

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE A ORNITOLOGICKÁ LABORATOŘ



**VOLNÉ RADIKÁLY A ANTIOXIDANTY V REPRODUKČNÍ
FYZIOLOGII ZVÍŘAT**

Bakalářská práce

Nina Mokráčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Studijní forma: prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Bezdíček, PhD.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením pana doc. Ing. Jiřího Bezdíčka, Ph.D. a že jsem čerpala pouze z pramenů uvedených v seznamu literatury.

V Olomouci dne

Podpis

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení: Nina Mokráčková

Název práce: Volné radikály a antioxidanty v reprodukční fyziologii zvířat

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra zoologie a ornitologická laboratoř PřF UP

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

Rok obhajoby: 2021

Počet stran: 91

Jazyk: český

Abstrakt:

V mé bakalářské práci se formou rešerše zabývám volnými radikály a antioxidanty v reprodukční fyziologii. Zmapovala jsem fyziologické funkce volných radikálů ve vývoji gamet (spermii a oocytů), ovulačním a menstruačním cyklu, oplození a graviditě a zaměřila jsem se na příčiny a důsledky oxidačního stresu v reprodukční soustavě. Část mé práce jsem věnovala souvislosti oxidačního stresu s narušenou plodností či neplodností a patologiím, které mohou v neplodnost vyústit. Dále jsem popsala důležité funkce antioxidantů v ochraně reprodukčního traktu před poškozením vyvolaným volnými radikály a jejich využití pro léčbu patologií a neplodnosti související s oxidačním stresem. Závěrečnou část práce jsem věnovala metodám asistované reprodukce, které jsou v současné době velmi populárním moderním řešením neschopnosti otěhotnět přirozenou cestou. V těchto kapitolách jsem se též zaměřila na ovlivnění technik asistované reprodukce oxidačním stresem. Dále jsem se věnovala využití antioxidantů v technikách asistované reprodukce prostřednictvím jejich přidání do kultivačního média nebo jejich použití jako kryoprotektiva při zmrazování gamet a embryí. Součástí mé práce je i obecná charakteristika volných radikálů, vysvětlení mechanismů jejich přirozeného vzniku v metabolismu, jejich fyziologické funkce v organismu a případné negativní vlivy při vzniku oxidačního stresu. Dále jsem uvedla nejvýznamnější enzymové antioxidanty a biomolekuly s antioxidační funkcí, které organismus před oxidačním stresem chrání.

Klíčová slova: volné radikály, neplodnost, léčba antioxidanty, asistovaná reprodukce

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

First name and surname: Nina Mokráčková

Title: Free radicals and antioxidants in reproductive physiology of animals

Type of thesis: Bachelor

Workplace: Department of Zoology PŘF UP

Supervisor: doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

Year of defense: 2021

Number of pages: 91

Language: Czech

Abstract:

My bachelor thesis is focused on free radicals and antioxidants in reproductive physiology based on my research on science articles. I reviewed the physiological roles of free radicals in sperm and oocyte production, ovulation and menstrual cycle, fertilization, and gravidity and I focused on causes and results of oxidative stress in the reproductive tract. Part of my work is focused on the link between oxidative stress and subfertility or infertility and pathologies, which can lead to infertility. I also reviewed the important roles of antioxidants in the protection of the reproductive tract against damage due to free radicals and their use in the treatment of pathologies and infertility caused by oxidative stress. The final part of my work is about assisted reproduction methods, which is a very popular and modern solution for couples, who cannot achieve pregnancy in a normal way. I focused mainly on the influence of free radicals on assisted reproduction. The next point was the use of antioxidants in assisted reproduction through adding them in culture media or their use as cryoprotectants in gametes and embryo freezing. I included a general description of free radicals, their sources in normal metabolism, their physiological role in the organism a possible negative influence of oxidative stress. I also described the most important enzymatic antioxidants and biomolecules with antioxidative effect, which protects our body against oxidative stress.

Keywords: free radicals, infertility, antioxidant treatment, assisted reproduction

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat panu doc. Ing. Jiřímu Bezdíčkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, poskytnutí odborné literatury, za jeho cenné rady při konzultaci a za výbornou komunikaci a vedení i v dnešních ztížených časech. Dále bych chtěla poděkovat mým přátelům z oboru Biologie a ekologie za vytvoření příjemného prostředí přátelského kolektivu a vzájemnou podporu během celého studia. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině za poskytnutou podporu během studia.

OBSAH

Seznam zkratk	8
Cíle práce	11
Úvod	12
1. Volné radikály, jejich vznik, fyziologické působení a negativní vliv	13
1.1. Přehled ROS a RNS	14
1.2. Vznik ROS a jejich fyziologické působení	15
1.2.1. Vznik superoxidového anionu a hydroxylového radikálu	15
1.2.2. Role ROS v imunitním systému	18
1.2.3. Enzymy podílející se na tvorbě RONS	19
1.3. Poškození biomolekul vlivem RONS	20
2. Antioxidační systém	21
2.1. Enzymový antioxidační systém	22
2.2. Biomolekuly působící jako antioxidanty	23
3. Volné radikály a antioxidanty a jejich role ve spermatogenezi a oplození	25
3.1. Zdroje ROS v semenné plazmě	25
3.2. Fyziologické funkce ROS a antioxidantů ve spermatogenezi a oplození	27
3.3. Negativní vliv oxidačního stresu na spermatogenezi a oplození	31
4. Volné radikály a antioxidanty a jejich role v tvorbě folikulů, ovulačním a endometriálním cyklu a graviditě	34
4.1. Zdroje ROS ve vaječnicích a děloze	34
4.2. Ovlivnění tvorby ROS hormony	34
4.3. Fyziologické role ROS a antioxidantů v tvorbě folikulů, ovulačním a endometriálním cyklu a graviditě	35
4.3.1. Role ROS a antioxidantů ve vývoji folikulů a ovulaci	35
4.3.2. Role ROS a antioxidantů v endometriálním cyklu	38
4.3.3. Role ROS a antioxidantů v graviditě a riziko potratu	39
4.4. Patologie v ovulaci a graviditě spojené s vlivem ROS	41
4.4.1. Negativní vliv ROS	41
4.4.2. Syndrom polycystických ovárií	42
4.4.3. Preeklampsie	42
4.4.4. Gestační diabetes mellitus	45
4.4.5. Endometrióza	46
4.4.6. Neplodnost spojená s oxidačním stresem	48
5. Léčba neplodnosti pomocí podávání antioxidantů a jejich využití v metodách umělého oplodnění	49

