

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Lidija I. Tulić**

**OKSIDATIVNI STRES I RAVNOTEŽA  
BIOELEMENATA KOD PACIJENTKINJA  
U POSTUPKU VANTELESNOG  
OPLOĐENJA**

**doktorska disertacija**

**Beograd, 2019. godine**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE**

**Lidija I. Tulić**

**OXIDATIVE STRESS AND TRACE  
ELEMENTS BALANCE IN PATIENTS  
DURING IN VITRO FERTILIZATION  
CYCLES**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2019**

## **Mentor**

Profesor dr Snežana Vidaković  
Klinika za ginekologiju i akušerstvo  
Klinički Centar Srbije, Beograd  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

## **Komentor**

Profesor dr sc Zorica Bulat  
Katedra za toksikologiju  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

## **Članovi komisije**

1. Profesor dr Mladenko Vasiljević, predsednik komisije  
Klinika za ginekologiju i akušerstvo  
Narodni front  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

2. Profesor dr Svetlana Spremović Rađenović  
Klinika za ginekologiju i akušerstvo  
Klinički Centar Srbije, Beograd  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

3. Profesor dr Jasmina Popović  
Klinika za ginekologiju i akušerstvo  
Klinički Centar Niš,  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## ZAHVALNOST

Neizmerno se zahvaljujem svojoj porodici na nesebičnoj ljubavi, podršci i razumevanju. Veliko hvala mojim roditeljima Radi i Ivanu koji su me doveli do mesta na kome se u ovom trenutku nalazim i naučili me pravim životnim vrednostima. Hvala mom bratu Filipu jer me je naučio da najjednostavnije stvari znače najviše. Posebno sam zahvalna svom bratu Viktoru i njegovoj supruzi Mileni na korisnim savetima, podršci, vremenu i strpljenju. Hvala mom dragom Franetu jer je uvek uz mene.

Zahvaljujem se profesorki Snežani Vidaković, mom mentoru, za podršku i pomoć.

Zahvaljujem se profesorki Zorici Bulat, mom komentoru, za dragocene savete, smernice i strpljenje.

Posebnu zahvalnost dugujem profesoru Aleksandru Stefanoviću na svesrdnoj pomoći, razumevanju i podršci.

Zahvaljujem se profesoru Mladenku Vasiljeviću, profesorki Svetlani Spremović Rađenović i profesorki Jasmini Popović za pomoć i podršku.

Hvala docentkinji Marijani Ćurčić na kvalitetnoj obradi biohemijskih analiza, bez kojih se ovo istraživanje ne bi moglo sprovesti i završiti.

Želim da zahvalim mojoj prijateljici i kolegici dr Željki Rašlić i gospođi Milici Rašlić za podstrek i savete.

Posebno se zahvaljujem bobicama sa odeljenja Asistiranih reproduktivnih tehnologija, Mijrani Podgorac, Ireni Cvetić, Adrijani Bjelobrk i Andrijani Minić za pomoć prilikom svih mojih istraživanja, kao i za prijateljsku atmosferu koju mi pružaju u svakodnevnem radu.

Hvala mojim prijateljima što su sve ovo vreme bili uz mene.

## Oksidativni stres i ravnoteža bioelemenata kod pacijenata u postupku vantelesnog oplodjenja

### SAŽETAK

**Uvod:** Oksidativni stres dešava se usled neuravnoteženog odnosa pro-oksidanata i antioksidanata u prilog poslednjih. Odnos može biti poremećen zbog povećane koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i/ili umanjene antioksidativne odbrane. Normalne fiziološke funkcije, uključujući proces signalizacije ćelija, proliferacije i diferencijacije, zavise od prisustva određenih koncentracija ROS. U reproduktivnom traktu, fiziološki nivoi ROS neophodni su ne samo za ovulaciju, već i za interakciju oocita-spermatozoid, fertilizaciju, implantaciju i rani razvoj embriona. Ipak, povećana produkcija ROS može da ošteti prirodnu antioksidativnu odbranu organizma, remeteći mikrosredinu u reproduktivnom traktu i normalne fiziološke reakcije. Razumevanje uloge ROS u ženskom infertilitetu i dalje je nepotpuno. Činjenica da su oksidativni i antioksidativni sistem prisutni u različitim ženskim reproduktivnim tkivima sugeriše da infertilitet i određenja reproduktivna oboljenja mogu biti uzrokovana, makar delimično, oksidativnim stresom. Već godinama se sve više smatra da oksidativni stres (OS) ima negativan uticaj na reproduktivne sposobnosti i muškaraca i žena. Doprinos OS patogenezi infertiliteta sve se obimnije ispituje u oblasti muškog infertiliteta, posebno u pogledu uticaja na različite aspekte kvaliteta spermatozoida.

**Cilj:** Ciljevi ove studije bili su da se kod pacijenata uključenih u postupak VTO ispita uticaj različitih protokola kontrolisane ovarijalne stimulacije (KOS), doze gonadotropina, promene koncentracija parametara OS pre stimulacije i posle stimulacije na ishod IVF postupka. Takođe smo ispitivali povezanost promene koncentracije parametara oksidativnog stresa, poremećaja ravnoteže bioelemenata i uticaj toksičnih metala kod žena na ishod IVF postupka kod žena, dok smo kod muških partnera ispitivali povezanosti promene koncentracija parametara oksidativnog stresa, poremećaja ravnoteže bioelemenata i uticaj toksičnih metala sa parametrima spermograma i ispitivali uticaj parametara spermograma na ishod postupka.

**Metod:** Istraživanje je obuhvatalo 107 žena i 52 muškarca, uključene u postupak vantelesnog oplođenja (VTO) na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Klinikog centra Srbije u periodu od januara 2014. godine do decembra 2014. godine. Ispitivane pacijentkinje bile su podeljene u tri grupe. Prvu grupu sačinjavalo je 58 pacijentkinja sa primenjenim kratkim protokolom KOS. Drugu grupu činilo je 18 pacijentkinja sa primenjenim kratkim protokolom KOS koje su imale pretretman sa kontraceptivima. U trećoj grupi bilo je 24 pacijentkinje sa primenjenim dugim protokolom KOS.

Ispitivanje kod muškaraca bilo je spovedeno u androloškoj laboratoriji Klinike za Urologiju, Kliničkog centra Srbije. Uzorak ejakulata koji se analizirao dobijen je posle 48-72 h apsintencije, u istoj laboratoriji. Pacijenti su bili podeljeni u dve grupe, grupu sa normalnim nalazom i grupu sa patološkim nalazom spermograma.

Pacijentkinjama u svakoj grupi je uzimana krv između drugog i četvrtog dana prethodnog ciklusa, pre uključivanja u postupak KOS, kada se inače radi i bazalni hormonski status. Prvo uzimanje krvi i seruma ujedno je i kontrolna grupa. Drugo uzimanje obavljeno je na dan administracije HCG, tzv "stop injekcije". Kod muškaraca je uzimana krv kada je i pacijentkinjama uzet prvi uzorak krvi, odnosno pre uključivanja u postupak.

Određivani su sledeći parametri oksidativnog stresa: SOD, MDA, -SH grupe, zatim sledeći bioelementu bakar (Cu), cink (Zn), selena (Se) i magnezijum (Mg), kao i toksični metali: kadmijum (Cd), arsen (As), živa (Hg) i olovo (Pb).

Za statističku obradu rezultata korišćen je Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) ver. 22 program.

**Rezultati:** Utvrđeno je da razlika u godinama starosti ( $p=0,002$ ), koncentracijama FSH ( $p=0,041$ ) i AMH ( $p=0,014$ ), kao i u broju jajnih ćelija ( $p<0,001$ ), kvalitetu jajnih ćelija ( $p=0,001$ ) i broju fertilisanih jajnih ćelija ( $p=0,009$ ) između žena na različitim protokolima stimulacije. Nije uočena statistički značajna razlika u stopi porođaja između žena sa različitim protokolima stimulacije ( $p=0,618$ ;  $\chi^2$  test). Stopa pobačaja takođe je bila slična.

Dokazana je statistički značajna razlika u aktivnosti SOD ( $p < 0,001$ ), koncentracijama MDA ( $p < 0,001$ ) i -SH grupa ( $p < 0,001$ ) pre i posle stimulacije, ali nije bilo značajne razlike u parametrima OS između žena sa različitim protokolima stimulacije.

Kada su poređene pacijentkinje sa nižim i višim primenjenim dozama GT, dokazana je statistički značajna razlika u vrednostima AMH između dve ispitivane grupe ( $p = 0,021$ ). Žene sa niskim i visokim dozama gonadotropina nisu imale statistički značajno različit broj jajnih ćelija, niti različitu stopu fertilizacije. Stopa trudnoća, pobačaja i porođaja bila je slična između dve grupe. Nije dokazana razlika u aktivnosti SOD ( $p = 0,286$ ), vrednostima MDA ( $p = 0,600$ ) i -SH grupa ( $p = 0,061$ ) između ispitivanih grupa.

Utvrđena je je statistički značajna razlika u dozi gonadotropina između grupe žena sa OS i žena bez OS ( $p = 0,021$ ). Nije bilo razlike u stopi trudnoća između dve grupe ( $p = 0,701$ ). Procenat porođaja ( $p = 0,629$ ) bio je sličan u obe grupe. Procenat pobačaja i biohemijskih trudnoća kod žena bez OS bio je skoro identičan u odnosu na žene sa OS ( $p = 0,478$ ,  $p = 0,176$ ;  $\chi^2$  test). Međutim, procenat pobačaja bio je značajno veći u grupi sa prisutnim OS posle stimulacije, dok je procenat porođaja je bio značajno veći u grupi žena bez OS u odnosu na žene sa OS posle stimulacije ( $p = 0,021$ ).

Ispitivane su koncentracije bioelemenata i toksičnih metala kod pacijentkinja, kao i njihov uticaj na različite parametre. Prosečne vrednosti magnezijuma (Mg) bile su niže kod trudnih pacijentkinja ( $p = 0,009$ ), kao i koncentracije arsena (As) ( $p = 0,050$ ) i olova (Pb) ( $p = 0,034$ ) u odnosu na ispitanice sa negativnim ishodom. Pokazana je direktna značajna povezanost viših vrednosti Cu sa višim dozama GT, zatim obrnuta statistički značajna korelacija nižih vrednosti Pb sa višim dozama GT, direktna statistički značajna korelacija viših vrednosti Cu sa većim brojem fertilisanih jajnih ćelija. Što se tiče stope fertilizacije, više stope fertilizacije koreliraju sa nižim vrednostima Mg, Zn, Se Hg i Pb, ali ne statistički značajno. Kada su poređeni bioelemenati i teški metali sa ishodom postupka dokazana je statistički značajna korelacija ishoda i magnezijuma - pozitivan ishod povezan sa nižim vrednostima Mg dok su sa negativnim ishodom povezane više vrednosti Pb i Cd. Dokazana je statistički značajna korelacija ishoda trudnoće i Mg, Cd i Pb. Porođaji su bili u korelaciji sa nižim vrednostima Mg i sa nižim vrednostima Cd, dok su pobačaji u korelaciji sa nižim vrednostima Pb. Multivarijantni prediktori pozitivnog ishoda su starost

ispitanica ispod 35 godina, viša doza gonadotropina, embrioni A i B, kao i niže koncentracije Mg i Pb.

Ispitivana je promena parametara oksidativnog statusa u zavisnosti od nalaza spermograma i vrednosti su upoređene u odnosu na grupu sa normospermijom. Nije dokazana statistički značajna razlika između grupa ni za jedan ispitivani parametar. Takođe smo analizirali vrednosti bioelemenata između muškraca sa normospermijom i sa ostalim nalazima spermograma i dokazana je statistički značajna razlika samo u koncentraciji Mg između NO pacijenata i pacijenata sa oligospermijom. Vrednosti teških metala upoređeni su između pacijenata sa različitim nalazima spermograma i nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa.

Nije pronađena statistički značajna razlika u broju fertilisanih jajnih ćelija i stopi fertilizacije kod partnerki ispitivanih muškaraca sa normospermijom i ostalim nalazima spermograma. Trudnoća je zabeležena kod 40% partnerki ispitanika u grupi sa NO, a u grupi sa ostalim nalazima spermograma 44,4%. Razlika nije statistički značajna  $p=0,756$ .

Kod 18 parova je detektovan pozitivan ishod odnosno trudnoća. Kod 83,3% (10/12) parova gde su muškarci imali dijagnozu NS ishod trudnoće je bio porođaj. Kod 62,5% (5/8) parova gde su muškarci imali ostale dijagnoze ishod je bio porođaj i to je bilo značajno manje u odnosu na prethodnu grupu ( $p=0,034$ ). Kada smo poredili broj fertilisanih jajnih ćelija i stopu fertilizacije partnerki muškaraca sa NO i ostalim nalazima spermograma nismo pronašli statistički značajna razlika, osim kod partnerki muškaraca koji su imali nalaz asthenospermije zabeležena je statistički značajno niža stopa fertilizacije u odnosu na partnerke muškaraca sa normospermijom ( $p=0,034$ ). Dokazana je statistički značajna razlika u porođajima između ispitivanih grupa sa NO i oligospermijom ( $p=0,013$ ).

**Zaključak:** Nismo našli razliku između primenjenog protokola stimulacije kao ni između primenjenih različitih doza gonadotropina u odnosu na kvalitet embriona i ishod IVF postupka. Postoji statistički značajna razlika u parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite pre i posle kontrolisane ovarijalne stimulacije. Prisustvo OS pre početka stimulacije ne utiče značajno na ishod IVF postupka, dok prisustvo oksidativnog stresa posle stimulacije utiče na ishod IVF postupka, odnosno, smanjena je stopa



porođaja, a povećane su stope pobačaja i biohemijskih trudnoća. Pacijentkinje kod kojih je došlo do trudnoće imale su niže koncentracije As i Pb, dok je kod žena kod kojih nije došlo do trudnoće bila veća koncentracija Pb i Cd, ukazujući na negativan uticaj teških metala na IVF postupak. Što se tiče bioelemenata, pacijentkinje kod kojih je došlo do trudnoće imale su niže koncentracije Mg. Nismo našli povezanost između parametara OS, bioelemenata i toksičnih metala i nalaza spermograma, ali je stopa porođaja veća je kod nalaza normospermije u poređenju sa oligospermijom, astenospermijom i teratospermijom.

**Ključne reči:** oksidativni stres, bioelementi, teški metali, IVF

**Naučna oblast:** Ginekologija i akušerstvo

**Uža naučna oblast:** Humana reprodukcija

## **Oxidative stress and trace elements balance in patients during in vitro fertilization cycles**

### **ABSTRACT**

**Background:** Oxidative stress occurs due to the unbalanced relationship pro-oxidants and antioxidants in favor of the latter. The relationship can be disrupted due to the increased concentration of reactive oxygen species (ROS) and / or reduced antioxidant defense. Normal physiological functions, including the process of cell signaling, proliferation and differentiation, depend on the presence of certain concentrations of ROS. In the reproductive tract, physiological levels of ROS are essential not only for ovulation, but also for oocyte-sperm interaction, fertilization, implantation and early embryo development. However, the increased production of ROS can damage the body's natural antioxidant defenses, disrupting microenvironment in the reproductive tract and normal physiological reactions. Understanding the role of ROS in the female and male infertility is still incomplete. The fact that the oxidative stress and antioxidant system are present in a different female reproductive tissues suggests that infertility and other reproductive disorders can be caused, at least in part, by oxidative stress. It is considered that oxidative stress (OS) has a negative impact on the reproductive abilities of both men and women. Contribution of OS in pathogenesis of infertility is extensively investigated in the field of male infertility, particularly in terms of impact on different aspects of sperm quality.

**Objective:** The aims of this study were to investigate the effect of different protocols of controlled ovarian stimulation (COS), doses of gonadotropins, changes in OS parameters OS prior to stimulation and after stimulation on IVF outcome. We also examined the association between the changes of OS parameters and trace elements in women on IVF outcome in women, while on male partners we examined the association between oxidative stress parameters and trace elements and semen parameters as well as the influence of semen parameters on IVF outcome.

**Design and Methods:** The study included 107 consecutive women and 52 men involved in the process of in vitro fertilization (IVF) at the Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Center of Serbia. Women were divided into three groups. The first

group consisted of 58 patients with short protocol of ovarian stimulation. The second group consisted of 18 patients with short protocol who had pretreatment with contraceptives. In the third group there were 24 patients with a long protocol of ovarian stimulation.

Male patients were divided into two groups, one group with normal and one group with abnormal semen analysis. Serum samples were obtained before the commencement of stimulation in their partners.

Serum samples were obtained between second and fourth day of the cycle. The first serum sample was control. The second samples were obtained on the day of HCG administration.

The following parameters of oxidative stress were examined: SOD, MDA, -SH groups, then the trace elements: copper (Cu), zinc (Zn), selenium (Se) and magnesium (Mg), and heavy metals: cadmium (Cd), mercury (Hg), arsenic (As) and lead (Pb).

For statistical analysis of the results was used Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) ver. 22 program.

**Results:** We determined significant difference in age ( $p = 0.002$ ), FSH concentrations ( $p = 0.041$ ) and AMH ( $p = 0.014$ ), as well as the number of oocytes ( $p < 0.001$ ), the quality of oocytes ( $p = 0.001$ ) and the number fertilized oocytes ( $p = 0.009$ ) between women in different protocols of ovarian stimulation. There was no statistically significant difference in the rate of births among women with different stimulation protocols ( $p = 0.618$ ). Miscarriage rate was similar between groups. There was significant difference in SOD activity ( $p < 0.001$ ) concentrations of MDA ( $p < 0.001$ ) and -SH groups ( $p < 0.001$ ) before and after stimulation, but there was no significant difference in the parameters of OS between women with different stimulation protocols.

When we compared patients with lower and higher doses of GT, we demonstrated a statistically significant difference in the values of AMH between the two groups ( $p = 0.021$ ). Women with low and high doses of gonadotropins did not have significantly different number of oocytes and fertilization rate. The rate of pregnancy, miscarriage and childbirth was similar between the two groups. There was no differences in SOD activity

( $p = 0.286$ ), the values of MDA ( $p = 0.600$ ) and the -SH groups ( $p = 0.061$ ) between the groups. There was a statistically significant difference in the dose of gonadotropin between the group of women with and without OS ( $p = 0.021$ ). There was no difference in the pregnancy rates between two groups ( $p = 0.701$ ). The percentage of births ( $p = 0.629$ ) was similar in both groups. Percentage of miscarriage and biochemical pregnancy in women without OS was almost identical as compared with those having OS ( $p = 0.478$ ,  $p = 0.176$ ). However, the percentage of miscarriage was significantly higher in the group presenting the OS after stimulation, while the percentage of births was significantly higher in women with no OS compared to women with the OS after stimulation ( $p = 0.021$ ).

When we compared mean concentrations of toxic metals and trace elements in IVF patients, with the outcome of IVF procedure, in patients who achieved pregnancy we found significantly lower mean concentrations of Mg ( $p=0.009$ ), as well as As ( $p=0.050$ ) and Pb ( $p=0.034$ ). Mean concentrations of Cd were higher in patients who failed to achieve pregnancy. We found direct significant correlation of higher Cu concentrations and higher GT dose, but also of lower Pb concentrations and higher GT dose. There was a significant correlation between higher Cu concentrations and a higher number of fertilized oocytes. Concerning fertilization rate, there was a correlation with lower concentrations of Mg, Zn, Se, Hg and Pb, but not significant. There was a significant correlation between the positive outcome of IVF procedure and the lower concentrations of Mg and negative outcome and higher concentrations of Pb and Cd. Concerning the outcome of pregnancy, patients who had delivery had the correlation with lower Mg and Cd concentrations, while there was a significant correlation between miscarriages and higher concentrations of Pb. Multivariate predictors of positive outcome were age less than 35 years, higher gonadotropin dose, A and B quality of embryos, as well as lower concentrations of Mg and Pb.

The change of OS parameters in men were compared between group with normospermia and all other findings. There was no significant difference between groups for any test parameter. We also analyzed the trace element values among men with normospermia and other findings and demonstrated a statistically significant difference only in the concentration of Mg between the normospermia patients and patients with oligospermia.

The values of heavy metals were compared between patients with different findings of semen and there was no statistically significant difference between the two groups. There was no statistically significant difference in the number of fertilized oocytes and fertilization rate between groups. Pregnancy was observed in 40% of patients in the group with NS, while 44.4% in other findings. The difference was not statistically significant  $p = 0.756$ . There was significant difference between normospermia and other findings in delivery rate ( $p = 0.034$ ). When we compared the number of fertilized oocytes and fertilization rate there was no significant difference between men with NS and men with other findings, except for asthenospermia where there was statistically significantly lower rate of fertilization in relation to men with NO ( $p = 0.034$ ). Also there was statistically significant difference in birth rates between the group with NS and oligospermia ( $p = 0.013$ ).

**Conclusion:** We found no difference between the applied stimulation protocols as well as between the different doses of gonadotropins in relation to the outcome of IVF. There was a statistically significant difference in the parameters of oxidative stress and antioxidative parameters before and after stimulation. The presence of the OS before the start of stimulation does not significantly affect the outcome of IVF, while the presence of oxidative stress after stimulation affect the outcome of IVF procedure, i.e. reduced the rate of childbirth, and increased rates of miscarriages and biochemical pregnancy. Patients who were pregnant had lower concentrations of As and Pb, while nonpregnant women had higher concentrations of Pb and Cd, indicating a possible negative impact of toxic metals on IVF outcome. Concerning trace elements, patients who were pregnant had lower concentrations of Mg. Association between OS parameters, bioelements and heavy metals and findings of semen was not found, but the rate of births was higher in NS compared to oligospermia, asthenospermia and teratospermia.

**Key words:** oxidative stress, trace elements, toxic metals, IVF

**Science Field:** Gynecology and Obstetrics

**Major in:** Human Reproduction

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. OKSIDATIVNI STRES .....	1
1.2. REAKTIVNE HEMIJSKE VRSTE - SLOBODNI RADIKALI.....	1
1.3. FIZIOLOŠKA ULOGA SLOBODNIH RADIKALA.....	3
1.3.1. Fagocitoza.....	3
1.3.2. Signalna transdukcija.....	3
1.3.3. Apoptoza.....	3
1.4. TOKSIČNI EFEKTI SLOBODNIH RADIKALA.....	4
1.4.1. Oksidativne i nitrozativne promene na lipidima .....	4
1.4.2. Oksidativne i nitrozativne promene na proteinima .....	5
1.4.3. Oksidativne i nitrozativne promene na DNK .....	5
1.5. ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA .....	5
1.6. MEHANIZMI DEJSTVA ANTIOKSIDANATA.....	7
1.6.1. Prevencija stvaranja slobodnih radikala .....	7
1.6.2. Neutralizacija stvorenih slobodnih radikala .....	7
1.6.2.1. Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite.....	7
1.6.2.2. Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite.....	8
1.6.3. Popravka i <i>de novo</i> sinteza oksdisanih molekula .....	8
1.7. OKSIDATIVNI STRES I REPRODUKCIJA.....	8
1.7.1 Uloga ROS u ženskom reproduktivnom traktu .....	9
1.7.2. Poreklo ROS u ženskom reproductivnom traktu.....	10
1.8. ROS I MUŠKI INFERTILITET .....	14
1.9. OKSIDATIVNI STRES I ASISTIRANA REPRODUKCIJA .....	17
1.10. BIOELEMENTI I TOKSIČNI METALI .....	18
1.10.1. Bioelementi.....	19
1.10.2. Toksični metali .....	20
1.11. BIOELEMENTI, TOKSIČNI METALI I INFERTILITET .....	22

<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIJAL I METOD RADA.....</b>	<b>26</b>
3.1. Ispitivana populacija.....	26
3.2. Protokoli stimulacije.....	27
3.3. Monitoring.....	28
3.4. Metodologija ispitivanja.....	28
3.4.1. Biohemijske analize.....	28
3.4.2. Određivanje parametara oksidativnog stresa.....	29
3.4.2.1. <i>Određivanje koncentracije proteina</i> .....	30
3.4.2.2. <i>Određivanje koncentracije malondialdehida</i> .....	30
3.4.2.3. <i>Određivanje aktivnosti ukupne superoksid-dismutaze</i> .....	30
3.4.3.4. <i>Određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa</i> .....	30
3.4.3. Određivanje bioeleminata i teških metala.....	31
3.5. Statistička obrada rezultata.....	31
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
4.1. PROTOKOLI KONTROLISANE OVARIJALNE STIMULACIJE I OKSIDATIVNI STRES.....	36
4.2. DOZA GONADOTROPINA I OKSIDATIVNI STRES.....	46
4.3. KONCENTRACIJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA PRE I POSLE STIMULACIJE.....	53
4.4. BIOELEMENTI I TOKSIČNI METALI KOD ISPITIVANIH ŽENA.....	58
4.5. OKSIDATIVNI STRES, BIOELEMENTI I TOKSIČNI METALI KOD ISPITIVANIH MUŠARACA.....	67
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>76</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>91</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>92</b>

# 1. UVOD

## 1.1. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres (OS) definisan je još 1985. godine, kao poremećaj odnosa slobodnih radikala i antioksidanata usled čega dolazi do oštećenja ćelijskih makromolekula: proteina, lipida, ugljenih hidrata i DNK (1). Odnos može biti poremećen zbog povećanog stvaranja slobodnih radikala i/ili umanjene antioksidativne odbrane (2,3). Svi oblici života održavaju redukujuće okruženje u svojim ćelijama, pomoću enzima koji konstantno dovode metaboličku energiju, te tokom metaboličkih procesa dolazi do stvaranja slobodnih radikala, koji se uključuju u uobičajene biološke procese, signalizaciju ćelija, proliferaciju i diferencijaciju (4,5). Poremećaji normalnog redoks stanja mogu da uzrokuju toksične efekte, odnosno nastanak oksidativnog stresa, putem povećanog stvaranja ili neadekvatnog uklanjanja slobodnih radikala, koji oštećuju sve klase biomolekula (proteine, lipide, hromatinski materijal) ili pak menjaju signalnu transdukciju i ekspresiju gena (6,7). Efekti OS zavise od razmere ovih promena, od mogućnosti ćelije da prevaziđe manje smetnje i ponovo stekne svoje originalno stanje. Slobodni radikali prema tome mogu imati fiziološku ili patološku ulogu u organizmu.

## 1.2. REAKTIVNE HEMIJSKE VRSTE - SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali (SR) definišu se kao bilo koji atom ili molekul koji sadrži jedan ili više neuparenih elektrona (8). Usled težnje da spare neuparen elektron, u reakciji sa donatorom elektrona, redukuju se i gube karakter slobodnih radikala, a substrat se oksidiše i postaje SR druge generacije i otpočinje lanac radikalskih reakcija, koji ima osobinu prostornog i vremenskog širenja uz pojačavanje efekta (9).

U organizmu se slobodni radikali stvaraju:

- u fiziološkim uslovima tokom: procesa oksidativne fosforilacije, oksidoredukcije, autooksidacije brojnih malih molekula;
- u inflamaciji: tokom procesa fagocitoze;
- u nekim bolestima: autoimune bolesti, neurodegenerativne, maligne, kardiovaskularne, profesionalna oboljenja radnika usled dejstva toksičnih supstanci;



- u različitim nefiziološkim uslovima: ishemija, hipoksija;
- tokom metabolisanja hrane,
- biotransformacijom lekova,
- pri ekspoziciji određenim toksičnim supstancama,
- pri pojačanoj fizičkoj aktivnosti (9).

U literaturi se umesto termina slobodni radikali sve više koristi termin reaktivne vrste (RS) i obuhvata sve klase jedinjenja elektrofilnog karaktera visoke reaktivnosti. Po hemijskoj strukturi reaktivne vrste mogu biti molekuli ili joni. U zavisnosti od toga koji je atom u aktivnom centru RS, one se dele na: reaktivne vrste sa kiseonikom (ROS), azotom (RNS), ugljenikom (RCS) i sumporom (RSS).

Slobodni radikali kiseonika nastaju procesom oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Od ukupno unetog molekularnog kiseonika ( $O_2$ ), 90% dospeva u mitohondrije, te se odvija četvoroelektronska redukcija  $O_2$  do  $H_2O$ , a oslobođena energija se koristi za sintezu adenozin trifosfata (ATP). Slobodni radikali se stvaraju od 2% kiseonika koji ne podleže potpunoj redukciji do  $H_2O$  i nastaju: hidroperoksilni radikal  $HO_2\cdot$ , superoksidni radikal  $O_2^-$ , vodonik peroksid  $H_2O_2$ , čijom redukcijom nastaje hidroskilni radikal  $HO\cdot$  itd (10).

Što se tiče slobodnih radikala azota, azot monoksid (NO) nastaje oksidacijom L-arginina i u fiziološkim uslovima kontroliše različite ćelijske procese: tonus krvnih sudova i mišića, adheziju i agregaciju trombocita, učestvuje u neuroendokrinoj regulaciji; reguliše glad, bol i san (11-14). Takođe učestvuje u izvesnim patofiziološkim procesima (15). Azot monoksid postoji u nekoliko hemijskih formi (nitroksil anjon ( $NO^-$ ), nitroksil radikal ( $NO\cdot$ ), nitrozonijum jon ( $NO^+$ )). U endotelnim ćelijama i makrofagima azotmonoksidni radikal reaguje sa superoksidnim anjonom i gradi visoko reaktivno jedinjenje peroksinitrit. Protonovanjem peroksinitrita nastaje peroksinitritna kiselina ( $ONOOH$ ) koja je vrlo nestabilna i njeni degradacioni produkti,  $OH\cdot$  i  $NO_2^-$  - azot dioksid radikal, vrlo aktivni radikali, doprinose sveukupnom citotoksičnom efektu (16).

### **1.3. FIZIOLOŠKA ULOGA SLOBODNIH RADIKALA**

Delovanje slobodnih radikala ima i odbrambenu i regulacionu ulogu u organizmu. Osnovne fiziološke funkcije slobodnih radikala su fagocitoza, signalna transdukcija i apoptoza.

#### **1.3.1. Fagocitoza**

Fagocitoza je proces neutralizacije mikroorganizama u kome stvaranje slobodnih radikala igra značajnu ulogu. Kada se mikroorganizam veže za receptore u fagocitima i započne proces ingestije, dolazi do aktivacije nekoliko enzima. Jedan od njih je NADPH oksidaza, koji prevodi molekularni kiseonik u superoksidni anjon i slobodne radikale, koji su toksični za ingestirane mikroorganizme (17).

#### **1.3.2. Signalna transdukcija**

Signalna transdukcija predstavlja prevođenje signala sa površine ćelije u njenu unutrašnjost (18). Tokom prenosa informacija do ciljnih molekula, slobodni radikali pokreću, prenose i/ili modifikuju ćelijski odgovor i tako su uključeni u različite signalne puteve (19). Oksidanti u svojstvu sekundarnih glasnika ostvaruju svoje fiziološko dejstvo modifikacijom prenosa signala, prevođenjem sekundarnih u tercijerne glasnike ili pokretanjem procesa signalne transdukcije (17,19). ROS su idealni unutarćelijski glasnici jer su visoko reaktivni i veoma difuzibilni molekuli.

#### **1.3.3. Apoptoza**

Apoptoza je oblik programirane ćelijske smrti koja je značajna u razvoju i homeostazi višecelijskih organizama, a čiji je krajni cilj razgradnja oštećenih ćelija (20,21). Programiranu ćelijsku smrt mogu da indukuju fiziološki aktivatori: faktor nekroze tumora (TNF), transformišući faktor rasta  $\beta$ , neurotransmiteri, kalcijum, glukokortikoidi itd; zatim, aktivatori nastali zbog oštećenja: virusna infekcija, bakterijski toksini, slobodni radikali, tumorski supresori; terapijski agensi kao što su hemioterapeutici, gama i UV zračenje i toksična jedinjenja: etanol i  $\beta$ -amiloid peptid (4). Takođe, ćelijski receptori mogu da budu uključeni u process apoptoze: epidermalni faktor rast i faktor rasta trombocita, receptor faktora nekroze tumora. Jedan od stimulusa oslobađanja proapoptotičnih faktora je i oksidativni stres.

## 1.4. TOKSIČNI EFEKTI SLOBODNIH RADIKALA

Kada se naruši redoks homeostaza ćelije, razvija se oksidativni stres, a koji će tip oštećenja biomolekula prevagnuti pod dejstvom slobodnih radikala, oksidativni ili nitrozativni, zavisi od vrste slobodnih radikala (ROS ili RNS). Oksidativni i nitrozativni stres kao mehanizmi toksičnosti su predmet interesovanja istraživača zbog mogućnosti oštećenja tkivnih i ćelijskih komponenti (22). Prema vrsti molekula koji se oštećuju delovanjem slobodnih radikala definisane su tri osnovne reakcije koje dovode do strukturnih i funkcionalnih promena u ćelijama: lipidna peroksidacija, oksidacija proteina i oksidativna modifikacija DNK.

### 1.4.1. Oksidativne i nitrozativne promene na lipidima

Ćelijska membrana sadrži do 40% lipida. Polinezasićene masne kiseline su ciljno mesto za delovanje SR kada se razvija proces lipidne peroksidacije (LP) bez oslobađanja energije, što dovodi do poremećaja funkcije membrane kao barijere, slabljenja interakcije lipida i proteina, povećane katalitičke aktivnosti membranskih proteina i smanjenje njihove termostabilnosti. Interakcije RNS sa lipidima podrazumevaju procese oksidacije i nitrovanja. Oba procesa mogu i da inhibiraju i da pospeše proces LP (23). Produkti lipidne peroksidacije imaju dug poluživot, veoma su reaktivni, dovode do inflamacije, potencijalno su toksični, mutageni i karcinogeni (24-29). Ipak, imaju i neke biološke funkcije: učestvuju u intracelularnom prenošenju signala, regulaciji genske ekspresije, aktivaciji transkriptora i faktora rasta (30-33). Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) protiče kroz fazu inicijacije, kada se pokreću lančane reakcije i stvaraju lipidni radikali, zatim propagacije kada mogu da reaguju sa drugim masnim kiselinama, proteinima i nukleinskim kiselinama, a proizvodi koji mogu nastati su: aldehidi, konjugovani dieni, ketoni, aktivni radikali, malondialdehid itd. Malondialdehid (MDA), terminalni produkt oksidativnog oštećenja PNMK, unakrsno se vezuje za proteine i fosfolipide membrane, čime se povećava oksidativno oštećenje biomolekula i priznat je kao validan marker LP. Merenje malondialdehida kao produkta lipidne peroksidacije najčešće se koristi kao pokazatelj inteziteta oksidativnog stresa (34-36). Istraživanja pokazuju da je nivo MDA povišen kod različitih karcinoma- pluća, dojke, želuca, grlića materice, melanoma, zatim kod preeklampsije, kod pacijenata sa aterosklerozom, dijabetesom, oboljenjima jetre, pacijenata sa Alchajmerovom bolešću, kao i kod pušača (37-43).

