitak embrija (82). S obzirom da je riječ o malom uzorku, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se potvrdila ta pretpostavka. Razmatrajući biljege antioksidacijske zaštite zapažene su značajno veće koncentracije vitamina E u skupini ispitanica s ostvarenom trudnoćom (96, 97). U našem istraživanju nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji vitamina E između skupina. S obzirom na to da je u svim istraživanjima isključni kriterij bio uzimanje suplemenata vitamina E, mogući uzrok neslaganja s našim rezultatima leži u vrsti prehrane ispitanica ili prisutnom oksidacijskom stresu. Naime, oba spomenuta istraživanja nisu obuhvatila određivanje biljega lipidne peroksidacije koja je izravno povezana s djelovanjem vitamina E. U istraživanju Cicek i sur. (98) uzimanje suplemenata s vitaminom E ne povećava stopu ostvarenih trudnoća kod ispitanica s idiopatskom neplodnosti. Suprotno tome, Fatemi i sur. (125) zaključuju da uzimanje vitamina E i vitamina D3 povećava stopu trudnoća kod ispitanica s PCOS-om. Uzrok neslaganja može se pripisati različitoj vrsti suplemenata i populaciji ispitanica. Povrh toga, u ovom istraživanju pronađena je značajno veća aktivnost enzima SOD u skupini ispitanica s neostvarenom trudnoćom, što je sukladno s rezultatima istraživanja u kojem su ispitanice također liječene zbog idiopatske neplodnosti

(129). Međutim, ostala istraživanja nisu utvrdila značajne razlike u aktivnosti enzima SOD između skupina ispitanica s različitim uzrocima neplodnosti (69, 77, 121). U protektivnom kontekstu, enzim superoksid-dismutaza predstavlja prvu liniju obrane i brze neutralizacije ROS-a. Veću aktivnost enzima SOD u idiopatskoj neplodnosti možemo pojasniti učinkovitim uklanjanjem slobodnih radikala, zbog čega nije došlo do oštećenja lipida. Ipak treba naglasiti ograničenje istraživanja jer se nisu određivali pokazatelji oksidacije drugih makromolekula, DNA i proteina.

Kako bi se održala redoks homeostaza, potrebno je međudjelovanje brojnih enzimskih i neenzimskih molekula antioksidacijskog djelovanja s ciljem da se održi normalan rast i sazrijevanje jajne stanice. Stoga se koncept ispitivanja samo jednog biljega čini neprikladnim. Upravo zato se ovim istraživanjem nastojala pokazati prisutnost narušene redoks ravnoteže prema oksidacijskom stresu pomoću dva biljega, od kojih se 15-F_{2t}-IsoP smatra zlatnim standardom lipidne peroksidacije. S njima usko u vezi određen je vitamin E koji ima protektivnu ulogu usmjerenu na sprečavanje lipidne peroksidacije. Također se određivala aktivnost superoksid-dismutaze jer je dio enzimskog antioksidacijskog sustava te se smatra prvom crtom obrane u neutralizaciji ROS-a. Unatoč napretku u liječenju neplodnosti još uvijek ne postoji test, odnosno skupina testova koja može predvidjeti ishod MPO postupka. S obzirom na to da je primarni cilj dobiti kvalitetan embrij koji će se uspješno implantirati i završiti trudnoćom, istraživanjem se pokušao načiniti regresijski model kojim bi se mogli predvidjeti pojedini koraci koji vode do krajnjeg ishoda, trudnoće. Pri izradi modela korištena su sva četiri biljega kojima se nastojalo definirati status redoks homeostaze. U model su također uključene opće varijable koje bi mogle utjecati na ishod, a to su vrijednosti BMI-a, status pušenja i biološka dob godine. U ovom istraživanju univarijatom regresijskom analizom niti jedan parametar nije se pokazao kvalitetnim prediktorom uspješne fertilizacije, kvalitete embrija i ostvarenja trudnoće. S obzirom na rezultate, nije primjenjivan multivarijatan regresijski model. Stoga zaključujemo da se predloženi parametri ne mogu koristiti u predviđanju ishoda MPO postupka. Korištenjem sličnog modela, Olszak-Wąsik i sur. (129) zaključili su da veća aktivnost glutation-peroksidaze u folikularnoj tekućini može poslužiti kao dobar prediktivni biljeg kvalitete embrija. Za razliku od naših rezultata, Liu i sur. (68) zaključuju da koncentracija MDA može poslužiti kao prediktivni biljeg kvalitete embrija u PCOS ispitanica. Treba naglasiti da autori ne navode omjer izgleda i interval pouzdanosti za spomenuti biljeg.