5.1. Léčba neplodnosti antioxidanty u mužů	50
5.1.1. Vitamin C	51
5.1.2. Vitamin E	51
5.1.3. L-karnitin	52
5.1.4. Karotenoidy	52
5.1.5. Glutathion	52
5.1.6. Koenzym Q10	53
5.1.7. Kombinovaná léčba	53
5.2. Léčba neplodnosti pomocí antioxidantů u ženy	53
5.2.1. Léčba endometriózy	54
5.2.2. Léčba syndromu polycystických ovárií	55
5.3. Využití antioxidantů v metodách umělého oplodnění	56
5.3.1. Zdroje oxidačního stresu v technikách asistované reprodukce	56
5.3.2. Využití antioxidantů pro zlepšení parametrů spermií při technikách asistované reprodukce	57
5.3.3. Využití antioxidantů pro zlepšení kvality oocytů, <i>in vitro</i> dozrávání oocytů a přizpůsobení kultivačního média v <i>in vitro</i> oplodnění	59
Závěr	61
Seznam literatury	64

Seznam zkratek

2A [•]	askorbyl
4-HNE	4-hydroxynonenal
AC	adenylcykláza
AH ⁻	redukovaný askorbát
ATP	adenosintrifosfát
Br ⁻	anion bromu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Cl ⁻	anion chloru
CNS	centrální nervová soustava
CoA	koenzym A
CoQH [•]	radikál koenzymu Q
CoQH ₂	redukovaný koenzym Q
Cu,Zn-SOD	měď, zinek-dependentní superoxiddismutáza
Cu ²⁺	měďnatý ion
DFI	index fragmentace DNA
DHA	dehydroaskorbát
e ⁻	elektron
eNOS	endotheliální syntáza oxidu dusnatého
Fe ²⁺	železnatý ion
Fe ³⁺	železitý ion
FSH	folikulostimulační hormon
GDM	gestační diabetes mellitus
GnRH _a	agonista gonadotropin uvolňujícího hormonu
GPx	glutathionperoxidáza
H ⁺	vodíkový kationt
H ₂ O ₂	hydrogenperoxid, peroxid vodíku
HBrO	kyselina bromná
hCG	humánní choriogonadotropin
HClO	kyselina chlorná

HCO ₃ ⁻	hydrogenuhličitan
HSP70	heat shock protein 70
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermií
IL-6	interleukin 6
IL-β	interleukin β
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
LDL	low density lipoprotein
LOO [•]	lipoperoxylový radikál
MDA	malondialdehyd
Mn-SOD	mangan-dependentní superoxiddismutáza
mtDNA	mitochondriální DNA
MTHFR	5,10-methylentetrahydrofolát reduktáza
NAD ⁺	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NK	natural killer cells (NK buňky)
NO [•]	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
N-Tyr	nitrotyrosin
O ₂	molekulární kyslík
O ₂ ^{•-}	superoxidový anion, superoxidový radikál
OH ⁻	hydroxidový anion
OH [•]	hydroxylový radikál
OONO ⁻	peroxynitrit
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinases
PCOS	syndrom polycystických ovárií
PDGF	platelet derived growth factor, růstový faktor odvozený z krevních destiček
PHGPx	fosfolipidhydroperoxidglutathionperoxidáza
PIP ₂	fosfatidylinosital-4,5-bisfosfátu
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C

PLA2	fosfolipáza A2
PIGF	placental growth factor, placentární růstový faktor
pO ₂	parciální tlak kyslíku
P-Thr/Ser-P	fosforylovaný threonin a serin
PTK	proteinová tyrosinkináza
PTPase	proteinová tyrosinfosfatáza
P-Tyr	fosforylovaný tyrosin
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RNS	reactive nitrogen species, reaktivní formy dusíku
RO [•]	alkoxylový radikál
ROH	alkohol
RONS	reactive oxygen and nitrogen species, reaktivní formy kyslíku a dusíku
ROO [•]	alkylperoxylový radikál
ROOH	hydroperoxid
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutáza
trxS ⁻	oxidovaný thioredoxin
trxSH	redukovaný thioredoxin
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulární endoteliální růstový faktor
WHO	World Health Organization
XO	xantinoxidáza
ZP3	zona pellucida sperm-binding protein
α-TokH	redukovaný α-tokoferol
α-TNF	tumor necrosis factor α, faktor nádorové nekrózy α
α-Tok [•]	α-tokoferolový radikál

Cíle práce

Ve své bakalářské práci se zabývám vlivem volných radikálů a antioxidantů v reprodukční fyziologii živočichů. Cílem práce je zpracovat rešerši, které pojednává o fyziologických rolích volných radikálů v reprodukční soustavě a o jejich negativním vlivu, který může způsobit různé patologie a neplodnost. Součástí práce je i zpracování nejnovějších poznatků v oblasti léčby neplodnosti způsobené oxidačním stresem pomocí antioxidantů a v oblasti využití antioxidantů v technikách asistované reprodukce.