#### **1.4.2. Oksidativne i nitrozativne promene na proteinima**

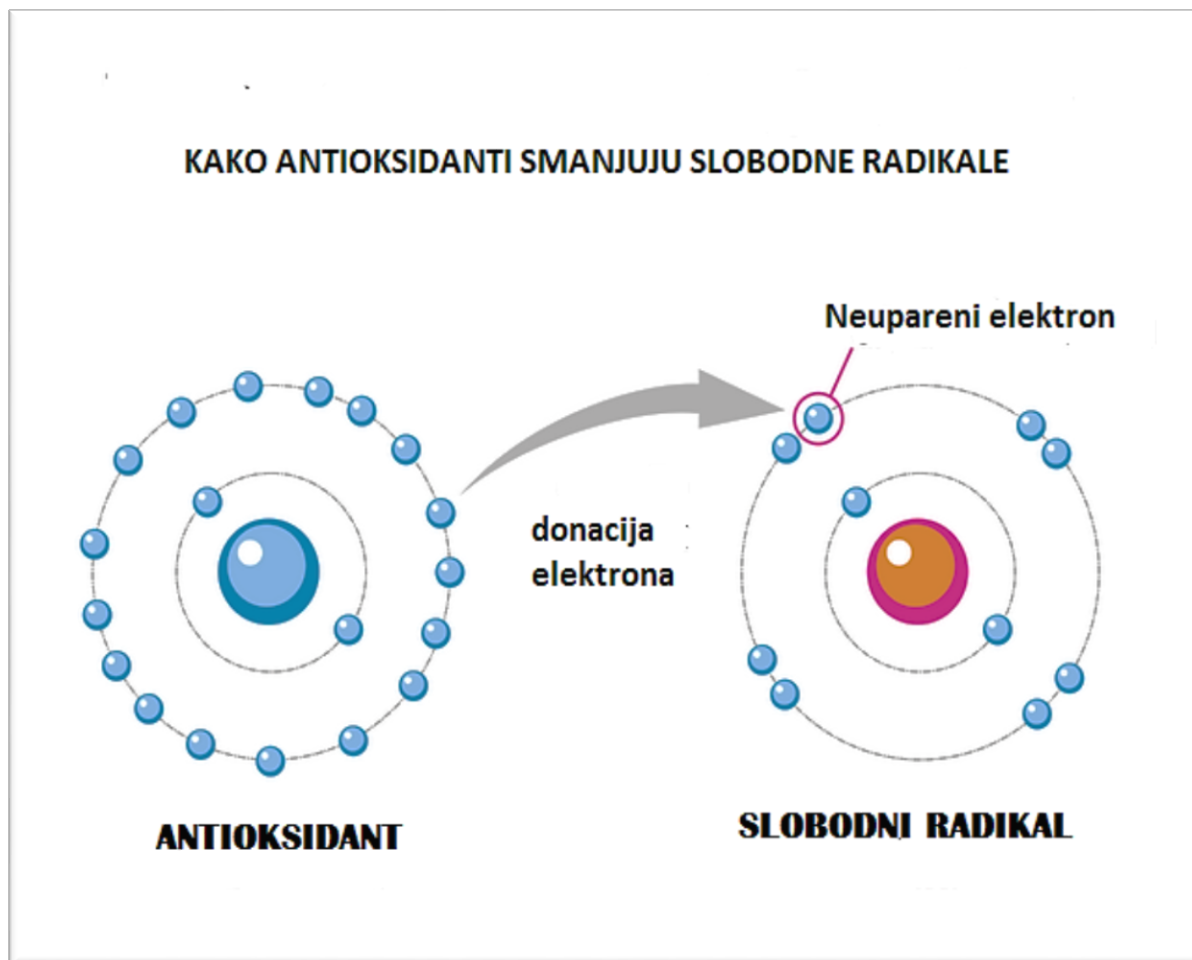
Oksidativna modifikacija proteina podrazumeva kovalentnu modifikaciju koja je indukovana reaktivnim vrstama (ROS, RNS, RSS i RCS) i menja se primarna struktura, modifikacijom pojedinih aminokiselina ili njihovim otcepljenjem, a zatim i sekundarna i tercijarna struktura (44). Oksidativna modifikacija menja funkcionalnu aktivnost proteina, što za posledice može imati: gubitak enzimske aktivnosti, proteinske funkcije, agregaciju proteina, gubitak imunološke funkcije, gubitak specifičnosti vezivanja za receptore ili modifikaciju genske transkripcije. Kod nitrozativne modifikacije proteina dolazi do reakcija nitrovanja ili nitrozovanja različitih funkcionalnih grupa (npr. –SH ili –NH<sub>2</sub>) aminokiselina. Promenom strukture aminokiseline, menja se i funkcija proteina (45-47).

#### **1.4.3. Oksidativne i nitrozativne promene na DNK**

Oksidativna modifikacija DNK dovodi do promene strukture DNK dovodeći do genetskih oštećenja i praktično menjajući strukturu dvospiralnog lanca. Može doći do prekida lanca, interakcija DNK azotnih baza, izmene ili otcepljenja baze, modifikacije baze. O modifikaciji molekula DNK posredovanoj nitrozativnim stresom postoji vrlo malo podataka. Azotna baze, riboza i fosfat DNK lanca ne ispoljavaju reaktivnost prema nitrozujućim agensima proizvedenim u toku metabolizma azot monoksida (NO). NO može oštetiti DNK deaminacijom i nitrozilacijom ili nitrovanjem i oksidacijom DNK (22). Trajno oksidativno oštećenje DNK predstavlja prvi korak u mutagenezi, karcinogenezi i starenju (48).

### **1.5. ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA**

Sistem antioksidativne zaštite (AOS) nastao je zbog mogućnosti stvaranja slobodnih radikala. Potencijalnu toksičnost slobodnih radikala u fiziološkim uslovima sprečava veliki broj citoprotektivnih enzima i antioksidanasa. Procenjuje se dnevno stvaranje od jedne do tri milijarde reaktivnih vrsta, što ukazuje na značaj antioksidativne zaštite ljudi (49). Antioksidanti se definišu kao supstance koje, u malim koncentracijama, imaju sposobnost da mehanizmom kompeticije odlože ili inhibišu oksidaciju drugih materija (50).



**Slika 1.** Mehanizam dejstva antioksidanata<sup>1</sup>

Antioksidanti se mogu podeliti prema poreklu (endogeni i egzogeni), mestu delovanja (ćelijski, vanćelijski i membranski), prema rastvorljivosti u vodi ili lipidima, kao i na enzimске i male molekule. Postoji podela prema načinu delovanja: preventivni (sprečavaju nastajanje radikala), čistači (engl. Scavenger- čiste radikale delujući na lančanu reakciju) i enzimi popravke (popravljaju nastala oštećenja).

Postoji više nivoa sistema antioksidativne zaštite. Primarni nivo predstavljaju enzimi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i reduktaza) i neenzimski antioksidansi (glutacion, vitamin C, vitamin E, koenzim Q itd). Sekundarni nivo čine specifične oksidoreduktaze (tiol-transferaza, ATP i Ca –nezavisna transferaza itd) i

---

<sup>1</sup> Preuzeto iz Healthline Media

reparativni enzimi (npr. endonukleaze), dok tercijerni nivo čine: proteini koji heliraju metale sa promenljivom valencom (ceruloplazmin, apoferitin, ferritin) ili koji se generišu tokom oksidativnog oštećenja (npr. metalotioneini) (9).

## **1.6. MEHANIZMI DEJSTVA ANTIOKSIDANATA**

Osnovni mehanizmi delovanja antioksidanata su: prevencija stvaranja slobodnih radikala, odnosno ROS; neutralizacija slobodnih radikala, odnosno njihovo otklanjanje pre nego što oštete biomolekule i reparacija i *de novo* sinteza oksidisanih molekula, odnosno otklanjanje oštećenih molekula i povratak izgubljenih funkcija.

### **1.6.1. Prevencija stvaranja slobodnih radikala**

Prevencija stvaranja ili dejstva slobodnih radikala predstavnja prvu liniju odbrane, a može se postići: održavanjem niskog pritiska kiseonika u tkivima, “zatvaranjem” enzima koji stvaraju radikale u posebne ćelijske strukture kao što su peroksizomi, lizozomi, mitohndrije i vezivanjem slobodnih jona gvožđa (Fe) i bakra (Cu), hemoglobina (Hgb) i hema u komplekse sa proteinima kao što su transferin, feritin, ceruloplazmin, albumin, haptoglobin, hemopeksin.

### **1.6.2. Neutralizacija stvorenih slobodnih radikala**

Drugi nivo antioksidativne zaštite aktivira se u uslovima normalnog ili pojačanog stvaranja slobodnih radikala. Antioksidatni ove grupe se mogu biti enzimski i neenzimski (51).

#### ***1.6.2.1. Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite***

Najvažniji enzimski antioksidanti su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST) (26). Ovi enzimi uklanjaju slobodne radikale tako što učestvuju u njihovom metabolizmu, dok druga grupa enzima AOS učestvuje u reparaciji već stvorenih oštećenja, u slučaju da je antioksidativna odbrana u određenoj meri bila nedovoljna da kompenzuje stvaranje slobodnih radikala i oksidativnog stresa. Enzimsku aktivnost superoksid dismutase dokazali su 1969. godine Mc. Cord i Fridovich, ali je izolovana mnogo ranije, 1938.godine, od strane Mann i Keilis (52,53). SOD je enzim koji katalizuje transformaciju superoksid anjon radikala do vodonik peroksida i kiseonika.

Kod ljudi postoje tri forme SOD-a: citosolna (Cu/Zn SOD1), mitohondrijalna (MnSOD2) i ekstracelularna SOD (EC-SOD3). Sva tri izoenzima katališu istu reakciju, ali imaju svoje specifične uloge, mesto dejstva, aktivatore i deaktivatore. Superoksid dismutaza prisutna je u svim tkivima: mozgu, jetri, bubrezima itd, a aktivna je i u telesnim tečnostima (54). Smanjena aktivnost superoksid dismutaze primećena je u nizu oboljenja, ali sa druge strane i povećanje njene aktivnosti (55,56).

#### ***1.6.2. Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite***

Neenzimski antioksidanti blokiraju, usporavaju ili menjaju oksidativne promene u ćelijama, tako što neutrališu SR pre nego što dođe do oštećenja biološki aktivnog molekula. Ovo se postiže preuzimanjem ili vodonikovog jona ili prvo elektrona, a potom protona od molekula slobodnog radikala, a brzina i učestalost ovih reakcija zavisi od uticaja sredine u kojoj se reakcija odvija (57). Ako je sredina hidrofilna, reagovalaće na primer, vitamin C, GSH, mokraćna kiselina, albumin, transferini, ceruloplazmin itd, ukoliko je lipofilna onda mogu delovati vitamin E, vitamin A, koenzim Q ili  $\beta$  karoten, dok antioksidanti kao što su selen i lipoična kiselina reaguju u svim sredinama (58).

#### **1.6.3. Popravka i *de novo* sinteza oksidisanih molekula**

Treći nivo antioksidativne zaštite podrazumeva popravku nastalog oksidativnog oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina. Enzimski antioksidanti koji omogućavaju reparaciju i remodelovanje oksidisanih supstrata su: klasična i fosfolipid-zavisna glutation peroksidaza, fosfolipaza A2, proteolitički enzimi, nuleaze, DNK-ligaze i polimeraze, specifične oksidoreduktaze (9). Ovi enzimi imaju ulogu u biotransformaciji primarnih i sekundarnih slobodnih radikala u manje aktivna jedinjenja i u obezbeđivanju dovoljne količine redukcionih ekvivalenata u ćeliji, čime preveniraju razvoj oksidativnog stresa.

### **1.7. OKSIDATIVNI STRES I REPRODUKCIJA**

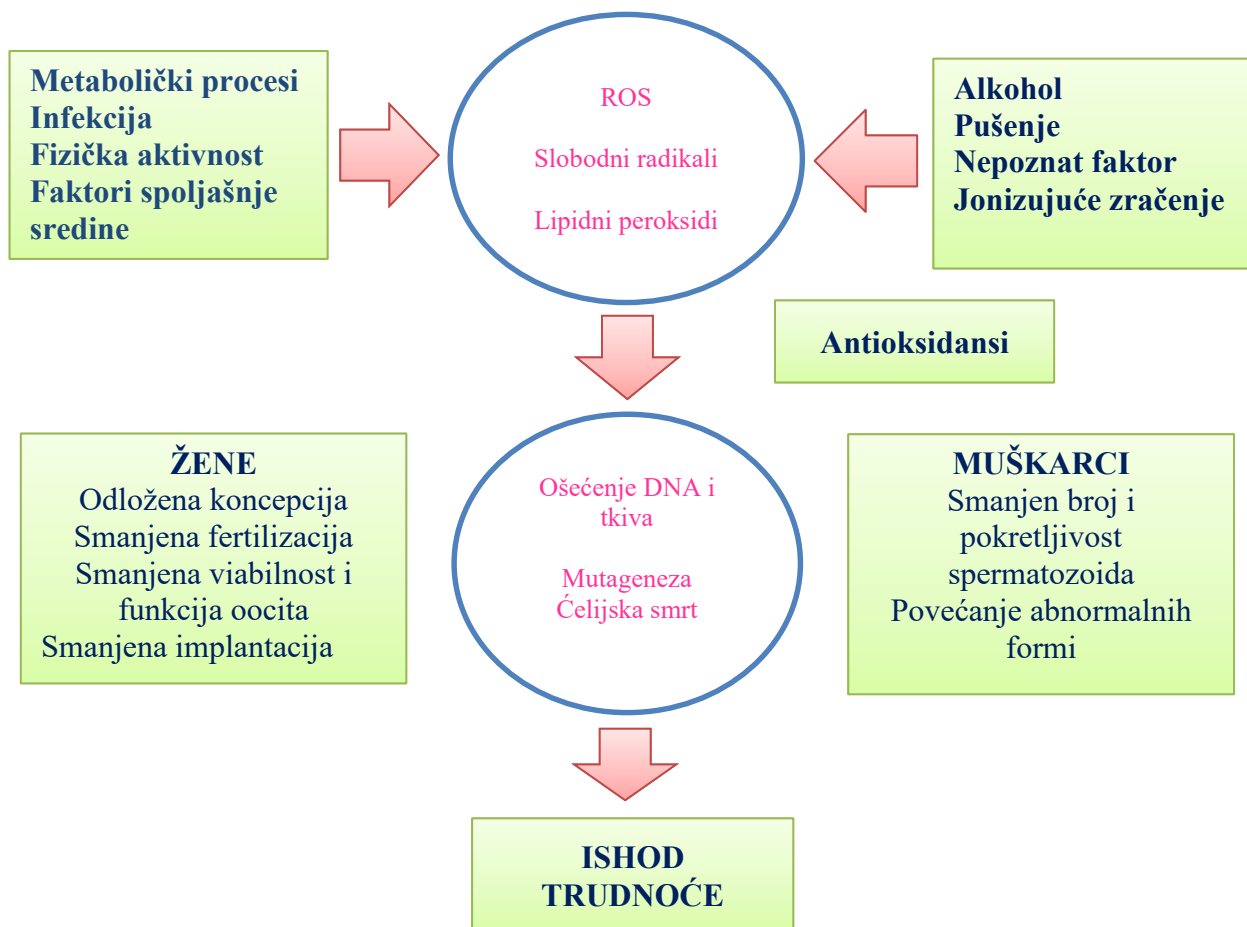
U reproduktivnom traktu, fiziološki nivoi ROS neophodni su ne samo za ovulaciju (59,60), već i za interakciju oocit-spermatozoid, fertilizaciju (61), implantaciju i rani razvoj embriona. Ipak, povećana produkcija ROS može da ošteti prirodnu antioksidativnu odbranu organizma, remeteći mikrosredinu u reproduktivnom traktu i normalne

fiziološke reakcije (62), što na kraju deluje na tok i ishod trudnoće (63-65). Moguće je da oksidativni stres dovodi do infertiliteta direktnim dejstvom na oocite u folikulima, zatim u peritonealnoj tečnosti, na spermatozoide u peritonealnoj tečnosti, oštećenjem embriona u tubama, poremećajem receptivnosti endometrijuma ili dovodi do prevremene regresije žutog tela i nedostatka lutealne hormonske podrške za nastavak trudnoće.

### **1.7.1 Uloga ROS u ženskom reproduktivnom traktu**

Reaktivne oksidativne vrste imaju i fiziološku i patološku ulogu u funkcionisanju ženskog reproduktivnog trakta. Kada su u ravnoteži sa antioksidativnim sistemom imaju ulogu u sazrevanju oocita, folikulogenezi, ovarijalnoj steroidogenezi, ovulaciji, fertilizaciji, lutealnoj regresiji i lutealnom održavanju trudnoće (66). Međutim, ukoliko antioksidativni mehanizam koji otlanja slobodne radikale, ne funkcioniše adekvatno, povećan metabolizam zbog visokih energetske potrebe usled razvoja može dovesti do oksidativnog stresa, početak mejoze može da uzrokuje OS. Različite studije su povezale mnogo oboljenja sa oksidativnim stresom: endometriozu, sindrom policističnih jajnika, spontane pobačaje, preeklampsiju, embriopatije, prevremeni porođaj, intrauterine zastoje u rastu ploda i idiopatski infertilitet (66-68). Mogući mehanizmi infertiliteta žena uzrokovanog oksidativnim stresom su: direktno oštećenje oocita u ovarijalnim folikulima, direktno oštećenje oocita i spermatozoida zbog oksidativnog stresa u peritonealnoj šupljini, direktno oštećenje embriona zbog oksidativnog stresa u tubama, poremećaj receptivnosti endometrijuma i potpore embrionu tokom nidacije, zatim lutealne regresije i nedostatka lutealne hormonske podrške za nastavak trudnoće.





**Slika 2.** Uloga oksidativnog stresa u reprodukciji

### 1.7.2. Poreklo ROS u ženskom reproduktivnom traktu

Prisustvo ROS i antioksidanata u ženskom reproduktivnom traktu potvrđeno je brojim humanim i animalnim studijama, ali odakle oni potiču još uvek nije poznato. Reaktivne kiseonične vrste i antioksidanti otkriveni su u folikularnoj tečnosti (66, 69,70), tubarnoj tečnosti, oocitima i embrionima (64). Takođe su pronađeni u endometriјumu, a neki antioksidanti prisutni su tokom celog menstrualnog ciklusa i tokom rane trudnoće (71).

Ciklične promene u endometriјumu praćene su promenama u nivou antioksidanata. Smanjena SOD, povišene ROS i povišeni lipidni peroksidi zapaženi su u kasnoj sekretornoj fazi ciklusa, pre početka menstruacije, što upućuje na ulogu oksidativnog stresa u odlublјivanju endometriјuma (72). Hormonske promene tokom

menstrualnog ciklusa povezane su sa nivoom GSH i njegovim metabolizmom i tako uključene u održavanje redoks ravnoteže (73).

Peritonealna tečnost je važna za normalnu fertilizaciju i rani razvoj embriona. Peritonealna tečnost sadrži makrofage koji mogu da proizvode ROS. Normalno, antioksidanti u peritonealnoj tečnosti održavaju koncentracije ROS u fiziološkom rasponu. Povišene koncentracije ROS mogu da oštete oocitu posle oslobađanja iz ovarijuma, zigot/embrion u tubama jer je tubarna tečnost u kontinuiranom kontaktu sa peritonealnom tečnošću i što je najvažnije, spermatozoide (74). Peritonealna tečnost kod žena sa endometriozom i neobjašnjenim infertilitetom negativno deluje na funkciju spermatozoida (75). Moguće je da su povišeni ROS i toksični produkti peroksidacije odgovorni za ovaj negativni efekat.

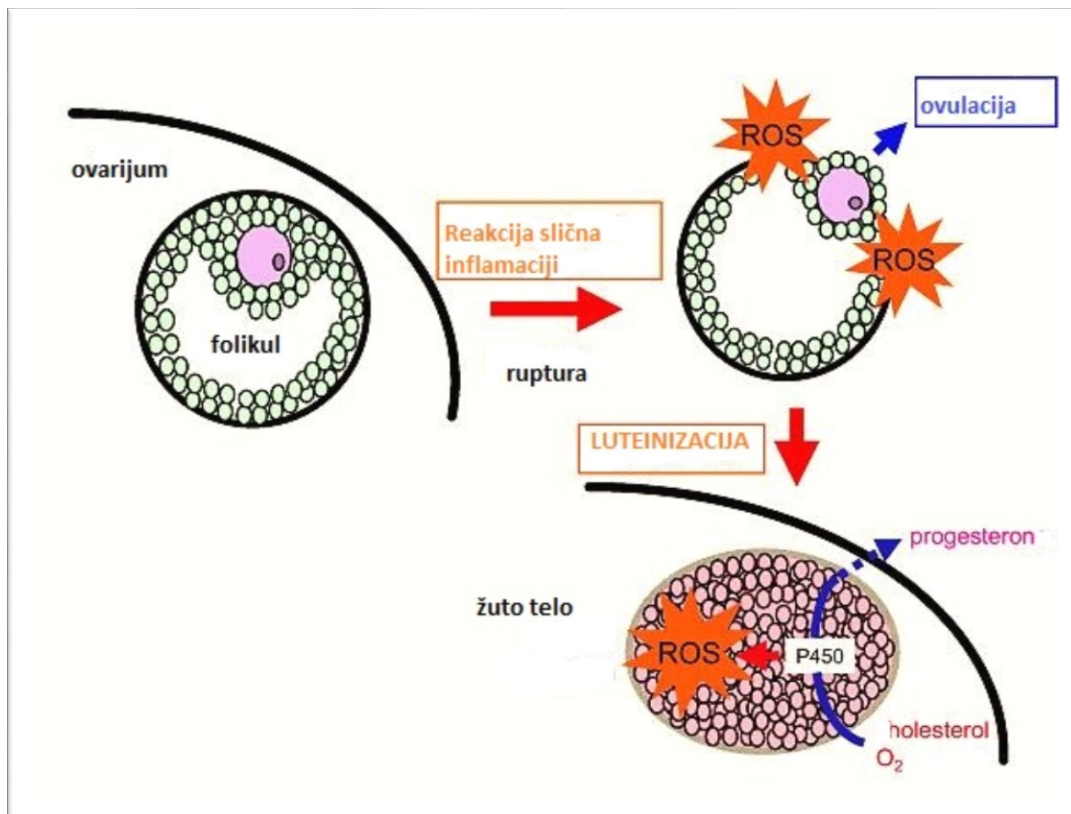
Smanjena količina azot monoksida u tubama može dovesti do poremećaja motiliteta, što dovodi do zadržavanja jajne ćelije, usporenog transporta spermatozoida i infertiliteta. Povišeni nivoi NO u tubama su citotoksični za mikrobe, ali takođe i za spermatozoide (76).

Kako folikul raste u antralni, ispunjava se folikularnom tečnošću (Follicular fluid-FF) koju sekretuju slojevi teka i granulosa ćelija. Redoks okruženje u folikularnoj tečnosti ima najveći uticaj na kvalitet oocite i sledstveno stvaranje embriona. ROS je uključen u fiziološke procese: razvoj folikula, ovulaciju i funkciju žutog tela (71,77). Iako folikularna tečnost sadrži visoke koncentracije antioksidanata, neravnoteža u pro-oksident/antioksidant sistemima može da dovede do abnormalnog razvoja oocita i poremećaja fertilizacione sposobnosti, kao i do oštećenja oocitne DNK (66, 69, 70, 78).

U ovarijumima ROS stvaraju fagocitni makrofagi, parenhimalne steroidogene ćelije i endotelne ćelije (79). Umereno povećanje ROS može da stimuliše rast i proliferaciju ćelija i neophodno je za proces ćelijske signalizacije. Takođe je povećano tokom rasta i razvoja dominantnog folikula i mejoze I. Suprotno, progresiju mejoze II pomažu antioksidanti, što sugeriše na kompleksan odnos između ROS i antioksidanata u ovarijumu. Ćelije uključene u steroidogenezu kao što su teka ćelije, granulosa luteinske ćelije i hilusne ćelije, pokazuju jaču aktivnost oksidativnih enzima (78). Reaktivne

kiseonične vrste koje stvaraju preovulatorni folikuli smatraju se važnim faktorima za nastanak ovulacije. Smatra se da je ovulacija rezultat vaskularnih promena i proteolitičke kaskade. Komunikaciju između dve kaskade posreduju citokini, vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) i ROS (i nitrogeni i oksigeni radikali). OS i citokini su povezani međusobno i deluju kao inter i intraćelijski glasnici u ovarijumu (80). Ovo zapažanje podržava nalaz da supresija ROS od strane SOD i/ili katalaze u *in vitro* preparatu ovarijuma zeca sprečava ovulaciju (81). U ovarijumu, žuto telo nastaje posle ovulacije. ROS se takođe stvaraju i u žutom telu i ključni su faktori u reprodukciji. Kada ne dođe do trudnoće, dolazi do regresije žutog tela. Tokom regresije žutog tela, nivoi ROS se povećavaju, inhibirajući produkciju progesterona. Brzo opadanje progesterona neophodno je za adekvatan razvoj folikula u sledećem ciklusu.

Ekscesivni nivoi ROS mogu biti štetni za oocite na više načina. Povišena produkcije ROS u oocitima dovodi do manje sposobnosti oocita za fertilizaciju, lošijeg kvaliteta embriona i smanjene stope implantacija. A desjtvo na citoskelet oocita, može da rezultuje disperzijom hromozoma, neuspehom normalne fertilizacije i zastojem razvoja (82,83). Starenje oocita udruženo je sa kongenitalnim abnormalnostima kod dece, verovatno jer ROS oštećuju oocite (84). Proces starenja može da uključuje oksidativno oštećenje mitohondrijalne DNA, proteina i lipida. Ove promene mogu da oštete vlakna citoskeleta i utiču na process fertilizacije i razvoj embriona, što se sve češće dešava u trudnoćama kod starijih žena (84).



**Slika 3.** Stvaranje ROS tokom ovulacije i steroidogeneze u žutom telu<sup>2</sup>

Embrion je organizam sa visokom energetskim potrebama koji se brzo razvija, a njegovo redoks stanje modulirano je njegovim stalno promenljivim potrebama i metabolizmom. Reaktivne kiseonične vrste mogu da potiču iz embrionalnih ćelija ili iz spoljašnje okoline (85), a delujući na ćelijske molekule i organele embriona mogu da blokiraju ili uspore embrionalni razvoj (64). Apoptoza je drugi proces kojim ROS deluje na embrione, što što je primećeno kod fragmentisanih embriona (86). Embrioni koriste različite mehanizme da bi se zaštitili od oksidativnog stresa u sebi samima i od onog iz okruženja (87). Okruženje oocita i embriona sadrži neenzimatske antioksidante (vitamin C, glutation, hipotaurin i taurin), koji štite embrion od spoljašnjih izvora ROS, kao i različite enzimatske antioksidante za zaštitu od ROS (SOD, katalaza i glutation peroskidaza) (88).

<sup>2</sup> Preuzeto od Fuji J. et al. *Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. Reproductive Biology and Endocrinology; 2005;3:43*

Uspešna implantacija zahteva adekvatnu endometrijalno-embriionalnu komunikaciju. Kao prvo, embrion treba da bude dobrog kvaliteta, a endometrijum treba da bude receptivan. Bilo kakav uticaj na neki od tih faktora može dovesti do neuspešne implantacije. Iako postoji veliki broj radova koji sugerišu da oksidativni stres može negativno da deluje na razvoj embriona, i dalje nije jasno da li OS ima ulogu u poremećaju receptivnosti endometrijuma (89).

Studije koje su ispitivale OS određivale su markere OS iz folikularne tečnosti i/ili iz seruma krvi. Metaboličke promene u serumu krvi mogu da se odražavaju na biohemijski sastav folikularne tečnosti i mogu indirektno da utiču na kvalitet oocita, što su pokazali Leroy i saradnici u ispitivanju sadržaja metabolita i jona u krvi i folikularnoj tečnosti kod goveda. Značajna korelacija u sastavu seruma i folikularne tečnosti ispitivanih metabolita sugeriše da će se nivoi metaboličkih promena u serumu odraziti na sastav folikularne tečnosti, te stoga mogu da utiču na kvalitet i oocita i granuloza ćelija (90). Primena različitih protokola KOS u postupku IVF može dovesti do poremećaja oksidant-antioksidant ravnoteže, što čini serum manje zaštićenim od oksidacije. Vrednosti antioksidanata u folikularnoj tečnosti bile su u korelaciji sa odgovarajućim koncentracijama u plazmi (91). I u drugim studijama nađena je pozitivna korelacija (92,93), što ukazuje da sistemski oksidacioni profil može da utiče na folikularni oksidacioni profil.

## **1.8. ROS I MUŠKI INFERTILITET**

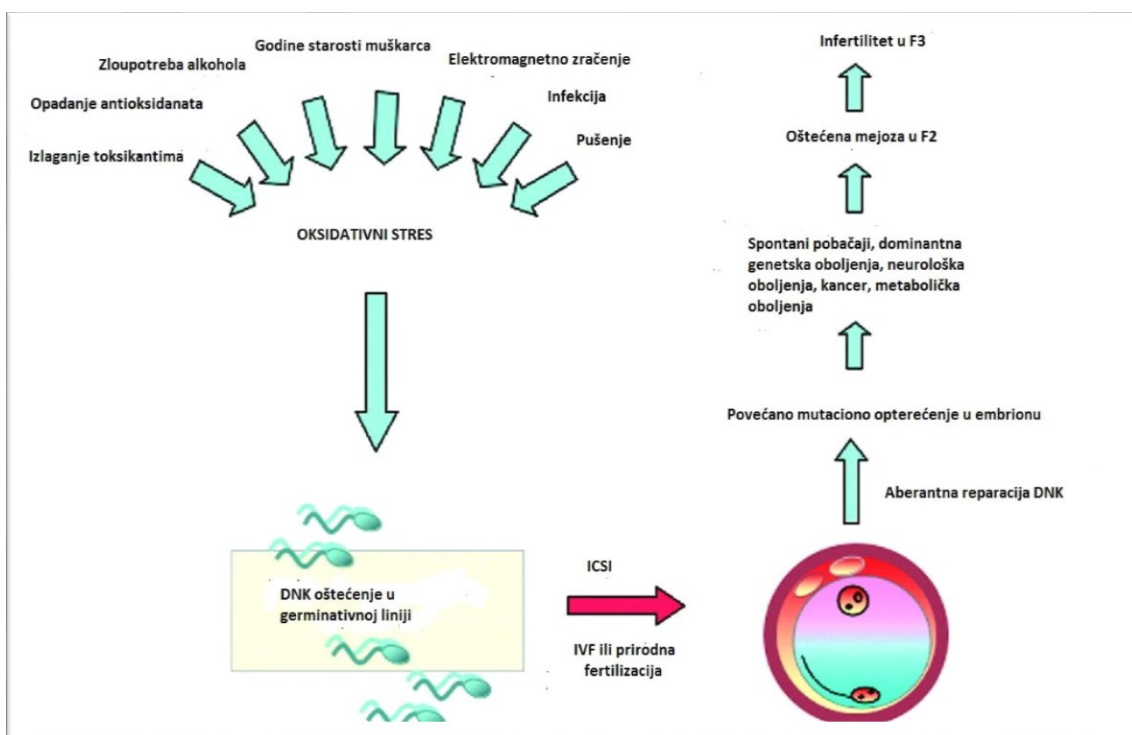
U ispitivanju muškog uzroka infertiliteta počinje se analizom spermograma, a pored toga mogu se uraditi dodatni testovi među njima su i biohemija ejakulata, procena nivoa ROS, ukupni antioksidativni kapacitet, nivo fragmentacije DNK, kompakcija i apoptoza DNK kao i prisustvo antispermatozoidnih antitela i genetski testovi. Ipak, rezultati ovih testova su ili izvan referentnih vrednosti ili ne pomažu u određivanju tačne etiologije infertiliteta, dovodeći do klasifikacije u idiopatski infertilitet (94).

ROS su prirodni produkti ćelijskog metabolizma, koji su, u fiziološkim koncentracijama, važni kod spermatozoida u procesima koji dovode do uspešne fertilizacije. ROS je okidač za hiperaktivaciju i kapacitaciju spermatozoida (95,96), za

sazrevanje spermatozoida, hemotaksu, vezivanje za zonu pelucidu, akrozomsku reakciju u sledstvenu fuziju spermatozoida i oocite (97-99), što ukazuje da ROS ukoliko nije povišen, sam po sebi nema toksičan efekat. ROS se stvara u mitohondrijama spermatozoida, a mitohondrijalna DNK podložnija je mutacijama od nuklearne, te je tako unutrašnja produkcija ROS povezana sa DNK fragmentacijom, lošom fertilizacijom, zastojem u razvoju embriona, spontanim pobačajima, defektima na rođenju, kao i manifestacijom različitih oboljenja kod potomaka, uključujući autizam i kancer (100,101). Spermatozoidi su bile prve ćelije za koje je objavljeno da su podložne oksidativnom oštećenju. MacLeod je još 1943. godine potvrdio brzi gubitak pokretljivosti spermatozoida kada koji su bili inkubirani u sredini sa povećanom koncentracijom kiseonika (102). Verujući da je gubitak pokretljivosti nastao zbog prekomerne produkcije oksidanata, dodao je antioksidant, katalazu, medijumu i povratio pokretljivost, čime je potvrdio svoju hipotezu. Plazma membrana spermatozoida sadrži velike količine nezasićenih masnih kiselina koje obezbeđuju fluidnost, neophodnu za membransku fuziju (100). Visok nivo polinezasićenih masnih kiselina i nedostatak protamina čini je osetljivim na ROS. Povećana lipidna peroksidacija membrane dovodi do gubitka njene fluidnosti i funkcije i do mutagenih i citotoksičnih efekata kao krajnjih produkata lipidne peroksidacije (103). Posledično, spermatozoidi gube pokretljivost, a dolazi i do oštećenja akrozomske reakcije i poremećaja procesa fuzije spermatozoid-oocita (104). Funkcionalno oštećeni spermatozoidi su drugi veliki izvor produkcije ROS. Ukoliko dođe do poremećaja procesa remodeliranja membrane spermatozoida u spermatogenezi, može doći do stvaranja ROS i abnormalne morfologije spermatozoida (105-108). Smatra se da na DNA spermatozoida utiču mitohondrijalni ROS porekla iz funkcionalno poremećenih spermatozoida (101), koji mogu dovesti do delecije, promene DNA veza, promene na hromozomima i singl i dvostruke rascepe DNA. Ova ROS oštećenja DNA smatraju se jednim od uzroka, ako ne i najvažnijim, različitih loših ishoda, uključujući povećanu incidencu pobačaja, kancere u detinjstvu i dominantna genetska oboljenja kao što je ahondroplazija (89).

Ejakulat muškarca sadrži različite vrste ćelija: zrele spermatozoide, nezrele germinativne ćelije, leukocite i rasute Sertolijeve ćelije. Među njima, leukociti i abnormalni spermatozoidi smatraju se glavnim izvorom stvaranja ROS (109), a brojne

studije pokušale su da opišu vezu između prisutstva leukocita u ejakulatu i muškog infertiliteta (110,111). Objavljeno je da su u ejakulatu najdominantniji polimorfonuklearni granulociti (PNM) (50-60%) i makrofagi/monociti (20-30%) (112). Peroksidaza pozitivni PNM granulociti dominantan su izvor ROS, nedavno je dokumentovano da neutrofili i makrofagi imaju sposobnost da oštete DNK i doprinesu oštećenju spermatozoida produkujući ROS (113).



**Slika 4.** Uticaj oštećenja DNK spermatozoida na ishod fertilizacije<sup>3</sup>

Procena oksidativnog stresa kod infertilnih muškaraca se može se pratiti pomoću različitih indikatora. Skorašnja studija pokazala je da vrednosti ROS imaju senzitivnost 68.8% i specifičnost 93.8% u dijagnozi muškog faktora infertiliteta (infertilitet koji je uzrokovan poremećajem parametara spermograma, bez ženskih faktora infertiliteta) (114).

<sup>3</sup> Preuzeto od Aitken RJ et al. Apoptosis in the germ Line. Reproduction Journal 2001; 141:139-150

## 1.9. OKSIDATIVNI STRES I ASISTIRANA REPRODUKCIJA

U normalnim uslovima, gameti i embrioni su izvor slobodnih radikala, ali tokom postupaka asistiranih reproduktivnih tehnologija, ove ćelije mogu biti izložene suprafiziološkim nivoima reaktivnih kiseoničnih vrsta, što može da bude jedan od faktora koji negativno utiču na ishod samog postupka (115-119). U toku IVF postupka mogu postojati višestruki izvori ROS, a oni mogu biti unutrašnji ili spoljašnji. Endogeni uključuju oocite, kumulusne ćelije, folikularnu tečnost, spermatozoide i embrione (118), dok su egzogeni nedostatak citokina, pH šok, osmotski šok, promena temperature, oštećenje UV zračenjem, neravnoteža nutritijenata itd.