Ovo istraživanje je jedinstveno jer je uspoređivan status redoks homeostaze u folikularnoj tekućini u mPC i ciklusu OS s protokolom GnRH antagonista. U istraživanju su istovremeno analizirana dva biljega lipidne peroksidacije, MDA i 15-F_{2t}-IsoP kako bi se dokazala prisutnost i mehanizam nastanka oksidacijskog stresa. Kako bi se postigao bolji

uvid u redoks homeostazu istovremeno je određivan biljeg vitamin E kao glavni antioksidacijski čimbenik zaštite lipida te aktivnost superoksid-dismutaze kao dio sustava enzimske antioksidacijske zaštite. Rezultati prikazani u ovom radu nose informaciju o mogućem utjecaju oksidacijskog stresa na embriološke parametre i klinički ishod u idiopatskoj neplodnosti. Ostaje otvoreno pitanje za buduća istraživanja o učinku oksidacijskog stresa na druge makromolekule osim lipida, na DNA i proteine te koliko se status redoks homeostaza razlikuje u susjednim folikulima.

7. ZAKLJUČCI

Slijedom provedenog istraživanja, dobiveni rezultati upućuju na sljedeće zaključke:

- Koncentracije malondialdehida, 15-F_{2t}-izoprostana, vitamina E te aktivnost enzima superoksid-dismutaze u folikularnoj tekućini zadržavaju slične vrijednosti u sve četiri dobne skupine, iz čega možemo zaključiti da su kapaciteti antioksidacijske zaštite dovoljno učinkoviti u sprečavanju lipidne peroksidacije tijekom godina.
- Na razine biljega redoks homeostaze u folikularnoj tekućini ne utječe indeks tjelesne mase, osim u slučaju ekstremno visokih vrijednosti. U ispitanica s pretilošću oksidacijski stres očituje se povišenim koncentracijama malondialdehida i vitamina E u folikularnoj tekućini iako razlike nisu statistički značajne.
- Usporedbom biljega lipidne peroksidacije malondialdehida i 15-F_{2t}-izoprostana te antioksidansa vitamina E i aktivnosti enzima superoksid-dismutaze u folikularnoj tekućini između ispitanica koje puše cigarete i ispitanica koje ne puše cigarete zaključujemo da se biljezi lipidne peroksidacije i antioksidacijske zaštite u folikularnoj tekućini značajno se ne mijenjaju.
- Ovarijska stimulacija izaziva prooksidacijski učinak u folikularnoj tekućini koji je karakteriziran značajno višim koncentracijama malondialdehida dok se koncentracija 15-F_{2t}-izoprostana značajno ne mijenja u odnosu na modificirani prirodni ciklus. Prooksidacijsko djelovanje u ciklusu ovarijske stimulacije prati odsustvo odgovora biljega antioksidacijskog statusa, vitamina E i enzima superoksid-dismutaze.
- Status zrelosti jajne stanice ne utječe na razine malondialdehida, 15-F_{2t}-izoprostana, vitamina E i aktivnost enzima superoksid-dismutaze u folikularnoj tekućini.
- Oksidacijski stres u folikularnoj tekućini uspješno fertiliziranih oocita karakteriziran je povišenom koncentracijom malondialdehida iako se razlika nije pokazala statistički značajnom.
- U folikularnoj tekućini iz koje su potekli suboptimalno ocijenjeni embriji dominira prisutnost oksidacijskog stresa kroz povišene koncentracije malondialdehida i vitamina E iako se razlika nije pokazala statistički značajnom.
- Koncentracije biljega malondialdehida, 15-F_{2t}-izoprostana i vitamina E nisu se značajno razlikovale s obzirom na ishod postupka, za razliku od izraženije aktivnosti enzima superoksid-dismutaze što upućuje na prooksidacijsko okruženje jajnih stanica kod ispitanica s neostvarenim trudnoćama.

- Koristeći model univarijatne regresijske analize, biljezi malondialdehid, 15-F_{2t}-izoprostani, vitamin E i superoksid-dismutaza ne mogu se koristiti u predviđanju ishoda u smislu uspješnosti fertilizacije, kvalitete embrija niti ostvarenja trudnoće u 12. tjednu gestacije.