Úvod

Volné radikály jsou velmi reaktivní substance, které v těle vznikají přirozenou cestou jako vedlejší produkty metabolismu. Společnost si volné radikály většinou vykládá spíše jako negativní věc spojenou s různými patologiemi. Volné radikály však hrají významné role v metabolismu například jako signalizační molekuly. Jejich reaktivita se také uplatňuje při reakcích imunitního systému, kdy jsou schopné rychle a účinně napadat a zneškodňovat cizorodé částice. Aby však volné radikály nepoškozovaly vlastní tkáně a orgány, musí být v organismu přítomen dostatek antioxidantů, které mají schopnost je neutralizovat, a tak které jejich působení regulují. Antioxidanty si tělo vytváří v podobě antioxidantních enzymů (superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, kataláza atd.) nebo biomolekul (melatonin, glutathion, koenzym Q10 atd.). Některé antioxidanty musíme přijímat v potravě (vitamin C a vitamin E).

V poslední době je nacházeno více a více souvislostí mezi volnými radikály a různými nemocemi či poruchami. Převaha volných radikálů nad antioxidantním systémem (tj. oxidační stres) může narušit integritu tkání a metabolické pochody v těle, v důsledku čehož se mohou rozvinout různá onemocnění (diabetes, různá plicní onemocnění, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba atd.). Proto je v současné době velkým trendem léčit nebo alespoň zlepšovat pacientův stav podáváním antioxidantů v podobě léků.

V mé bakalářské práci jsem se rozhodla formou rešerše zaměřit na fyziologickou funkci volných radikálů v reprodukci a jejich negativní vliv, který může rozvinout různé patologie reprodukčního traktu a mít za důsledek sníženou plodnost nebo dokonce úplnou neplodnost. Oxidační stres se, jak již bylo zmíněno, dá zmírnit podáváním antioxidantů, proto jsem se rozhodla zaměřit i na léčbu neplodnosti orálním podáváním antioxidantů. Neplodnost neboli neschopnost otěhotnět přirozenou cestou se v současné době řeší různými metodami asistované reprodukce, které mají však také svá úskalí, jež s působením volných radikálů úzce souvisí. Antioxidanty se při asistované reprodukci též užívají ke zmírnění oxidačního stresu v kultivačním médiu nebo jako kryoprotektiva.

1. Volné radikály, jejich vznik, fyziologické působení a negativní vliv

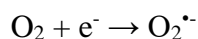
Volné radikály jsou charakterizovány aspoň jedním nepárovým elektronem ve vnější sféře svého elektronového obalu, což je dělá vysoce reaktivními molekulami s velmi krátkou životností (Silva a Lima 2014). Vznikají homolytickým štěpením dvouelektronové vazby (X-X), přičemž jedna částice přijme jeden elektron (redukce) a druhá ho naopak ztratí (oxidace). V obou případech částice obsahuje nepárový elektron. Volné radikály jsou vysoce reaktivní částice, neboť si snaží doplnit párový elektron, a proto se dokážou rychle navázat na jinou částici či jiné částici odejmout (donor) nebo naopak odevzdat elektron (akceptor). Částice, se kterou volný radikál reaguje, se sama stane radikálem, zatímco se původní volný radikál neutralizuje. Tento jev se nazývá propagace reakce. Pokud se dva radikály spojí vazbou, radikálová reakce se ukončí (terminace; Štípek et al. 2000).

Pro vznik volného radikálu, a tedy pro uskutečnění homolytického štěpení dvouelektronové vazby, je potřeba velké množství energie, např. vysoká teplota, ionizační nebo ultrafialové záření. V organismu vznikají přirozeně v místech intenzivního aerobního metabolismu (mitochondrie), při některých metabolických reakcích, při zánětu, infekci apod. Míra reaktivity volného radikálu závisí na velikosti jejich základního atomu nebo molekuly a u větších radikálových molekul na jejich struktuře. Mezi nejreaktivnější radikály patří jedno- a dvouatomové molekuly jako je vodíkový nebo hydroxylový radikál. Tyto radikály reagují ve zlomku sekundy. Výjimkou je např. nitrosylový radikál, který je méně reaktivní. Naopak radikálové formy větších aromatických molekul jsou schopné existovat až několik dnů bez reakce (Stratil a Kubáň 2018).

Reaktivní formy kyslíku (ROS; Reactive oxygen species) a dusíku (RNS; Reactive nitrogen species) mohou mít radikálovou či neradikálovou formu. Reaktivní formy kyslíku, mezi které patří superoxidový radikál, hydroxylový radikál, hydrogenperoxid a nitrosylový radikál, vznikají v těle přirozeně v aerobním metabolismu (Agarwal et al. 2005). Buňky si udržují rovnováhu správným poměrem antioxidantů vůči reaktivním formám kyslíku. Jakmile ale začnou reaktivní formy kyslíku převažovat, buňka se dostává do oxidačního stresu, což může zapříčinit nefunkčnost enzymů, poškození lipidů, proteinů či DNA a může vést až k buněčné smrti (Agarwal et al. 2005).

1.1. Přehled ROS a RNS

Superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$) je nejhojnějším volným radikálem v organismu. Nejčastěji vzniká v mitochondriích, kde se elektrony uniklé z řetězce navazují na molekulu kyslíku a redukují ji na superoxidový radikál:



Superoxidový radikál je méně reaktivní než hydroxylový radikál (OH^{\cdot}). Jeho nebezpečnost ale spočívá v možnosti dismutace na H_2O_2 , který může v reakci s přechodnými kovy generovat reaktivnější hydroxylový radikál (Halliwell a Gutteridge 2015) nebo je enzymem katalázou odbouráván.

Hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) patří k nejreaktivnějším volným radikálům, tudíž velmi rychle reaguje s jinými částicemi. Často dochází k okamžitému poškození struktury či funkce biomolekul (aminokyseliny, sacharidy, triacylglyceroly, nukleové kyseliny atd.) ještě, než radikál dokáže zneškodnit jakýkoli antioxidant (Stratil a Kubáň 2018). Jak již bylo zmíněno výše, hydroxylový radikál může vzniknout reakcí přechodných kovů s H_2O_2 . Naopak setkáním dvou molekul OH^{\cdot} vzniká hydrogenperoxid.