U IVF postupcima se formira mikrosredina koja imitira fiziološke uslove in vivo sistema. Ipak, nedostatak endogenih mehanizama odbrane, izlaganje gameta i embriona različitim manipulacijama i okruženju mogu dovesti akumulaciji OS in vitro. U fiziološkim uslovima proces metabolizma dovodi do produkcije ROS, ali i različita patološka stanja mogu da utiču na njegovo preterano stvaranje. Uprkos aspiraciji folikularna tečnost tokom ART postupaka, uvek je kontaminirana krvlju ili medijumom. Nivoi OS u folikularnoj tečnosti mogu biti potencijalni marker predikcije uspeha kod IVF pacijenata (69,117), zatim nivoi RS u granuloza ćelijama povezani su sa kvalitetom oocita i sledstveno, razvojem embriona (120). Kod embriona, spor razvoj, velika fragmentacija i smanjeno formiranje morfološki normalne blastociste udruženi sa povišenim nivoima OS prvog dana kulture embriona, što na kraju dovodi do nižih stopa trudnoća (121).

Različita stanja spoljašnje okoline mogu da utiču na koncentracije ROS, uključujući koncentraciju kiseonika, metalnih jona, prirodnu ili veštačku svetlost, amino oksidaze, medijume i suplemente, zagađivače, proces zamrzavanja i otapanja. Medijumi i suplementi koji se koriste u IVF mogu takođe da doprinose stvaranju ROS i to direktno može da utiče na kvalitet oocita i embriona (63). Zatim, tokom IVF postupaka, pO<sub>2</sub> u kulturi medijuma mnogo je viši od pO<sub>2</sub> na nivou tkiva in vivo, stoga ova bogato oksigenisana sredina inkubatora može dovesti do stvaranja ROS i OS pošto aktivira različite enzime oksidaza u ćelijama tako utičući na in vitro razvoj embriona (122,123). Tokom ART gametima se manipuliše, što doprinosi tome da se ćelijski izvori ROS razlikuju kod konvencionalnog IVF od onih kod ICSI (63). Spermatozoidi se normalno



centrifugiraju tokom tehnika obrade, što takođe povećava produkciju ROS i OS kod muških gameta. Tokom konvencionalnog IVF, oociti, masa kumulus ćelija i spermatozoidi mogu da stvaraju i doprinesu nivoima ROS u medijumima. Kada se kao tehnika inseminacije koristi ICSI, postoji rizik od unošenja spermatozoida sa oštećenom DNK u oocitu, jer je prevaziđena prirodna barijera (104). U ART spermatozoidi sa oštećenom DNK mogu da smanje stope fertilizacije i trudnoća i da utiču na kvalitet i razvoj embriona i povećavaju rizik od spontanih pobačaja, defekta na rođenju i bolesti u detinjstvu (100).

Pošto ROS ima i fiziološku i patološku funkciju, humano telo je razvilo sistem odbrane da bi održalo njegove koncentracije u određenom rasponu. Spermatozoidi, oociti i embrioni imaju prirodne mehanizme antioksidativne odbrane protiv OS. Spermatozoidi imaju ograničena antioksidativna odbrambena svojstva, zbog veličine i male količine citoplazme, a uglavnom sadrže enzimske antioksidante i nekoliko neenzimatskih antioksidanata, kao što su vitamin E, vitamin A, haptoglobulin, transferin i ceruloplazmin. Od najveće važnosti u zaštiti spermatozoida od OS je uloga antioksidanata u semenoj plazmi (124). Ženski reproduktivni sistem je bogat i enzimatskim (katalaza, SOD i glutation peroskidaza/ reduktaza) i neenzimatskim antioksidantima (vitamin C, vitamin E, glutation, taurin i hipotaurin). Pokazano je da je SOD prisutan u humanim ovarijumima sa normalnim ciklusom i smatra se prvim enzimskim korakom koji štiti oocite i embrione od ROS (125). Brojni neenzimatski antioksidanti prisutni su u folikularnoj i tubarnoj tečnosti i obezbeđuju spoljašnju zaštitu gametima i embrionu.

## **1.10. BIOELEMENTI I TOKSIČNI METALI**

Makro i mikroelementi imaju značajne fiziološke funkcije u organizmu, dok toksični efekti metala prvenstveno uključuju hepatotoksičnost, nefrotoksičnost i neurotoksičnost, što zavisi od njihove različite rastvorljivosti, apsorpcije, distribucije, hemijske reaktivnosti i kompleksa koje grade u organizmu, kao i interakcije sa bioelementima (9). Postoje dve vrste patoloških promena koncentracija metala u organizmu: nedostatak esencijalnih elemenata zbog nedovoljnog unošenja hranom, poremećene ravnoteže ili nekog oboljenja i nakupljanje toksičnih elemenata, koji mogu

delovati toksično na ćelije ili istisnuti i zameniti esencijalne elemente. Ove promene mogu se utvrditi određivanjem metala u serumu, eritrocitima, krvi i/ili u urinu.

### 1.10.1. Bioelementi

U elemente nužne za normalnu funkciju organizma čoveka spadaju između ostalih i cink, bakar, selen i magnezijum.

Selen (Se) je sastavni deo glutathion-peroksidaze, enzima koji katalizuje razgradnju peroksida stvorenih tokom oksidativnog metabolizma u ćelijama i na taj način štiti organizam od nakupljanja lipidnih peroksida i slobodnih radikala koji oštećuju ćelijske membrane. U krvi se nalazi više selena u eritrocitima nego u plazmi u kojoj je vezan za -SH grupe proteina. Trovanje selenom kao i njegov nedostatak su retki. Osim određivanja same koncentracije selena može se odrediti i aktivnost glutathion peroksidaze (126).

Bakar (Cu) je element prirodnog sistema sa jednim nesparenim elektronom u svojoj elektronskoj strukturi koji ga čini aktivnim elementom u redoks reakcijama, takođe je važan za funkciju nekih enzima. Male količine bakra nužne su za normalnu aktivnost enzima koji učestvuju u umrežavanju vezivnog tkiva i elastina (lizil-oksidaza), deluje kao antioksidant (superoksid dismutaza), učestvuje u prenosu elektrona (citohrom oksidaza), u stvaranju pigmenta (tirozinaza) i u prenosu nervnih impulse (dopamine  $\beta$ -monooksigenaza). Nedostatak bakra može da se javi kod prevremeno rođene dece i kod malnutricije i malapsorpcije. Višak bakra je toksičan za organizam, inhibira neke enzime, onemogućuje vezivanje drugih bioelemenata, može da ošteti DNK, dovodi do aterogeneze i vazokonstrikcije, a takođe oksiduje i HDL-lipoproteine velike gustine koji imaju kardioprotektivnu ulogu (127). Trovanje bakrom manifestuje se gastrointestinalnim tegobama, hemolizom, tahikardijom i na kraju komom (128).

Cink (Zn) spada u esencijalne elemente i neophodan je za integritet ćelijske membrane, metabolizam glukoze, funkcionisanje enzima i imunog sistema, regulaciju transkripcije i replikacije. Sve ovo ukazuje na njegovu važnost za metabolizam i održavanje normalne funkcije organizma, kao i da je nedostatak cinka prisutan u različitim patološkim stanjima. Cink se nalazi u ćelijama skoro svih organa u obliku kompleksa sa proteinima. Smatra se da cink deluje kao stabilizator membrane, da ima

značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti i inhibiciji oksidativnog stresa. Mehanizmi antioksidativnog dejstva Zn mogu se podeliti na akutne i hronične. Cink štiti sulfhidrilne grupe proteina i enzima od uticaja SR ili oksidacije i smanjuje stvaranje hidroksilnog radikala (127). Nedostatak cinka može da izazove: oksidativno oštećenje tkiva uključujući povećanu oksidaciju lipida, proteina i DNK; dovodi do oksidativnih oštećenja pluća, mikrozoma i mitohondrija jetre i oksidativnog oštećenja testisa; posledica nedostataka Zn je fragmentacija DNK direktnim mehanizmom ili preko endonukleaze, koju inaktivira (127).

Magnezijum (Mg) je esencijalan za brojne metaboličke i fiziološke procese: glikolizu, metabolizam nukleotida, sintezu proteina, oksidativnu fosforilaciju, za akzivnost velikog broja enzimskih sistema i dr. Deficit Mg može dovesti do smanjenja integriteta i funkcije membrane i povećava mogućnost nastanka oksidativnog stresa, kardiovaskularnih bolesti, karcinoma i dovodi do ubrzanog starenja (129). Deficit magnezijuma izaziva povećanje produkcije SR. Dolazi do značajnog povećanja LP u jetri, MDA u plazmi, smanjenja GSH u eritrocitima i askorbata u jetri, mozgu i drugim tkivima. Deficit Mg u plazmi praćen je porastom redoks aktivnih jona Cu i Fe u različitim tkivima i smanjenjem enzimskih ili neenzimskih komponenata antioksidativne zaštite (130). Protektivna uloga povećanog unošenja Mg na OS objašnjena je destabilizacijom neutrofilne NADPH oksidaze putem ATP čime se onemogućava stvaranje kiseoničnih i hidroksi radikala, a samim tim i oštećenje DNK (129).

### **1.10.2. Toksični metali**

Toksični metali mogu biti toksični ako im koncentracija u organizmu poraste, a najveća je izloženost kadmijumu, olovu i živi.

Ljudi su izloženi kadmijumu (Cd) i u životnoj sredini i na radnom mestu, kao i unošenjem hrane i vode. Kadmijum ima izraženo kumulativno dejstvo, izaziva niz štetnih efekata u organizmu na različite organe (bubrege, pluća, skeletni sistem), može biti uzročnik karcinoma pluća i testisa, može se povezati i sa sindromom hroničnog umora (127). Izlaganje kadmijumu uzrokuje i endokrine promene, deluje na estrogene, prolaktin i hormona rasta (131). Različiti biohemijski poremećaji koje izaziva u organizmu

objašnjavaju se njegovim dejstvom na ključne enzime organizma i interakciju sa bioelementima. Pokazano je da je kadmijum uzročnik nastanka oksidativnih oštećenja lipida, proteina i DNK (132). Kadmijum utiče na enzimске i neenzimске komponente antioksidativnog sistema odbrane organizma, čime se može objasniti njegov uticaj na nastanak oksidativnog stresa. Svi antioksidativni enzimi su metal zavisni, odnosno sadrže jone metala u svojoj strukturi, a kadmijum može konkurisati za iste položaje na enzimu za koje se vezuju metalni joni ili može uticati na njihove kofaktore (133), ali može izazvati i promene u regulaciji transkripcije i translacije ovih enzima. Kadmijum izaziva promene i u aktivnosti neenzimskih antioksidanata: vitamin C, E, redukovani glutation i koenzim Q (134).

Olovo (Pb) je uzročnik profesionalnih trovanja, ali postoji i velika izloženost stanovništva olovu putem vazduha, vode, hrane, predmeta opšte upotrebe itd. Olovo se nakuplja u kostima, kosi, jetri i bubrezima. Hronično trovanje izaziva hematološke, gastrointestinalne, neurološke poremećaje, kao oštećenje bubrega i reproduktivnog sistema. Olovo može idukovati nastanak SR, oksidativnu modifikaciju lipida, a deluje i na enzime antioksidativne zaštite (135).

Arsen (As) se u prirodi nalazi u malim količinama, a može se naći u zemljištu, vazduhu i vodi. Antropogeni izvori su topionice metala, sagorevanje ulja i drveta, đubrišta, herbicidi itd. Trovanje arsenom može dovesti do promena na koži ili carcinoma kože, a akutno trovanje može dovesti do gastrointestinalnih, pulmoloških i hematoloških poremećaja (135).

Živa (Hg) se u prirodi nalazi u brojnim hemijskim i fizičkim oblicima, kao elementarna, u obliku neorganskih i organskih jedinjenja. Ljudi su izloženi živi iz prirodnih izvora: erupcije vulkana, erozije tla, izvori gasova, vetrovi. U antropoge izvore spadaju: pesticidi, termoelektrane, rudnici, rafinerije srebra i zlata itd. Svi oblici Hg izazivaju brojne štetne efekte uključujući nefrotoksičnost, neurotoksičnost i poremećaje gastrointestinalnog trakta, s tim što neorganska jedinjenja dominantno oštećuju bubrege, a organska nervni sistem. Iako se efekti neorganskih i organskih jedinjenja Hg na organizam razlikuju, zajednička osobina im je da mogu uzrokovati nastanak oksidativnog stresa (9).

## 1.11. BIOELEMENTI, TOKSIČNI METALI I INFERTILITET

Neploidnost ima multifaktorijalnu etiologiju u kojoj mnogi genetski i faktori sredine deluju zajedno. Za razliku od genetskih faktora, na faktore sredine se može donekle uticati, kao i na životne navike, što je značajno u tretmanu infertiliteta. Značajan ali uveliko zapostavljen faktor je ishrana. Pored toga ishrana je izvor vitamina antioskidanata i bioelemenata (Se, Zn, Cu). Kada se procenjuje korelacija između nedostatka mikronutritienata i fertiliteta na globalnom nivou, trebalo bi uzeti u obzir i druge faktore, upale i seksualno prenosive bolesti kao uzrok infertiliteta (136). Različite studije pokazale su da nedostatak bioelemenata može da utiče na i reproduktivno zdravlje (137). Postoji poseban interes u uticaju nedostatka bioelemenata na fiziološke funkcije, posebno reprodukciju (138). Bioelemeni kao što su cink i selen imaju svojstva antioksidanasa i imaju ulogu u razvoju testisa, sazrevanju spermatozoida i sintezi testostosterone kod muškaraca, dok kod žena imaju ulogu u seksualnom razvoju, ovulaciji i menstrualnom ciklusu (138,139). Nedostatak pojedinih bioelemenata, posebno Cu, Se i Zn, često se sreće kod IVF pacijenata (138-141).

Metali su široko rasprostranjeni u čovekovoј okolini, hrani, vodi, vazduhu, cigaretama i alkoholnim pićima. Iako je štetan efekat nikotina, katrana i drugih gasova prisutnih u duvanskom dimu dobro poznat, štetni efekti toksičnih metala u duvanskom dimu nedovoljno su naglašeni. Unos toksičnih metala putem duvanskog dima može biti veoma značajan izvor izloženosti ne samo za one ljude koji su pušači, već i za sve one koji su pasivno izloženi dimu, nepušače. U nekim zemljama unos hranom, posebno morskih plodova, je veliki ne-okupacioni izvor izlaganja Hg, a određene populacije mogu biti izložene visokim dozama neorganskih soli Hg i/ili Pb putem tradicionalnih lekova (142). Rezultati eksperimentalnih istraživanja sugerišu štetno dejstvo toksičnih metala na reproduktivnu funkciju (143). Deluju direktno na specifične reproduktivne organe ili indirektno na neuroendokrini sistem, a čest odgovor na izlaganje ovim toksičnim metalima je indukcija oksidativnog stresa (144). Toksični metali utiču i na veličinu testisa, sekretornu funkciju prostate i semenih vezikula, reproduktivnu endokrinu funkciju, spermatogenezu i mogu dovesti do smanjenja fertiliteta, smanjenja libida ili impotencije (145-148). Izlaganje toksičnim metalima može da utiče kod žena na hormonske promene, ovulaciju, sazrevanje oocita kao i na smanjenje ili gubitak

fertilizacije sposobnosti, a samim tim i postizanje trudnoće (149,150). Takođe neki od njih kao što su kadmijum i olovo, povećavaju stopu spontanih pobačaja i utiču na razvoj fetusa (151). Reproaktivna toksičnost koja rezultuje iz dugotrajne izloženosti niskim nivoima toksičnih metala može da ima uticaj na uspeh IVF postupaka (152,153).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove studije bio je da se kod pacijenata uključenih u postupak vantelesnog oplodjenja utvrdi sledeće:

1. ispita uticaj različitih protokola kontrolisane ovarijalne stimulacije (KOS) na:

- a) broj i kvalitet jajnih ćelija
- b) broj fertilisanih jajnih ćelija
- c) stopu fertilizacije
- d) kvalitet embriona
- e) ishod postupka vantelesnog oplodjenja

kao i promenu koncentracije parametara oksidativnog stresa u odnosu na primenjeni protokol kontrolisane ovarijalne stimulacije pre i posle stimulacije.

2. ispita uticaj doze gonadotropina na:

- a) broj i kvalitet jajnih ćelija
- b) broj fertilisanih jajnih ćelija
- c) stopu fertilizacije
- d) kvalitet embriona
- e) ishod postupka vantelesnog oplodjenja

kao i promenu koncentracije parametara oksidativnog stresa u odnosu na primenjenu dozu gonadotropina.

3. ispita povezanost promena koncentracija parametara OS u grupi pacijentkinja sa

OS pre stimulacije i u grupi pacijentkinja sa OS posle stimulacije na:

- a) broj i kvalitet jajnih ćelija
- b) broj fertilisanih jajnih ćelija
- c) stopu fertilizacije
- d) kvalitet embriona
- e) ishod postupka vantelesnog oplodjenja

4. ispita povezanost poremećaja ravnoteže bioelemenata i uticaj toksičnih metala kod žena na:

- a) broj i kvalitet jajnih ćelija
- b) broj fertilisanih jajnih ćelija
- c) stopu fertilizacije
- d) kvalitet embriona
- e) ishod postupka vantelesnog oplođenja

5. ispita povezanosti promene koncentracija parametara oksidativnog stresa, poremećaja ravnoteže bioelemenata i uticaj toksičnih metala kod muškog partnera na:

- a) parametre spermograma

i ispita uticaj parametara spermograma na

- a) broj fertilisanih jajnih ćelija
- b) stopu fertilizacije partnerki ispitivanih muškaraca
- c) ishod postupka vantelesnog oplođenja



### 3. MATERIJAL I METOD RADA

#### 3.1. Ispitivana populacija

Prospektivno kliničko istraživanje sprovedeno je na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije u periodu od januara 2014. godine do decembra 2014. godine. Istraživanje je obuhvatalo 107 žena i 52 muškarca, uključene u postupak vantelesnog oplodjenja (VTO) na Klinici.

Uključujući kriterijumi kod pacijentkinja bili su starost od 18 do 40 godina, BMI od 18 do 30 kg/m<sup>2</sup>, regularni menstrualni ciklusi od 25-32 dana, uzrok infertiliteta: muški, ovarijalni, tubarni, kombinovani ili nepoznatim faktorom. Kriterijumi za isključivanje bili su hronična oboljenja, endokrinološka oboljenja, hidrosalpinx i/ili endometrioza stadijumi III i IV. Ispitivane pacijentkinje bile su podeljene u tri grupe. Prvu grupu sačinjavalo je 58 pacijentkinja sa primenjenim kratkim protokolom kontrolisane ovarijalne stimulacije (KOS). Drugu grupu činilo je 18 pacijentkinja sa primenjenim kratkim protokolom KOS koje su imale pretretman sa kontraceptivima. U trećoj grupi bilo je 24 pacijentkinje sa primenjenim dugim protokolom KOS. Kod svih pacijentkinja određivane su godine starosti, *body mass index* (BMI), dužina trajanje infertiliteta, status pušenja (pušači/nepušači) i uzrok infertiliteta.

Ispitivanje kod muškaraca bilo je sprovedeno u androloškoj laboratoriji Klinike za Urologiju, Kliničkog centra Srbije. Pacijenti sa azoospermijom bili su isključeni iz studije. Uzorak ejakulata koji se analizirao dobijen je posle 48-72 h apsistencije. Uzorci su bili analizirani u istoj laboratoriji. Kod svih su volumen ejakulata, koncentracija i pokretljivost bili određivani prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (World Health Organization – WHO) iz 2010. godine (volumen ejakulata  $\geq 1.5\text{mL}$ , koncentracija  $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$ , ukupan broj  $\geq 39 \times 10^6$ , ukupna pokretljivost  $\geq 40\%$  ili progresivna pokretljivost  $\geq 32\%$ )(154) dok je morfologija spermatozoida određivana prema kriterijumima WHO iz 1992. godine (normalne forme  $> 30\%$ , patološke forme  $< 70\%$ ). Uzorci su bili klasifikovani na osnovu broja, progresivne pokretljivosti i morfologije spermatozoida na sledeće grupe: normospermiju, astenospermiju, oligospermiju, teratospermiju i oligoastenoteratospermiju. Prema tim parametrima

pacijenti su bili podeljeni u dve grupe, grupu sa normalnim nalazom i grupu sa patološkim nalazom spermograma.

Određivanje parametara oksidativnog stresa, bioelemenata i toksičnih metala kod svih uključenih pacijenata bilo je sprovedeno na Katedri za toksikologiju “Akademik Danilo Soldatović” Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Pacijenti su u pismenoj formi informisani o sadržaju istraživanja i načinu upotrebe dobijenih rezultata, nakon čega su potpisali saglasnost za učešće u istraživanju. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Medicinskog fakulteta u Beogradu.

### **3.2. Protokoli stimulacije**

Svim pacijentkinjama je drugi ili treći dan ciklusa pre uključivanja u postupak određivan bazalni hormonski status. Određivani su serumski nivoi estradiola (E2-pg/mL), progesterona (P4- ng/mL) folikulostimulirajućeg hormona (FSH-mIU/mL), luteinizirajućeg hormona (LH- mIU/mL) i antimilerovog hormona (AMH- ng/mL). Pacijentkinje na dugom protokolu stimulacije sa GnRH agonistima (n=24) primale su Triptoreline (Diphereline, Ipsen Pharma Biotech, Francuska) u dozi od 0.1mg dnevno subkutano sa početkom u sredini lutealne faze prethodnog ciklusa. Posle supresije hipofize, koja je potvrđena 2/3 dan narednog ciklusa serumskim nivoom estradiola <70pg/ml i transvaginalnim ultrazvučnim nalazom na kome nije bilo ovarijalnih cista većih od 10mm, ni debljine endometrijuma >4mm, započeta je ovarijalna stimulacija gonadotropinima (GT)- rekombinovanim FSH (Gonal-F, Serono, Švajcarska) u dozi od 150-300IU/dnevno zavisno od godina starosti, ovarijalne rezerve i ovarijalnog odgovora u prethodnim postupcima. Stimulacija je trajala dok vodeći folikul nije dostigao dijametar od 20mm ili dva ili više folikula dijametar 18mm. Pacijentkinje na kratkom protokolu stimulacije sa GnRH antagonistima (n=58) primale su istu stimulaciju sa početkom od drugog ili trećeg dana ciklusa, a nakon urednog transvaginalnog ultrazvučnog pregleda i urednog bazalnog hormonskog statusa. GnRH antagonisti – Cetrotide (Cetrorelix, Merk Serono, Nemačka) u dozi do 0.25mg dnevno dodavani su kada je vodeći folikul dostigao dijametar od 14mm i primenjivani su do dana HCG. Stimulacija je sprovedena po opisanoj šemi. Treća grupa obuhvatala je pacijentkinje sa kratkim protokolom stimulacije i pretretmanom oranim kontraceptivima. Ova grupa (n=18) koristila je kombinovane

oralne kontraceptivne pilule (Microgynon, Bayer, Nemačka) od petog dana prethodnog ciklusa u toku 21 dana, a zatim je po dobijanju sledećeg ciklusa bio primenjen gore naveden protokol sa GnRH antagonistima po istoj semi.

### **3.3. Monitoring**

U svim protokolima KOS, ovarijalni odgovor praćen je sekvencionalnim transvaginalnim ultrazvučnim pregledima i određivanjem nivoa estradiola u krvi. Kada je porast koncentracije estradiola u serumu odgovarao prisustvu dva ili više folikula >18mm, primenjen je humani horionski gonadotropin (Pregnyl, Organon, Holandija) u dozi od 5000IU 34-36 sati pre aspiracije oocita. Oocite dobijene u toku aspiracije klasifikovane su prema stepenu zrelosti na zrele (MII) i nezrele (MI) oocite. Metode fertilizacije bile su IVF, ICSI ili kombinovana metoda.

Da li je došlo do fertilizacije ili nije konstatovano je posle 16-20 sati posle inseminacije prisustvom dva pronukleusa. Pri proceni kvaliteta embriona korišćeni su kriterijumi Istambuskog konsenzusa kliničkih embriologa, kao referentni okvir (155). Kriterijumi uključuju ocenu, stepena fragmentacije i simetričnost blastomera. Embrioni su podeljeni na klasu A (ivrstan, bez ili 1-10% fragmentacije, savršena simetrija) klasu B (osrednji, 11-25% fragmentacije, umerena asimetrija), klasu C (loš, >25% fragmentacije, izražena asimetrija). Drugog ili trećeg dana posle aspiracije oocita urađen je embriotransfer, najviše tri embriona, pod kontrolom transabdominalnog ultrazvuka. Od dana aspiracije oocita pacijentkinje se primale Progesterone depo intramuskularno na drugi dan, kao podrška lutealnoj fazi. Trudnoća je konstatovana pozitivnim nalazom serumskog  $\beta$ -hCG (>25MIU/ml) 14 dana posle embriotransfera. Kliničke trudnoće potvrđene su transvaginalnim ultrazvučnim nalazom gestacijskog meška sa vitalnim embrionom 6-te gestacione nedelje.

### **3.4. Metodologija ispitivanja**

#### **3.4.1. Biohemijske analize**

Pacijentkinjama u svakoj grupi je uzimana krv između drugog i četvrtog dana prethodnog ciklusa, pre uključivanja u postupak KOS, kada se inače radi i bazalni hormonski status. Prvo uzimanje krvi i seruma ujedno je i kontrolna grupa. Drugo

uzimanje obavljeno je na dan administracije HCG, tzv "stop injekcije". Kod muškaraca je uzimana krv kada je i pacijentkijama uzet prvi uzorak krvi, odnosno pre uključivanja u postupak.

Posle izdvajanja, serum/plazma bila je zamrznuta i čuvana na temperaturi  $-70^{\circ}\text{C}$ . Određivani su sledeći parametri oksidativnog stresa: superoksid dizmutaza (SOD), malondialdehid (MDA), sulfhidrilne (-SH) grupe, zatim sledeći bioelementi bakar (Cu), cink (Zn), selen (Se) i magnezijum (Mg), kao i toksični metali: kadmijum (Cd), arsen (As), živa (Hg) i olovo (Pb).

### 3.4.2. Određivanje parametara oksidativnog stresa

Kalijumdihidrogen-fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) p.a. (Merck, *Darmstadt*, Nemačka), Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich, *St.Louis, MA, SAD*), albumin *fraction V* (goveđi serum) (Merck, *Darmstadt*, Nemačka), 2-tiobarbiturna kiselina (TBA), (Sigma-Aldrich, *St Louis, MA, SAD*),  $\text{NaHCO}_3$  p.a., (Acros Organics, *Geel*, Belgija), epinefrin-hidrohlorid (Sigma-Aldrich chemie, *Steinheim*, Nemačka), 5,5'-ditiobis-(2-nitro-benzoeva kiselina) (DTNB) (Sigma-Aldrich, *St Louis, MA, SAD*) bili su komercijalnog porekla, dok je malondialdehid (MDA) standard (Sigma-Aldrich, *St Louis, MA, SAD*) ustupljen bez nadoknade.

Nakon nepotpunog odmrzavanja, brzim postupkom na ledu ( $0 - 4^{\circ}\text{C}$ ), priprema seruma za analize vršena je homogenizacijom 0,5 ml/g uzorka na ledu, u hladnom puferizovanom saharoznom medijumu (1 ml) u staklenoj epruveti za homogenizaciju sa teflonskim tučkom, na 800 obrtaja/min. Nakon centrifugiranja 15 minuta na 3500 obrtaja/min, supernatant je izdvojan i sonifikovan, a talog odbacivan. Pripremljeni uzorci su čuvani u ependorf posudama na  $-20^{\circ}\text{C}$  do momenta određivanja koncentracije proteina i odgovarajućih parametara oksidativnog stresa, a tokom određivanja aktivnosti enzimskih i neenzimskih parametara antioksidativne zaštite analize su držane na  $+4^{\circ}\text{C}$ .

Nakon pripreme uzorka seruma određivani su parametri oksidativnog stresa: MDA, aktivnost ukupne SOD i koncentracija ukupnih -SH grupa.

#### **3.4.2.1. Određivanje koncentracije proteina**

Proteini su određivani metodom po Bradford-u, koja se zasniva na vezivanju boje za molekul proteina, pri čemu dolazi do pomeranja apsorpcionog maksimuma vezane, u odnosu na apsorpcioni maksimum boje u slobodnom obliku (156).

U epruvetu je odmeravano 10  $\mu$ l uzorka, zatim 2,5 ml Bradford-ovog reagensa i mešano na vorteksu. Uzorci su inkubirani 5 minuta, a zatim je merena apsorbanacija na 595 nm. Koncentracija proteina se izračunava iz regresione jednačine:  $y = 0,091x + 0,032$  ( $r^2 = 0,9947$ ) gde je  $x$  - koncentracija proteina ( $\mu$ g/ml), a  $y$  - apsorbanacija.

#### **3.4.2.2. Određivanje koncentracije malondialdehida**

Određivanje MDA u serumu se zasniva na reakciji MDA sa TBA u kiseloj sredini u toku 15 minuta na 95 °C u vodenom kupatilu. Intenzitet bledožute do ljubičaste boje je meren na talasnim dužinama od 523 nm i 600 nm, da bi se otklonile interferencije.

U epruvete je odmeravano 0,3 ml seruma i 0,6 ml TBA reagensa (15%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  i 0,375% TBA u 0,25 mol/l HCl), a zatim zagrevano 15 minuta na 95 °C u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja apsorbanacija je merena prema slepoj probi. Koncentracija MDA je izračunavana iz regresione jednačine:  $y = 0,0020x + 0,0101$  ( $r^2 = 0,9990$ ), gde je  $y$  – razlika apsorbanacija na 523 nm i 600 nm, a  $x$  – koncentracija MDA (nmol/ml homogenata).

#### **3.4.2.3. Određivanje aktivnosti ukupne superoksid-dismutaze**

Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1.) u serumu je određivana po metodi Misra i Fridovich (157), na talasnoj dužini od 480 nm, kinetičkom metodom u baznoj sredini. Aktivnost SOD u internacionalnim jedinicama (IU) je izračunavana preko sledeće proporcije:  $0,0125 : 1\text{IU} = [0,025 (\Delta A \text{ analize/min})] : X$ , a IU se definiše kao aktivnost enzima koja izaziva 50% inhibicije autooksidacije adrenalina.

#### **3.4.3.4. Određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih grupa**

Ukupna koncentracija –SH grupa u homogenatima tkiva određivana je Ellman-ovom metodom (158). Apsoorbancija žute boje je merena na 412 nm, a zasniva se na reakciji sa DTNB reagensom. Koncentracija –SH grupa se u analiziranim uzorcima

izračunava iz standardne krive:  $y = 0,0017x + 0,0032$ , gde je  $y$  – apsorbanacija na 412 nm, a  $x$  – koncentracija –SH grupa (nmol/ml homogenata).

### 3.4.3. Određivanje bioelemenata i teških metala

Nitratna kiselina ( $\text{HNO}_3$ ) 64% p.a. (Sigma-Aldrich, *St. Louis, MA, SAD*) (J.T. Baker, *Deventer, Holandija*) je nabavljena iz komercijalnih izvora, kao i osnovni standardni rastvori: Cd ( $c=1000\pm 2$  mg/l), Pb ( $c=1001\pm 3$  mg/l), Hg ( $c=1000\pm 4$  mg/l), As ( $c=1000\pm 1$  mg/l), Mn ( $c=1001\pm 2$  mg/l), Cu ( $c=1001\pm 5$  mg/l), Zn ( $c=1001\pm 5$  mg/l) i Fe ( $c=1001\pm 5$  mg/l) (Merck, *Darmstadt, Nemačka*). Od osnovnih standardnih rastvora metala do radnih standardnih rastvora za kalibraciju pravljeni su razblaženja sa 5%  $\text{HNO}_3$ .

Uzorci krvi (oko 1mL) za određivanje sadržaja bioelemenata i toksičnih metala su bili mineralizovani postupkom vlažne mineralizacije. Odmeravani su u teflonsku posudu aparata za mikrotalasnu digestiju (START D, *Milestone, Sorisole, Italija*), a zatim je dodavano 8 mL konc.  $\text{HNO}_3$ . Uslovi za mineralizaciju ispitivanog uzorka su postavljeni podešavanjem parametara programa digestije što je predstavljalo postizanje temperature od 170 °C tokom 10 minuta koja se održava narednih 10 minuta, zatim održavanje ventilacije u trajanju od 15 minuta. Uzorci pripremljeni na prethodno opisan način kvantitativno su prenošeni u normalne sudove, a zatim se u tim rastvorima određivala koncentracija metala metodom idukovano kuplovane plazme sa masenom spektrometrijom (ICP-MS) (iCap Q mass spectrometer, Thermo Scientific, Bremen, Germany). Metoda za određivanje koncentracije metala je validovana, čime je obuhvaćena linearnost za dat raspon koncentracija, limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), koeficijent varijacije i preciznost. Radi provere metode određivanja metala ICP-MS korišćen je sertifikovani referentni materijal (*Seronam*<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood, Serro AS, Billingstad, Norway). *Recovery* vrednosti dobijene iz sertifikovanog referentnog materijala bile su za Mg 100,5, za Cu 99,6, za Zn 99,9, za As 98,7, za Se 101,4, za Cd 100,2, za Hg 101,8 i za Pb 98,9 %.

### 3.5. Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija za varijable sa normalnom distribucijom i kao medijana i interkvartilni raspon za varijable čija

distribucija nije normalna. Kategorične varijable prikazane su kao relativne ili apsolutne frekvence.

Testiranje raspodele izvršeno je Kolmogorov-Smirnov analizom. Poređenje srednjih vrednosti nezavisnih grupa podataka izvršeno je Student t-testom i ANOVA analizom sa Tukey's *post hoc* testom za razlike između podgrupa. Za parametre za koje nije dokazana normalna raspodela, testiranje značajnosti između grupa izvršeno je Mann Whitney testom ili Kruskal–Wallis testom sa *post hoc* Mann Whitney testom. Poređenje dve zavisne populacije izvršeno je Wilcoxon signed-rank testom za podatke koji nisu normalno distribuirani. Analiza kategoričnih vrednosti izvedena je pomoću Chi-kvadrat testa. Udruženost određenih varijabli sa ishodom procenjivano je univarijantnom i multivarijantnom regresionom analizom.  $P < 0,05$  smatrana je statistički značajnom. Sve kalkulacije urađene su pomoću Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) ver. 22 programa.

## 4. REZULTATI

Rezultati ove studije prikazani su u pet delova. U prvom delu pokazane su razlike u protokolima stimulacije između ispitivanih pacijentkinja. U drugom delu pokazan je uticaj doze gonadotropina na ispitivane parametre. Treći deo rezultata činila je analiza prisustva i odsustva oksidativnog stresa. U četvrtom delu prikazan je uticaj bioelemenata i toksičnih metala na različite parametre kod ispitivanih pacijentkinja. Peti deo rezultata prikazuje parametre oksidativnog statusa, bioelemente i toksične metale i njihov uticaj na ispitivane parametre u grupi muških pacijenata.