8. SAŽETAK

Staničnim metabolizmom ili djelovanjem egzogenih tvari nastaju slobodni radikali koji sudjeluju u međustaničnoj signalizaciji, a njihovo prekomjerno stvaranje oštećuje makromolekule. Cilj istraživanja bio je po prvi puta odrediti biljege lipidne peroksidacije u folikularnoj tekućini (FT) između modificiranog prirodnog ciklusa (mPC) i ciklusa s ovarijskom stimulacijom (OS) u ispitanica s idiopatskom neplodnosti. Također pokušala se ispitati razlika između razine biljega u FT 15-F_{2t}-izoprostana (15-F_{2t}-IsoP), malondialdehida (MDA), vitamina E i superoksid-dismutaze (SOD) s obzirom na godine, indeks tjelesne mase (BMI) i status pušenja te embriološke parametre i ishod liječenja. U istraživanje je uključeno 30 ispitanica u mPC i 30 ispitanica u OS ciklusu. Biljezi MDA, 15-F_{2t}-IsoP, vitamin E i enzim SOD zadržavaju slične koncentracije tijekom godina. Povišena koncentracija MDA i vitamina E upućuje na prisutnost oksidacijskog stresa u skupini ispitanica visokog BMI dok status pušenja ne mijenja značajno biljege lipidne peroksidacije u FT. Prooksidacijski učinak u FT karakteriziran je statistički značajno višom koncentracijom MDA u ovarijskoj stimulaciji. Status zrelosti jajne stanice ne utječe na razine biljega redoks homeostaze. U FT-i uspješno fertiliziranih oocita postoji trend povišene koncentracije MDA koji nije statistički značajan. Isti trend zajedno s višom koncentracijom vitamina E prisutan je u suboptimalno ocijenjenim embrijima. Izraženija aktivnost SOD upućuje na prooksidacijsko okruženje jajnih stanica kod ispitanica s neostvarenim trudnoćama. Biljezi MDA, 15-F_{2t}-IsoP, vitamin E i SOD ne mogu se koristiti u predviđanju ishoda u smislu uspješnosti fertilizacije, kvalitete embrija ili trudnoće. Ovaj doktorski rad daje doprinos sveobuhvatnijem uvidu u status redoks homeostaze u FT-i obzirom na pristup liječenja. Nastale promijene mogu kasnije utjecati na kvalitetu embrija i na ostvarenje trudnoće.

9. ABSTRACT

Assessment of F₂ isoprostane, malondialdehyde, vitamin E, and superoxide dismutase levels in follicular fluid of women with idiopathic infertility, Ivana Zec, 2024

Reactive oxygen species are products of cell metabolism or can be generated by exogenous factors. A certain amount of ROS is needed for cell signalisation but excessive amount can cause cellular injury. This study aimed to determine for the first time redox homeostasis in follicular fluid (FF) between modified natural cycle (mNC) and ovarian stimulation (OS). Women with idiopathic infertility were recruited in the study. Additionally, a comparison was made between 15-F_{2t}-isoprostane (15-F_{2t}-IsoP), malondialdehyde (MDA), vitamin E and superoxide dismutase (SOD) regarding age, BMI, smoking status, embryological parameters and treatment outcome. The study included 30 women in mNC and 30 women in OC. Ageing and smoking status does not affect concentrations of MDA, 15-F_{2t}-IsoP, vitamin E and activity of SOD. Although the differences were not statistically significant, oxidative stress is present in obesity through higher concentrations of MDA and vitamin E. Higher MDA in women with OS reflects prooxidant activity in FF. The state of oocyte maturity does not affect redox homeostasis. The trend to higher levels of MDA are present in FF from successfully fertilized oocyte but the differences are not statistically significant. The same trend with MDA and vitamin E levels is noticed in suboptimal embryos. Higher SOD activity reflects a prooxidant state in FF in the group with unsuccessful pregnancy. The levels of MDA, 15-F_{2t}-IsoP, vitamin E and SOD can not predict successful fertilization, embryo quality and pregnancy success. This study contributes to a more comprehensive insight into the status of redox homeostasis regarding the choice of treatment. Changes can also affect embryo quality and pregnancy outcomes.

10. LITERATURA

1. Cox CM, Thoma ME, Tchangalova N, Mburu G, Bornstein MJ, Johnson CL, i sur. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Open*. 2022;1-24
2. Barbieri RL. Female infertility. U: Strauss JF, Barbieri RL, Gargiulo AR. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical management. 8. izd. Philadelphia: Elsevier; 2019, str. 556-581.
3. Šimunić V. Početno istraživanje neplodnosti. U: Šimunić V i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga, 2012, str. 363-69.
4. Schubert M, Lanuza LP, Woste M, Dugas M, David Carmona F, Palomino-Morales RJ, i sur. A GWAS in Idiopathic/Unexplained Infertile Men Detects a Genomic Region Determining Follicle-Stimulating Hormone Levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022;107(8):2350–61.
5. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(2):271–85.
6. Eberhard E, Idiopathic infertility. U: John Wass AH i sur. Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes. 2 izd. Oxford: Oxford Textbooks; 2011; [pristupljeno 2023 Aug 30]. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/med/9780199235292.003.9102>.
7. The Unexplained Infertility guideline group, Romualdi D, Ata B, Bhattacharya S, Bosch E, Costello M, Gersak K, et al. Evidence-based guideline: Unexplained Infertility. Guideline of European Society of Human Reproduction and Embryology. [pristupljeno 2023 Oct 17]. 2023; Dostupno na: <https://www.eshre.eu/guideline/UI>.
8. Gudeloglu A, Brahmhatt J, Parekattil S. Definitions and epidemiology of unexplained male infertility. U: Schattman, Esteves SC, Agarwal A. Unexplained Infertility Pathophysiology Evaluation and Treatment. New York: Springer; 2015;7–12.
9. Nardo LG, Chouliaras S. Definitions and epidemiology of unexplained female infertility. U: Schattman, Esteves SC, Agarwal A. Unexplained Infertility Pathophysiology Evaluation and Treatment. New York: Springer; 2015 ;21–5.
10. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, i sur. Male infertility. *Lancet (London, England)*. 2021;397(10271):319–33.
11. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (sixth edition). Geneva: World Health Organization; 2021; [pristupljeno 2023 Oct 17]. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>.
12. Simon L, Emery B, Carrell DT. Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1166:87–105.