Peroxid vodíku (hydrogenperoxid, H_2O_2) není přímo volným radikálem, avšak mezi ROS řazen je, neboť se podílí na reakcích, při kterých volné radikály vznikají. Nejnebezpečnější jsou pro organismus jeho reakce v přítomnosti přechodných kovů, kdy vzniká, jak již bylo zmíněno, hydroxylový radikál (Fentova reakce):



Nitrosylový radikál (NO^{\cdot}) vzniká jako vedlejší produkt při přeměně argininu na citrulin. Tato reakce je katalyzována enzymem nitrosylsyntázou (NOS). Nitrosylový radikál reaguje velmi snadno s jinými volnými radikály. Například v reakci v superoxidovým radikálem tvoří toxický peroxynitrit ($OONO^{\cdot}$). Při vyplavení nitrosylového radikálu do krve reaguje s erytrocyty za vzniku methemoglobinu a nitrátu.

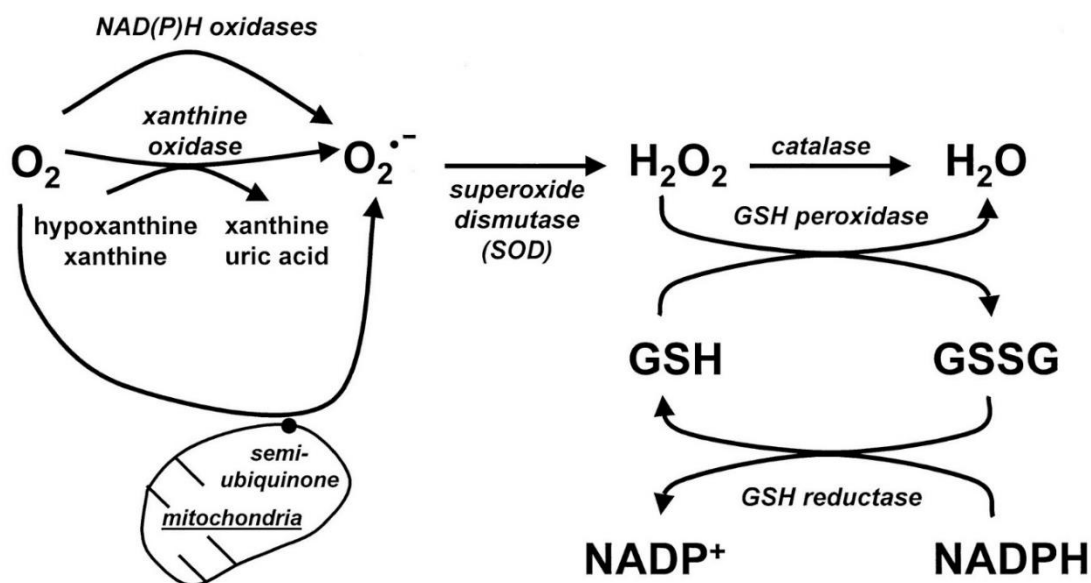
Peroxyinitrit ($OONO^{\cdot}$) vzniká, jak už bylo zmíněno výše, reakcí nitrosylového radikálu a superoxidového radikálu. Peroxyinitrit reaguje s biomolekulami relativně pomalu, avšak představuje pro organismus nebezpečí nitrace lipidů a proteinů, přičemž může dojít k inaktivaci enzymů (např. NOS, SOD). Dále může dojít k nitraci či deaminaci bází, a tím k porušení řetězce DNA (Stratil a Kubáň 2018).

1.2. Vznik ROS a jejich fyziologické působení

Reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) vznikají fyziologicky jako vedlejší produkty kyslíkového metabolismu (Agarwal et al. 2006). Velice známým zdrojem konkrétně superoxidových radikálů ($O_2^{\cdot-}$) je mitochondriální elektronový transportní řetězec (Boveris a Cadenas 1975). Podobná reakce může být zapříčiněna enzymy nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidázou (NOX) a xantin oxidázou (XO). Důležitým zdrojem superoxidových radikálů jsou i neutrofilie a makrofágy, jejichž součástí jsou právě různé isoformy NOX (Dröge 2002).

1.2.1. Vznik superoxidového anionu a hydroxylového radikálu

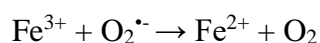
Superoxidový anion vzniká univalentní redukcí O_2 . Jak již bylo zmíněno výše, největší podíl těchto superoxidových anionů vzniká únikem elektronů z elektronového transportního řetězce za působení enzymu NADPH oxidázy. Buňka má proti tomuto defektu přirozenou obranu ve formě enzymu superoxidodismutázy (SOD), která je katalyzuje dismutaci dvou molekul $O_2^{\cdot-}$ na kyslík (O_2) a peroxid vodíku (H_2O_2). Peroxid vodíku je dále přeměněn na vodu pomocí enzymů katalázy nebo glutathionperoxidázy. Během této reakce se však enzym glutathionperoxidáza oxiduje na glutathiondisulfid. Je tedy nutná přítomnost dalšího enzymu, který se nazývá glutathionreduktáza. Tento enzym spolu s NADPH, která dodá H^+ , vrátí glutathionperoxidázu do původního stavu (viz obr. 1; Dröge 2002). U peroxidu vodíku hrozí nebezpečí v přítomnosti přechodných kovů (ionty železa či mědi). Proběhne Fentonova reakce, což vede ke vzniku hydroxylového radikálu (OH^{\cdot} ; Silva a Lima 2014).



Obr. 1: Produkce a odstraňování reaktivních forem kyslíku. Superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$) vzniká buď v mitochondriích, v xantinoxidázové reakci nebo v reakci NADPH oxidáz. Dále může být za účasti superoxidodismutázy (SOD) přeměněn na hydrogenperoxid (H_2O_2), který je dále přeměněn na vodu (H_2O) buď prostřednictvím katalázy, nebo prostřednictvím glutathionperoxidázy. Této reakce se účastní glutathion (GSH), který je přeměněn na glutathion disulfid (GSSG). Pro regeneraci glutathionu je nutný enzym glutathionreduktáza a jedna molekula NADPH (Dröge 2002).