**Tabela 1.** Demografske karakteristike, bazalni hormonski status, broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija, stopa fertilizacije i stopa trudnoća i porođaja u ispitivanoj grupi pacijentkinja

PARAMETRI	PROSEČNA VREDNOST
Starost	34,7 ± 3,9
BMI, kg/m <sup>2</sup>	22,06 ± 2,84
Pušači, %	28
Dužina steriliteta, godine	5 (3-6)
FSH, mIU/mL	7,29 ± 2,5
LH, mIU/mL	5,2 (3,4-6,6)
E2, pg/mL	40,00 (3,00-60,00)
AMH, ng/mL	1,40 (0,68-3,12)
Doza gonadotropina, IU	2250,2 ± 604,2
Br. jajnih ćelija	5 (3-11)*
Br. zrelih jajnih ćelija (MII)	5 (2-9)
Br. fertilisanih jajnih ćelija	3 (1-5)*
Stopa fertilizacije, %	50,00 (30,07-78,6)
Stopa trudnoća, %	46
Stopa porođaja, %	36



U tabeli 1. prikazane su prosečne vrednosti demografskih karakteristika pacijentkinja uključenih u ispitivanj, kao i karakteristike ciklusa i ishod postupka vantelesnog oplođenja. Takođe je prikazana procentualna zastupljenost uzroka steriliteta, primenjenih protokola stimulacije i metoda fertilizacije u ispitivanoj grupi pacijentkinja (tabela 2). Najzastupljeniji bio je muški faktor infertiliteta (31%), najčešće primenjivan protokol stimulacije bio je kratak protokol, primenjen kod 58% pacijentkinja, dok je metoda inseminacije koja je bila najzastupljenija (43%) bila kombinovana metoda IVF/ICSI.

**Tabela 2.** Uzrok steriliteta, protokoli stimulacije i metoda fertilizacije u ispitivanoj grupi pacijentkinja

<b>Uzrok steriliteta</b>	
<i>Muški, %</i>	31
<i>Nepoznat, %</i>	20
<i>Ovarijalni, %</i>	22
<i>Tubarni, %</i>	22
<i>Kombinovan, %</i>	5
<b>Protokol stimulacije</b>	
<i>Kratak, %</i>	58
<i>Kratak sa kontracepcijom, %</i>	18
<i>Dugi, %</i>	24
<b>Metoda fertilizacije</b>	
<i>IVF %</i>	24
<i>ICSI %</i>	28
<i>Kombinovana %</i>	43

Kvalitet embriona prikazan u tabeli 3 ocenjivan je prema Istambulskom konsenzusu - The Istanbul Consensus workshop of embyo assesement: procedings of an expert meeting, iz 2011. godine. Kod ispitivanih pacijentkinja najviše je bilo embriona klase A (47,1%) i klase B (30,6%).

**Tabela 3.** Kvalitet embriona u ispitivanoj grupi pacijentkinja

<b>Kvalitet embriona</b>	<b>%</b>
<i>Klasa A</i>	47,1
<i>Klasa B</i>	30,6
<i>Klasa C</i>	9,4
<i>Klasa A/ B</i>	12,9

U tabeli 4 prikazan je interkvartilni raspon određivanih parametara oksidativnog stresa (MDA, SODiI –SH grupa) pre i posle započinjanja kontrolisane ovarijalne stimulacije i posle završene stimulacije.

**Tabela 4.** Parametri oksidativnog stresa (OS) pre i posle stimulacije u ispitivanoj grupi pacijentkinja

<b>PARAMETRI OS</b>	<b>Medijana (interkvartilni raspon)</b>
<b>Pre stimulacije</b>	
<i>SOD, U/L</i>	17,57 (15,88-19,53)
<i>MDA, <math>\mu</math>mol/L</i>	1,41 (1,27-1,51)
<i>-SHgrupe, mmol/L</i>	0,24 (0,19-0,29)
<b>Posle stimulacije</b>	
<i>SOD, U/L</i>	14,23 (12,97-16,68)
<i>MDA, <math>\mu</math>mol/L</i>	1,74 (1,50-1,93)
<i>-SHgrupe, mmol/L</i>	0,46 (0,36-0,56)

#### **4.1. PROTOKOLI KONTROLISANE OVARIJALNE STIMULACIJE I OKSIDATIVNI STRES**

U tabeli 5. prikazane su demografske karakteristike, bazalni hormonski status, broj zrelih jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije ispitanica na različitim protokolima stimulacije.

Postoji razlika u godinama starosti ( $p=0,002$ ), koncentracijama FSH ( $p=0,041$ ) i AMH ( $p=0,014$ ), kao i u broju jajnih ćelija ( $p<0,001$ ), kvalitetu jajnih ćelija ( $p=0,001$ ) i broju fertilisanih jajnih ćelija ( $p=0,009$ ) između žena na različitim protokolima stimulacije. Ispitanice na kratkom protokolu stimulacije značajno su starije u odnosu na ispitanice na dugom protokolu stimulacije ( $p=0,001$ ). Takođe, pacijentkinje na kratkom protokolu stimulacije imale su značajno višu koncentraciju FSH u odnosu na žene na kratkom protokolu sa kontraceptivima ( $p=0,043$ ) i dugom protokolu ( $p=0,044$ ) stimulacije, dok su vrednosti AMH bile značajno niže kod žena na kratkom protokolu u poređenju sa dugim protokolom stimulacije ( $p<0,007$ ).

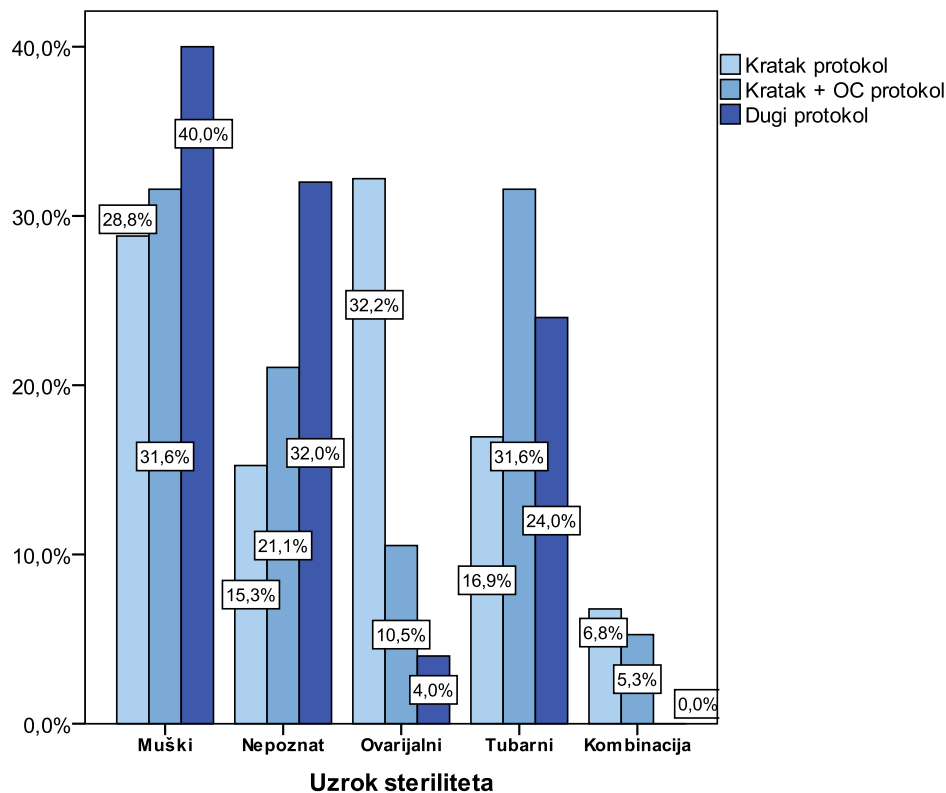
Pacijentkinje kod kojih je primenjen dugi protokol stimulacije imale su značajno veći broj jajnih ćelija u odnosu na druge dve ispitivane grupe ( $p<0,001$  za kratak i  $p=0,001$  za kratak sa kontraceptivima) i kvalitet jajnih ćelija (broj MII ćelija) je bio veći kod žena na dugom protokolu u odnosu na žene na kratkom ( $p<0,001$ ) i kratkom protokolu sa kontraceptivima ( $p=0,002$ ). Slično, broj fertilisanih jajnih ćelija je bio najveći kod žena kod kojih je primenjen dugi protokol stimulacije u odnosu na žene kod kojih je primenjen kratak protokol ( $p=0,003$ ) i kratak protokol sa kontracepcijom ( $p=0,042$ ). Međutim stopa fertilizacije bila je veća u grupi sa kratkim protokolom KOS uz pretretman kontraceptivima u odnosu na kratak i dugi protokol KOS ( $p=0,398$ ).

**Tabela 5.** Demografske karakteristike, bazalni hormonski status, broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije u zavisnosti od protokola stimulacije- kratak, kratak sa pretretmanom oralnim kontraceptivima (OC) i dugi

PARAMETRI	Kratak protokol	Kratak + OC	Dugi protokol	p
Starost	35,5 ± 4,0*	34,8 ± 3,8	32,2 ± 2,9	0,002 <sup>a</sup>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	22,13 ± 2,52	21,38 ± 2,90	22,21 ± 3,52	0,592 <sup>a</sup>
Pušači, %	28,8	33,3	20,0	0,587
Dužina steriliteta, god	5 (4-6)	6 (3-7)	4 (3-5)	0,250 <sup>b</sup>
FSH, mIU/ML	7,87 ± 2,69 <sup>**,*</sup>	6,52 ± 2,21	6,65 ± 1,84	0,041 <sup>a</sup>
AMH, ng/ML	0,95 (0,42-2,79)*	1,45 (1,14-2,85)	2,30 (1,28-4,08)	0,014 <sup>b</sup>
Doza GT, IU	2209,25 ± 577,61	2248,61 ± 657,78	2354,78 ± 641,68	0,625 <sup>a</sup>
Br. jajnih ćelija	4 (1-10)*	5 (4-7)*	12(6-14)	<0,001 <sup>b</sup>
Br. zrelih jajnih ćelija, MII	4 (2-8) *	4 (2-6)*	9 (5-12)	0,001 <sup>b</sup>
Br. fertilisanih jajnih ćelija	2 (1-5)*	2 (2-5)*	5 (3-8)	0,009 <sup>b</sup>
Stopa fertilizacije, %	50,00 (36,4-75,0)	66,7 (50,0-85,7)	47,9 (24,1-78,16)	0,398 <sup>b</sup>

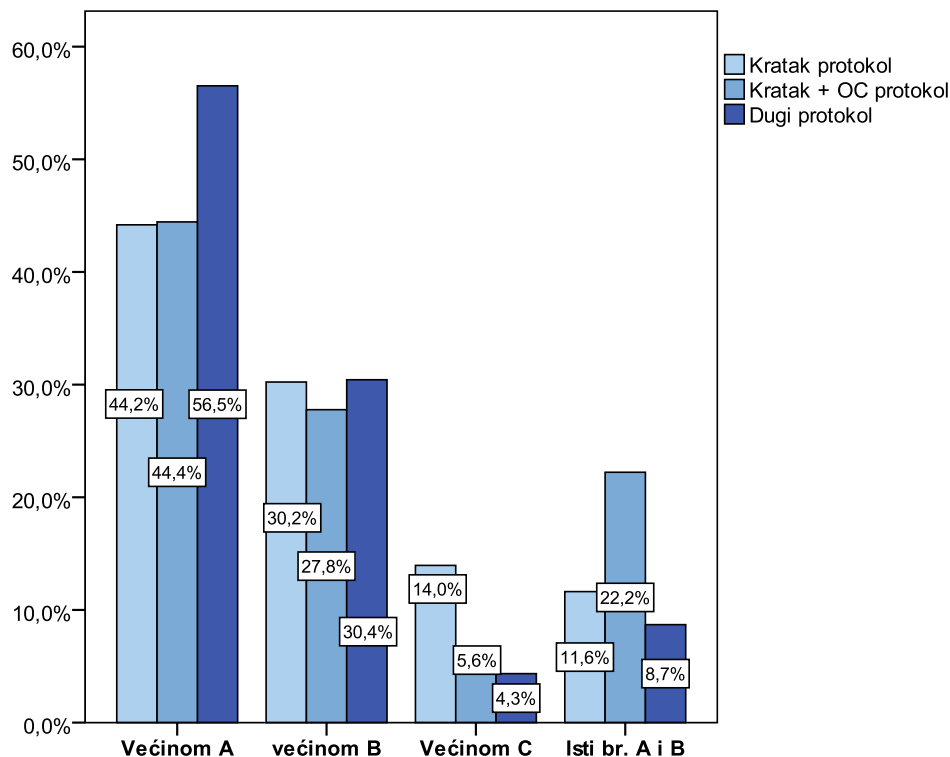
Prikazane su aritmetičke srednje vrednosti ± SD za normalno distribuirane varijable ili medijane (interkvartilni opseg) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. <sup>a</sup> Prema ANOVA-testu; <sup>b</sup> Prema Kruskal–Wallis testu. \* značajna razlika u odnosu na dugi protokol; \*\* značajna razlika u odnosu na kratak + OC protokol

Uzrok steriliteta kod žena gde su primenjeni dugi i kratak protokol KOS uz pretretman sa oralnim kontraceptivima najčešće je bio muški faktor (40% i 32%) dok je uzrok steriliteta u grupi žena gde je primenjen kratak protokol KOS bio poremećaj funkcije ovarijuma (32%), grafikon 1. Nije dokazana razlika u distribuciji uzroka steriliteta između ispitanica na različitim protokolima stimulacije (p=0,079;  $\chi^2$  test).



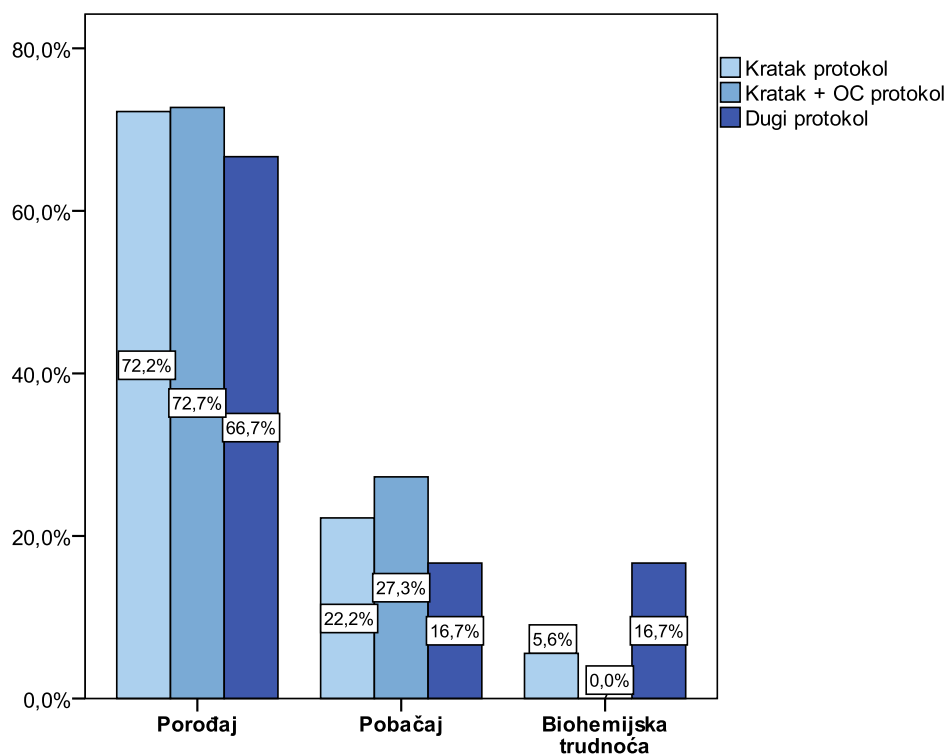
**Grafikon 1.** Uzroci steriliteta kod žena na različitim protokolima kontrolisane ovarijalne stimulacije

Procenjivan je i kvalitet embriona kod ispitanica na različitim protokolima stimulacije (grafikon 2). Nezavisno od protokola stimulacije kod žena su preovladavali embrioni klase A. Navedenu klasu embriona imalo je 44% žena stimulisanih kratkim i kratkim protokolom sa kontraceptivima i 57% žena stimulisanih dugim protokolom. Kvalitet embriona u odnosu na ovaj kriterijum nije bio značajno različit između posmatranih grupa ( $p=0,684$ ;  $\chi^2$  test).



**Grafikon 2.** Kvalitet embriona kod žena na različitim protokolima stimulacije

Analiziran je ishod trudnoća kod pacijentkinja na različitim protokolima stimulacije (grafikon 3). Kod oko 70% žena kod kojih je došlo do trudnoće krajnji ishod je bio porođaj. Nije uočena statistički značajna razlika u stopi porođaja između žena sa različitim protokolima stimulacije ( $p=0,828$ ;  $\chi^2$  test). Stopa pobačaja takođe je bila slična ( $p=0.894$ ), kao i stopa biohemijskih trudnoća  $p=0,449$  (Fisher test).



**Grafikon 3.** Procentualna zastupljenost ishoda trudnoća kod žena izloženih različitim protokolima kontrolisane ovarijalne stimulacije

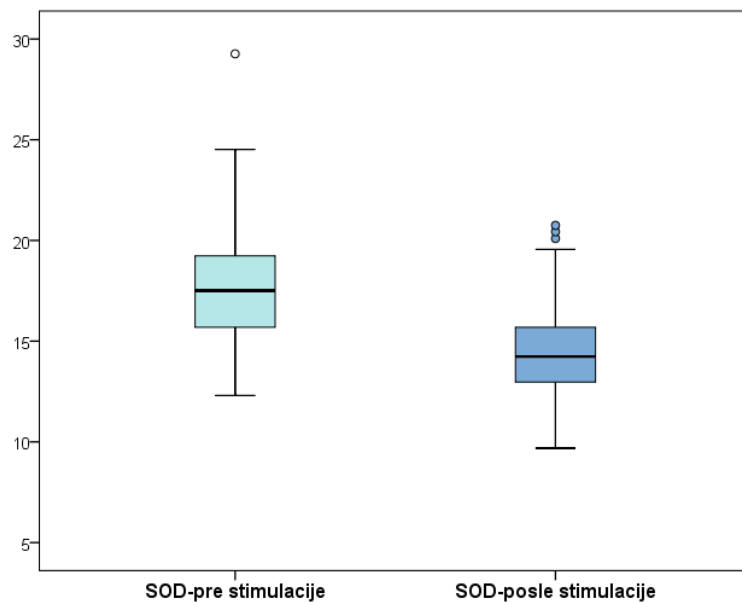
U tabeli 6 prikazane su vrednosti parametara oksidativnog statusa u krvi pre i posle primenjene kontrolisane ovarijalne stimulacije kod ispitivanih pacijentkinja. Dokazana je statistički značajna razlika u aktivnosti SOD ( $p < 0,001$ ), koncentracijama MDA ( $p < 0,001$ ) i -SH grupa ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 6.** Parametri oksidativnog statusa pre i posle stimulacije

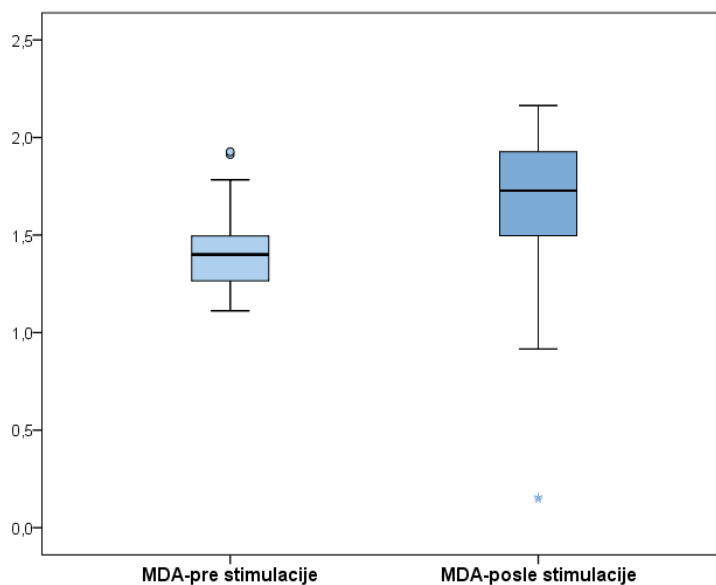
PARAMETRI	Pre stimulacije	Posle stimulacije	p
SOD, U/L	17,56 (15,88-19,53)	14,23 (12,96-15,68)	<0,001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	1,41 (1,27-1,51)	1,74 (1,49-1,93)	<0,001
-SH grupe, $\text{mmol/L}$	0,24 (0,19-0,29)	0,46 (0,36-0,56)	<0,001

Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Wilcoxon signed-rank testom (poređenje dve zavisne populacije).

Aktivnosti SOD bile su značajno niže posle stimulacije u odnosu na vrednosti pre stimulacije (grafikon 4), dok su koncentracije MDA (grafikon 5) i -SH grupa (grafikon 6) posle stimulacije značajno više u odnosu na vrednosti pre stimulacije.

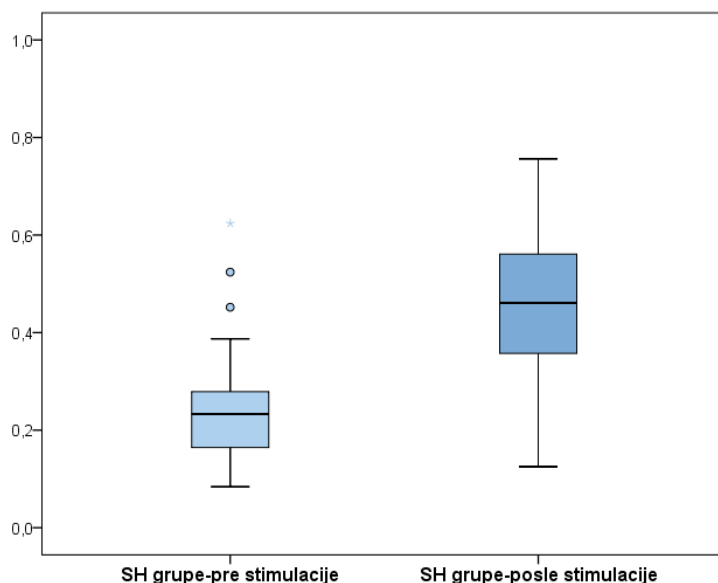


**Grafikon 4.** Aktivnost SOD pre i posle stimulacije



**Grafikon 5.** Koncentracije MDA pre i posle stimulacije





**Grafikon 6.** Koncentracije –SH grupa pre i posle stimulacije

Efekat primenjenog protokola KOS na parametre oksidativnog statusa prikazan je u tabelama 7-9. Kod 40 žena sa primenjenim kratkim protokolom stimulacije, aktivnost SOD bila je značajno niža dok su vrednosti MDA i –SH grupa bile značajno više posle stimulacije u odnosu na vrednosti pre stimulacije (tabela 7).

**Tabela 7.** Parametri oksidativnog statusa pre i posle stimulacije kratkim protokolom kontrolisane ovarijalne stimulacije

PARAMETRI	Pre stimulacije	Posle stimulacije	p
SOD, U/L	17,56 (15,57-19,61)	14,5 (12,97-16,03)	<0,001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	1,40 (1,29-1,50)	1,71 (1,49-1,93)	<0,001
-SH grupe, $\text{mmol/L}$	0,24 (0,19-0,29)	0,47 (0,34-0,57)	<0,001

Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Wilcoxon signed-rank testom (poređenje dve zavisne populacije).

Promene parametara oksidativnog statusa kod 17 ispitanica kod kojih je primenjen kratak protokol stimulacije sa pretretmanom kontraceptivima prikazan je u tabeli 8. Dokazana je statistički značajna razlika za sva tri ispitivana parametra oksidativnog statusa pre i posle stimulacije (SOD  $p=0,002$ ; MDA  $p=0,013$ ; -SH grupe  $p=0,002$ ).

**Tabela 8.** Parametri oksidativnog statusa pre i posle stimulacije kratkim protokolom stimulacije sa pretretmanom kontraceptivima

PARAMETRI	Pre stimulacije	Posle stimulacije	p
SOD, U/L	17,85 (15,86-19,32)	13,6 (12,37-15,33)	0,002
MDA, $\mu\text{mol/L}$	1,48 (1,25-1,60)	1,75 (1,53-1,87)	0,013
-SH grupe, $\text{mmol/L}$	0,23 (0,15-0,25)	0,43 (0,35-0,52)	0,002

Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Wilcoxon signed-rank testom (poređenje dve zavisne populacije).

Dugi protokol stimulacije primenjen je kod 24 žene. I u ovoj grupi ispitanica, aktivnost SOD ( $p < 0,001$ ) bila je značajno niža, a vrednosti MDA ( $p = 0,003$ ) i -SH grupa ( $p < 0,001$ ) značajno više posle stimulacije u odnosu na vrednosti pre stimulacije (tabela 9).

**Tabela 9.** Parametri oksidativnog statusa pre i posle dugog protokola kontrolisane ovarijalne stimulacije

PARAMETRI	Pre stimulacije	Posle stimulacije	p
SOD, U/L	17,37 (16,58-19,99)	14,08 (12,59-15,22)	$< 0,001$
MDA, $\mu\text{mol/L}$	1,38 (1,26-1,46)	1,78 (1,45-1,96)	0,003
-SH grupe, $\text{mmol/L}$	0,24 (0,17-0,32)	0,51 (0,42-0,57)	$< 0,001$

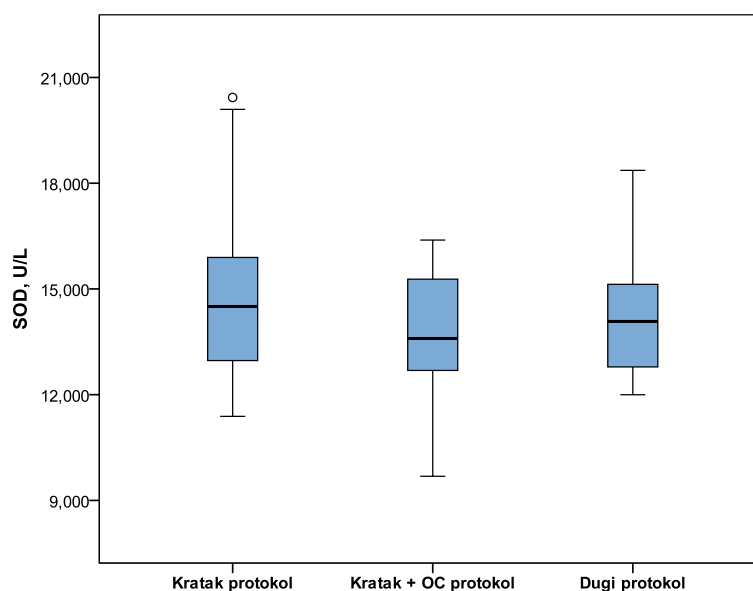
Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Wilcoxon signed-rank testom (poređenje dve zavisne populacije).

Dodatno je ispitivana razlika u vrednostima parametara oksidativnog statusa između ispitanica na različitim protokolima stimulacije (tabela 10). Bez obzira da li su žene bile na kratkom, dugom ili kratkom protokolu stimulacije sa pretretmanom kontraceptivima, nije dokazana razlika u aktivnosti SOD ( $p = 0,289$ , grafikon 7). Slično, vrednosti MDA ( $p = 0,561$ ) i -SH grupa ( $p = 0,207$ ) nisu se značajno razlikovale između ispitanica na različitim protokolima stimulacije (grafikoni 8 i 9).

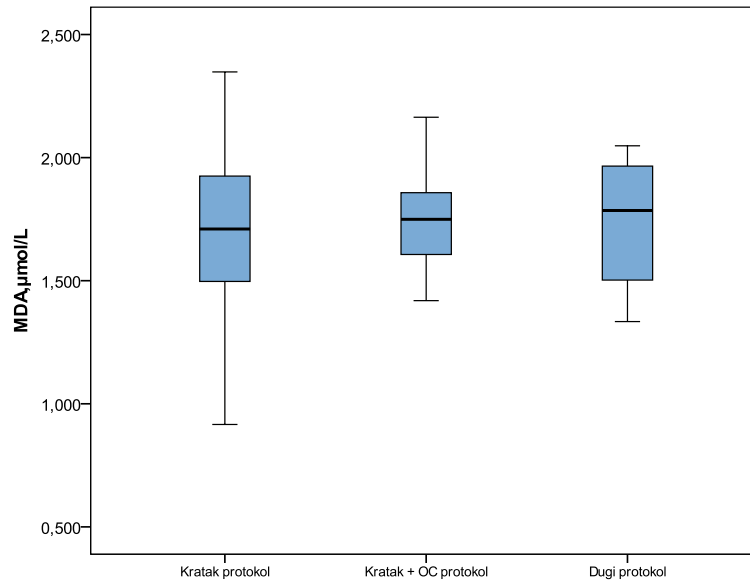
**Tabela 10.** Vrednosti parametara okidativnog statusa nakon stimulacije, a u zavisnosti od protokola stimulacije- kratak, kratak sa pretretmanom oralnim kontraceptivima (OC) i dugi

PARAMETRI	Kratak protokol	Kratak + OC	Dugi protokol	p
SOD, U/L	14,5 (12,97-16,03)	13,6 (12,37-15,33)	14,08 (12,59 -15,22)	0,289
MDA, $\mu\text{mol/L}$	1,71 (1,49-1,93)	1,75 (1,53-1,87)	1,78 (1,45-1,96)	0,561
-SH grupe, mmol/L	0,47 (0,34-0,57)	0,43 (0,35-0,52)	0,51 (0,42-0,57)	0,207

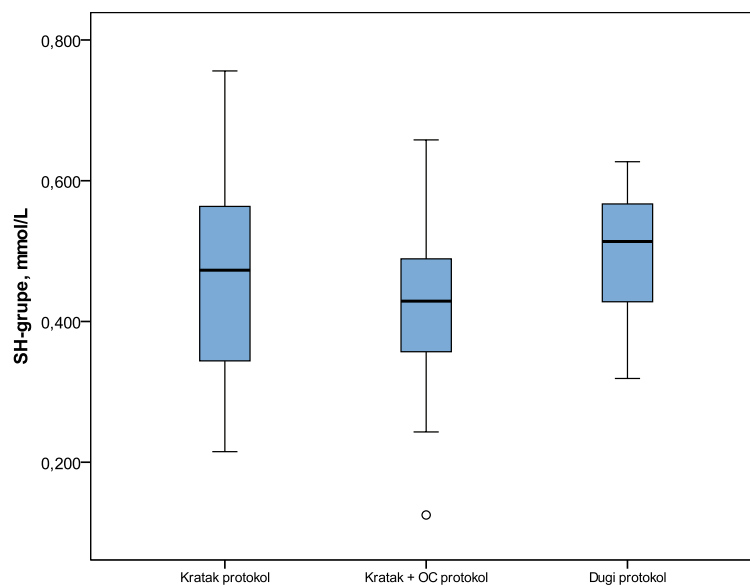
*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje vrednosti posle stimulacije izvršeno je Kruskal–Wallis testom.*



**Grafikon 7.** Aktivnost SOD posle primene različitih protokola stimulacije



**Grafikon 8.** Koncentracije MDA posle primene različitih protokola stimulacije



**Grafikon 9.** Koncentracije -SH grupa posle primene različitih protokola stimulacije

Vrednosti ispitivanih parametara ne razlikuju se između žena koje su tretirane različitim protokolima stimulacije. Nezavisno od protokola stimulacije aktivnost SOD bila je značajno niža, a MDA i -SH koncentracije značajno više u odnosu na vrednosti pre stimulacije.

## 4.2. DOZA GONADOTROPINA I OKSIDATIVNI STRES

Analiziran je uticaj doze gonadotropina (GT) na broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija, na stopu fertilizacije, kvalitet embriona, ishod trudnoće, kao i na parametre oksidativnog statusa ispitanica. Analizirane su i demografske karakteristike žena u odnosu na dozu gonadotropina. Sve ispitanice su podeljene u dve grupe na osnovu doze GT. Ispitanice sa dozom GT nižim od 75-tog percentila (<2625 mlU/mL) svrstane su u grupu sa niskom dozom GT, a žene sa dozom iznad 75-tog percentila (≥2625 mlU/mL) u grupu sa visokom dozom GT.

**Tabela 11.** Demografske karakteristike, bazalni hormonski status, broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije u zavisnosti od primenjene doze gonadotropina

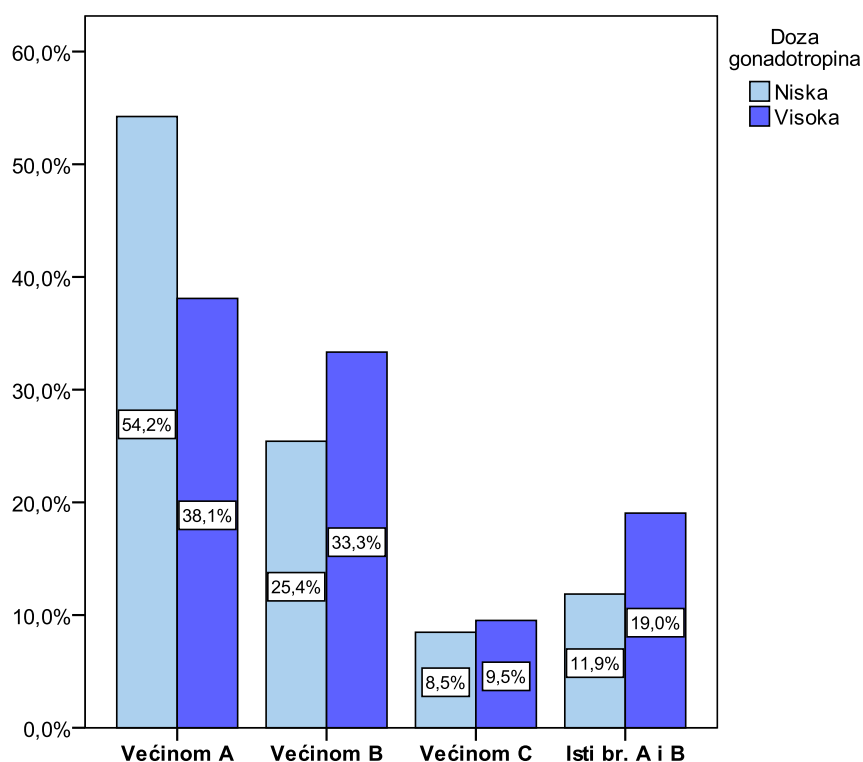
PARAMETRI	Doza gonadotropina		p
	<2625 mlU/mL	≥2625 mlU/mL	
Starost	34,8 ± 4,0	34,4 ± 3,7	0,664 <sup>a</sup>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	22,01 ± 2,95	22,31 ± 2,69	0,650 <sup>a</sup>
Pušači, %	25,4	29,4	0,668
Dužina steriliteta, god	5 (3-6)	5 (4-7)	0,567 <sup>b</sup>
FSH, mIU/mL	7,30 ± 2,49	7,48 ± 2,56	0,750 <sup>a</sup>
AMH, ng/mL	1,86 (0,77 -3,13)	1,00 (0,41 – 2,20)	0,021 <sup>b</sup>
Br. jajnih ćelija	6 (3-11)	5 (2-9)	0,311 <sup>b</sup>
Br. zrelih jajnih ćelija (MII)	5 (2-8)	4 (2-9,75)	0,170 <sup>b</sup>
Br. fertilisanih jajnih ćelija	3 (1-6)	3 (2-5)	0,695 <sup>b</sup>
Stopa fertilizacija %	50,0 (32,0-72,4)	63,6 (36,65-100)	0,689 <sup>b</sup>

Prikazane su aritmetičke srednje vrednosti ± SD za normalno distribuirane varijable ili medijane (interkvartilni opseg) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. <sup>a</sup> Prema Student t-testu; <sup>b</sup> Prema Mann Whitneu U testu.