13. Sugihara A, Van Avermaete F, Roelant E, Punjabi U, De Neubourg D. The role of sperm DNA fragmentation testing in predicting intra-uterine insemination outcome: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2020;244:8-15.
14. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(6):951–60.
15. Homer HA. The Role of Oocyte Quality in Explaining Unexplained Infertility. *Semin Reprod Med.* 2020;38(1):21–8.
16. Zheng D, Nguyen QN, Li R, Dang VQ, Hart RJ, Mol BW. Is Intracytoplasmic Sperm Injection the Solution for all in Unexplained Infertility? *Semin Reprod Med.* 2020;38(1):36-47.
17. Hunt S, Abdallah KS, Ng E, Rombauts L, Vollenhoven B, Mol BW. Impairment of Uterine Contractility Is Associated with Unexplained Infertility. *Semin Reprod Med.* 2020;38(1):61–73.
18. Granot I, Gnainsky Y, Dekel N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. *Reproduction.* 2012;144(6):661–8.
19. Wilkinson J, Roberts SA, Showell M, Brison DR, Vail A. No common denominator: a review of outcome measures in IVF RCTs. *Hum Reprod.* 2016;31(12):2714–22.
20. Kaser DJ, Ginsburg ES, Carrell DT, Racowsky C. Assisted Reproduction. U: Strauss JF, Barbieri RL, Gargiulo AR. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical management.* 8. izd. Philadelphia: Elsevier; 2019, str.779-822.
21. Fauser BCJM. Medical Approaches to Ovarian Stimulation for Infertility. U: Strauss JF, Barbieri RL, Gargiulo AR. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical management.* 8. izd. Philadelphia: Elsevier; 2019, str.743-778.
22. Wang R, Van Eekelen R, Mochtar MH, Mol F, Van Wely M. Treatment Strategies for Unexplained Infertility. *Semin Reprod Med.* 2020;38(1):48–54.
23. Johnson LNC, Sasson IE, Sammel MD, Dokras A. Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2013;100(3):704–11.
24. Dang VQ, Vuong LN, Luu TM, Pham TD, Ho TM, Ha AN, i sur. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilisation in couples with infertility in whom the male partner has normal total sperm count and motility: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet (London, England).* 2021;397(10284):1554–63.

25. Balaban B, Brison D, Calderón G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, i sur. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26(6):1270–83.
26. Rosen M, Yang X, Marsh P, Runge A, Olivera G, Ribeiro S, i sur. Gamete and Embryo Manipulation. U: Strauss JF, Barbieri RL, Gargiulo AR. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical management*. 8. izd. Philadelphia: Elsevier; 2019, str.823-856.
27. Sies H. Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol*. 2021 May [pristupljeno 2023 Aug 30];41:101867. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101867>.
28. Nikolaidis MG, Kyparos A, Spanou C, Paschalis V, Theodorou AA, Vrabas IS. Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *J Exp Biol*. 2012;215(10):1615–25.
29. Halliwell B. Update on Reactive Species and Antioxidants Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol*. 2006;141(2):312-22.
30. Liang J, Gao Y, Feng Z, Zhang B, Na Z, Li D. Reactive oxygen species and ovarian diseases: Antioxidant strategies. *Redox Biol*. 2023 Jun [pristupljeno 2023 Oct 10];62:102659. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102659>.
31. Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453.
32. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10:49.
33. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, i sur. Reactive oxygen species level in follicular fluid - Embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod*. 2006;21(9):2403–7.
34. Elizur SE, Lebovitz O, Orvieto R, Dor J, Zan-Bar T. Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30(10):705–7.
35. Jana SK, K NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reprod Toxicol*. 2010;29(4):447–51.
36. Revelli A, Piane LD, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:40.
37. Zamah AM, Hassis ME, Albertolle ME, Williams KE. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clin Proteomics*. 2015;12(1).