1.2.1.1. Haber-Weissova reakce

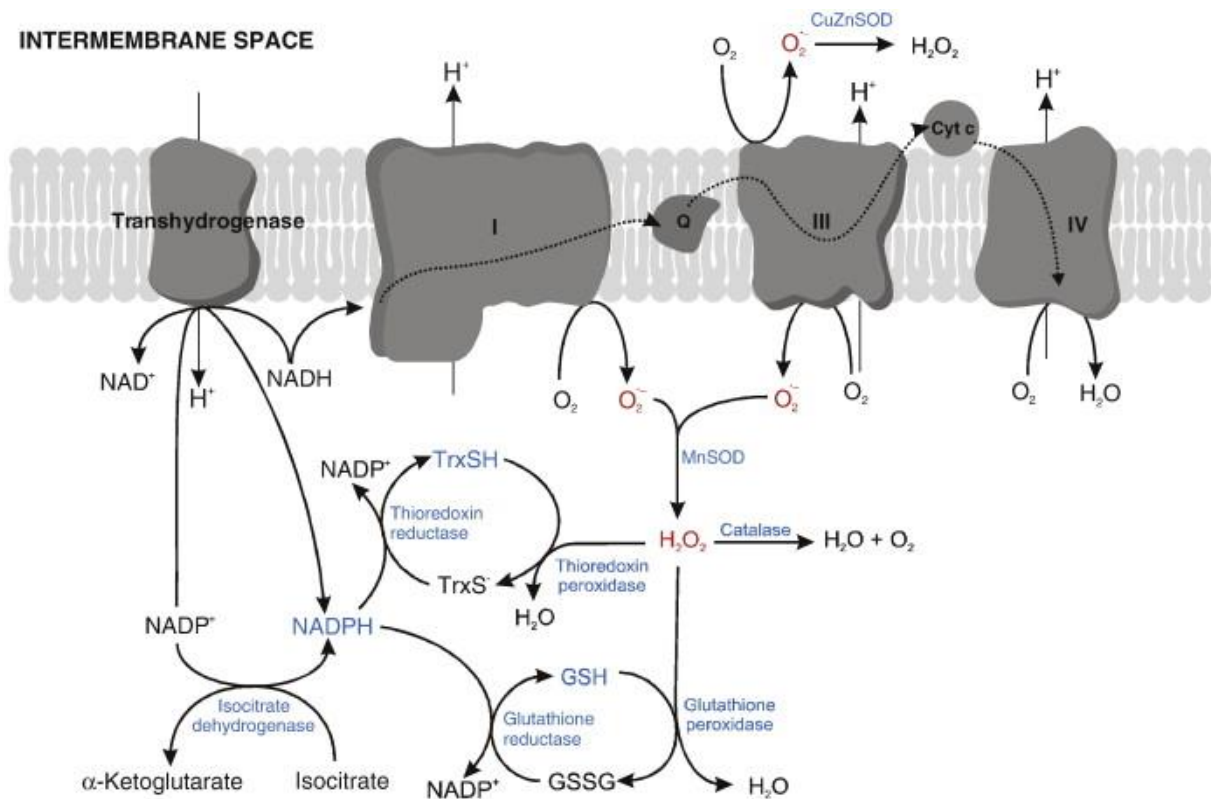
Haber-Weissova reakce je jednou z redoxních reakcí, kdy superoxidový anion reaguje s hydrogenperoxidem v přítomnosti kovového iontu. Vzniká zde hydroxylový radikál. Tuto reakci lze rozdělit na dva kroky. V prvním kroku se redukuje železitý ion (Fe^{3+}) na železnatý (Fe^{2+}) pomocí superoxidového aniontu. Druhým krokem je Fentonova reakce, kde je produkován hydroxylový radikál (Haber a Wiess 1932; Kehrer 2000).



1.2.1.2. Mitochondriální elektronový transportní řetězec

Mitochondriální elektronový transportní řetězec je již dlouho považován za nejvýznamnější zdroj ROS (konkrétně superoxidového anionu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu). Již dříve bylo objeveno, že některé elektrony, které putují řetězcem za pomoci elektronových přenašečů, z řetězce uniknou a okamžitě se navážou na volné molekuly O_2 za vzniku

superoxidového radikálu ($O_2^{\bullet-}$). V organelle se však nachází mitochondriální superoxidodismutáza (MnSOD), která superoxidový radikál dismutuje na peroxid vodíku. (viz obr. 2; Loschen et al. 1971 a 1974).



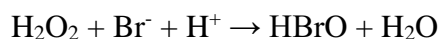
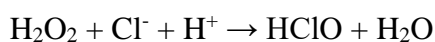
Obr. 2: Produkce ROS v mitochondriích a jejich neutralizace prostřednictvím antioxidantů. Superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$) vzniká redukcí O_2 volným elektronem, který unikl z transportního řetězce, převážně z komplexu I a III. $O_2^{\bullet-}$ může být dismutován na hydrogenperoxid (H_2O_2) prostřednictvím superoxidodismutázy Cu,Zn-SOD v mezimembránovém prostoru nebo prostřednictvím superoxidodismutázy Mn-SOD v matrixu. H_2O_2 je následně eliminován katalázou, glutathionperoxidázou využívající redukovaný glutathion (GSH) jako substrát nebo thioredoxinperoxidázou, která využívá thioredoxin (TrxSH) jako substrát. Vzniká oxidovaný glutathion (GSSG) a thioredoxin (TrxS), které opět redukovány pomocí NADPH sloužícího jako zdroj elektronů (Kowaltowski et al. 2009).