Dokazana je statistički značajna razlika u vrednostima AMH između dve ispitivane grupe (p=0,021). Koncentracije AMH su značajno više u grupi žena sa nižim dozama gonadotropina u odnosu na žene sa višim dozama gonadotropina. Žene sa niskim

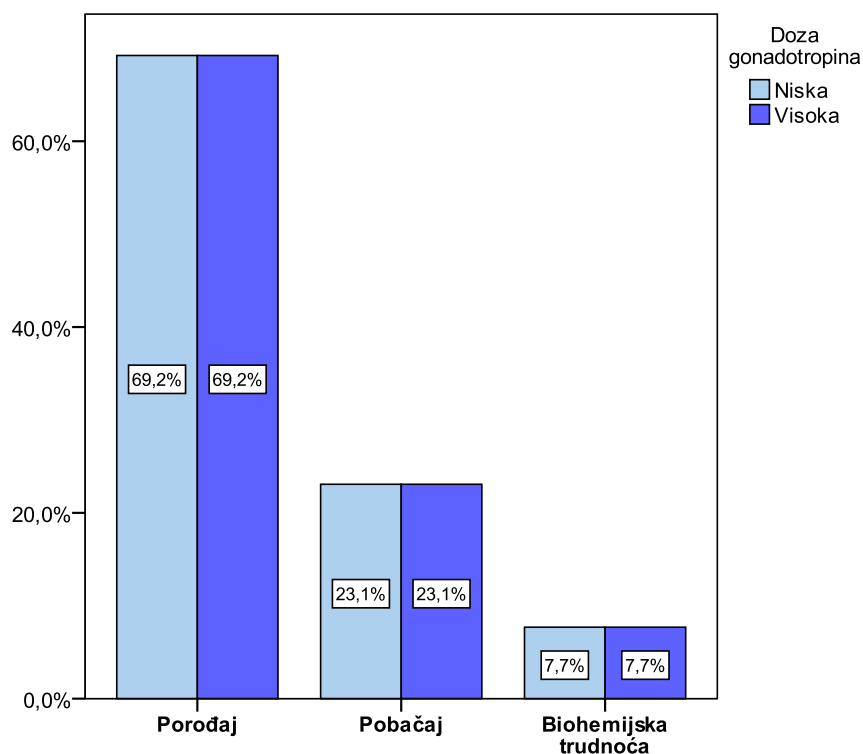
i visokim dozama gonadotropina nisu imale statistički značajno različit broj jajnih ćelija, niti različitu stopu fertilizacije.

Nezavisno od doze GT kod žena su preovladavali embrioni klase A (grafion10). Navedenu klasu embriona imalo je 54% žena sa niskom dozom gonadotropina i 38% žena sa visokom dozom gonadotropina. Kvalitet embriona u odnosu na ovaj kriterijum nije bio značajno različit između posmatranih grupa ( $p=0,625$ ;  $\chi^2$  test).



**Grafikon 10.** Kvalitet embriona kod žena sa različitom primenjenom dozom gonadotropina

Kod oko 69% žena krajnji ishod stimulacije je bio porođaj u obe ispitivane grupe (grafikon 11) ( $p=0,999$ ,  $\chi^2$  test). Takođe i procenat pobačaja je bio približno isti  $p=0,998$  u obe grupe kao i učestalost biohemijskih trudnoća ( $p=0,999$ ).



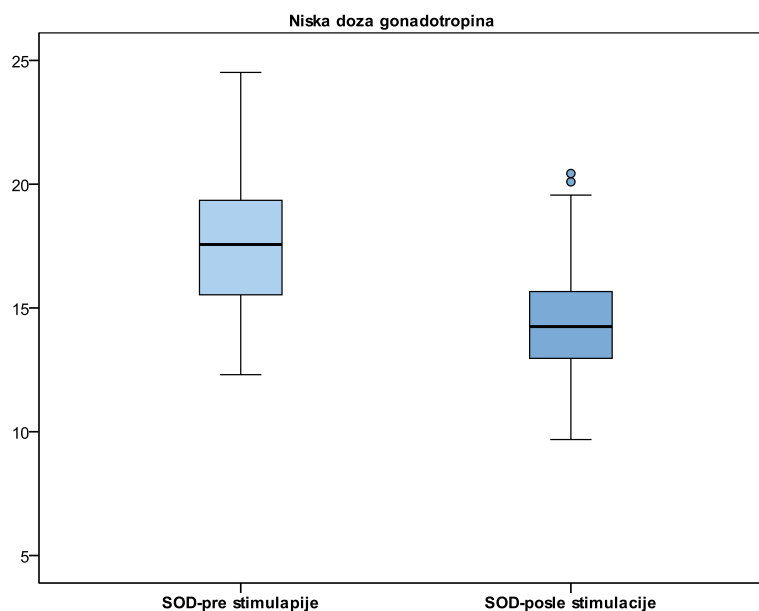
**Grafikon 11.** Procentualna zastupljenost ishoda trudnoća kod žena sa primenjenom različitom dozom gonadotropina

U tabeli 12 prikazane su vrednosti parametara oksidativnog statusa pre i posle stimulacije kod žena sa niskom dozom gonadotropina. Dokazana je statistički značajna razlika u aktivnosti SOD ( $p < 0,001$ ), koncentracijama MDA ( $p < 0,001$ ) i -SH grupa ( $p < 0,001$ ). Aktivnosti SOD bile su značajno niže posle stimulacije u odnosu na vrednosti pre stimulacije (grafikon 12), dok su koncentracije MDA (grafikon 13) i -SH grupa (grafikon 14) posle stimulacije značajno više u odnosu na vrednosti pre stimulacije.

**Tabela 12.** Parametri oksidativnog statusa pre i posle stimulacije kod žena sa primenjenim niskim dozama gonadotropina

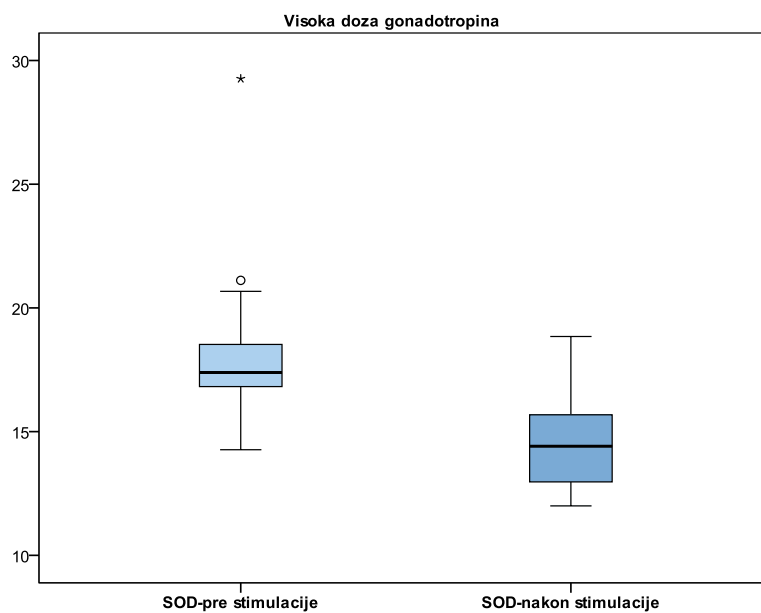
PARAMETRI	Pre stimulacije	Posle stimulacije	p
SOD, U/L	17,56 (15,60-19,68)	14,24 (12,98-15,63)	<0,001
MDA, $\mu\text{mol/L}$	1,41 (1,26-1,50)	1,74 (1,26-1,50)	<0,001
-SH grupe, mmol/L	0,24 (0,18-0,28)	0,46 (0,35-0,54)	<0,001

Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Wilcoxon signed-rank testom (poređenje dve zavisne populacije).

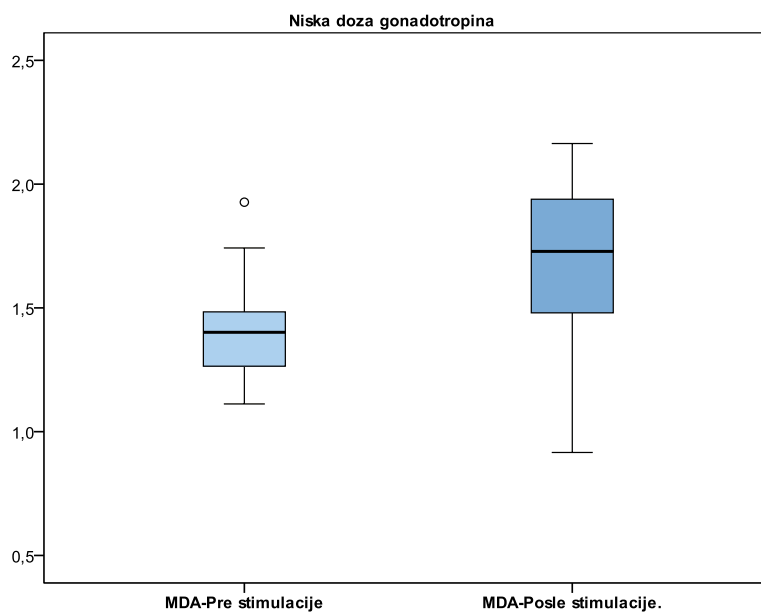


**Grafikon 12.** Aktivnost SOD pre i posle stimulacije kod žena sa primenjenom niskom dozom gonadotropina





**Grafikon 13.** Koncentracije MDA pre i posle stimulacije kod žena sa primenjenom niskom dozom gonadotropina



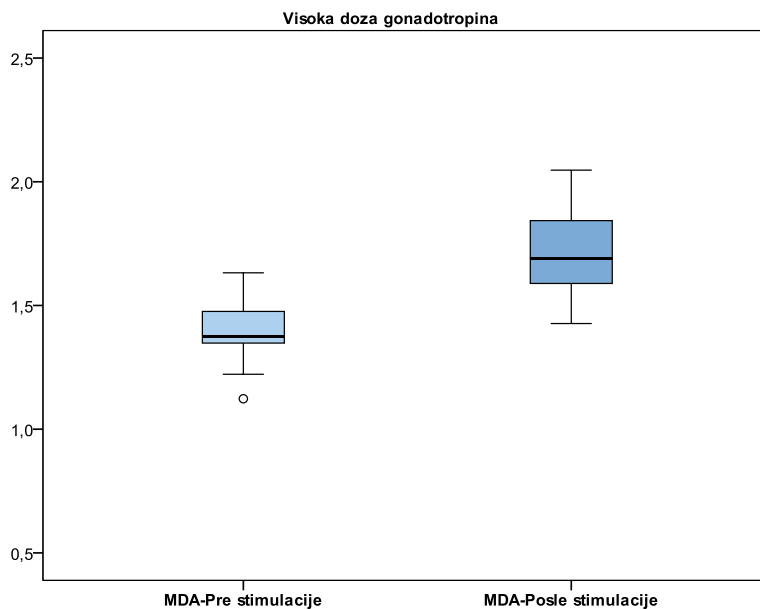
**Grafikon 14.** Koncentracije -SH grupe pre i posle stimulacije kod žena sa primenjenom niskom dozom gonadotropina

Efekat visokih doza gonadotropina na parametre okidativnog statusa prikazan je u tabeli 13. Aktivnost SOD bila je značajno (grafikon15) niža dok su vrednosti MDA (grafikon 16) i -SH grupa (grafikon 17) bile značajno više posle stimulacije u odnosu na vrednosti pre stimulacije.

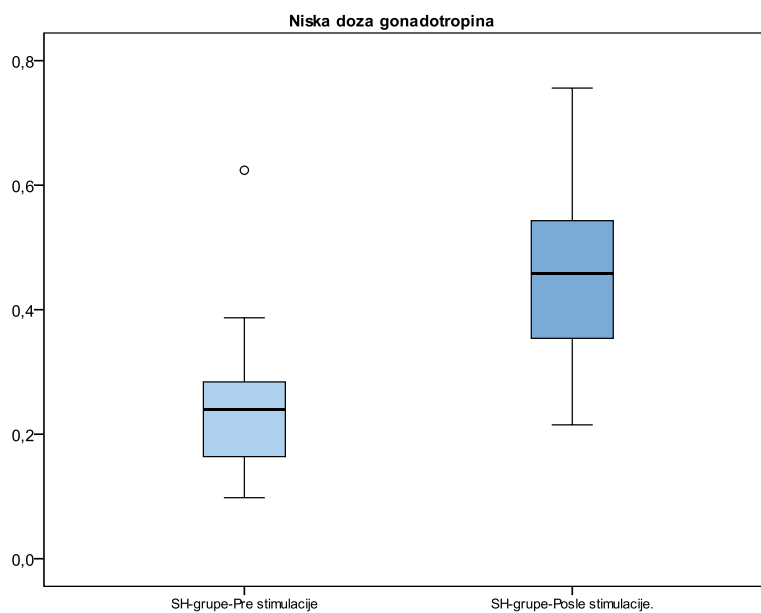
**Tabela 13.** Parametri okidativnog statusa pre i posle stimulacije kod žena sa primenjenim visokim dozama gonadotropina

PARAMETRI	Pre stimulacije	Posle stimulacije	p
SOD, U/L	17,81 (16,9 -19,00)	14,59 (12,97-15,68)	0,003
MDA, $\mu\text{mol/L}$	1,40 (1,33-1,53)	1,69 (1,59-1,84)	0,004
-SH grupe, $\text{mmol/L}$	0,23 (0,21-0,30)	0,53 (0,42-0,59)	<0,001

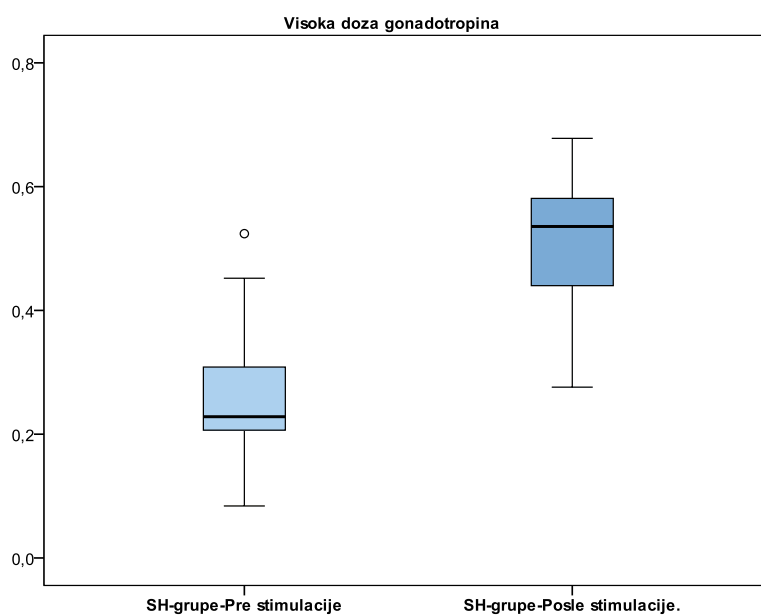
Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Wilcoxon signed-rank testom (poređenje dve zavisne populacije).



**Grafikon 15.** Aktivnost SOD pre i posle stimulacije kod žena sa primenjenom visokom dozom gonadotropina



**Grafikon 16.** Koncentracija MDA pre i posle stimulacije kod žena sa primenjenom visokom dozom gonadotropina



**Grafikon 17.** Koncentracija -SHgrupa pre i posle stimulacije kod žena sa visokom dozom gonadotropina

Dodatno je ispitivana razlika u vrednostima parametara oksidativnog statusa nakon stimulacije između ispitanica sa različitom dozom gonadotropina (tabela 14). Nije

dokazana razlika u aktivnosti SOD ( $p=0,286$ ), vrednostima MDA ( $p=0,600$ ) i -SH grupa ( $p=0,061$ ) između ispitivanih grupa.

**Tabela 14.** Vrednosti parametara oksidativnog statusa u zavisnosti od primenjene doze gonadotropina

PARAMETRI	Doza gonadotropina		p
	<2625 mlU/mL	≥2625 mlU/mL	
SOD, U/L	14,24 (12,98-15,63)	14,59 (12,97-15,68)	0,866
MDA, μmol/L	1,74 (1,26-1,50)	1,69 (1,59-1,84)	0,600
-SH grupe, mmol/L	0,46 (0,35-0,54)	0,53 (0,42-0,59)	0,061

Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje vrednosti posle stimulacije izvršeno je Mann Whitney testom.

### 4.3. KONCENTRACIJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA PRE I POSLE STIMULACIJE

Sve pacijentkinje koje su imale aktivnost SOD manju od 25-tog percentila u ispitivanoj grupi pre stimulacije i koncentracije MDA i -SH grupa veće od 75-tog percentila takođe u ispitivanoj grupi pre stimulacije svrstane su u grupu sa prisutnim oksidativnim stresom (OS grupa). Ostale žene su svrstane u grupu bez oksidativnog stresa (bez OS grupa). U tabeli 15 predstavljene su granične vrednosti ispitivanih parametara OS.

**Tabela 15.** Granične vrednosti za parametare oksidativnog statusa

Percentili	SOD, U/L	MDA, μmol/L	-SHgrupe, mmol/L
25	15,88		
75		1,05	0,285

U grupi bez OS bilo je 46,6% žena, što je značajno manje od žena sa OS pre stimulacije (53,4%), ( $p<0,023$ ;  $\chi^2$  test).

**Tabela 16.** Demografske karakteristike, bazalni hormonski status, broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije kod žena sa i bez oksidativnog stresa

PARAMETRI	OKSIDATIVNI STRES		p
	Odsutan	Prisutan	
Starost	34,2 ± 3,5	35,1 ± 4,2	0,244 <sup>a</sup>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	21,43 ± 2,45	22,34 ± 2,92	0,109 <sup>a</sup>
Pušači, %	17,9	33,9	0,082
Dužina steriliteta, godine	4 (3-6)	5 (4-7)	0,106 <sup>b</sup>
FSH, mIU/mL	7,20 ± 2,82	7,374 ± 2,24	0,734 <sup>a</sup>
AMH, ng/mL	1,54 (0,76 -3,43)	1,40 (0,53 – 3,03)	0,652 <sup>b</sup>
Doza GT, IU	2079,78 ± 575,38	2373,31 ± 597,01	0,021 <sup>a</sup>
Br. jajnih ćelija	6 (3-12)	5 (2-11)	0,504 <sup>b</sup>
Br. zrelih jajnih ćelija, MII	3,5 (2,3-7,0)	5,0 (2,0-10,0)	0,339 <sup>b</sup>
Br. fertilisanih jajnih ćelija	3 (1-5)	3 (1-5)	0,704 <sup>b</sup>
Stopa fertilizacije, %	50,0 (39,8-86,3)	50,0 (25,6-75,5)	0,457 <sup>b</sup>

Prikazane su aritmetičke srednje vrednosti ± SD za normalno distribuirane varijable ili medijane (interkvartilni opseg) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. <sup>a</sup> Prema Student t-testu; <sup>b</sup> Prema Mann Whitneu U testu.

U tabeli 16. prikazane su demografske karakteristike, bazalni hormonski status, broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije kod žena sa i bez OS. Dokazana je statistički značajna razlika u dozi gonadotropina između dve ispitivane grupe (p=0,021). Vrednosti su značajno niže u grupi žena bez OS u odnosu na žene sa OS.

Procenjivan je kvalitet embriona kod ispitanica sa i bez OS (Tabela 17). Nezavisno od prisutnih optimalnih vrednosti parametara oksidativnog stresa preovladavali su embrioni klase A. Ova klasa embriona bila je prisutna kod 41,7% pacijentkinja sa OS i 53% pacijetkinja bez OS. Kvalitet embriona u odnosu na ovaj kriterijum nije bio značajno različit između posmatranih grupa (P=0,571;  $\chi^2$  test).

Tabela 17. Kvalitet embriona kod žena sa i bez oksidativnog stresa

Kvalitet embriona, %	Oksidativni stres		p
	Odustan	Prisutan	
Klasa A	52,9	41,7	0,571
Klasa B	26,5	33,3	
Klasa C	11,8	8,3	
Klasa A/B	8,8	16,7	

Stopa trudnoća je zabeležena kod 47,1% žena bez OS za razliku od 42,9% žena sa OS ( $P=0,701$ ). Stopa porođaja ( $p=0,629$ ) bila je slična u obe grupe, kao i stopa pobačaja i biohemijskih trudnoća (tabela 18), ( $p=0,478$ ,  $p=0,176$ ;  $\chi^2$  test).

Tabela 18. Procentualna zastupljenost ishoda trudnoća kod žena sa i bez oksidativnog stresa pre stimulacije

Ishodi trudnoća, %	Parametari oksidativnog stresa		p
	Odsutan	Prisutan	
Porođaji	73,7	70,8	0,629
Pobačaji	20,0	20,8	0,477
Biohemijska trudnoća	6,7	8,3	0,176

Pošto je nakon stimulacije zabeležen porast parametara OS posmatran je uticaj izraženog disbalansa u parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite nakon stimulacije na sve ispitivane parametre. I u ovom slučaju sve žene koje su nakon stimulacije imale aktivnost SOD manju od vrednosti koja je definisana u tabeli 15 i koncentracije MDA i -SH grupa veće od vrednosti takođe definisanih u tabeli 15, svrstane su u grupu sa disbalansom u parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (OS grupa). Ostale žene su svrstane u grupu bez poremećenog oksidativnog stresa (bez OS grupa). U 62,7% žena postojao je OS nakon stimulacije ( $p<0,021$ ;  $\chi^2$  test).

U tabeli 19 prikazane su demografske karakteristike, bazalni hormonski status, broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije kod žena sa i bez OS. Nije dokazana statistički značajna razlika u ispitivanim parametrima u zavisnosti od prisutnog ili odsutnog OS posle stimulacije.

**Tabela 19.** Demografske karakteristike, bazalni hormonski status, broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije u zavisnosti od prisutnog oksidativnog stresa posle stimulacije

PARAMETRI	Oksidativni stres posle stimulacije		p
	Odsutan	Prisutan	
Starost	34,3 ± 4,3	34,5 ± 3,5	0,824 <sup>a</sup>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	22,14 ± 2,73	21,88 ± 3,17	0,705 <sup>a</sup>
Pušači, %	19,4	27,5	0,408
Dužina steriliteta, god	4 (3-7)	5 (3-6)	0,644 <sup>b</sup>
FSH, mIU/mL	6,99 ± 2,93	7,13 ± 2,30	0,816 <sup>a</sup>
AMH, ng/mL	1,40 (0,72 -2,80)	1,64 (0,71 – 3,92)	0,644 <sup>b</sup>
Doza GT, IU	2212,96 ± 507,65	2181,41 ± 672,93	0,874 <sup>a</sup>
Br. jajnih ćelija	5 (3-11)	7 (3-12)	0,326 <sup>b</sup>
Br. zrelih jajnih ćelija (MII)	4,0 (2,0-8,0)	5,0 (2,0-10,0)	0,495 <sup>b</sup>
Br. fertilisanih jajnih ćelija	3 (1-4)	3 (2-6)	0,240 <sup>b</sup>
Stopa fertilizacije, %	50,0 (25,0-66,7)	50,0 (28,6-81,8)	0,450

Prikazane su aritmetičke srednje vrednosti ± SD za normalno distribuirane varijable ili medijane (interkvartilni opseg) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. <sup>a</sup> Prema Student t-testu; <sup>b</sup> Prema Mann Whitneu U testu.

Procenjivan je i kvalitet embriona kod ispitanica u zavisnosti od prisutnog ili odsutnog OS posle stimulacije (Tabela 20). Nezavisno od prisustva OS preovladavali su embrioni klase A, koju je imalo 42,3% žena bez i 55% žena sa OS. Kvalitet embriona u odnosu na ovaj kriterijum nije bio značajno različit između posmatranih grupa ( $p=0,737$ ;  $\chi^2$  test).

**Tabela 20.** Kvalitet embriona u zavisnosti od prisutnog ili odsutnog oksidativnog stresa posle stimulacije

Kvalitet embriona, %	Oksidativni stres posle stimulacije		p
	Odsutan	Prisutan	
Klasa A	42,3	54,8	0,737
Klasa B	34,6	31,0	
Klasa C	11,5	7,1	
Klasa A / B	11,5	7,1	

**Tabela 21.** Procentualna zastupljenost ishoda trudnoća u zavisnosti od prisutnog ili odsutnog oksidativnog stresa posle stimulacije

Ishod trudnoće, %	Oksidativni stres posle stimulacije		p
	Odsutan	Prisutan	
Porodaji	81,8	68,2	0,347
Pobačaji	0	31,8	0,040
Biohemijske trudnoće	18,2	0	0,104

Trudnoća je zabeležena kod 40,7% žena bez OS za razliku od 51,2% žena sa OS nakon stimulacije ( $p=0,395$ ). Međutim iako je kod svega 40,7% žena bez OS zabeležena trudnoća, 82% trudnoća se završilo porođajem, a nije zabeležen ni jedan pobačaj. S druge strane kod 51,2% žena sa OS zabeležena je trudnoća koja se u 68% slučajeva završila porođajem, a u 31,8% slučajeva pobačajem. Procenat pobačaja bio je značajno veći u grupi sa prisutnim OS, dok je procenat porođaja je bio značajno veći u grupi žena bez OS u odnosu na žene sa OS posle stimulacije ( $p=0,021$ ) (tabela 21).



#### 4.4. BIOELEMENTI I TOKSIČNI METALI KOD ISPITIVANIH ŽENA

U ovom delu analiziran je uticaj bioelemenata i toksičnih metala na ispitivane parametre. Od bioelemenata i toksičnih metala ispitivane su koncentracije Mg, Zn, Se i Cu (bioelementi) i Hg, Pb, As i Cd (toksični metali). U ovoj grupi ispitanica analiziran je manji broj ispitanica (104), kod preostalih pacijentkinja nije bilo moguće izvršiti analizu iz tehničkih razloga tokom obrade materijala.

U tabeli 22 prikazana je distribucija ispitanica prema demografskim karakteristikama, faktorima rizika dužini i uzroku infertiliteta, kao i tehnici inseminacije, protokolu stimulacije, kvalitetu embriona i ishodu lečenja. Među ispitanicama sa pozitivnim ishodom statistički značajno je veća zastupljenost žena mlađih od 35 godina ( $p < 0,004$ ). Najzastupljenije su ispitanice sa pozitivnim ishodom koje su normalno uhranjene, u odnosu na gojazne ili pothranjene pacijentkinje, ali bez statističke značajnosti, ( $p = 0,530$ ). Neznatno je veća je zastupljenost ispitanica sa pozitivnim ishodom koje imaju trajanje infertiliteta do 3 godine ( $p = 0,537$ ). Manje je bilo ispitanica sa pozitivnim ishodom koje su pušači, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na ispitanice sa ovim faktorom rizika sa negativnim ishodom ( $p = 0,068$ ). Najveća je zastupljenost ispitanica sa pozitivnim ishodom gde je primenjena kombinovana tehnika (46,3%) u odnosu na ispitanice sa negativnim ishodom (38,1%), ali bez značajnosti. Među ispitanicama sa pozitivnim ishodom statistički značajno je najmanja zastupljenost žena sa ovarijalnim uzrokom steriliteta ( $p < 0,031$ ) u odnosu na ispitanice sa negativnim ishodom. Najzastupljeniji uzroci steriliteta kod žena sa pozitivnim ishodom su muški uzrok steriliteta kod trećine žena, kao i nepoznat uzrok kod druge trećine, a 22% ispitanica sa pozitivnim ishodom je imalo tubarni uzrok steriliteta. Od ukupnog broja žena sa pozitivnim ishodom statistički značajno je veća zastupljenost žena sa pozitivnim ishodom trudnoće ( $p < 0,0001$ ), u odnosu na ispitanice sa pobačajima ili biohemijskim trudnoćama.

**Tabela 22.** Distribucija ispitanica prema demografskim karakteristikama, faktorima rizika dužini i uzroku infertiliteta, kao i tehnici inseminacije, protokolu stimulacije, kvalitetu embriona i ishodu lečenja.

	Ukupno N=104	%	Nisu trudne		Trudne		p
			N=63	%	N=41	%	
<b>Starost</b>							
< 35godina	48	46%	22	35%	26	63%	0,004
35 godina i više	56	54%	41	65%	15	37%	
Ukupno	104	100%	63	100%	41	100%	
<b>BMI</b>							
Pothranjene	5	5%	2	3%	3	7%	0,530
Normalno uhranjene	81	78%	51	81%	30	73%	
Gojazne	18	17%	10	16%	8	20%	
<b>Navika pušenja</b>							
Pušači	28	27%	21	33%	7	17%	0,068
Nepušači	76	73%	42	67%	34	83%	
<b>Trajanje infertiliteta</b>							
< 3 godine	27	26%	15	24%	12	29%	0,537
3 godine i više	77	74%	48	76%	29	71%	
<b>Tehnika inseminacije</b>							
Otkazani postupci	9	9%	9	14%	0	0%	0,083
IVF	24	23%	13	21%	11	27%	
ICSI	28	27%	17	27%	11	27%	
Kombinovana tehnika	43	41%	24	38%	19	46%	
<b>Uzrok infertiliteta</b>							
Muški factor	33	32%	20	32%	13	32%	0,031
Kombinovani	5	5%	2	3%	3	7%	
Nepoznat	22	21%	9	14%	13	32%	
Ovarijalni	22	21%	19	30%	3	7%	
Tubarni	22	21%	13	21%	9	22%	
<b>Protokol stimulacije</b>							
Kratak sa GnRH ant	60	58%	42	67%	18	44%	0,057
Kratak sa GnRH ant i OC	19	18%	8	13%	11	27%	
Dugi sa GnRH agonistima	25	24%	13	21%	12	29%	
<b>Ishod trudnoće</b>							
Nisu trudne	63	61%	63	100%	0	0%	0,000
Porodaji	29	28%	0	0%	29	71%	
Pobačaji	9	9%	0	0%	9	22%	
Biohemijske trudnoće	3	3%	0	0%	3	7%	

$\chi^2$  test

**Tabela 23.** Demografske varijable i karakteristike ciklusa ispitivanih pacijentkinja

	Nisu trudne		Trudne		p
	Mean±SD	Min.-Max.	Mean±SD	Min.-Max.	
Godine starosti	35,11±4,08	21-41	33,95±3,71	25-40	0,145
BMI	22,32±2,83	16,5-29,4	21,65±2,82	16,8-27,5	0,243
Dužina infertiliteta (godine)	5,83±3,43	2-18	4,63±1,71	2-9	‡0,05
Doza gonadotropina (IU)	2194,5±636,8	900-4275	2335,5±537,6	1200-3375	‡0,589
Broj jajnih ćelija	6,49±6,84	0-31	8,32±4,83	1-21	‡0,026
Broj zrelih jajnih ćelija (MII)	4,67±5,09	0-24	6,83±4,02	1-16	‡0,063
Broj fertilisanih jajnih ćelija	2,93±2,90	0-13	4,63±2,88	1-11	‡0,032
Embrioni klase A	2,05±1,32	1-6	2,82±2,25	1-11	‡0,777
Embrioni klase B	1,88±1,15	1-6	1,68±0,82	1-4	‡0,999
Embrioni klase C	1,00±0,00	1-1	1,80±1,10	1-3	‡0,586
Stopa fertilizacije (%)	67,64±28,57	4,17-100	73,80±25,60	10-100	‡0,429

Min.-Minimum, Max. -Maximum, Mean±SD Mean±Standardna devijacija, Anova F test, ‡K-W test

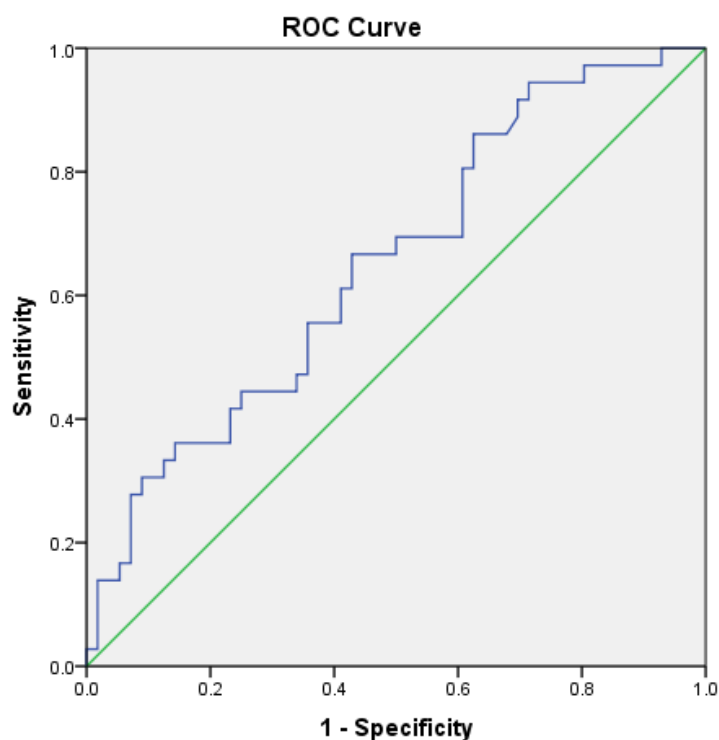
Prosečne vrednosti sa standardnim devijacijama, kao i minimalne i maksimalne vrednosti karakteristika ciklusa i ishoda IVF postupka prikazane su u tabeli 23. Pacijentkinje koje su postigle koncepciju imale su više jajnih ćelija ( $p=0,026$ ), kao i veći broj fertilisanih jajnih ćelija ( $p=0,032$ ). Kod ovih pacijentkinja je i infertilitet kraće trajao ( $p=0,050$ ).

Kod žena sa pozitivnim ishodom statistički značajno je niža prosečna vrednost Mg ( $p<0,009$ ), u odnosu na ispitanice sa negativnim ishodom, kao i koncentracije As ( $p<0,05$ ), u odnosu na ispitanice sa negativnim ishodom zatim kao i koncentracija Pb ( $p<0,034$ ) u odnosu na ispitanice sa negativnim ishodom (tabela 24).

**Tabela 24.** Prosečne vrednosti bioeleminata i toksičnih metala u odnosu na ishod postupka vantelesnog oplodjenja

	Nisu trudne		Trudne		P
	Mean±SD	Min.-Max.	Mean±SD	Min.-Max.	
Mg, mg/dL	3,11±0,28	2,26-3,69	2,95±0,29	2,22-3,48	0,009
Cu, µg/dL	116,48±20,59	55-177	121,14±19,14	88-177	0,280
Zn, mmol/L	88,98±12,58	65,46-110,43	84,81±12,45	43,90-109,51	0,123
As, µg/L	1,29±1,31	0,50-6,90	0,85±0,44	0,50-2,44	‡ 0,050
Se, µg/l	78,38-30,40	49-170	74,43-29,02	49-150	0,936
Cd, µg/l	1,83±5,44	0,49-31,14	0,51±0,13	0,49-1,24	‡ 0,012
Hg, µg/l	1,27±0,86	0,90-5,27	2,07±3,37	0,90-17,14	‡ 0,966
Pb, µg/dl	1,02±0,66	0,39-4,30	0,72±0,38	0,10-2,23	‡ 0,034

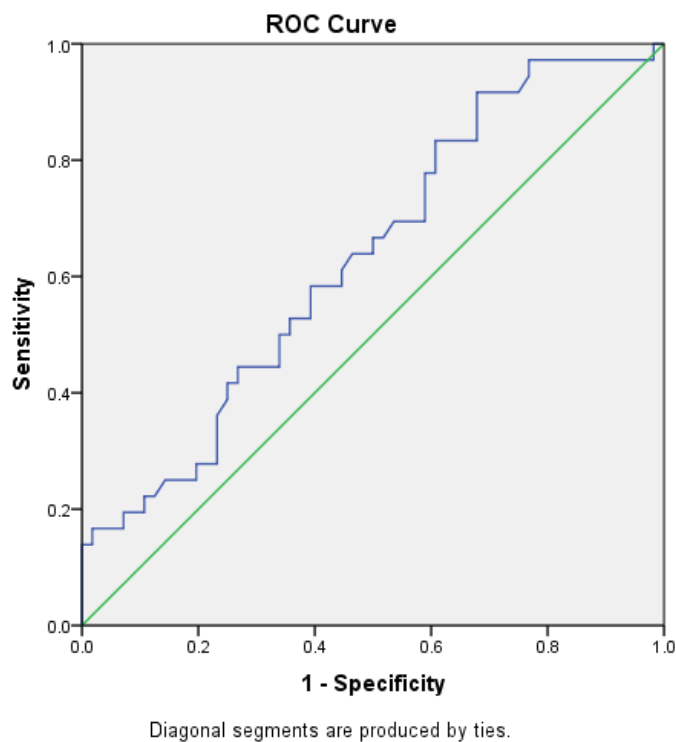
Mean±SD Mean±Standardna devijacija , Min.-Minimum,Max. –Maximum, ,Anova F test, ‡K-W test



Diagonal segments are produced by ties.