38. Ambekar AS, Nirujogi RS, Srikanth SM, Chavan S, Kelkar DS, Hinduja I, i sur. Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. *J Proteomics*. 2013;87:68–77.
39. Freitas C, Neto AC, Matos L, Silva E, Ribeiro Â, Silva-Carvalho JL, i sur. Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. *J Ovarian Res*. 2017 J;10(1):1–10.
40. Poulsen L la C, Pla I, Sanchez A, Grøndahl ML, Marko-Varga G, Yding Andersen C, i sur. Progressive changes in human follicular fluid composition over the course of ovulation: quantitative proteomic analyses. *Mol Cell Endocrinol*. 2019 Sep [pristupljeno 2023 Oct 14];495:110522. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110522>
41. Benkhalifa M, Madkour A, Louanjli N, Bouamoud N, Saadani B, Kaarouch I, i sur. From global proteome profiling to single targeted molecules of follicular fluid and oocyte: contribution to embryo development and IVF outcome. *Expert Rev Proteomics*. 2015;12(4):407–23.
42. Pérez-Ruiz I, Mejjide S, Ferrando M, Larreategui Z, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. Ovarian stimulated cycles reduce protection of follicular fluid against free radicals. *Free Radic Biol Med*. 2019;145:330–5.
43. Pérez-Ruiz I, Mejjide S, Hernández M-L, Navarro R, Larreategui Z, Ferrando M, i sur. Analysis of Protein Oxidative Modifications in Follicular Fluid from Fertile Women: Natural Versus Stimulated Cycles. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(12):176.
44. Wang L, Tang J, Wang L, Tan F, Song H, Zhou J, i sur. Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *J Cell Physiol*. 2021;236(12):7966–83.
45. Aitken RJ, Bromfield EG, Gibb Z. Oxidative stress and reproductive function: The impact of oxidative stress on reproduction: a focus on gametogenesis and fertilization. *Reproduction*. 2022;164(6):F79–94.
46. Sasaki H, Hamatani T, Kamijo S, Iwai M, Kobanawa M, Ogawa S, i sur. Impact of Oxidative Stress on Age-Associated Decline in Oocyte Developmental Competence. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:811.
47. Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(5):735–51.
48. Stensen MH, Tanbo T, Storeng R, Fedorcsak P. Advanced glycation end products and their receptor contribute to ovarian ageing. *Hum Reprod*. 2014;29(1):125–34.
49. Lipke K, Kubis-Kubiak A, Piwowar A. Molecular Mechanism of Lipotoxicity as an Interesting Aspect in the Development of Pathological States—Current View of Knowledge. *Cells*. 2022;11(5):844.
50. Broughton DE, Moley KH. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertil Steril*. 2017;107(4):840–7.

51. Paszkowski T, Clarke RN, Hornstein MD. Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Hum Reprod.* 2002;17(4):921–5.
52. Kazemi A, Ramezanzadeh F, Nasr Esfahani MH, Saboor-Yaraghi AA, Nejat S, Rahimi-Foroshani A. Impact of environmental tobacco smoke exposure in women on oxidative stress in the antral follicle and assisted reproduction outcomes. *J Res Med Sci.* 2013;18(8):688.
53. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2012; 10:49.
54. Da Broi MG, de Albuquerque FO, de Andrade AZ, Cardoso RL, Jordão Junior AA, Navarro PA. Increased concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in follicular fluid of infertile women with endometriosis. *Cell Tissue Res.* 2016;366(1):231–42.
55. Zec I, Goldštajn MŠ, Kuna K, Mikuš M, Stabile G, Bianco B, i sur. Oxidative homeostasis in follicular fluid and reproductive outcomes - from bench to bedside. *Menopause Rev.* 2022;21(4):276–84.
56. Atiken RJ. Implications for fertility. *Reproduction.* 2020;159(4):R189–201.
57. Agarwal A, Parekh N, Selvam MKP, Henkel R, Shah R, Homa ST, i sur. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health.* 2019;37(3):296–312.
58. Cipak Gasparovic A, Zarkovic N, Zarkovic K, Semen K, Kaminsky D, Yelisyeyeva O, i sur. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1771–83.
59. Štefan L, Tepšić T, Zavidic T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija: uzroci i posljedice. *Medicina: glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka* 2007;43(2):84-94.
60. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014 May [pristupljeno 2023 Oct 14]; 2014:360438 Dostupno na: <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
61. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017;524:13–30.
62. Nasiri N, Moini A, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Salman-Yazdi R, Arabipour A, i sur. Oxidative Stress Statues in Serum and Follicular Fluid of Women with Endometriosis Citation. *Cell Journal(Yakhteh).* 18(4):582–7.
63. Campos Petean C, Ferriani RA, dos Reis RM, Dias de Moura M, Jordão AA, Andrea