1.2.2. Role ROS v imunitním systému

ROS, navzdory své škodlivosti pro organismus, hrají velmi důležitou roli v imunitním systému. Fagocyty (neutrofilů a monocytů) využívají reaktivní formy kyslíku k zabíjení patogenů a k odstraňování zbytků mrtvých buněčných fragmentů (Babior 1978). Produkují ROS za pomoci NADPH oxidázy, která je součástí membrány leukocytů. NADPH oxidáza katalyzuje elektronovou redukci O_2 , který se přenesou přímo na NADPH. Tato reakce však musí být striktně redukována, aby nedošlo k nadměrné produkci ROS, které by mohly ničit vlastní tkáň organismu. Spuštění reakce je proto podmíněno navázáním různých cytosolových a membránových proteinů, které enzym aktivují (Elbim 2005).

Tato masivní lokální produkce reaktivních oxidantů se nazývá oxidační vzplanutí (Dröge 2002). Zdroj těchto reaktivních oxidantů nazýváme zánět. Pokud zánět trvá a stane se chronickým, může dojít k závažnému poškození tkáňe či se dokonce může stát karcinogenním činitelem (Stratil a Kubáň 2018).

Prekurzorem všech reaktivních oxidantů, vznikajících v imunitním systému, je superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), který vzniká, jak bylo již zmíněno, elektronovou redukcí O_2 za účasti enzymu NADPH oxidázy, která se nachází na membráně fagocytů. Většina molekul $O_2^{\cdot-}$ dismutuje přirozeně nebo za pomoci enzymu superoxidodismutasy na hydrogenperoxid (H_2O_2), který je zpracován různým způsobem různými druhy leukocytů. Kyselé prostředí, které zajišťuje protonová pumpa v membráně leukocytů, usnadní vylučování železitých iontů, které jsou k dispozici pro Fentonovu reakci, při které vzniká hydroxylový radikál. Hydrogenperoxid může reagovat s neutrofilovou myeloperoxidázou a být přeměněn na kyselinu chlornou nebo s eozinovou peroxidasou a vytvořit kyselinu bromnou (Weiss 1989).

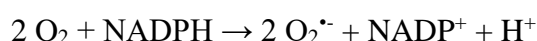


V imunitním systému je významná i produkce nitrosylového radikálu (NO^{\cdot}), který vzniká jako vedlejší produkt v buňkách při přeměně argininu na citrulin. Reakce se účastní kosubstráty O_2 a NADPH. Reakce je katalyzována isoformami syntázy oxidu dusného (NOS). Pro imunitní systém je důležitá NOS II (iNOS), která je součástí makrofágů a neutrofilů. Tento enzym je aktivován samotnou přítomností mikrobů a cytokininů (Billiar 1975). Na tyto podněty je zahájena intenzivní syntéza NO^{\cdot} , který může být případně v reakci se superoxidovým aniontem ($O_2^{\cdot-}$) přeměněn na peroxyinitrit ($OONO^{\cdot}$).

1.2.3. Enzymy podílející se na tvorbě RONS

NADPH oxidáza

Již v kapitole o imunitním systému byla zmíněna NADPH oxidáza, která se nachází na membráně fagocytujících buněk a tvoří volné radikály v reakci na cizorodé komponenty v organismu. NADPH oxidáza se však nachází i v nefagocytujících buňkách, např. buňky endotelu, fibroblasty, chondrocyty, buňky hladkého svalstva atd. V těchto případech hrají ROS roli signálních molekul. ROS mohou ovlivňovat aktivitu transkripčních faktorů, která může mít za následek stimulaci imunitní odpovědi nebo proliferaci buněk (Štípek 2000). NADPH oxidáza katalyzuje reakci, při které je redukován kyslík, přičemž vzniká superoxidový radikál:



Tyto isoformy NADPH oxidáz jsou stimulovány různými faktory vyplavovanými při lokálních metabolických změnách. Například v endotelu cév může aktivaci NADPH oxidázy a vyplavení ROS stimulovat trombin, faktor nádorové nekrózy (TNF- α) či růstový faktor PDGF (Dröge 2002).

NO syntáza

Nitrosylový radikál (NO \cdot ; oxid dusnatý) působí jako signální molekula a dokáže regulovat mnoho buněčných funkcí. Reakci, při které je oxid dusnatý vedlejším produktem katalyzuje nitroxidsyntáza (NO syntáza; NOS). Nitroxidsyntáza je enzym obsahující dvě identické podjednotky, které jsou schopny vázat 4 různé prostetické skupiny nutné k aktivaci enzymu (Racek a Holeček 1999). V určitých oblastech CNS a autonomním nervovém systému je syntetizován enzym NOS I zodpovědný za tvorbu NO \cdot , který zde funguje jako neurotransmitter. Jeho tvorba může nepřímo přes jiné signální proteiny stimulovat syntézu dalších neurotransmitterů a může tak ovlivnit diferenciaci neuronů, proces učení či dlouhodobou paměť (Wang a Robinson 1997).

Xantinoxidáza

Xantinoxidáza je enzym, který hraje důležitou roli v katabolismu purinů. Generuje superoxidový radikál a hydrogenperoxid. Její největší aktivita byla zjištěna v játrech a v tenkém střevě, dále také v endotelu krevních kapilár. Tento enzym může fungovat jako xantindehydrogenáza, která ROS netvoří a odnímá elektrony různým substrátům (xantinu, hypoxantinu, aldehydům atd.). Tyto elektrony předává na NAD $^+$. Působením určitých faktorů se změní vazebné místo enzymu a je přeměněn na xantinoxidázu. Tato forma enzymu již

nedokáže předat elektrony NAD^+ a předává je molekulám kyslíku, přičemž vzniká superoxidový anion (Racek a Holeček 1999). Přeměněná xanthinoxidáza může být uvolněna do krevního oběhu a poškodit cévní endotel (Stratil a Kubáň 2018).