**Grafikon 18.** ROC kriva za Mg

Prikazana je ROC kriva konstruisana za Mg – površina ispod krive je za pozitivan ishod za trudnoću bila je 0.651 ( $p < 0,015$ ). Optimalna *cut-off* tačka za Mg bila je 3,3 mg/dl sa senzitivnošću od 94% i specifičnošću 30% za pozitivan ishod postupka (grafikon 18).



**Grafikon 19.** ROC kriva za Pb

Prikazana je ROC kriva konstruisana za olovo – površina ispod krive je za trudnoću 0.632 ( $p < 0,015$ ). Optimalna *cut-off* tačka za Pb bila je 0.96 mg/dl sa senzitivnošću od 92% i specifičnošću 40% za pozitivan ishod postupka ( $p < 0,034$ ) (grafikon 19).

**Tabela 25.** Korelacija između koncentracija bioelemenata i toksičnih metala sa dozom gonadotropina, ishodom postupka - brojem jajnih ćelija, kvalitetom jajnih ćelija (MII), brojem fertilisanih jajnih ćelija i stopom fertilizacije

<b>Pirsonova korelacija (r)</b>	<b>Mg, (mg/dL)</b>	<b>Cu (µg/dl)</b>	<b>Zn (mmol/l)</b>	<b>As (µg/l)</b>	<b>Se (µg/l)</b>	<b>Cd (µg/l)</b>	<b>Hg (µg/l)</b>	<b>Pb (µg/dl)</b>
Doza GT	0,109	0,218*	0,073	0,207	-0,020	0,092	0,024	- 0,279**
Br. zrelih jajnih ćelija	-0,154	0,131	-0,004	-0,122	-0,004	-0,16	0,006	-0,095
Fertilisane jajne ćelije	-0,127	0,221*	-0,066	-0,115	0,011	-0,154	0,064	-0,091
Br. fertilisanih jajnih ćelija	0,016	0,164	0,001	-0,029	0,031	-0,197	0,12	-0,048
Stopa fertiliz. %	-0,134	0,16	-0,004	0,029	-0,069	0,144	-0,034	-0,03

Analizom intervala vrednosti i karakteristika ishoda dobijeni su sledeći rezultati: dokazana je međusobna povezanost, odnosno direktna statistički značajna Pirsonova korelacija viših vrednosti Cu sa višim dozama GT ( $p < 0,039$ ). Dokazana je međusobna povezanost, odnosno obrnuta statistički značajna korelacija nižih vrednosti Pb sa višim dozama GT ( $p < 0,008$ ), dokazana je međusobna povezanost, odnosno direktna statistički značajna korelacija viših vrednosti Cu sa većim brojem fertilisanih jajnih ćelija ( $p < 0,041$ ). Stopa fertilizacije je u obrnutoj korelaciji sa koncentracijama Mg, Zn, Se, Hg i Pb, odnosno više stope fertilizacije koreliraju sa nižim vrednostima Mg, Zn, Se, Hg i Pb, ali ne statistički značajno (tabela 25).

**Tabela 26.** Povezanost bioelemedenata i toksičnih metala sa ishodom postupka – kvalitet embriona, tehnika inseminacije, doza gonadotropina, protokol stimulacije i ishodom postupka kao i same trudnoće (biohemijska trudnoća, porođaj, pobačaj)

Spirmanova korelacija (r)		*Embrioni	Tehn. Insemin.	Doza GT	Protokol stim.	Mg	Cu
Ishod IVF Trudne/ Nisu Trudne	r	-0,263*	0,127	0,197*	0,200*	-0,267*	0,168
Ishod trudnoće	r	0,251*	0,110	0,175	0,203*	0,227*	-0,174
		Zn	As	Se	Cd	Hg	Pb
Ishod IVF Trudne/ nisu trudne	r	0,071	-0,126	-0,090	-0,245*	-0,044	-0,208*
Ishod trudnoće	r	-0,085	0,108	0,116	0,218*	0,047	0,245*

\* Kvalitet embriona – dobri (A i B) loši (A/B I C), Cut off vrednosti rezultata, zavisno od intervala: Cu<98=>µg/dl, Mg <3,3>mg/dL Zn<(70-100)=> mmol/l , As <1>= µg/l, Se <50>=µg/l, Cd<0.5 => µg/l, Hg < 1 => µg/l, Pb <0.96=> µg/dl, \*p<0.05; \*\*p<0.01

Analizom povezanosti bioelemedenata i toksičnih metala sa ishodom postupka dokazana je statistički značajna korelacija ishoda i magnezijuma – češće je pozitivan ishod povezan sa nižim vrednostima magnezijuma ( $p < 0,010$ ). U statistički značajnoj korelaciji sa negativnim ishodom su više vrednosti olova Pb ( $p < 0,046$ ), više vrednosti Cd ( $p < 0,012$ ). Analizom povezanosti kvaliteta embriona sa ishodom postupka, kao i sa ishodom trudnoće dokazana je statistički značajna korelacija pozitivnog ishoda i A i B embriona ( $p < 0,013$ ), kao i višom dozom GT ( $p < 0,045$ ) (tabela 26).

**Tabela 27.** Spirmanova korelacija bioeleminata i toksičnih metala sa ishodom trudnoće

Spirmanova korelacija			Zn	Cu	As	Se	Cd	Hg	Pb
Porodajci	r	-0,283**	-0,141	0,095	-0,162	-0,026	-0,252*	-0,046	-0,040
Pobačaji	r	-0,052	-0,078	0,102	0,057	-0,060	-0,123	0,018	-0,238*

Cut off vrednosti iz naših rezultata, na osnovu intervala: Mg <3,3≥mg/dl, Zn<(70-100)=> mmol/l, Cu<98=>µg/dl, As <1>= µg/l, Se <50>=µg/l, Cd<0.5 => µg/l, Hg < 1 => µg/l, Pb <0.96=> µg/dl \*p<0.05; \*\*p<0.01

Dokazana je statistički značajna korelacija ishoda trudnoće i nivoa Mg, Cd i Pb. Porodajci su bili u korelaciji sa nižim vrednostima Mg (p<0,006), kao i sa nižim vrednostima Cd (p<0,016), dok su pobačaji u korelaciji sa nižim vrednostima Pb (p<0,032) (tabela 27).

U tabeli 28 prikazani su ispitivani parametri koji su u univarijantnoj i multivarijantnoj regresionoj analizi pokazali značajnu prediktivnu moć. Parametri kao što su BMI, dužina infertiliteta, tehnika inseminacije i stopa fertilizacije nisu pokazali značajnu prediktivnu moć u univarijalnoj analizi. Univarijantni prediktori pozitivnog ishoda su starost ispitanica ispod 35 godina (OR=3,2, p<0,005), nepoznat uzrok infertiliteta OR=2,79, (p<0,037), viša doza gonadotropina (OR= 2,28, p<0,041), dve ili više fertilisane ćelije (OR=2,39, p<0,040), dobri embrioni (A i B), (OR=4,85,p<0,021) i Cd ispod 0,05µg/l (OR=9,43, p<0,035).Ovarijalni uzrok steriliteta je prediktor za negativan ishod (OR=5,46,p<0,010). Za pozitivan ishod su univarijantni prediktori Mg ispod ispod 3,3mg/dl, (OR=6,21, p<0,02) kao i Pb ispod 0.96 µg/l, (OR=2,86, p<0,05).



**Tabela 28.** Univarijantna i multivarijantna regresiona analiza

	Univarijantna				Multivarijantna			
	OR	p	95% C.I.for OR		OR	P	95% C.I.for OR	
			Lower	Upper			Lower	Upper
Godine starosti	0,310	0,005	0,136	0,703	0,169	0,007	0,047	0,611
Navika pušenja	2,429	0,072	0,923	6,391				
Nepoznat faktor infertiliteta	2,786	0,037	1,062	7,310				
Ovarijalni faktor	0,183	0,010	0,050	0,666				
Doza gonadotropina (IU)	2,276	0,041	1,035	5,005	4,229	0,015	1,330	13,444
Broj fertilisanih jajnih ćelija	2,391	0,040	1,039	5,502				
Kvalitet embriona	0,206	0,021	0,054	0,787	0,140	0,049	0,020	0,993
Cd( $\mu\text{g/l}$ )	0,106	0,035	0,013	0,852				
Mg, (mg/dL)	0,161	0,020	0,034	0,752	0,117	0,032	0,016	0,816
Pb( $\mu\text{g/dl}$ )	0,373	0,050	0,139	0,998	0,224	0,026	0,060	0,835

Cut off vrednosti na osnovu intervala: Age< 35 years>, smoking/nosmoking, GT dose - < 2100iu , Embryos -High (A and B) quality or Low(C and D) quality embryos , Mg <3,3 $\geq$ mg/dL, Cd<0.5 =>  $\mu\text{g/l}$ , Pb <0.96=>  $\mu\text{g/dl}$

Multivarijantni prediktori pozitivnog ishoda su starost ispitanica ispod 35 godina ( $p<0,007$ ) , viša doza gonadotropina ( $p<0,015$ ), dobri embrioni (A i B), ( $p<0,049$ ) , kao i Mg ispod ispod 3,3 mg/dl, ( $p<0,032$ ) i Pb ispod 0.96  $\mu\text{g/l}$ , ( $p<0,026$ ) (tabela 28).

#### 4.5. OKSIDATIVNI STRES, BIOELEMENTI I TOKSIČNI METALI KOD ISPITIVANIH MUŠARACA

U ovom delu analizirani su parametri oksidativnog statusa, vrednosti bioelemenata i toksičnih metala u krvi ispitivanih muškaraca. U tabeli 29 prikazane su prosečne vrednosti parametara oksidativnog stresa (SOD, MDA i –SH grupa), a u tabeli 30 i 31 prikazane su prosečne vrednosti bioelemenata (Mg, Cu, Zn, Se) i toksičnih metala (Cd, Hg, Pb).

**Tabela 29.** Parametri oksidativnog statusa kod ispitivanih muškaraca

Parametri	Oksidativni status
SOD, U/L	25,17 (22,40-28,82)
MDA, $\mu\text{mol/L}$	0,56 (0,48-0,65)
-SH grupe, mmol/L	0,44 (0,39-0,52)

**Tabela 30.** Prosečne vrednosti bioelemenata kod ispitivanih muškaraca

Bioelementi, mmol/l	Vrednosti
Mg	1,36 (1,28-1,43)
Cu	0,017 (0,016-0,018)
Zn	0,11 (0,10-0,12)
Se	0,0012 (0,0010 -0,0013)

**Tabela 31.** Prosečne vrednosti toksičnih metala kod ispitivanih muškaraca

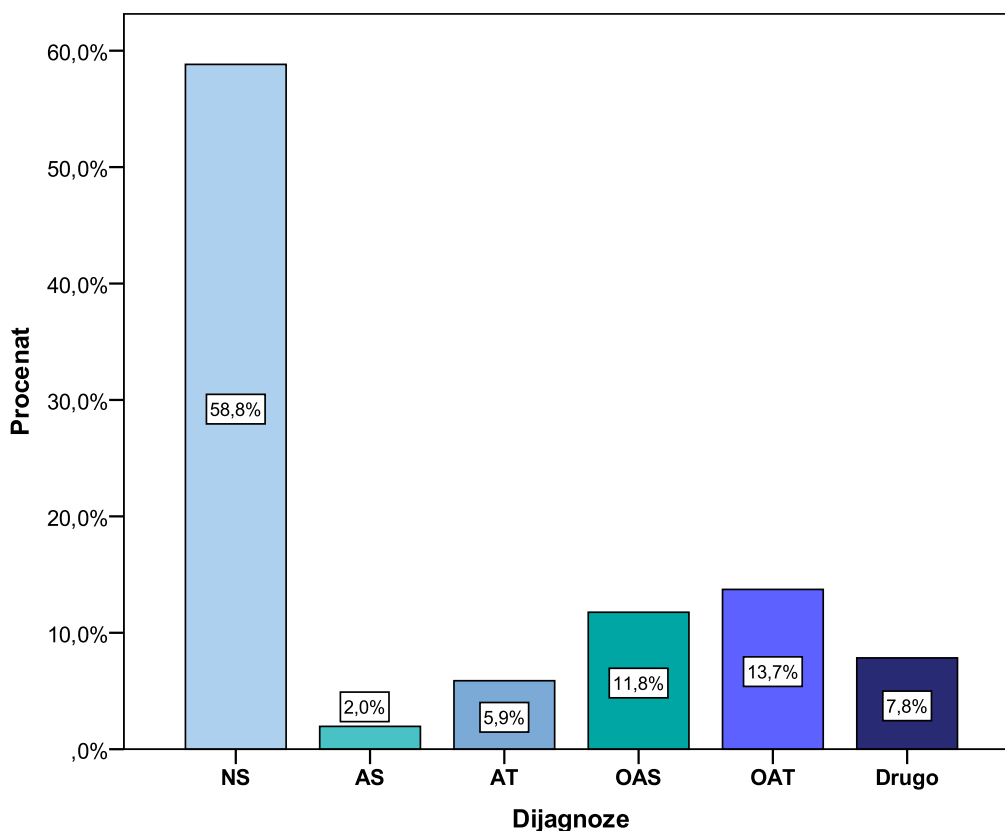
Toksični metali, $\mu\text{mol/l}$	Vrednosti
Cd	0,004 (0,004-0,0045)
Hg	0,006 (0,004-0,010)
Pb	0,10 (0,05-0,172)

**Tabela 32.** Ishodi postupaka vantelesnog oplođenja kod partnerki ispitivanih muškaraca

Parametri	Prosečne vrednosti
Br fertilisanih jajnih ćelija	2,5 (1,0-6,0)
Stopa fertilizacije, %	54,5 (33,3-81,8)
Stopa trudnoća, %	41%
Stopa porođaja*, %	83%

\*stopa porođaja u odnosu na stopu trudnoća

U tabeli 32. prikazan je ishod postupka vantelesnog oplođenja - broj fertilizovanih jajnih ćelija, stopa fertilizacije, kao i stopa trudnoće i porođaja kod partnerki ispitivanih muškaraca.



**Grafikon 20.** Nalazi spermograma u grupi muških ispitanika

Ispitivani pacijenti podeljeni su u dve grupe, zavisno od nalaza spermograma. Prvu grupu činili su pacijenti sa nalazom normospermije, dok su u drugoj grupi bili pacijenti sa patološkim nalazima spermograma: oligospermija, astenospermija, teratospermija ili kombinacijom. Najviše ispitivanih muškaraca (59%) imalo je nalaz normospermije (NO), dok je najmanje zastupljen nalaz astenospermije (2,0%). Kada smo poredili zastupljenost patoloških nalaza, najzastupljeniji je bio nalaz oligoastenoteratospermije (OAT). Svi nalazi spermograma prikazani su na grafikonu 20.

Takođe, ispitivana je promena parametara oksidativnog statusa u zavisnosti od nalaza spermograma i vrednosti su upoređene u odnosu na grupu sa normospermijom. U tabeli 33 prikazane su medijane ispitivanih parametara. Pacijenti sa patološkim nalazima spermograma imali su slične vrednosti SOD, MDA i -SH grupa u odnosu na one sa nalazom normospermije.

**Tabela 33.** Parametri oksidativnog statusa kod muškaraca sa normospermijom i ostalim nalazima spermograma

Parametri	Normospermija (N-30)	Ostali nalazi (N-20)	p
SOD, U/L	26,18 (22,63-28,89)	24,12 (22,37-29,08)	0,348
MDA, $\mu\text{mol/L}$	0,52 (0,47-0,64)	0,57 (0,51-0,65)	0,254
-SH grupe, mmol/L	0,46 (0,41-0,53)	0,43 (0,38-0,47)	0,138

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

Dodatno je izvršena podela pacijenata sa sledećim nalazima spermograma: oligospermije, teratospermije i astenospermije. Pacijeti sa nalazom oligospermije poređeni su sa grupom pacijenata sa nalazom normospermije. Ni kada smo patološke nalaze odvojili u tri različite grupe nismo prnali razliku u parametrima parametara oksidativnog statusa u odnosu na grupu sa normospermijom (tabela 34).

**Tabela 34.** Parametri oksidativnog statusa kod muškaraca sa normospermijom i oligospermijom

Parametri	Normospermija (N-30)	Oligospermija (N-17)	p
SOD, U/L	26,18 (22,63-28,89)	24,12 (22,36-29,08)	0,111
MDA, $\mu\text{mol/L}$	0,52 (0,47-0,64)	0,57 (0,51-0,65)	0,241
-SH grupe, mmol/L	0,46 (0,41-0,53)	0,43 (0,38-0,47)	0,069

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

Slično poređenje je izvršeno i između muškaraca sa normospermijom i teratospermijom (tabela 35). I prilikom ovog poređenja nije dokazana statistički značajna razlika u parametrima oksidativnog statusa.

**Tabela 35.** Parametri oksidativnog statusa kod muškaraca normospermijom i teratospermijom

Parametri	Normospermija (N-30)	Teratospermija (N-12)	p
SOD, U/L	26,18 (22,63-28,89)	26,0 (23,43-29,65)	0,711
MDA, $\mu\text{mol/L}$	0,52 (0,47-0,64)	0,58 (0,51-0,64)	0,372
-SH grupe, mmol/L	0,46 (0,41-0,53)	1,38 (1,28-1,46)	0,286

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

Nakon poređenja parametara oksidativnog statusa između pacijenata sa normospermijom i astenospermijom nije dokazana razlika u parametrima OS (tabela 36).

**Tabela 36.** Parametri oksidativnog statusa kod muškaraca sa normospermijom i astenospermijom

Parametri	Normospermija (N-30)	Astenospermija (N-16)	p
SOD, U/L	26,18 (22,63-28,89)	23,9 (22,4-29,3)	0,299
MDA, $\mu\text{mol/L}$	0,52 (0,47-0,64)	0,58 (0,52-0,65)	0,222
-SH grupe, mmol/L	0,46 (0,41-0,53)	0,41 (0,34-0,46)	0,075

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

U ovom delu ispitivanja analizirali smo i vrednosti bioeleminata između muškaraca sa normospermijom i sa svim ostalim nalazima spermograma (tabele 37), kao i sa patološkim nalazima spermograma pojedinačno (38). U tabelama su prikazane medijane. Vrednosti bioeleminata kod muškaraca sa normospermijom bile su slične vrednostima kod muškaraca sa patološkim nalazom spermograma.

**Tabela 37.** Vrednosti bioeleminata kod muškaraca sa normospermijom i ostalim dijagnozama

Bioelementi, <i>mmol/l</i>	Normospermija (N-30)	Ostali nalazi (N-20)	p
Mg	1,33 (1,23-1,43)	1,39 (1,32-1,45)	0,169
Cu	0,017 (0,016-0,018)	0,017 (0,015-0,018)	0,213
Zn	0,12 (0,10-0,12)	0,11 (0,11-0,12)	0,774
Se	0,0012 (0,0010 -0,0013)	0,0010 (0,0012-0,0015)	0,389

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

U tabeli 38 prikazane su vrednosti bioeleminata kod muškaraca sa normospermijom i muškaraca sa patološkim nalazima spermograma: oligospermijom, teratospermijom i astenospermijom. Dokazana je statistički značajna razlika samo u koncentraciji Mg između pacijenata sa normalnim nalazom i pacijenata sa oligospermijom. Pacijenti sa dijagnozom oligospermije imaju značajno više koncentracije Mg u odnosu na pacijente sa dijagnozom normospermije.

**Tabela 38.** Bioelementi kod muškaraca sa normospermijom i oligospermijom, teratospermijom i astenospermijom

Bioelementi <i>mmol/l</i>	Normospermija/ Oligospermija p	Normospermija/ Teratospermija P	Normospermija/ Asteno spermija p
<b>Mg</b>	0,031	0,441	0,265
<b>Cu</b>	0,383	0,682	0,512
<b>Zn</b>	0.885	0,660	0,825
<b>Se</b>	0,574	0,216	0.369

*Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

Vrednosti toksičnih metala upoređeni su između pacijenata sa različitim nalazima spermograma. Vrednosti toksičnih metala Cd, Hg i Pb nisu se razlikovale između muškaraca sa normalnim nalazom spermograma i onih sa patološkim nalazima (tabela 39). Ni kada smo patološke nalaze poredili pojedinačno sa normalnim nalazom nije bilo značajne razlike (tabela 40).

**Tabela 39.** Vrednosti toksičnih metala kod muškaraca sa normospermijom i ostalim nalazima spermograma

Toksični metali, <i>μmol/l</i>	Normospermija (N-30)	Ostali (N-20)	p
<b>Cd</b>	0,004 (0,004-0,010)	0,001 (0,004-0,004)	0,123
<b>Hg</b>	0,006 (0,004-0,009)	0,008 (0,004-0,010)	0,292
<b>Pb</b>	0,08 (0,04-0,174)	0,12 (0,07-0,22)	0,313

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

**Tabela 40.** Toksični metali kod muškaraca sa normospermijom i oligospermijom, teratospermijom i astenospermijom

Toksični metali	Normospermija/ Oligospermija p	Normospermija/ Teratospermija p	Normospermija/ Asthenospermija p
Hg	0,244	0,247	0,244
Pb	0,326	0,481	0,174
Se	0,400	0,523	0,398

*Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

Ispitali smo ishod postupka vantelesnog oplođenja: broj fertilisanih jajnih ćelija, stopu fertilizacije i ishode trudnoća kod ženskih partnera u zavisnosti od nalaza spermograma muškaraca.

Nije pronađena statistički značajna razlika u broju fertilisanih jajnih ćelija. Stopa fertilizacije bila je veća kod partnerki ispitivanih muškaraca sa normospermijom u odnosu na ostale nalaze spermograma (tabela 41). Kod 40% partnerki ispitivanih muškaraca koji su imali normalan nalaz spermograma, došlo je do trudnoće, dok je u grupi pacijenata sa patološkim nalazima spermogram procenat trudnoće bio 44,4%, što nije bilo statistički značajno ( $p=0,756$ ).

**Tabela 41.** Broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije kod partnerki muškaraca sa normospermijom i ostalim nalazima spermograma

Parametri	Normospermija (N-30)	Ostali (N-20)	p
Br. fertilisanih jajnih ćelija	2,5 (1,8-5,6)	2,5 (1,0-6,0)	0,955
Stopa fertilizacije, %	68,0 (39,1-100,0)	50,0 (25,2-74,6)	0,102

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

Kod ukupno 18 ispitivanih parova došlo je do trudnoće. Kod partnerki muškaraca koji su imali normalan nalaz spermograma u 83,3% trudnoća je završena porođajem. Kod



62,5% parova gde su muškarci imali patološke nalaze dijagnoze ishod je bio porođaj i to je bilo značajno manje u odnosu na prethodnu grupu ( $p=0,034$ ).

**Tabela 42.** Broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije kod partnerki muškaraca sa nalazom normospermije i oligospermije

Parametri	Normospermija (N-30)	Oligospermija (N-17)	p
Br. fertilisanih jajnih ćelija	2,5 (1,8-5,6)	2,5 (1,0-6,0)	0,864
Stopa fertilizacije, %	68,0 (39,1-100,0)	50,0 (25,2-74,6)	0,475

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

Kada smo poredili ishod vantelesnog oplođenja: broj fertilisanih jajnih ćelija i stopu fertilizacije partnerki muškaraca sa normospermijom i oligospermijom nismo pronašli statistički značajnu razliku (tabela 42). Što se tiče ishoda trudnoća, kod 40% partnerki muškaraca sa normalnim nalazom spermograma došlo je do trudnoće, a u 83.3% trudnoća je završena porođajem. Kod 37,5% partnerki muškaraca sa sniženim brojem spermatozoida- oligospermijom, zabeležena je trudnoća, dok je kod 50% pacijentkinja ishod bio porođaj. Dokazana je statistički značajna razlika u porođajima između dve ispitivane grupe ( $p=0,013$ ).

**Tabela 43.** Broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije kod partnerki muškaraca sa normospermijom i teratospermijom

Parametri	Normospermija (N-30)	Teratospermija (N-12)	p
Br. fertilisanih jajnih ćelija	2,5 (1,8-5,6)	2,0 (1,0-3,0)	0,160
Stopa fertilizacije, %	68,0 (39,1-100,0)	50,0 (25,0-75,0)	0,160

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

Kada smo poredili ishod potupka VTO kod partnerki muškaraca sa normospermijom i teratospermijom nismo našli značajnu razliku između ispitivanih grupa muškaraca u odnosu na stopu fertilizacije i broj fertilisanih jajnih ćelija partnerki (tabela 43). Od svih trudnoća postignutih kod ispitivanih parova, u 83,3% zabeležen je

porođaj kod parova kod kojih su muški partneri imali nalaz normospermije, dok je kod 50% parova gde su muškarci imali teratospermiju ishod bio porođaj ( $p=0,020$ ).

**Tabela 44.** Broj fertilisanih jajnih ćelija i stopa fertilizacije kod partnerki muškaraca sa normospermijom i astenospermijom

Parametri	Normospermija (N-30)	Astenospermija (N-16)	p
Br. fertilisanih jajnih ćelija	2,5 (1,8-5,6)	2,5 (1,0-5,8)	0,990
Stopa fertilizacije, %	68,0 (39,1-100,0)	35,7 (25,0-68,6)	0,034

*Prikazane su medijane (25-ti i 75-ti percentil). Poređenje je izvršeno Mann whitney test*

Kod partnerki muškaraca koji su imali nalaz astenospermije zabeležena je statistički značajno niža stopa fertilizacije u odnosu na partnerke muškaraca sa normospermijom ( $p=0,034$ ). Kod partnerki muškaraca koji su imali normalan nalaz spermograma ishod trudnoće bio je porođaj kod 83.3%, dok je kod 50% parova kod kojih su muški partneri imali nalaz teratospermije trudnoća je završena porođajem u ( $p=0,020$ ).

## 5. DISKUSIJA

Pretpostavlja se da fiziološki odnosno niski nivoi ROS mogu da imaju regulatornu ulogu u reproduktivnim procesima (119,159), međutim razumevanje uloge ROS u ženskom infertilitetu i dalje je nepotpuno. Uspeh ili neuspeh ART postupaka zavisi od više faktora među kojima je uzrok infertiliteta, kao i primenjeni protokol kontrolisane ovarijalne stimulacije i dr. Koji će se protokol kontrolisane ovarijalne stimulacije primeniti (dugi, kratki sa GnRH agonistima ili antagonistima) zavisi od više faktora, među kojima su: godine starosti, bazalni hormonski status, broj antralnih folikula, odgovor na prethodnu stimulaciju jajnika i dr. Vrednost FSH 3. dana ciklusa, kao i E2 široko su u upotrebi kao prognostički test za ovarijalnu rezervu (160-162). Razvoj imunoeseja za proteinske hormone kao što je AMH dovela je do njegove rastuće upotrebe u predikciji ovarijalne rezerve (163). Veća vrednost FSH i E2 u folikularnoj fazi udružena je sa lošim ovarijalnim odgovorom (161,162, 165), dok je veća vrednost AMH udružena sa dobrim ovarijalnim odgovorom (165). GnRH antagonisti imaju nekoliko prednosti u odnosu na GnRH agoniste kao što su značajno kraće trajanje tretmana, ukupne doze gonadotropina korišćene u stimulaciji i manji rizik od razvoja sindroma ovarijalne hiperstimulacije (166,167). Ipak njihov uticaj na ishod IVF i stope trudnoća je kontraverzan (168,169). Stoga smo u prvom delu studije hteli da ispitamo uticaj različitih protokola stimulacije na broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija, stopu fertilizacije, kvalitet embriona i ishod trudnoća.

U našoj studiji, protokoli stimulacije određivani su individualno. Primenjivali smo kratak protokol, zatim kratak protokol sa pretretmanom kontraceptivima i dugi protokol. Žene sa primenjenim kratkim protokolom stimulacije bile su starije od grupe sa dugim protokolom stimulacije, imale su više bazalne nivoe FSH i niže vrednosti AMH. Ti podaci ukazuju na smanjenu ovarijalnu rezervu kao mogući češći uzrok infertiliteta u ovoj grupi, a i pokazano je da je u 32,2% slučajeva to bio poremećaj ovarijalne funkcije, što je u našem radu bio i najčešći uzrok infertiliteta u ovoj grupi. Grupe pacijentkinja sa primenjenim kratkim protokolom stimulacije imale su i manji broj jajnih ćelija, a samim tim i manje zrelih jajnih ćelija. Ovo se može objasniti time što je dugi protokol primenjen kod mlađih pacijentkinja i onih sa nižim vrednostima FSH i višim vrednostima AMH.

Kvalitet embriona, stope fertilizacije i stope kliničkih trudnoća i porođaja bile su slične kod svih primenjenih protokola. Ovakve rezultate pokazala je i meta analiza koja je obuhvatala pet randomizovanih ispitivanja, poredeći protokole GnRH agonista i antagonista, i pokazala je slične stope implantacija i trudnoća po ciklusu u oba protokola (170). I druge randomizovane studije nisu našle značajnu razliku u stopi kliničkih trudnoća (167, 171). Takođe je pokazano da nema razlike u stopama porođaja kod tretmana GnRH agonista u poređenju sa GnRH antagonistima (172).

Ovarijalna stimulacija, koja podrazumeva primenu različitih doza gonadotropina, a koja prethodi IVF postupku predstavlja stres u izvesnom smislu. U kombinaciji sa genetskom predispozicijom i životnim navikama, ishod IVF može da bude značajno promenjen stresom i prirodnim mehanizmima odbrane neophodnim da ga savladaju (173). Ovarijalna stimulacija može da ima direktan uticaj na markere oksidativnog stresa; IVF ciklusi udruženi su sa produkcijom ROS i poremećajem ravnoteže oksidant-antioksidant, dovodeći do smanjene zaštite od oksidacije (174). U našem istraživanju pokazali smo da ovarijalna stimulacija u IVF postupku izaziva oksidativni stres, što može da se detektuje u serumu. Nalazi Younis i sar. (175) pokazali su takođe da ovarijalna stimulacija ima uticaj na produkciju SOD, GPx i IL-6. Što se ishoda postupaka tiče, pokazali smo da pacijentkinje bez OS posle ovarijalne stimulacije imaju bolji ishod postupka. Kada smo poredili efekte različitih protokola stimulacije na parametre oksidativnog stresa, aktivnost SOD bila je smanjena posle stimulacije, dok je koncentracija MDA i -SH grupa bila povišena. Ipak, vrednosti SOD, MDA i -SH grupa nisu se značajno razlikovale kod pacijentkinja sa primenjenim različitim protokolima stimulacije, što je u saglasnosti sa Aurrekoetxea i sar. (174). U studiji Pallini S i sar. (91), ispitivane su koncentracije antioksidanata u plazmi žena podvrgnutih IVF/ICSI postupku, uz dugi protokol sa GnRH-a, pre početka tretmana, po supresiji hipofize GnRH agonistima i na dan aspiracije folikula. Nije bilo značajnih promena bazalnog profila antioksidanata posle supresije hipofize agonistima GnRH u poređenju sa vrednostima pre tretmana. Ipak, kada su poređene koncentracije antioksidanata u serumu posle stimulacije GT kod žena podvrgnutih IVF sa onima u folikularnoj fazi prirodnog ciklusa, pokazano je da stimulacija dovodi do poremećaja oksidant-antioksidant ravnoteže dovodeći do smanjenih koncentracija antioksidanata u plazmi i smanjenja zaštite od oksidacije u

serumu (176). Ovaj zaključak je u skladu i sa rezultatima u našoj studiji, a smanjenje antioksidanata posle stimulacije može da bude uzrokovano i administracijom gonadotropina. U studiji Oral i sar. nivoi MDA bili su niži u grupi pacijentkinja kod kojih je postignuta trudnoća, što sugeriše da MDA može da se koristi kao prediktivni marker uspeha IVF postupka (177). Suprotno našem nalazu, neke studije koje su ispitivale odnos između oksidativnog stresa i ovarijalnog odgovora na stimulaciju gonadotropinima u IVF ciklusima pokazale su da ovarijalna stimulacija uzorkuje povećanje aktivnosti antioksidanata (177). U jednoj studiji zaključeno je da je oksidativni stres povoljan za ishod ovarijalne stimulacije, dok je viši ukupni antioksidativni status u plazmi bolji za postizanje trudnoća (178).

U IVF postupcima koristi se kontrolisana ovarijalna stimulacija sa povišenim dozama gonadotropina da bi se stimulisao razvoj multiplih folikula u jednom ciklusu. To omogućava dobijanje većeg broja jajnih ćelija, kao i embriona za transfer ili za zamrzavanje (179). U drugom delu istraživanja analizirali smo i uticaj doze gonadotropina na različite parametre. Vrednosti AMH bile su značajno više u grupi sa nižim dozama GT, što je bilo i očekivano. Pacijentkinje sa primenjenim niskim i visokim dozama GT nisu imale značajno različit broj i kvalitet jajnih ćelija, broj fertilisanih jajnih ćelija, kao ni stope fertilizacije. Grupa pacijentkinja sa nižim dozama GT imala je nešto veći procenat embriona A klase, ali nije bilo statistički značajno. Takođe nije bilo razlike u parametrima OS između ove dve grupe. Iako su neke ekspreminetalne studije predlagale da protokol sa GnRH antagonistima može nepovoljno da utiče na folikulogenezu, humane studije nisu pronašle negativne efekte na rastuće folikule (180,181). Procenjivan je i štetan efekat egzogenih gonadotropina na razvoj embriona. Studija koja je poredila kvalitet embriona u prirodnim i stimulisanim ciklusima sa dugim protokolom nije nasla razliku u stopama fertilizacije, kapacitetu razvoja (broju blastomera) i stepenu fragmentacije embriona (177). Pored toga, ekscesivan odgovor na ovarijalnu stimulaciju nema negativan uticaj na kvalitet embriona (172).

U trećem delu rezultata ispitivali smo uticaj oksidativnog stresa na različite parametre podelivši pacijentkinje u grupu sa i bez OS pre započinjanja KOS. Od demografskih karakteristika značajna je bila razlika u procentu pušača, oksidativni stres je postojao kod 33.9% pacijentkinja koje su pušile. I doze gonadotropina bile su nešto

veće kod pacijentkinja koje su bile pušači, ali nije postojala značajna razlika. Životne navike kao što je pušenje cigareta takođe su povezane sa oksidativnim poremećajima, koji mogu negativno da utiču fertilitet. Štetan efekat cigareta na reproduktivni ishod je najverovatnije multifaktorijalan. Tek od nedavno se OS smatra bitnim faktorom infertiliteta udruženog sa pušenjem. Udahnuti dim sadrži slobodne radikale i broje toksične supstance. Pušenje, a čak i pasivno izlaganje dimu cigareta dovodi do produženog vremena koncepcije i infertiliteta u prirodnim, a i IVF ciklusima (182). U drugim studijama zapažena je smanjenja stopa fertilizacije kod pušača (183). Dim cigarete značajan je izvor egzogenog OS koji deluje na folikularnu mikrosredinu. Tiboni i sar (183) pronašli su povećane nivoe folikularne lipidne peroksidacije udružene sa izlaganjem duvanskom dimu sa paralelnim smanjenjem lokalnog antioksidativnog kapaciteta. Oksidativni stres bio je evidentniji i u folikularnoj tečnosti žena koje su pušile (184).