- de Albuquerque Salles Navarro P. Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. *Fertil Steril*. 2008;90(6):2080–5.
64. Nasiri N, Moini A, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Salman-Yazdi R, Zolfaghari Z, i sur. Abdominal obesity can induce both systemic and follicular fluid oxidative stress independent from polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015;184:112–6.
65. Lu X, Wu Z, Wang M, Cheng W. Effects of vitamin C on the outcome of in vitro fertilization–embryo transfer in endometriosis: A randomized controlled study. *J Int Med Res*. 2018;46(11):4624.
66. Pekel A, Gönenç A, Öztürk Turhan N, Kafalı H. Changes of sFas and sFasL, oxidative stress markers in serum and follicular fluid of patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(2):233-41.
67. Yuksel B, Kilic S, Yilmaz N, Goktas T, Keskin U, Seven A, i sur. Obesity is not a descriptive factor for oxidative stress and viscosity in follicular fluid of in vitro fertilization patients. *Ir J Med Sci*. 2017;186(3):641–6.
68. Liu Y, Yu Z, Zhao S, Cheng L, Man Y, Gao X, i sur. Oxidative stress markers in the follicular fluid of patients with polycystic ovary syndrome correlate with a decrease in embryo quality. *J Assist Reprod Genet*. 2021;38(2):471–7.
69. Singh AK, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod Toxicol*. 2013;42:116–24.
70. Artimani T, Karimi J, Mehdizadeh M, Yavangi M, Khanlarzadeh E, Ghorbani M, i sur. Evaluation of pro-oxidant-antioxidant balance (PAB) and its association with inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(2):148–52.
71. Chattopadhyay R, Ganesh A, Samanta J, Jana SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. Effect of Follicular Fluid Oxidative Stress on Meiotic Spindle Formation in Infertile Women with Polycystic Ovarian Syndrome. *Orig Artic Gynecol Obs Invest*. 2010;69:197–202.
72. Choi YS, Cho SH, Seo SK, Park JH, Kim SH, Lee BS. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. *Reproduction*. 2015;149(2):155–62.
73. Da Broi MG, Jordão-Jr AA, Ferriani RA, Navarro PA. Oocyte oxidative DNA damage may be involved in minimal/mild endometriosis-related infertility. *Mol Reprod Dev*. 2018;85(2):128–36.
74. Prieto L, Quesada JF, Cambero O, Pacheco A, Pellicer A, Codoceo R, i sur. Analysis

- of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;98(1):126–30.
75. Collodel G, Gambera L, Stendardi A, Nerucci F, Signorini C, Pisani C, i sur. Follicular Fluid Components in Reduced Ovarian Reserve, Endometriosis, and Idiopathic Infertility. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):24.
 76. Borowiecka M, Wojsiat J, Polac I, Radwan M, Radwan P, Zbikowska HM. Oxidative stress markers in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Syst Biol Reprod Med*. 2012;58(6):301–5.
 77. Kumar S, Mishra V, Thaker R, Gor M, Perumal S, Joshi P, i sur. Role of environmental factors & oxidative stress with respect to in vitro fertilization outcome. *Indian J Med Res*. 2018;148 Suppl 1:S125.
 78. Oral O, Kutlu T, Aksoy E, Fıçıcıoğlu C, Uslu H, Tuğrul S. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. *J Assist Reprod Genet*. 2006;23(2):81–5.
 79. Milne GL, Dai Q, Jackson L, li R. The isoprostanes-25 years later. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):433-45.
 80. Halliwell B, Lee CYJ. Using Isoprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress: Some Rarely Considered Issues. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(2):145–56.
 81. Pier B, Edmonds JW, Wilson L, Arabshahi A, Moore R, Bates GW, i sur. Comprehensive profiling of prostaglandins in human ovarian follicular fluid using mass spectrometry. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2018;134:7–15.
 82. Gongdashetti K, Gupta P, Dada R, Malhotra N, Abbas A. Follicular fluid oxidative stress biomarkers and ART outcomes in PCOS women undergoing in vitro fertilization: A cross-sectional study. *Int J Reprod Biomed*. 2021;19(5):449-456.
 83. Younis A, Clower C, Nelsen D, Butler W, Carvalho A, Hok E, i sur. The relationship between pregnancy and oxidative stress markers on patients undergoing ovarian stimulations. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(10):1083–9.
 84. Lin K, Barnhart K, Shaunik A, Butts S, Fitzgerald GA, Coutifaris C. Follicular Fluid F2-isoprostanes: A Novel Assessment of Oxidative Stress in IVF Patients. *Fertil Steril*. 2005; 84: S47.
 85. Smith KA, Shepherd J, Wakil A, Kilpatrick ES, Shepherd J. A comparison of methods for the measurement of 8-isoPGF 2a : a marker of oxidative stress. *Ann Clin Biochem*. 2011;48(2):147-54.
 86. Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS, Jackson L, li R. Isoprostane Generation and Function. *Chem Rev*. 2011;111(10):5973-96.
 87. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:28.