1.3. Poškození biomolekul vlivem RONS

Za normálních podmínek je rovnováha mezi tvorbou RONS a antioxidanty, které jsou schopné RONS odstraňovat, a tak chránit organismus před poškozením. Pokud organismus trpí nedostatkem antioxidantů nebo se naopak tvoří větší množství RONS, vzniká nerovnováha mezi jejich vznikem a odstraňováním, kterou nazýváme oxidační stres. Nadměrné množství může způsobovat poškození různých biomolekul a dlouhodobější oxidační stres v konkrétních tkáních může mít za následek rozvinutí různých nemocí, jako je například diabetes mellitus, neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba), ateroskleróza, různá plicní onemocnění atd. (Štípek 2000).

Volné radikály mohou atakovat různé molekuly a modifikovat jejich strukturu. Náchylné na poškození jsou lipidy. Poškození mastných kyselin volnými radikály se nazývá lipoperoxidace. Reakce je iniciována vytržením vodíkového atomu v methylenové vazbě uhlovodíkového řetězce mastné kyseliny. Lipid se tak stává uhlíkovým radikálem, který je schopen reagovat s molekulárním kyslíkem nebo přechodnými kovy a vzniká peroxylový radikál (LOO^\bullet), který je schopen napadat další sousední lipidy (propagace reakce). Tímto způsobem může dojít k poškození membrán, které jsou tvořeny právě nejvíce náchylnými polynenasycenými mastnými kyselinami. Peroxidace mění fluiditu membrán, její propustnost pro ionty a může přispět k lýzi buněk (Štípek 2000; Stratil a Kubáň 2018).

Proteiny mohou poškodit nejen volné radikály ale právě i produkty lipoperoxidace. Může dojít k fragmentaci proteinového řetězce, změnám elektrického náboje proteinu nebo k oxidaci bočních řetězců aminokyselin. Reakce opět začíná vytržením vodíkového atomu na atomu uhlíku a následně protein reaguje s molekulou kyslíku za vzniku peroxylového radikálu. Nebezpečné je opět setkání s přechodnými kovy, neboť peroxylový radikál je v reakci s nimi rychle přeměněn na proteinperoxid a alkoxylový radikál. Mezi aminokyselinami, které jsou na oxidaci nejnáchylnější patří methionin, který je oxidován na sulfoxid, cystein, který je oxidován na kyselinu cysteinovou a tryptofan, oxidován na kynurenin. Oxidace methioninu může navíc způsobit změnu konformace složeného proteinu a způsobit jeho degradaci, nebo naopak může vzniknout disulfidová vazba mezi dvěma proteiny, které původně nebyly spojeny. Velmi náchylné k oxidaci jsou enzymy obsahující kov v aktivním místě. Enzym modifikovaný oxidací

ztrácí svoji funkci a podléhá rozkladu proteázami. S RNS reaguje tyrosinový radikál za tvorby 3-nitrotytosinu, přičemž tato modifikace je nevratná. Modifikované proteiny mohou být degradovány proteolytickým systémem na aminokyseliny. Pokud se modifikované proteiny v buňce hromadí, může to způsobit buněčnou smrt a ve větším rozsahu i poškození tkání (Štípek 2000, Stratil a Kubáň 2018).

Velkým problémem je také poškození DNA volnými radikály, především HO[•], který je schopen se připojit na purinové a pyrimidinové báze a přeměnit je na hydroxyderiváty a oxoderiváty (např. 8-hydroxyguanin, 8-hydroxyadenin, 5,6-dihydroxythymin atd.). Tyto změny mohou zapříčinit chyby při replikaci (chybné párování bází). Poškození DNA může zapříčinit buněčnou smrt, mutagenezi či karcinogenezi (Štípek 2000).

Velmi náchylná na poškození je mitochondriální DNA, neboť není chráněna histony a DNA-vazebnými proteiny. Bylo prokázáno, že tvorba superoxidového anionu a hydrogenperoxidu se v mitochondriích zvyšuje s věkem (Sohal a Sohal 1991). Zároveň se s rostoucím věkem snižuje množství a aktivita antioxidantů obsažených v mitochondriích (Mn-SOD, kataláza či glutathion peroxidáza; Sohal et al. 1990). Výsledkem je s věkem se zvyšující oxidační stres v mitochondriích, a proto je více poškozována nejen mitochondriální DNA ale i mitochondriální membrána, která je tvořena nenasycenými mastnými kyselinami, které jsou, jak již bylo zmíněno výše, velice náchylné na lipoperoxidaci. Vliv mutací mitochondriální DNA byl prokázán u osob trpící Parkinsonovou chorobou, konkrétně v buňkách nigrostriatální dráhy v mozku (Ikebe et al. 1990).

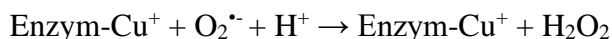
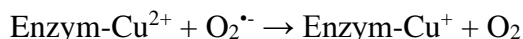
2. Antioxidační systém

Antioxidanty jsou látky, kterými se organismy brání proti oxidačnímu stresu (tj. nadměrné tvorbě reaktivních forem kyslíku). Jednou možností je předcházení tvorby volných radikálů prostřednictvím regulace aktivity enzymů, které volné radikály tvoří nebo vychytáváním a skladování přechodných prvků, aby nemohly s volnými radikály reagovat, a tím vytvořit ještě nebezpečnější formy. Další možností je vychytání a odstranění již vzniklých radikálů. Tyto látky dělíme na vychytávače (scavengers), lapače (trappers) a zhášecí (quenchers). Poslední možností je reparace již oxidačně poškozených biomolekul (Štípek 2000). Antioxidanty můžeme podle původu rozdělit na endogenní, které jsou syntetizovány organismem (ubichinon, glutathion, močová kyselina, melatonin), a exogenní, které organismus přijímá potravou (vitamin C a E, karotenoidy, lipoová kyselina). Dále můžeme antioxidanty dělit na enzymové

a neenzymové. Většina antioxidantů je velmi specifická a často působí na určité typy molekul na určitém místě v organismu (Stratil a Kubáň 2018).