Kod ispitivanih pacijentkinja, manji procenat je imao povišene parametre oksidativnog stresa pre stimulacije. U grupi pacijentkinja sa prisutnim OS pre početka stimulacije pronašli smo da je bila potrebna veća doza GT za stimulaciju. Što se tiče broja jajnih ćelija, kvaliteta jajnih ćelija, broja fertilizovanih jajnih ćelija i procenta fertilizacije nismo našli značajnu razliku između ispitivanih grupa. Ipak, ekscesivni nivoi ROS prema nekim istraživanjima mogu biti štetni za oocite. Nedavno su Choi i saradnici pokazali da OS uzrokuje promene u formiranju deobnog vretena u metafazi II oocita miševa (185), što može da rezultuje disperzijom hromozoma i izostankom normalne fertilizacije, što je direktno povezano sa ishodom IVF (85). Seino i saradnici su 2002. godine objavili više dokaza koji sugerišu patološku ulogu viših nivoa ROS u IVF, takođe povezujući ga sa kvalitetom oocita i razvojem embriona (120). Folikularna tečnost koja okružuje oocite može se smatrati biološkim „prozorom“ koji odražava metaboličke i hormonske procese u mikrosredini oocita. Naš nalaz mogao bi se objasniti time da folikularna tečnost sadrži i visoke koncentracije antioksidanata, koji štite oocite od ROS-indukovanog oštećenja, a takođe razvojna sposobnost oocita dobijenih u IVF je multifaktorijalni proces i ne može se pripisati samo OS (69). U našoj studiji nije bilo razlike ni u broju fertilisanih jajnih ćelija, niti stope fertilizacije između pacijentkinja sa i bez povišenih parametara oksidativnog stresa. Međutim, meta-analiza Agrawal i sar. (186) analizirala je devet studija koje su ispitivale ulogu ROS u ishodu IVF i ukazala da su nivoi ROS u negativnoj

korelaciji sa stopama fertilizacije u IVF postupku. Razlika u nalazima može da se objasni različitim uzrocima infertiliteta, broju pacijentkinja ili fiziološkom ulogom ROS u kapacitaciji i fertilizaciji.

Što se embriona tiče, ekscesivno stvaranje ROS dešava se u kritičnim trenucima zbog povećanih energetske potrebe, kao što je aktivacija genoma embriona, embrionalna kompaktacija i hečing (187). Interesantno je da su Goto i saradnici otkrili da je produkcija ROS bila povećana kod embriona kultivisanih u *in vitro* uslovima u poređenju sa onima *in vivo* (65). Ipak, IVF postupak nikad ne može da imitira potpuno fiziologiju *in vivo*, te je neizbežno stvaranje ROS, a pored toga i nedostaju antioksidansi prisutni u tubarnoj tečnosti, koji deluju kao prirodna fiziološka odbrana protiv OS. Oksidativni stres može biti uključen u poremećen razvoj ili zastoj u rastu embriona (64) koji su pripisani indukovanim oštećenju ćelijske membrane, oštećenju DNK i apoptozi. Apoptoza rezultuje fragmentacijom embriona, koji imaju ograničen potencijal za implantaciju i stoga rezultuju lošim reproduktivnim ishodima (188). Povećana fragmentacija embriona i smanjena stopa klivaža mogli bi se delimično pripisati ranom izlaganju embriona visokim nivoima ROS u ICSI ciklusima (189). Pacijentkinje u našem istraživanju, kod kojih nisu bili povišeni markeri OS, imale su nešto više embriona kvaliteta A od onih sa prisutnim OS, ali nije bilo statistički značajno. U studiji Fujimoto i sar. (190) nije pronađena značajna korelacija između derivata lipidne peroksidacije i aktivnosti enzimskih antioksidanata i kvaliteta embriona. Ovo se razlikuje od studije Jana S. i sar. (191) koji su pronašli veće nivoe ROS kod embriona lošijeg kvaliteta.

Kada su u pitanju bili ishodi IVF postupaka kod ispitivanih pacijentkinja, trudnoća je zabeležena kod 47,1% pacijentkinja bez OS za razliku od 42,9% pacijentkinja sa OS, pre započinjanja stimulacije, ali procenat porođaja, spontanijeh pobačaja kao i biohemijskih trudnoća bio je sličan. U grupi pacijentkinja koje nisu imale povišene parametre oksidativnog stresa ni posle stimulacije procenat porođaja bio je značajno veći, dok je procenat pobačaja i biohemijskih trudnoća bio manji nego u grupi sa prisutnim oksidativnim stresom. Međutim, rezultati studija se razlikuju, dok se u studiji Younis i sar. (173) vrednosti markera oksidativnog stresa nisu razlikovale u grupi ispitivanih pacijentkinja koje su postigle koncepciju i onih koje nisu, Oral i sar. (174) pronašli su da su nivoi MDA bili niži u grupi pacijentkinja koje su postigle koncepciju. Studija Velhut

i saradnika (176) ispitivala je i intrafolikularni i sistemski oksidativni stres i antioksidativni odgovor na ovarijalnu stimulaciju i ishod ICSI postupka. Određivana je koncentracija peroksida i ukupan antioksidativni odgovor u folikularnoj tečnosti i plazmi. Povišeni intrafolikularni parametri oksidativnog stresa bili su u pozitivnoj korelaciji sa ishodom ovarijalne stimulacije: korišćena je manja doza GT za stimulaciju, dobijeno je više oocita i veće koncentracije estradiola su postignute. Veći antioksidativni odgovor u krvi bio je povezan sa većim procentom kliničkih trudnoća. Još jedna studija koja je konzistentna sa našim nalazima je studija Bedaiwy i sar. (192) koja je pokazala negativnu korelaciju između ROS nivoa u folikularnoj tečnosti i trudnoća, kao i pozitivnu korelaciju između ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) i trudnoća. Ovih nekoliko studija pokazalo je da je antioksidativni status u pozitivnoj korelaciji sa stopama trudnoća (192, 193), kao i da je povišen antioksidativni status u plazmi povoljan za postizanje kliničke trudnoće (176).

Što se tiče pobačaja procenta je bio skoro identičan u obe grupe pre stimulacije, međutim kada je poređen oksidativni status posle stimulacije, u grupi koja ni tada nije imala povišene markere oksidativnog stresa nije zabeležen ni jedan spontani pobačaj u odnosu na grupu sa OS, dok je bilo više biohemijskih trudnoća. Iako se malo zna o faktorima koji utiču na fertilitet i rani gubitak trudnoće, postoji dovoljno dokaza da se pretpostavi da OS može da ima ulogu u vremenu i održavanju viabilne trudnoće. Pronađena je negativna korelacija lipidnog hidroperoksida kod pacijentkinja sa ranim gubitkom trudnoće, što ukazuje na visoku osetljivost na lipidnu peroksidaciju (194). Smanjena detoksikaciona sposobnost GPx može se povezati sa spontanim pobačajima i rekurentnim gubicima trudnoća (195). Kod rekurentnih gubitaka trudnoća pronadjeni su povišeni nivoi GSH i lipidnih peroksida u plazmi, kao i sniženi nivoi vitamina E i beta karotena (196,197). Jedna druga studija pokazala je značajno snižene nivoe antioksidativnih enzima GPx, SOD i katalaze kod žena sa idiopatskim rekurentnim gubicima trudnoća, pored pronadjenih visokih nivoa MDA (198).

Studije koje su ispitivale bioelemente i toksične metale u infertilitetu imaju kontraverzne rezultate, a za neke elemente i veoma oskudne (199-201). U četvrtom delu našeg ispitivanja hteli smo da ispitamo da li bioelementi i/ili toksični metali utiču na bilo koju fazu u IVF postupku. Nije bilo korelacije između koncentracije bioelemenata i broja



oocita, kao ni sa brojem fertilisanih jajnih ćelija, osim viših koncentracija bakra, koje su bile u direktnoj korelaciji sa većim brojem fertilisanih oocita. Slični rezultati dobijeni su u nedavnoj studiji Ingle i sar. (202) koji su ispitali korelaciju između bioelemenata u folikularnoj tečnosti, kao i u urinu i ishoda IVF postupaka. U ovoj studiji prosečan broj oocita bio je u korelaciji sa višim koncentracijama Cu u urinu. Takođe, u njihovoj studiji koncentracije Zn u folikularnoj tečnosti bile su u obrnutoj korelaciji sa prosečnom stopom fertilizacije, a nije bilo korelacije sa stopama implantacije, trudnoća niti živorođenosti.

Kod naših pacijetkinja sa pozitivnim ishodom, pronašli smo značajno niže koncentracije Mg, dok su prosečne koncentracije Cu bile nešto više, a prosečne koncentracije Zn i Se nešto niže u odnosu na pacijetkinje kod kojih nije došlo do trudnoće, ipak bez statističke značajnosti. Što se tiče ishoda trudnoća postojala je značajna korelacija između niže koncentracije magnezijuma i porođaja. Pacijetkinje kod kojih se trudnoća završila porođajem imale su niže koncentracije Mg i Cu u poređenju sa onima kod kojih je došlo do pobačaja. Magnezijum se vezuje za ćelijske membrane i stabilizuje ih, kao i za proteine i nukleinske kiseline (203). Takođe štiti lipoproteine od oksidativnog stresa (204). Ipak, u literaturi nema podataka o udruženosti magnezijuma sa ishodom IVF postupaka. U jednoj studiji pokazano je da su pacijetkinje kod kojih je došlo do trudnoće posle IVF postupka imale niže nivoe bioelemenata, uključujući i magnezijum u poređenju sa ženama koje su ostale prirodno trudne (205). Ovo je delimično u skladu sa našim rezultatima. Grossi i saradnici pronašli su blagi pad koncentracije magnezijuma u serumu kod žena u postupku kontrolisane ovarijalne stimulacije (206). Međutim, u studiji Bloom i sar (152) koncentracije Mg bile su veće kod žena koje su postigle trudnoću, dok su koncentracije Zn bile niže kod trudnih žena, ali ne značajno.

Cink je nedavno prepoznat kao važan faktor koji je neophodan u završavanju mejoze i aktivacije oocita *in vitro* (207, 208) kao i u rupturi folikula i završavanju mejoze *in vivo* (208). Ipak, posledica nedostatka cinka tokom finalnog perioda oogeneze na metilaciju hromatina, fertilizaciju i preimplantacioni razvoj nije ispitivana, iako se zna da nedostatak cinka smanjuje metilaciju hromatina u drugim tkivima (209). U studiji Thian i Diaz (210) pronašli su da su DNA metilacija i neki transkripcioni faktori značajno smanjeni u oocitima miševa koji su imali smanjenu koncentraciju cinka. Ispitivan je i uticaj niske koncentracije cinka na fertilizacioni potencijal. Stopa fertilizacije bila je

značajno snižena u grupi sa smanjenom koncentracijom Zn, ali smanjena koncentracija Zn nije tako uticala na fertilizaciju *in vivo*. Neke studije nisu našle razliku između nivoa Zn u serumu kod infertilnih žena, niti korelaciju između koncentracije cinka, veličine folikula, prisustva oocita i fertilizacije oocita (211).

Tolunay i sar. (212) ispitivali su vezu između bioelemenata i toksičnih metala u krvi i folikularnoj tečnosti pacijentkinja sa neobjašnjenim infertilitetom u postupku IVF. Određivane su koncentracije Cd, Pb, Hg, As kao i Cu, Zn, Fe. Pronašli su niže stope trudnoća kod pacijentkinja sa višim koncentracijama Cu u folikularnoj tečnosti. U našoj studiji pacijentkinje sa višom koncentracijom Cu imale su više fertilisanih oocita i više trudnoća, ali one kod kojih se trudnoća završila porođajem imale su niže koncentracije bakra u poređenju sa ženama koje sui male spontane pobačaje. Bakar je važan faktor u reprodukciji i neophodan za različite metaboličke procese i enzimske reakcije (213), međutim, zapženi su i toksični efekti kod hroničnog izlaganja bakru, posebno na folikularno sazrevanje i razvoj embriona (212).

U našem istraživanju nismo pronašli značajnu razliku u koncentraciji Se između žena sa pozitivnim i negativnim ishodom IVF postupka. U literaturi su podaci o selenu i ženskom fertilitetu oskudni. Paskowski i sar (214) ispitivali su uzorke folikularne tečnosti i pronašli su da pacijentkinje sa nepoznatim uzrokom infertiliteta imaju manje koncentracije Se u odnosu na one sa tubarnim ili muškim uzrokom. Nedavna studija je takođe pronašla niže koncentracije Se u serumu i folikularnoj tečnosti kod žena u postupku IVF u poređenju sa kontrolnim ženama (215). Što se tiče trudnoće objavljene su niže koncentracije Se kod žena sa pobačajima u prvom trimestru u odnosu na žene sa kliničkim trudnoćama (216).

Ljudi su tokom života hronično izloženi niskim nivoima toksičnih metala putem ishrane, vode i vazduha (217), a kada su oni prisutni u krvi ili folikularnoj tečnosti mogu da utiču na reproduktivno zdravlje žene, a samim tim i na ishod IVF postupaka (212). Putem jonske mimikrije esencijalnih elemenata, ulaze u eukariotske ćelije, gde deluju brojnim mehanizmima toksičnosti, među kojima je i nastanak slobodnih radikala, rezultujući oštećenjem proteina i lipidnom peroksidacijom, modifikuju genetsku

ekspresiju delujući na DNK metilaciju, remete funkciju citoskeleta i inhibiraju intraćelijsku komunikaciju (218).

U našem istraživanju nismo pronašli korelaciju koncentracije toksičnih metala sa brojem jajnih ćelija, niti sa brojem zrelih jajnih ćelija, kao ni brojem fertilisanih jajnih ćelija. Sličan nalaz imala je studija Bloom i saradnika (219) u kojoj nije pronađena korelacija između teških metala i zrelih oocita, mada rezultati druge studije ukazuju na niže stope fertilizacije kod povišenih vrednosti Pb u folikularnoj tečnosti (152). U studiji Al-Selaha i sar. (220) ispitan je uticaj Pb, Cd i Hg na stope fertilizacije i trudnoća kod 619 žena koje su bile u IVF postupku. Studija je pronašla obrnuto proporcionalan odnos između nivoa Pb u krvi i ishoda fertilizacije. Interesantno, pronađeno je da su nivoi Cd u folikularnoj tečnosti u pozitivnoj korelaciji sa ishodom fertilizacije. Taj nalaz bi moglo da podrži objašnjenje Henson and Chedrese (221) da Cd može da ima paradoksalni efekat na steroidogenezu, delujući na morfologiju ovarijuma- veoma male doze mogu da stimulišu biosintezu lutealnog progesterona, a veoma velike doze da inhibiraju.

Kod trudnih pacijentkinja u našoj studiji pronašli smo i niže vrednosti As i Pb, dok one koje nisu bile trudne imale su povišene koncentracije Pb i Cd. Koncentracije Cd bile su niže kod pacijentkinja kod kojih je trudnoća završena porođajem. Svi ovi toksični metali imali su u našem istraživanju prediktorsku vrednost za postizanje trudnoće. U multivarijabilnom modelu koji je obuhvatao Hg iz krvi, Pb iz krvi i Cd iz urina kao biomarkere izlaganja među ženskom populacijom, Bloom i sar pronašli su smanjenu verovatnoću od 35 i 33% za kliničke i biohemijske trudnoće povezanu sa Hg, dok nije bilo povezanosti sa dugotrajnom izloženošću Pb i Cd. Kada su analizirali Cd u krvi pronašli su smanjenu verovatnoću od 94% i 82% za kliničke i biohemijske trudnoće (219). Žene koje nisu postigle trudnoću imale su više prosečne koncentracije Hg i Cd u krvi, slično kao i u našem istraživanju, dok su rezultati za Pb bili obrnuti. Tolunay i sar (212) pronašli su statistički značajnu negativnu korelaciju između koncentracija Pb u krvi i MII oocita, stopa implantacija i kliničkih trudnoća. Rezultati povezani sa trudnoćama u skladu su i sa našim istraživanjem. Longitudinalna studija infertiliteta i okoline (LIFE) nije pronašla povezanost u koncentracijama Hg u krvi određivane kod 500 žena, niti između koncentracija Pb i stopa trudnoća (222). Do sličnog nalaza došla je i još jedna studija (202). Pokazano je da olovo i kadmijum povećavaju slobodne radikale (223), pokazuju

fiziološki efekat estrogena (224) i menjaju sintezu progesteron (221) što može da ima negativan uticaj na postizanje trudnoće. Ipak, iako su u našem istraživanju pronađene više koncentracije Cd i Pb u grupi pacijentkinja kod kojih nije došlo do trudnoće, treba uzeti u obzir i druge faktore koji bi mogli da utiču na ishod, kao što su smanjen procenat koncepcije kod pacijentkinja starijih od 35 godina, duže trajanje infertiliteta, kao i ovarijalni uzrok infertiliteta, što je sve i u našem istraživanju bilo zastupljenije u grupi pacijentkinja kod kojih nije došlo do koncepcije. Uticaj As na ženski fertilitet nije još uvek dovoljno ispitan niti je jasan.

Povećane koncentracije ROS i OS u muškom reproduktivnom traktu nepovoljno deluju na spermatozoide i udruženi su sa poremećajem u koncentraciji, pokretljivosti i morfologiji spermatozoida, dovodeći do pogoršanja parametara spermograma i sledstvenog infertiliteta (100). Na pojavu OS može uticati način života (ishrana, pušenje, zloupotreba alkohola, preterana fizička aktivnost), gojaznost, izloženost toksičnim supstancama (ftalati, pesticidi, toksični metali), poremećaji u funkciji testisa, kao i nepoznati faktori (89,225-227). Oksidativni stres mogu da uzrokuju i terapijski postupci kao što su hemioterapija i zračenje, a čak i određeni postupci ART kao što su IVF ili IUI povećavaju OS (124).

U poslednjem delu našeg istraživanja određivali smo u krvi muških ispitanika promene koncentracije MDA, aktivnosti SOD i -SH grupe, u zavisnosti od prisutnih poremećaja u spermogramu i vrednosti smo poredili sa urednim nalazom spermograma. Nije dokazana značajna razlika u ispitivanim parametrima između grupa, iako su vrednosti MDA bile nešto niže u grupi sa normospermijom u odnosu na ostale poremećaje spermatogeneze, dok su vrednosti SOD i -SH grupa bile nešto više u grupi sa normospermijom. Kada smo poredili pojedinačno nalaze normospermije sa patološkim nalazima: oligospermijom, teratospermijom i astenospermijom, rezultati su bili isti, odnosno vrednosti MDA bile su nešto niže, a vrednosti SOD i -SH grupa nešto više u grupi sa normalnim nalazom spermograma. Ove razlike u vrednostima, iako ne statistički značajne u našem ispitivanju, moguće zbog malog broja pacijenata, saglasne su sa velikim brojem drugih studija (227,228). Međutim nalazi studija se razlikuju, u velikom broju ispitivanja parametri oksidativnog stresa su povišeni kod muškaraca sa infertilitetom, dok

su parametri antioksidativne zaštite povišeni ili uopšte nije bilo razlike u njihovoj aktivnosti, au nekim istraživanjima čak su bili niži kod infertilnih muškaraca.

Dostupni podaci o uticaju oksidativnog stresa na spermatozoide uglavnom se baziraju na merenju nivoa MDA u semenoj tečnosti. Nedavno je pored određivanja OS u ejakulatu predloženo određivanje parametara oksidativnog stresa u krvi, kao značajno sredstvo za procenu reproduktivnog i funkcionalnog kapaciteta spermatozoida (229). Antioksidativni profil u krvi u odnosu na antioksidativni profil spermatozoida i kvalitet spermatozoida manje je ispitivan. Korelacija između SOD u krvi i broja spermatozoida, kao i glutationa i progresivne pokretljivosti spermatozoida (229) sugerise da ovi parametri mogu da budu važni biohemijski markeri u proceni kvaliteta spermatozoida, što čini antioksidativni profil iz krvi značajnim sredstvom zajedno sa profilom ejakulata, u proceni reproduktivne i funkcionalne sposobnosti spermatozoida.

Ipak, u samo nekoliko studija ispitivan je OS i antioksidativna zaštita u plazmi pacijenata. U studiji Shamsi i sar. (227) ispitivan je oksidativni status infertilnih pacijenata. Pronađena je pozitivna korelacija između povišenih nivoa MDA i abnormalne morfologije spermatozoida. Huang i saradnici (230) pronašli su više koncentracije MDA kod muškaraca sa astenozoospermijom i oligozoospermijom u poređenju sa normospermijom, što bi bilo konzistentno sa našom studijom. Što se tiče studija koje su ispitivale oksidativni status i antioksidativne parametre samo u semenoj plazmi, nalazi su bili isti. I u ovim studijama koncentracija MDA bila je viša kod patoloških nalaza spermograma u odnosu na normalan nalaz (231-233). MDA je jedan od reaktivnih i mutagenih proizvoda lipidne peroksidacije u semenoj plazmi. Poznato je da toksični lipidni peroksidi utiču na koncentraciju spermatozoida, pokretljivost, morfologiju kao i da je lipidna peroksidacija udružena sa lošim kvalitetom spermatozoida. MDA je indikator lipidne peroksidacije i može biti dijagnostičko sredstvo u ispitivanju infertiliteta, kao i prediktor uspeha ART postupaka (226).

Infertilni muškarci imaju niže koncentracije antioksidanata u ejakulatu u poređenju sa fertilnim (227, 233,234), a udruženost antioksidativnog kapaciteta ejakulata, oksidativnog oštećenja spermatozoida i parametara spermograma dobro je dokumentovana (233,235). Rezultati studije koji su slični kao u našem istraživanju, mada

statistiki značajni, pokazali su korelaciju između nivoa SOD u serumu i broja spermatozoida (227). Ova grupa istraživača pronašla je i značajnu korelaciju između nivoa GSH u serumu i progresivne pokretljivosti spermatozoida kod pacijenata sa infertilitetom i kontrolne grupe. U studiji Benedeti i sar. (228) koja je procenjivala antioksidativni profil u plazmi pacijenata, otkrivene su značajne razlike između fertilnih i infertilnih muškaraca. Infertilni muškarci imali su niže nivoe antioksidanata, koji su bili u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom, pokretljivošću i morfologijom spermatozoida. Oni smatraju da je dobar antioksidativni status u plazmi udružen sa dobrim antioksidativnim kapacitetom ejakulata i suprotno. Mahanta i sar. (236) ispitivani nivo lipidnih peroksida u krvi infertilne grupe bio je značajno viši nego kod fertilne. U infertilnoj grupi aktivnost SOD i GPX u krvi bila je značajno niža u poređenju sa fertilnom. Nekoliko drugih studija takođe je pronašlo povezanost između nivoa SOD u serumu i patološkog nalaza spermograma (237, 238), čak i smanjen ukupan antioksidativni status kod patološkog nalaza (239).

Pored parametara oksidativnog stresa kod muških partnera, određivali smo i bioelemente i toksične metale u serumu. Koncentracije toksičnih metala i bioelemenata su obimno proučavane kod muškaraca sa problemom infertiliteta, ali se vrednosti razlikuju među autorima. To može da bude zbog različitih tehnika analize koje su korišćene, razlike u izloženosti, individualne razlike zavisno od navika itd. U našem istraživanju poredili smo vrednosti mikroelemenata (Mg, Cu, Zn i Se) između muškaraca sa normalnim i patološkim nalazom spermograma. Dokazana je razlika u koncentraciji Mg kada poredimo normalan nalaz spermograma sa patološkim nalazom. Kada smo poredili nalaz normospermije pojedinačno sa oligo-, terato- i astenospermijom, samo pacijenti sa smanjenim brojem spermatozoida (oligospermijom) imali su značajno više koncentracije Mg u odnosu na pacijente sa normalnim nalazom spermograma. Vrednosti ostalih ispitivanih bioelemenata nisu se razlikovale između grupa. Što se teških metala tiče, ni u jednoj od ispitivanih grupa nije nađena statistički značajna razlika, iako su nalazi Hg i Pb bili nešto viši u grupama sa patološkim nalazom spermograma u odnosu na normalan nalaz. Ovakav nalaz mogao bi se objasniti malim brojem muških ispitanika u našem istraživanju.

Izveštaji poslednjih godina ukazuju da neki bioelementi kao što su Cu, Se, Zn, Mg i Mo, koji su inače esencijalni metali, mogu da imaju i negativan efekat na mušku reprodukciju, zavisno od njihovih koncentracija. Mg je bioelement neophodan za normalnu funkciju spermatozoida. Visoki nivoi Mg povezani su u nekim istraživanjima sa poremećenim parametrima spermograma, što je u skladu i sa našim istraživanjem (240, 241). Studija Saglama i sar. (242) ispitala je uticaj bioelemenata na muški fertilitet i obuhvatila je 85 muškaraca sa problemom infertiliteta kojima su uzimani uzorci krvi, ejakulata i urina. Kada su nalazi spermograma grupisani prema kriterijumima WHO na normospermiju, oligospermiju i azospermiju, pronađena je statistički značajna razlika kod ispitivanih Zn, Ca, Al, Cu, Mg, Se. Koncentracije Zn u serumu bile su niže kod pacijenata sa azospermijom, koncentracija Cu bila je viša u serumu pacijenata sa astenospermijom, dok je koncentracija Mg bila je niža u ejakulatu pacijenata sa azospermijom nego sa normospermijom, međutim vrednosti Mg u ovoj studiji u uzorcima seruma bile su iste kod pacijenata sa azospermijom i normospermijom. U nekim studijama nivoi Zn u ejakulatu bili su u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom i pokretljivošću spermatozoida dok u drugim studijama nisu (139), kao što je slučaj i sa našom. Cink je važan u nekoliko aspekata muške reprodukcije, njegove koncentracije visoke su u genitalnim organima muškaraca u poređenju sa drugim tkivima i tečnostima u telu. Jedna grupa autora pronašla je da su koncentracije cinka u semenoj plazmi bile niže kod muškaraca sa idiopatskim infertilitetom u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe je pronađeno da muškarci sa oligospermijom imaju blago snižene koncentracije cinka u semenoj plazmi u poređenju sa onima sa normospermijom (138). Iako je uloga Se u humanoj reprodukciji obimno ispitana, nalazi o udruženosti kvaliteta spermatozoida i Se u biološkim tečnostima su inkonzistentni (242).

Pb, Cd i Hg su toksični metali koji se normalno nalaze u kori zemlje. Izlaganje ovim metalima obično je akcidentalno, kod profesionalnog izlaganja, putem unosa zagađene vode i hrane ili udisanjem zagađenog vazduha. Najveći broj istraživanja o njihovom uticaju su studije na životinjama ili epidemiološke i profesionalne izloženosti, koje obično obuhvataju izlaganje većim koncentracijama, što se ne dešava u opštoj populaciji. Zbog široke rasprostranjenosti izlaganja ovim metalima počela su istraživanja i o uticaju nižeg nivoa izlaganja.

Prirodni nivoi Pb su niski, ali zbog različitih zagađenja, povećan je sadržaj olova u okolini. U neprofesionalnom okruženju najčešće se unosi hranom i vodom. Pb se nakuplja u krvi, mekim tkivima i kostima, a takođe i u muškim reproduktivnim tkivima (243). Izlaganje niskim nivoima Pb bilo je udruženo sa negativnim uticajem na reproduktivnu funkciju muškaraca u nekoliko studija. U jednoj studiji muškarci sa nižim koncentracijama Pb imali su veći broj spermatozoida i pokretljivost (244), dok je u studiji Talisman i sar. (245), pronađeno je da je nivo Pb u krvi pozitivno udružen sa patološkim formama spermatozoida. Drugi nalazi se razlikuju od naše studije. Meeker i sar. (246) procenjivali su odnos između izlaganja ekološkim nivoima multiplih metala i parametra kvaliteta spermograma, nađena udruženost ispitivanih metala i parametara spermograma, osim molibdena. Xu i sar. (229) ispitivali su koncentracije Cd, Pb, Se i Zn u krvi i ejakulatu muškarca i nisu pronašli uticaj Pb na kvalitet spermatozoida.

Kod ljudi metil Hg pronađena je u ejakulatu (247) i ti nivoi bili su povezani sa lošim reproduktivnim ishodima kod muškaraca. Muški partneri sa abnormalnim parametrima spermograma, imali su značajno više vrednosti Hg u krvi od onih koji su bili fertilni, što je u skladu i sa našom studijom. U studiji sprovedenoj u Hon Kongu, nivo Hg u ejakulatu bio je u pozitivnoj korelaciji sa abnormalnom morfologijom spermatozoida i u negativnoj sa pokretljivošću (248). Međutim studija na ribarima koji su imali povišene vrednosti metil Hg nije pokazala povezanost sa parametrima spermograma, kao ni studija u USA (246). Može se zaključiti da kod muškaraca nešto više koncentracije Hg u krvi mogu da imaju određen uticaj na parametre spermograma.

Nekoliko studija ispitivalo je izlaganje niskim koncentracijama Cd i uticaj na kvalitet spermatozoida. Iako u našem istraživanju nismo našli korelaciju između koncentracija Cd i parametara spermograma, studije muškaraca sa problemom infertiliteta pokazale su korelaciju viših koncentracija Cd sa smanjenom pokretljivošću spermatozoida, kao i sa nižim brojem spermatozoida (249,250).

Na kraju ovog dela ispitivanja poredili smo broj oplođenih jajnih ćelija, stopu fertilizacije i ishod trudnoća kod partnerki ispitivanih muškaraca u zavisnosti od nalaza spermograma. Broj ferilizovanih jajnih ćelija nije se razlikovao između grupa, dok je stopa fertilizacije bila veća u grupi sa normospermijom u odnosu na patološki nalaz



spermograma, dok je u grupi sa astenospermijom stopa fertilizacije bila statistički značajno niža nego kod normalnog nalaza. Stopa trudnoća nije se razlikovala između grupa, ali je stopa porođaja bila viša u grupi sa normospermijom.

Iako se spermogram rutinski analizira, ne dobijamo informaciju o funkcionalnom kapacitetu spermatozoida. Ni jedan parameter spermograma sam po sebi ne može predvideti mogućnost uspeha ART postupaka, ipak, procenat spermatozoida sa normalnom morfologijom, u pozitivnoj je korelaciji sa stopama fertilizacije i stopama trudnoća u IVF (251, 252), što je pokazalo i naše istraživanje. Iako se stope fertilizacije značajno razlikuju kod nalaza normospermije u poređenju sa patološkim nalazim spermograma, neke studije nisu našle povezanost (253, 254). Osim toga, kod pacijenata sa teškom teratospermijom (255) i oligo ili azospermijom (256), DNA fragmentacija spermatozoida i stepen aneuploidija bio je značajno veći, a pronađen je i veći procenat aneuploidija u embrionima (257). Čak i sa ovim nalazima može doći do fertilizacije, ali su stope pobačaja znatno veće (258).

Postoje vremenski specifični periodi osetljivosti u razvoju čoveka, u kojima različiti faktori spoljašnje sredine, čak i izlaganje jako malim koncentracijama, može da promeni signale programiranja i da bude okidač za različite neželjene posledice po zdravlje, koje mogu da se manifestuju bilo kada tokom života ili generacijama (259-262). Takođe i što se oksidativnog stresa tiče, iako je jasno da ima i fiziološku funkciju i patološku ulogu, u zavisnosti od koncentracije, a minimalne bezbedne koncentracije ili fiziološki korisne koncentracije treba tek da se definišu. Pored toga, ispitivane populacije nisu uniformne. Takođe, mnogi drugi faktori mogu da utiču na ishod IVF postupka u bilo kom trenutku u vreme od fertilizacije do trudnoće. Uprkos potencijalu da obezbedi dodatne prognostičke informacije, ova testiranja se ne rade rutinski zbog svoje cene, nedostatka standardnih protokola za procenu ROS, niti standarda za optimalnu suplementaciju antioskidantima. Veće randomizovane studije pomogle bi da se prepoznaju pacijenti sa povišenim rizikom i kod kojih bi trebalo započeti odgovarajući tretman pre uključivanja u postupak VTO ili u toku samog postupka, da se ove laboratorijske analize ipak uvedu u rutinsku praksu ispitivanja uzroka neplodnosti, sa ciljem da se umanj ili otkloni nepovoljan uticaj oksidativnog stresa, poremećaja ravnoteže bioelemenata i uticaj toksičnih metala na ishod postupka VTO.

## 6. ZAKLJUČCI

- 1) Primena različitih protokola stimulacije ne utiče na kvalitet jajnih ćelija niti embriona, kao ni na procenat fertilizacije i ishod IVF postupka
- 2) Ovarijalna stimulacija uzrokuje promene parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, nezavisno od primenjenog protokola stimulacije
- 3) Prisustvo oksidativnog stresa posle stimulacije utiče na ishod IVF postupka, odnosno, smanjena je stopa porođaja, a povećane su stope pobačaja i biohemijskih trudnoća
- 4) Doza gonadotropina primenjena u stimulaciji nije udružena sa promenom parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao ni sa kvalitetom oocita i embriona, niti sa stopama fertilizacije i ishodom postupka
- 5) Različite koncentracije bioelemenata u serumu nisu povezane sa kvalitetom jajnih ćelija i embriona niti fertilizacijom, ali je koncentracija Mg niža kod pacijentkinja kod kojih je došlo do koncepcije
- 6) Razlika u koncentraciji toksičnih metala ne utiče na kvalitet oocita i embriona, ali može da utiče na ishod IVF postupka - pacijentkinje kod kojih je došlo do koncepcije imale su niže koncentracije As i Pb, dok su pacijentkinje sa negativnim ishodom IVF postupka imale veće koncentracije Pb i Cd
- 7) Nismo našli značajnu povezanost između parametara oksidativnog stresa, bioelemenata i toksičnih metala i nalaza spermograma
- 8) Patološki parametri spermograma utiču na ishod IVF postupka- stopa fertilizacije niža je kod poremećaja pokretljivosti spermatozoida, a stopa porođaja viša je kod nalaza normospermije

## 7. LITERATURA

1. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91:31-8.
2. Burton GJ, E J. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2010; 25(3): 287-99.
3. Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21(3): 219-22.
4. Chandra ASN, Kesavan SAA. Significance of oxidative stress in human reproduction. *Arch Med* 2009; 5(1A): 528-42.
5. Rhee SG. Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a necessary evil for cell signaling. *Science* 2006; 312(5782): 1882-3.
6. Halliwell B, Gutteridge MCJ. *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford 1985.
7. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human diseases Curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344:721-724.
8. Portz DM, Elkins TE, White R et al. Oxygen free radicals and pelvic adhesion formation: I. Blocking oxygen free radical toxicity to prevent adhesion formation in an endometriosis model. *Int. J. Fertil.* 1991; 36: 39–42.
9. Đukić M. Oksidativni stres- slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi. Mono i manjana 2008.
10. Predin T. Oksidativni stres kod pacijenata sa paradontopatijom. Doktorska distertacija. Novi Sad 2014.
11. Kowels R, Moncada S. Nitric oxide synhases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
12. Jelenković A. Mesto i značaj azot oksida u patogenezi konvulzija i u delovanju antikonvulziva. Doktorska disertacija Beograd, 1998.
13. Jelenković A, Jovanović M, Ninković M et al. Nitric oxide and convulsions induces by pentylene tetrazol. *Ann NY Acad Sci* 2002;962:296-305
14. Jelenković A, Jovanović M, Ninković M, Maksimović M, Bošković B. Total anaesthesia, rats, brain surgery, nitric oxide (NO) and free radicals. *Acta Vet-Beograd* 2005;55:375-83.
15. Jovičić A, Ivanišević V, Marković M, Simović M. Uloga azotnog oksida u fizioloških funkcijama i patološkim stanjima. *Vojnosanit Pregl* 1994;51:126-31.
16. Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall P, Freeman B. Apparent hydroxyl radical production by peroxinitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *P Natl Acad Sci USA* 1991;87:1620-4.
17. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG. Biohemija slobodnih radikala. Niš, Medicinski fakultet, 2000.