88. Buettner GR. Superoxide Dismutase in Redox Biology: The roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11(4):341-6.
89. Seleem AK, Aziz A, Refaeey E, Shaalan D, Sherbiny Y, Badawy A. Superoxide dismutase in polycystic ovary syndrome patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(4):499-504.
90. Bausenwein J, Serke H, Eberle K, Hirrlinger J, Jogschies P, Hmeidani FA, et al. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and of catalase activity in follicular fluid of obese women. *Mol Hum Reprod.* 2009;16(2):117–24.
91. Alviggi C, Cariati F, Conforti A, De Rosa P, Vallone R, Strina I, et al. The effect of FT500 Plus® on ovarian stimulation in PCOS women. *Reprod Toxicol.* 2016;59:40–4.
92. Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: Characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(11):639–43.
93. Debbarh H, Louanjli N, Aboulmaouhib S, Jamil M, Ahbbas L, Kaarouch I, et al. Antioxidant activities and lipid peroxidation status in human follicular fluid: age-dependent change. *Zygote.* 2021;29(6):490–4.
94. Evans HM. The Pioneer History of Vitamin E. U: IGWGFH Harris RS, Wool IG, Marrian GF, Thimann KV, *Vitamins & Hormones*, Academic Press, 1962;20:379-387.
95. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, Nakagawa K, Miyazawa T. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life.* 2019;71(4):430–41.
96. Ashraf M, Mustansir F, Baqir SM, Alam F, Rehman R. Changes in vitamin E levels as a marker of female infertility. *J Pak Med Assoc.* 2020;70(10):1762–6.
97. Palini S, Benedetti S, Tagliamonte MC, De Stefani S, Primiterra M, Polli V, et al. Influence of ovarian stimulation for IVF/ICSI on the antioxidant defence system and relationship to outcome. *Reprod Biomed Online.* 2014;29(1):65–71.
98. Cicek N, Eryilmaz OG, Sarikaya E, Gulerman C, Genc Y. Vitamin E effect on controlled ovarian stimulation of unexplained infertile women. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(4):325–8.
99. Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: Follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril.* 2015;103(2):303-16.
100. Igarashi H, Takahashi T, Nagase S. Oocyte aging underlies female reproductive aging: biological mechanisms and therapeutic strategies. *Reprod Med Biol.* 2015;14(4):159–69.
101. Yuan XQ, Du YY, Liu C, Guo N, Teng XM, Hua X, et al. Phthalate metabolites and biomarkers of oxidative stress in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Sci Total Environ.* 2020;738:139834.

102. Tatone C, Carbone MC, Falone S, Aimola P, Giardinelli A, Caserta D, i sur. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(11):655–60.
103. Lintsen AME, Pasker-De Jong PCM, De Boer EJ, Burger CW, Jansen CAM, Braat DDM, i sur. Effects of subfertility cause, smoking and body weight on the success rate of IVF. *Hum Reprod.* 2005;20(7):1867-75.
104. Gupta S, Fedor J, Biedenharn K, Agarwal A. Lifestyle factors and oxidative stress in female infertility: is there an evidence base to support the linkage? *Expert Rev Obstet Gynecol.* 2013;8(6):607–24.
105. Wang L-T, Wang C-X, Sun H-L, Wang X, Li X-F, Wang Y-L, i sur. Effect of BMI on blood value of patients on HCG day with IUI treatment. *BMC Womens Health.* 2020;20(1):105.
106. Basu S. Bioactive eicosanoids: Role of prostaglandin F₂ α and F₂-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Mol Cells.* 2010;30(5):383–91.
107. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9(6):813–39.
108. Yuan XQ, Du YY, Liu C, Guo N, Teng XM, Hua X, i sur. Phthalate metabolites and biomarkers of oxidative stress in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Sci Total Environ.* 2020;738:139834.
109. Hart RJ. Physiological aspects of female fertility: Role of the environment, modern lifestyle, and genetics. *Physiol Rev.* 2016;96(3):873–909.
110. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, i sur. Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations. *Am J Epidemiol.* 2002; 156(3):274-85.
111. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, i sur. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med.* 1995;332(18):1198–203.
112. Sowers M, McConnell D, Jannausch ML, Randolph JF, Brook R, Gold EB, i sur. Oestrogen metabolites in relation to isoprostanes as a measure of oxidative stress. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68:806–13.
113. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta.* 1995;236(2):173–80.
114. Tiboni GM, Bucciarelli T, Giampietro F, Sulpizio M, Di Ilio C. Influence of cigarette smoking on vitamin E, vitamin A, β -carotene and lycopene concentrations in human pre-ovulatory follicular fluid. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004;17(3):389–93.

115. Celik E, Celik O, Kumbak B, Yilmaz E, Turkcuoglu I, Simsek Y, i sur. A comparative study on oxidative and antioxidative markers of serum and follicular fluid in GnRH agonist and antagonist cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(11):1175–83.
116. Thaker R, Mishra V, Gor M, Agarwal R, Sheth H, Kapadia P, i sur. The role of stimulation protocol, number of oocytes retrieved with respect to follicular fluid oxidative stress and IVF outcome. *Hum Fertil.* 2020;23(1):23–31.
117. Tamura H, Takasaki A, Nakamura Y, Numa F, Sugino N. A pilot study to search possible mechanisms of ultralong gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in IVF-ET patients with endometriosis. *J Ovarian Res.* 2014;7:100.
118. Wu Y-T, Wu Y, Zhang J-Y, Hou N-N, Liu A-X, Pan J-X, i sur. Preliminary proteomic analysis on the alterations in follicular fluid proteins from women undergoing natural cycles or controlled ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(3):417-27.
119. Papler TB, Bokal EV, Tacer KF, Juvan P, Klun IV, Devjak R. Differences in cumulus cells gene expression between modified natural and stimulated in vitro fertilization cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(1):79–88.
120. Agarwal A, Allamaneni SSR. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2004;9(3):338-47.
121. Pasqualotto EB, Lara LV, Salvador M, Sobreiro BP, Borges E, Pasqualotto FF. The role of enzymatic antioxidants detected in the follicular fluid and semen of infertile couples undergoing assisted reproduction. *Hum Fertil.* 2009;12(3):166–71.
122. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S, Zeev Reznick A, Ishai D, i sur. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004;82 Suppl 3:1171–6.
123. Combelles CMH, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online.* 2009;18(6):864.
124. Luddi A, Capaldo A, Focarelli R, Gori M, Morgante G, Piomboni P, i sur. Antioxidants reduce oxidative stress in follicular fluid of aged women undergoing IVF. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016;14(1):57.
125. Fatemi F, Mohammadzadeh A, Sadeghi MR, Akhondi MM, Mohammadmoradi S, Kamali K, i sur. Role of vitamin E and D3 supplementation in Intra-Cytoplasmic Sperm Injection outcomes of women with polycystic ovarian syndrome: A double blinded randomized placebo-controlled trial. *Clin Nutr ESPEN.* 2017;18:23–30.
126. Hadi Bahadori M, Hajar Sharami S, Fakor F, Milani F, Pourmarzi D, Fatemeh Dalil-Heirati S. Level of Vitamin E in Follicular Fluid and Serum and Oocyte Morphology and Embryo Quality in Patients Undergoing IVF Treatment. *J Family Reprod Health.*

2017;11(2):74-81.

127. Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod.* 1999;5(5):409-13.
128. Revelli A, Canosa S, Bergandi L, Skorokhod OA, Biasoni V, Carosso A, i sur. Oocyte polarized light microscopy, assay of specific follicular fluid metabolites, and gene expression in cumulus cells as different approaches to predict fertilization efficiency after ICSI. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017;15(1):47
129. Olszak-Wąsik K, Bednarska-Czerwińska A, Olejek A, Tukiendorf A. From “every Day” Hormonal to Oxidative Stress Biomarkers in Blood and Follicular Fluid, to Embryo Quality and Pregnancy Success? *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Nov [pristupljeno 2023 Oct 14];26;2019:1092415 Dostupno na: doi: 10.1155/2019/1092415.
130. Becatti M, Fucci R, Mannucci A, Barygina V, Mugnaini M, Criscuoli L, i sur. A Biochemical Approach to Detect Oxidative Stress in Infertile Women Undergoing Assisted Reproductive Technology Procedures. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):592.
131. Fujimoto VY, Bloom MS, Huddleston HG, Shelley WB, Ocque AJ, Browne RW. Correlations of follicular fluid oxidative stress biomarkers and enzyme activities with embryo morphology parameters during in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2011;96(6):1357–61.

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Zec, rođena je 17. 02. 1981. godine u Zagrebu, gdje je pohađala osnovnu školu i srednju školu Zdravstveno učilište, smjer: farmaceutski tehničar. Godine 2000. upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Diplomirala je 2006. godine stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije. Nakon pripravničkog staža, od 2008. godine do danas radi u Endokrinološkom laboratoriju, Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu koji 2022. postaje Odjel za endokrinološku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog zavoda za kemiju, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine položila je 2018. godine stekavši zvanje specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine. Aktivni je član Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB), Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM). Doktorski studij Biomedicine i zdravstva pri Medicinskom fakultetu upisala je 2018. godine, pod mentorstvom prof. dr. sc. Marine Šprem Goldštajn, dr. med. i prof. dr. sc. Krunoslava Kune, dr. med. Predavač je na tri tečaja trajne edukacije HKMB-a. Autor je i koautor osam znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranima u Current Contents i Web of Science Core Collection i sedam znanstvenih članaka u ostalim časopisima.