18. Pavlović D, Đorđević V, Kocić G. Ćelijska signalna transdukcija – modulacija slobodnim radikalima. *Jugoslav Med Biochem* 2002;21:69-84.
19. Đukić M. Oksidativni stres - Kliničko dijagnostički značaj. Beograd: Mono i Manjana; 2008.
20. Curtin JF. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 2002;265:49-72.
21. Boehm I. Apoptosis in physiological and pathological skin: implications for therapy. *Curr Mol Med* 2006;6:375-94.
22. Ćurčić M. Uloga azot(II)-oksida u neurotoksičnosti parakvata i dikvata. Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, 2007.
23. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 1998 Jan 22;391(6665):393-7.
24. Greenberg ME, Li XM, Gugiu BG, Gu X, Qin J, Salomon RG et al.. The lipid Whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J Biol Chem* 2008;283:2385–96.
25. West JD, Marnett LJ. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol* 2006;19:173–94.
26. Laguerre M, Leconte J, Villeneuve P. Evaluation of ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trend and challenges. *Prog Lipid Res* 2007;46:244-82.
27. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Brit Med Bull* 1993;49:566–76.
28. Boyd NF, Mcguire V. The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free Radical Bio Med* 1991;10:185–90.
29. Markesbery WR, Lovell MA. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998;19:33–6.
30. Ceaser EK, Moellering DR, Shiva A, Ramachandran A, Lander A, Venkartraman A et al. Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem Soc T* 2004;32:151–5.
31. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008;28:569–631.
32. Noguchi N. Role of oxidative stress in adaptive responses in special reference to atherogenesis. *J Clin Biochem Nutr* 2008;43:131–8.
33. Parthasarathy S, Santanam N, Ramachandran S, Meilhac O. Potential role of oxidized lipids and lipoproteins in antioxidant defense. *Free Radical Res* 2000; 33:197–215.
34. Frankel EN. Lipid oxidation: Mechanisms, Products and Biological Significance. *J Am Oil Chem Soc* 1984;61:1908-17.
35. Đukić M, Jovanović M, Nedeljković M, Milić B. Indeks lipidne peroksidacije u plazmi alkoholičara u toku terapije disulfiramom. *Jugoslav Med Biochem* 1996;15:285.

36. Jovičić A, Mihajlović R, Jovanović M, Čolić M, Selaković MV. Content of malondialdehyde and TGF- $\beta$  in the CSF of patients in the acute phase of completed stroke. *Eur J Neurol* 2000;(suppl):110.
37. Del Rio D, Stewart A, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc* 2005;15:316-28.
38. İlhan N, İlhan N, Simsek M. The changes of trace elements, malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in pregnancy with or without preeclampsia. *Clin Biochem* 2002;35:393-7.
39. Polidori MC, Savino K, Alunni G, Freddio M, Senin U, Sies H et al. Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. *Free Radical Bio Med* 2002;32:148-52.
40. Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Bio Med* 2003;34:1-10.
41. Delibas N, Ozcankaya R, Altuntas I. Clinical importance of erythrocyte malondialdehyde levels as a marker for cognitive deterioration in patients with dementia of Alzheimer type: a repeated study in 5-year interval. *Clin Biochem* 2002;35:137-41.
42. Leuratti C, Watson MA, Deag EJ, Welch A, Singh R, Gottschalg E, et al. Detection of malondialdehyde DNA adducts in human colorectal mucosa: relationship with diet and the presence of adenomas. *Cancer Epidem Biomar* 2002;11:267-73.
- 43 Zhang Y, Chen SY, Hsu T, Santella RM. Immunohistochemical detection of malondialdehyde-DNA adducts in human oral mucosa cells. *Carcinogenesis* 2002;23:207- 11.
44. Stadtman ER, Berlett SB. Free-Radical-Mediated Modification of Proteins. In: *Free radical Toxicology*, Ed. Wallace KB, Taylor&Francis, NY,1997.
45. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003;25:207-18.
46. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000;32:307–26.
47. Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Bio Med* 2002;32:797–803.
48. Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin MT, Maur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B* 2007;39:44-84.
49. Ames BN, Shigenaga MK, Hagan TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7915–22.
50. Halliwell B. Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. *Adv pharmacol* 1997;38:3–20.
51. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994;52:253-65.

52. Fridovich I. Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. *Adv Exp Med Biol* 1976;74:530-9.
53. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1986; 58: 61- 97.
54. Michelson MA. Medical aspects of superoxide dismutase. *Life Chem Rep* 1987;6:1-142.
55. Reddy VN, Kasahara E, Hiraoka M, Lin YS, Ho YS. Effects of variation in superoxide dismutases (SOD), on oxidative stress and apoptosis in lens epithelium. *Exp Eye Res* 2004;79:859-68.
56. Žorić L, Jovanović P. Oksidacioni stres u patogenezi očnih bolesti. Medicinski fakultet Niš. Sven, 2006.
57. Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituents effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc* 2001;123:1173–83.
58. Bergendi L, Beneš L, Duračkova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999;65:1865-74.
59. Imai M, Qin J, Tamakawa N, Miyado K, Umezawa A, Takahashi Y. Molecular alterations during female reproductive aging: Can aged oocytes remind youth? In: Pereira LV, editor. *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics: InTech*; 2012; pp. 3-22.
60. Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(4): 1462-7.
61. Lopes AS, Lane M, Thompson JG. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Hum Reprod* 2010; 25(11): 2762-73.
62. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(10): 1634-50.
63. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.* 2006; 86:503–512
64. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update.* 2001; 7:175–189.
65. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 1993; 15: 69–75.
66. Riley J.C, Behrmen H.R, Oxigen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991; 198: 781-91.
67. Jozwik M, Wolczynski S, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5: 409-13

68. Carbone M.C, tatone C, Delle Monache S et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum reprod.* 2003; 9: 639-43.
69. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Women's Medicine.* 2000; 45: 314–320
70. Paszkowski T. Clarke RN. Hornstein MD. Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Human Reproduction* 2002; 17:921-925.
71. Sugino N, Shimamura K.Takiguchi S et al. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Human Reproduction* 1996; 11:1073-1078.
72. Sugino N, Karube-harada A, Taketani T, et al. Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F2 alpha production through nuclear factor- kappa B activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. *J Reprod Dev.* 2004; 50:215-25.
73. Serviddio G, Loverro G, Vicino M, et al. Modulation of endometrial redox balance during the menstrual cycle: relation with sex hormones. *J Clin Endocrinol metab.* 2002; 87: 2843-8.
74. Polak C, Koziot-Montewka M,Gogacz M et al. Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 2001; 94: 261-263.
75. Oak MK. Chantler EN. Williams CA et al. Sperm survival studies in peritoneal fluid from infertile women with endometriosis and unexplained infertility. *Clinical Reproduction and Fertility.*1985; 3: 297-303.
76. Saleh RA. Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 2002; 23:737-752.
77. Tamate K, Sengoku K, Ishikawa M. The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *J Obstet Gynecol.* 1995; 21: 401-9.
78. Scully R.E, Cohen R.B. Oxidative enzyme activity in normal and pathologic human ovaries. *Obstet Gynecol.* 1964; 24: 667-81.
79. Halliwell B. Gutteridge JM. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Human Toxicology* 1988; 7:7-13.
80. Agarwal A, Gupta S. Shama RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3: 28.
81. Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Bulkley GB, Wallach EE. Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil.* 1991;91:207–212.
82. Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil. Steril.* 1998; 69: 944–957.
83. Schatten G, Simerly C, Schatten H. Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-

mediated motility during mammalian fertilization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1985; 82: 4152–4156

84. Tarin JJ. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Molecular Human Reproduction* 1996; 2:717-724.

85. Nasr-F. Sfahani MH. Winston NJ. Johnson MH. Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 1992; 96: 219-231.

86. Yang HW. Hwang KJ. Kwon HC et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction* 1998; 13: 998-1012.

87. Paskowski T, Clarke RN. Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Human Reproduction* 1996; 11: 2493-2495.

88. Li J. Foote RH. Simkin M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biology of Reproduction* 1993; 49: 33-37.

89. du Pleissis S, Maker K, Desai N, Agarwal A. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* 2008; 3(4): 539–554

90. Leroy J.L.M.R, Vanholter T, Delanghe J.R et al. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 2004 (80) 3-4:201-11

91. Pallini S, Benedetti S, Tagliamonte MC et al. Influence of ovarian stimulation for IVF/ICSI on the antioxidant defence system and relationship to outcome. *Reprod Biomed Online* 2014; 29: 65-71.

92. Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P et al. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones and response to gonadotropin stimulation. *Fertil Steril* 2008; 89(4): 912-921.

93. Velhut A, Zilmer M, Zilmer K, Kaart T, Karro H, Salumets A. Elevated blood plasma antioxidant status is favourable for achieving IVF/ICSI pregnancy. *Reprod Biomed. Online* 2013; 26: 345-352.

94. Kovac, J.R., Pastuszak, A.W., Lamb, D.J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil. Steril.* 2013;99:998–1007.

95. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med* 1993; 14(2):157–166.

96. de Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16(1):21–25.

97. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2(1):48–54

98. Ford WC Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 2004; 10(5):387–399



99. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997; 20(2):61–69
100. Agrawal A, Durairajanayagam D, Halabi J et al. Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reprod Biomed Online* 2014; 29: 32-58.
101. Gharagozloo P, Aitken J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum reprod* 2011; 26 (7): 1628-1640.
102. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943; 138 (3): 512-518.
103. Chen S, Allam J, Duan Y, Haidl G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 288: 191-199.
104. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 2003; 79: 829–843.
105. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol* 2010;48: 425–35.
106. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996;48:835–50.
107. Platts AE, Dix D, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, Rockett JC, et al. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermia RNAs. *Hum Mol Genet* 2007;16:763–73.
108. Venkatesh S, Singh MP, Gupta NP, Deccaraman M, Dada R. Correlation of sperm morphology and oxidative stress in infertile men. *Iran J Reprod Med* 2009;1:29–34.
109. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J Androl* 2011; 13(1):43–52
110. Plante M, de Lamirande E, Gagnon C Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* 1994; 62(2):387–393
111. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 2001; 22(4):575–583
112. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1995; 63(6):1143–1157
113. Tremellen K, Tunc O. Macrophage activity in semen is significantly correlated with sperm quality in infertile men. *Int J Androl* 2010; 33(6):823–831.
114. Trummer, H., Habermann, H., Haas, J., Pummer, K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum. Reprod.* 2002;17:1554–1559.
115. Taylor C. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ. Toxicol Pharmacol.* 2001; 10:189–198.
116. Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* 2004; 9: 338–347.

117. Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK *et al.* Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil. Steril.* 2004;81: 973–976.
118. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A *et al.* Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 2004; 82 (3): 1171–1176.
119. Agarwal A, Gupta S, Abdel-Razek H, Krajcir N, Athayde K. Impact of oxidative stress on gametes and embryos in an ART Laboratory. *Clin. Embryol.*2006; 9: 5–22.
120. Seino T, Saito H, Kaneko T *et al.* Eighthydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an *in vitro* fertilization embryo transfer program. *Fertil. Steril.*2002; 77:1184–1190
121. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS *et al.* Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. *Fertil. Steril.* 2004; 82: 593–600.
122. Booth PJ, Holm P, Callesen H. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology*2005; 63: 2040–2052
123. Leoni GG, Rosati I, Succu S *et al.* A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of *in vitro* produced ovine blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.*2007; 42: 299–304.
124. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J. Exp. Biol.*2005; 43: 963–974.
125. Shiotani M, Noda Y, Narimoto K *et al.* Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Hum. Reprod.* 1991; 6:1349–1353.
126. Brown K.M, Arthur J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr* 2001; 4: 593-9.
127. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12: 1161-1208.
128. Linder M.C, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 797S-811S.
129. Anastassopoulou J, Theophanides T. magnesium –DNK interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Crit Rev Onc/Hem.* 2002; 42: 79-91.
130. Wolf F.I, Torsello A, Fasanella S.F, Cittadini A. Cell physiology of magnesium. *Mol Asp Med.* 2003; 24: 11-26.).
131. Lafuente A, cano P, Esquifino A. Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH levels dose dependent? *Biometals*, 2003a: 16: 243-250
132. Padh H. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 1166-73.
133. Nedergaard J, Alexon S, Cannon B. Cold adaptation in the rat: increased brown fat peroxisomal b-oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity. *Cell Physiol* 1980; 239: C208-C216.
134. Matović V, Plamenac-Bulat Z, Đukić D. Uticaj povećanog unošenja kadmijuma na antioksidativni zaštitini sistem. *Jugoslav Med Bioh:* 2004; 23: 117-126.

135. Kang Y.J, Enger M.D. Cellular and molecular mechanisms of metal toxicities. In: Masaro E.J. ed Human Toxicology. New York: CRC Press. 1997: 256-275
136. Grajecki D, Zyriax B, Buhling K. The effect of micronutrient supplements on female fertility: a systematic review. Arch Gynecol Obstet 2012; 285:1463–1471.
137. Kontic-Vucinic O, Sulovic N, Radunovic N (2005) Micronutrients in women's reproductive health: II. Minerals and trace elements. Int J fertile Womens Med 51:116-124.
138. Ebisch I.M.W, Thomas C.M.G, Peters W.H.M et al. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. Hum Reprod Update, 2007; 13(2): 163-174.
139. Turk S, mandar R, mahlapuu R et al. Male infertility: Decreased levels of selenium, zinc and antioxidants. J Trace Elem Med Biol; 2014; 28: 179-185
140. Silberstein T, Saphier O, Paz-Tal O, Gonzalez L, Keefe DL, Trimarchi JR (2009) Trace element concentrations in follicular fluid of small follicles differ from those in blood serum, and may represent long-term exposure. Fertil Steril 91:1771–1774
141. Favier AE (1992) The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanism. Biol Trace Elem Res 32:363–382.
142. Garvey G, Hahn G, Lee R, Harbison R. Heavy metal hazards of Asian traditional remedies. Int J Environ Health Res 2001;11:63–71.
143. Elissa W.P, Wong and C. Yan Cheng. Impact of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. Trends in Pharm Scien; 2011; 32(5): 290-299.
144. Wellejus A, Poulsen HE, Loft S. Iron-induced oxidative DNA damage in rat sperm cells *in vivo* and *in vitro*. Free Radical Res 2000;32:75-83.
145. Apostoli P, Telišman S, Sager PR. Reproductive and developmental toxicity of metals. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors. Handbook on the Toxicology of Metals. Amsterdam: Academic Press Elsevier; 2007; 213-49.
146. Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. Syst Biol Reprod Med 2010;56:147-67.
147. Apostoli P, Catalani S. Metal ions affecting reproduction and development. Met Ions Life Sci 2011;8:263-303.
148. Iavicoli I, Fontana L, Bergamaschi A. The effects of metals as endocrine disruptors. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2009;12:206-23.
149. Bloom M.S, Parson P.J, Steuerwald J.A and al. Toxic trace metals and human oocytes during *in vitro* fertilization (IVF). Reprod Toxicol. 2010; 23(3):298-305.
150. Choi, S.M., Yoo, S.D., Lee, B.M.. Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. J. Toxicol. Environ. Health B 2004;7: 1–24.
151. Bellinger, D.C. Teratogen update: lead and pregnancy. Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol. 2005;73: 409–420.

152. Bloom MS, Parsons PJ, Kim D, Steuerwald AJ, Vaccari S, Cheng G, et al. Toxic trace metals and embryo quality indicators during in vitro fertilization (IVF). *Reproductive Toxicology* 2011;31:164–70.
153. Silberstein T, Saphier O, Paz-Tal O, Gonzalez L, Keefe DL, Trimarchi JR. Trace element concentrations in follicular fluid of small follicles differ from those in blood serum, and may represent long-term exposure. *Fertil Steril* 2009; 91:1771–1774
154. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
155. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of embryology. The Istanbul Consensus workshop of embryo assessment : proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011: 1–14.
156. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1):248–54.
157. Misra HP, Fridrovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247 (10): 3180-5.
158. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82 (1):70–7.
159. Sugino N, Takiguchi S, Kashida S et al. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 6: 19–25
160. Ahmed Ebbiary NA, Lenton EA, Cooke ID. Hypothalamic-pituitary ageing: progressive increase in FSH and LH concentrations throughout the reproductive life in regularly menstruating women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994;41:199–206.
161. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;64:991–4.
162. Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995;64:1136–40.
163. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004;111:1248–53.
164. Cahill D, Prosser CJ, Wardle PG, Ford WC, Hull MG. Relative influence of serum follicle stimulating hormone, age and other factors on ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101: 999–1002.
165. Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Sheldon RM. Early follicular serum mullerian inhibiting substance levels are associated with ovarian response in during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002;77:468–71.
166. Engel JB, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Felberbaum R, Diedrich K. GnRH agonists and antagonists in assisted reproduction: pregnancy rate. *Reprod Biomed Online.* 2006;13:84–7.

167. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, Abou-Setta AM. GnRH antagonists are safer than agonists: an update of a Cochrane review. *Hum Reprod Update*. 2011;17:435.
168. Devesa M, Martínez F, Coroleu B, Tur R, González C, Rodríguez I, Barri PN. Poor prognosis for ovarian response o stimulation: results of a randomised trial comparing the flare-up GnRH agonist protocol vs. the antagonist protocol. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26:509–15.
169. Kahraman K, Berker B, Atabekoglu CS, Sonmezer M, Cetinkaya E, Aytac R, Satiroglu H. Microdose gonadotropin-releasing hormone agonist flare-up protocol versus multiple dose gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in poor responders undergoing intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer cycle. *Fertil Steril*. 2009;91:2437–44.
170. Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V, Martins AM, Cornicelli J, Cavagna M, Oliveira JB, Franco Jr JG. Recombinant LH supplementation to recombinant FSH during induced ovarian stimulation in the GnRH-antagonist protocol: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:14–25.
171. Albano C, Felberbaum RE, Smits J, Riethmuller-Winzen H, Engel J, Diedrich K, Devroey P. Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist and the LHRH-agonist buserelin. *Hum Reprod*. 2000;15:526–31.
172. Santos M, Kuijk E, Macklon N. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction* 2010; 139: 23-34.
173. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human Reproduction Update* 2008; 14: 345–357.
174. Aurrekoetxea I, Ruiz-Sanz JI, Ruiz del Agua A, et al Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertile Steril* 2010; 94 (4): 1279-1286.
175. Younis A, Clower C, Nelsen D, Butler W, Carvalho A, Hok E, Garelnabi M. The relationship between pregnancy and oxidative stress markers on patients undergoing ovarian stimulations. *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29(10): 1083–1089.
176. Oral O, Kutlu K, Aksoy E, Fıçıcıoğlu C, Uslu H, Tuğrul S. The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. *JARG*. 2006;23(2):81–85.
177. Ziebe S, Bangsboll S, Schmidt KL, Loft A, Lindhard A, Nyboe Andersen A. Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Hum Reprod* 2004; 19:1457–1460.
178. Velhut A, Zilmer M, Zilmer K, Kaart T, Karro H, Salumets A. Elevated blood plasma antioxidant status is favourable for achieving IVF/ICSI pregnancy. *Reprod Biomed. Online* 2013; 26: 345-352.
179. Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocrine Reviews* 2006; 27: 170–207.
180. Funston RN, Seidel Jr GE. Gonadotropin-releasing hormone increases cleavage rates of bovine oocytes fertilized in vitro. *Biol Reprod*. 1995;53:541–5.

181. Raga F, Casañ EM, Kruessel J, Wen Y, Bonilla-Musoles F, Polan ML. The role of gonadotropin-releasing hormone in murine preimplantation embryonic development. *Endocrinology*. 1999;140:3705–12.
182. Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil. Steril*. 1998; 69: 944–957.
183. Tiboni GM, Bucciarelli T, Gianpietro F, Sulpizio M, Di Illio C. Influence of cigarette smoking on vitamin E, vitamin A, beta-caroten and lycopene concentrations in human pre-ovulatory follicular fluid. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17: 389-393.
184. Sugino N, Karube-harada A, Taketani T, et al. Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F2 alpha production through nuclear factor- kappa B activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. *J Reprod Dev*. 2004; 50:215-25.
185. Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 2005; 83(3):635–642.
186. Agarwal A, Allamaneni Sh, Nallella K. Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis. *Fertil Steril* 2005; 84(1): 228-231
187. Gott AL, Hardy K, Winston RM, Leese HJ. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum. Reprod*. 1990; 5: 104–108.
188. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:93–98.
189. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005, 3:43
190. Fujimoto V, Bloom M, Huddleston H, Shelley W, Ocque A, Browne R. Correlations of follicular fluid oxidative stress biomarkers and enzyme activities with embryo morphology parameters during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2011; 96 (6): 1357-1361.
191. Jana SK, Babu N, 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;29:447–51.
192. Bedaiwy M, Ek-Nashar S, Jeffrey M et al. Effect of follicular fluid oxidative stress parameters on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Gynecological Endocrinology*, 2012; 28(1): 51–55
193. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil. Steril*. 2003; 9(3): 1597–1605
194. Toy H, Camuzcuoglu H, Celik H, Erel O, Aksoy N: Assessment of serum paraoxonase and arylesterase activities in early pregnancy failure. *Swiss Med Wkly* 2009, 139:76–81.

195. Al-Kunani AS, Knight R, Haswell SJ, Thompson JW, Lindow SW: The selenium status of women with a history of recurrent miscarriage. *BJOG* 2001, 108:1094–1097.
196. Simsek M, Naziroglu M, Simsek H, Cay M, Aksakal M, Kumru S: Blood plasma levels of lipoperoxides, glutathione peroxidase, beta carotene, vitamin A and E in women with habitual abortion. *Cell Biochem Funct* 1998, 16:227–231.
197. Miller H, Wilson R, Jenkins C, MacLean MA, Roberts J, Walker JJ: Glutathione levels and miscarriage. *Fertil Steril* 2000, 74:1257–1258.
198. El-Far M, El-Sayed IH, El-Motwally Ael G, Hashem IA, Bakry N: Tumor necrosis factor-alpha and oxidant status are essential participating factors in unexplained recurrent spontaneous abortions. *Clin Chem LabMed* 2007, 45:879–883.
- 199.. Figà-Talamanca I. Occupational risk factors and reproductive health of women. *Occupational Medicine* 2006; 56:521–31.
200. Mendola P, Messer LC, Rappazzo K Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. *Fertil Steril* 2008;89:e81–94.
201. Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect* 2010; 118:182–90.
202. Ingle M, Bloom M, Parsons P et al. Associations between IVF outcomes and essential trace elements measured in follicular fluid and urine: a pilot study. *J Asist reprod Genet* 2017; 34: 253-261.
203. Bara M, Guiet-Bara A, Durlach J. Analysis of magnesium membranous effects: binding and screening. *Magnes Res* 1990;29:4121–8.
204. Rayssiguier Y, Gueux E, Bussiere L, Durlach J, Mazur A. Dietary magnesium affects susceptibility of lipoproteins and tissues to peroxidation in rats. *J Am Coll Nutr* 1993;12:133–7.
205. Skalny AV, Tinkov AA, Voronina I, Terekhina O, Skalnaya MG, Kovas Y. Hair Trace Element and Electrolyte Content in Women with Natural and In Vitro Fertilization-Induced Pregnancy. *Biol Trace Elem Res* 2018; 181:1-9.
206. Grossi E, Castiglioni S, Moscheni C, Antonazzo P et al. Serum Magnesium and Calcium Levels in Infertile Women During a Cycle of Reproductive Assistance. *Magnes Res* 2017; 30: 35-41.
207. Bernhardt ML, et al. Zinc Requirement During Meiosis Iâ€“Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Is Independent of the MOS-MAPK Pathway. *Biology of Reproduction*. 2011; 84:526–536.
208. Tian X, Diaz FJ. Zinc Depletion Causes Multiple Defects in Ovarian Function during the Perioovulatory Period in Mice. *Endocrinology*. 2012; 153:873–886.
209. Breksa Iii AP, Garrow TA. Random Mutagenesis of the Zinc-Binding Motif of Betaine-Homocysteine Methyltransferase Reveals That Gly 214 Is Essential. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002; 399:73–80.
210. Tian X and Diaz FJ. Acute dietary zinc deficiency before conception compromises oocyte epigenetic programming and disrupts embryonic development. *Dev Biol*. 2013 April 1; 376(1): 51–61.

211. Soltan MH and Jenkins DM (1983) Plasma copper and zinc concentrations and infertility. *Br J Obstet Gynaecol* 90,457–459.
212. Tolunay HE, Şükür YE, Ozkavukcu S, Seval MM, Ateş C, Türksoy VA, Ecemiş T, Atabekoğlu CS, Özmen B, Berker B, Sönmezer M. Heavy metal and trace element concentrations in blood and follicular fluid affect ART outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016 Mar;198:73-7
213. Michaluk A, Kochman K . Involvement of copper in female reproduction. *Reprod Biol* 2007; 7:193–205.
214. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta* 1995; 236:173–180.
215. Ozkaya MO, Naziroglu M, Barak C, BerkkanogluM. Effects of multivitamin/mineral supplementation on trace element levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). *Biol Trace Elem Res* 2010; 139:1-9.
216. Kocak I, Aksoy E, Ustun C. Recurrent spontaneous abortion and selenium deficiency. *Int J Gynaecol Obstet* 1999;65:79-80.
217. U.S. Centers of Disease Controls and Prevention (CDC).Fourth national report on human exposure to environmental chemicals – updated tables. 2010; Atlanta, GA.
218. Bloom M., Fujimoto M, Steuerwalda A et al. Background exposure to toxic metals in women adversely influences pregnancy during in vitro fertilization (IVF) *Reproductive Toxicology* 2012; 34: 471– 481.
219. Bloom M, Fujimoto M, Steuerwalda A et al. Background exposure to toxic metals in women adversely influences pregnancy during in vitro fertilization (IVF) *Reprod Toxicol* 2010; 34: 471– 481.
220. Al-Saleh I, Coskun S, Mashhour A, Shinwari N, El-Doush I, Billedo G, et al. Exposure to heavy metals (lead, cadmium and mercury) and its effect on the outcome of in vitro fertilization treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2008;211:560–79
221. Henson MC, Chedrese PJ. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med* 2004; 229: 383–392.
222. Buck Louis GM, Sundaram R, Schisterman EF, Sweeney AM, Lynch CD, Gore-Langton RE, et al. Heavy metals and couple fecundity, the LIFE Study. *Chemosphere* 2012;87:1201–7.
223. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress. Part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001; 1:529–39.
224. Dyer CA. Heavy metals as endocrine-disrupting chemicals. In: Gore AC, editor. *Endocrine-disrupting chemicals: from basic research to clinical practice.* Totowa, NJ: Humana Press.2007; 111–33.



225. Agarwal A, Sharma RK, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM, Alshahrani S, et al. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:33.
226. Colagar A, Karimi F, Ali Jorsaraei S. Correlation of Sperm Parameters With Semen Lipid Peroxidation and Total Antioxidants Levels in Astheno- and Oligoastheno-Teratospermic Men. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2013 September; 15(9): 780-5
227. Shamsi MB, Venkatesh S, Kumar R, Gupta NP, Malhotra N, Singh N, Mittal S, Arora S, Arya DS, Talwar P, Sharma RK, Dada R. Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian J Biochem Biophys*. 2010;47(1):38-228. Benedetti S, Tagliamonte M, Catalani S. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(3):300-6.
229. Xu, D.X., Shen, H.M., Zhu, Q.X., Chua, L., Wang, Q.N., Chia, S.E., Ong, C.N. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat. Res*. 2003;534:155–163.
230. Huang YL, Tseng WC, Cheng SY, Lin TH. Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. *Biol Trace Elem Res* 2000;76:207–215.
231. Hauser, R., Meeker, J.D., Singh, N.P., Silva, M.J., Ryan, L., Duty, S., Calafat, A.M. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum. Reprod*. 2007;22:688–695.
232. Tavilani H, Doosti M, Saeidi H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. *Clin Chim Acta*. 2005 Jun;356(1-2):199-203
233. Fraczek M, Szkuntik D, Sanocka D, Kurpisz M. Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility. *Ginekol Pol*. 2001; 72 (Suppl 2): 73-9
234. Patel, S., Panda, S., Nanda, R., Mangaraj, M., Mohapatra, P.C. Influence of oxidants and anti-oxidants on semen parameters in infertile males. *J. Indian Med. Assoc*. 2009;107:78–80.
- 235.. Shiva M, gautam A.K, Verma Y et al. Association between sperm quality, oxidative stress and seminal antioxidant activity. *Clin Bioch*; 2011 (44): 319-324
236. Mahanta R, Gogoi A, Chaudhry P.N, Roy. Association of Oxidative stress biomarkers and antioxidant enzymatic activity in male infertility of North-Est India. *J Obst Gynec India* 2012; 62 (5): 546-550.
237. Sanocka D, Kurpisz M: Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004, 2:12
238. Palmer, N.O., Bakos, H.W., Fullston, T., Lane, M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012;2:253–263.
239. Nabil H, Moemen LA, Elela MHA. Studying the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma. *Aust J Basic Appl Sci*. 2008;2(3):773-8

240. ATSDR. Toxicological profile for manganese (Draft for Public Comment). U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Atlanta, GA, USA, 2008.
241. Wirth, J. J., Rossano, M. G., Daly, D. C., Paneth, N., Puscheck, E., Potter, R. C. and Diamond, M. P. Ambient manganese exposure is negatively associated with human sperm motility and concentration. *Epidemiology* 2007; 18:270–273.
242. SAĞLAM H, ALTUNDAĞ H, ATİK Y. Trace elements levels in the serum, urine, and semen of patients with infertility. *Turk J Med Sci* 2015 45: 443-448
243. Oldereid, N. B., Thomassen, Y., Attramadal, A., Olaisen, B. and Purvis, K. Concentrations of lead, cadmium and zinc in the tissues of reproductive organs of men. *J Reprod Fertil* 1993; 99:421–425.
244. Telisman, S., Cvitkovic, P., Jurasovic, J., Pizent, A., Gavella, M. and Rocic, B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ Health Perspect* 2000; 108:45–53.
245. Telisman, S., Colak, B., Pizent, A., Jurasovic, J., and Cvitkovic, P. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environ Res* 2007; 105:256–266.
246. Meeker, J. D., Rossano, M. G., Protas, B., Diamond, M. P., Puscheck, E., Daly, D., et al. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. *Environ Health Perspect* 2008; 116:1473–1479.
247. Rignell-Hydbom, A., Axmon, A., Lundh, T., Jonsson, B. A., Tiido, T. and Spano, M. Dietary exposure to methyl mercury and PCB and the associations with semen parameters among Swedish fishermen. *Environ Health* 2007; 6:14.
248. Choy, C. M., Yeung, Q. S., Britton-Jones, C. M., Cheung, C. K., Lam, C. W. and Haines, C. J. Relationship between semen parameters and mercury concentrations in blood and in seminal fluid from subfertile males in Hong Kong. *Fertil Steril*. 2002;78:426–428.
249. Akinloye, O., Arowojolu, A. O., Shittu, O. B. and Anetor, J. I. Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reprod Biol*.2006; 6:17–30.
250. Chia, S. E., Ong, C. N., Lee, S. T. and Tsakok, F. H. Blood concentrations of lead, cadmium, mercury, zinc, and copper and human semen parameters. *Arch Androl* 1992; 29:177–183.
251. Kruger TF, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 1999;5: 172–178.
252. Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ, Toner JP, Swanson RJ, et al. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil Steril* 1994; 62: 559–567.
253. Bourne H, Richings N, Harari O, *et al.*: The use of intracytoplasmic injection for the treatment of severe and extreme male infertility. *Reprod Fert Dev* 1995;7:237-245
254. Nagy Z, Liu J, Joris H, *et al.*: The results of intracytoplasmic sperm injection are not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;10:1123-1129

255. Perrin A, Louanjli N, Ziane Y, Louanjli T, Le Roy C, et al. Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia. *Reprod Biomed Online* 2011; 22: 148–154.
256. Mokánszki A, Molnár Z, Ujfalusi A, Balogh E, Bazsáné ZK, et al. Correlation study between sperm concentration, hyaluronic acid-binding capacity and sperm aneuploidy in Hungarian patients. *Reprod Biomed Online* 2012; 25: 620–626.
257. Kahraman S, Findikli N, Biricik A, Oncu N, Ogur C, et al. Preliminary FISH studies on spermatozoa and embryos in patients with variable degrees of teratozoospermia and a history of poor prognosis. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 752–761.
258. Dul EC, van Echten-Arends J, Groen H, Dijkhuizen T, Land JA, et al. Chromosomal abnormalities in azoospermic and non- azoospermic infertile men: numbers needed to be screened to prevent adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod* 2012; 27: 2850–2856.
259. Grandean P, Bellinger D, Bergman A, Cordier S, Davey-Smith G, et al. The faroes statement: human health effects of developmental exposure to chemicals in our environment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102 (2): 73-75
260. Woodruff TJ, Janssen SJ, Guillette LJ, Giudice LC. Environmental impacts on reproductive health and fertility. Cambridge University Press, Cambridge, 2010.
261. Newbold R, Heindel J. Developmental Exposures and Implications for Early and Latent Disease.
262. T.J. Woodruff, S.J. Janssen, L.J. Guillette Jr, L.C. Giudice (Eds.), Environmental impacts on reproductive health and fertility, Cambridge University Press, New York, 2010.
263. American Academy of Pediatrics Council on Environmental Health. Pediatric environmental health. (3rd ed.) American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, IL, 2010.

## **BIOGRAFIJA**

Rođena 08.februara 1978. godine u Beogradu.

Osnovnu školu i gimnaziju završila u Beogradu.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala školske 1997/98. godine.

Diplomirala na Medicinskom fakultetu 2004. godine, sa prosečnom ocenom 9,20.

Zaposlena na Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Klinički Centar Srbije, 2006. godine, kao klinički lekar.

Specijalizaciju iz ginekologije i akušerstva, Medicinski fakultet, Univerzitetu Beogradu, upisala 2008. Godine.

Završni akademski specijalistički rad: “Tretman hidrosalpingsa u asistiranoj reprodukciji” odbranila 2010. godine.

Specijalistički ispit iz ginekologije i akušerstva položila 2012. godine sa ocenom odličan.

Izabrana u zvanje kliničkog asistenta 2014. godine na katedri za ginekologiju i akušerstvo.

Položila ispit i odbranila završni rad uže specijalizacije: „Uticaj nivoa progesterona na dan aspiracije na ishod IVF postupka 2017. godine.

Autor i koautor većeg broja radova na domaćim i inostranim kongresima i u domaćim i inostranim časopisima.

Aktivno se služi engleskim, francuskim, španskim i italijasnkim jezikom.

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisani-a Lidija I. Tulić

broj upisa \_\_\_\_\_

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom:

**Oksidativni stres i ravnoteža bioelemenata kod pacijenata u postupku  
vantelesnog oplodjenja**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 17.01.2019.

  
\_\_\_\_\_

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora     **Lidija I. Tulić**    

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada : **Oksidativni stres i ravnoteža bioelemenata kod pacijenata u postupku vantelesnog oplodjenja**

Mentor     **Profesor dr Snežana Vidaković**    

Potpisani     **Lidija I. Tulić**    

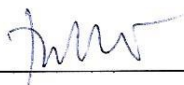
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 17.01.2019.

  
\_\_\_\_\_

### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Oksidativni stres i ravnoteža bioelemenata kod pacijenata u postupku vantelesnog oplodjenja**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 17.01.2019.



---

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.