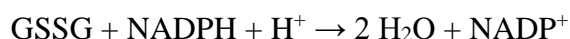
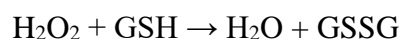
2.1. Enzymový antioxidační systém

Superoxiddismutázy (SOD) patří k nejdůležitějším antioxidačním enzymům. Jsou obsaženy v téměř každé buňce, kde velmi rychle katalyzují přeměnu superoxidového anionu na hydrogenperoxid. Existují různé typy superoxiddismutáz, které se liší kovy v aktivním centru a lokalizací v buňce. Enzym funguje na principu redukce a poté zpětné oxidace, tudíž první molekula superoxidového anionu odebírá elektron kovu v aktivním centru enzymu a vzniká molekula kyslíku, a druhý superoxidový anion elektron naopak dodá a výsledkem reakce je hydrogenperoxid. SOD1 (Cu,Zn-SOD) s dvěma aktivními centry ve dvou identických podjednotkách se vyskytuje především v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrií, kde působí především na vnější membráně mitochondrie, kde vychytává molekuly superoxidových anionů vzniklé únikem elektronů z elektronového transportního řetězce. Oxidace a redukce zde probíhá pouze na atomu mědi, atom zinku má pouze strukturní funkci:



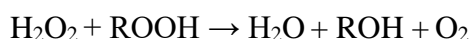
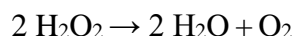
SOD2 (MnSOD) je mitochondriální izoenzym, který se vyvinul až u vyšších eukaryot. Dále existuje extracelulární SOD (SOD3). V aktivním centru se opět nachází měď a zinek. U bakterií se vyskytují superoxiddismutázy obsahující Fe^{3+} (Štípek 2000; Stratil a Kubáň 2018; Racek a Holeček 1999).

Glutathionperoxidáza (GPx) potřebuje ke své aktivitě redukováný glutathion (GSH) jako kofaktor. **Glutathion** v cytosolu spolu s enzymy tvoří redukované prostředí. Glutathion je tripeptid složený ze tří aminokyselin: glutamová kyselina, cystein, glycin. Za antioxidační aktivitu je zodpovědná thiolová skupina. Glutathionperoxidáza je enzym, který se podílí spolu s katalázou na dismutaci H_2O_2 na vodu. Je ale schopna redukovat i hydrogenperoxydy mastných kyselin, což se uplatňuje v opravování oxidačně poškozených buněčných membránách. Při redukci ROS se však enzym sám oxiduje a je třeba dodat enzym **glutathionreduktázu**, která obsahuje oxidovanou formu glutathionu (GSSG). Glutathion se regeneruje za spotřeby NADPH, které odebírá 2 elektrony.



Existuje více izoenzymů glutathionperoxidázy, které se liší působením na různých místech v organismu. Cytosolová glutathionperoxidáza rozkládá hydrogenperoxydy mastných kyselin, které musí být z lipidů nejprve uvolněny. Dále se v buňce stará o dismutaci hydrogenperoxidu, jak již bylo zmíněno výše. **Fosfolipihydroperoxid-GSH-peroxidáza** (PHGPx) redukuje fosfolipidové hydroperoxydy na hydroxylové deriváty přímo na membránách, mastné kyseliny nemusí být z lipidů uvolňovány. Dále byla v lidském těle objevena gastrointestinální a plazmatická glutathionperoxidáza (Štípek 2000; Stratil a Kubáň 2018; Racek a Holeček 1999).

Kataláza je hem obsahující enzym, který katalyzuje přeměnu H_2O_2 na vodu a molekulární kyslík. Reakce probíhá dvoustupňovým mechanismem, kdy v prvním kroku hydrogenperoxid oxiduje železo v hemu a v druhém kroku je další molekula hydrogenperoxidu použita naopak k zpětné redukci, čímž je enzym regeneruje. Kromě toho může katalyzovat i peroxidázové reakce, kde jako donor vodíků slouží např. alkohol (v játrech) nebo jiné organické sloučeniny.



Kataláza nejvíce působí v mitochondriích, kde odstraňuje hydrogenperoxid vzniklý ze superoxidových anionů a zabraňuje tak jeho přeměně na hydroxylový radikál, který je pro organismus mnohem nebezpečnější. Dále je také hojně obsažena v peroxizomech hepatocytů a v cytoplazmě erytrocytů, kde chrání před oxidací hemoglobinu (Štípek 2000; Stratil a Kubáň 2018; Racek a Holeček 1999).

2.2. Biomolekuly působící jako antioxidanty

Jak již bylo zmíněno, velmi nebezpečnou roli v reakcích volných radikálů hrají přechodné kovy. V organismu existují proteiny, které jsou schopny přechodné kovy vázat a zabraňovat jim tak, aby vstupovaly do reakcí s volnými radikály. V tomto smyslu můžeme mezi antioxidanty řadit **transferin**, který transportuje železo do buněk, kde je skladován ve **feritinu** nebo **laktoferinu**, které železo oxidují na trojmocné, a tím se stává metabolicky neaktivní. Podobně funguje **celuroplazmin**, který je schopen vázat ještě měď, a **haptoglobin** (vážící extracelulární hemoglobin) a **hemopexin** (vážící uvolněný hem). **Albumin**, který váže ion

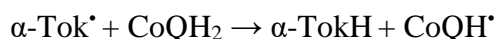
Cu^{2+} , reaguje s hydrogenperoxidem, čímž se oxiduje (Cu^{3+}), a to má za následek poškození dalších struktur albuminu a následně je určen k degradaci. Albuminu se proto přezdívá „sebeobětující“ antioxidant (Stratil a Kubáň 2018; Štípek 2000).

Melatonin, hormon epifyzy, který u člověka především řídí denní rytmus, může také působit jako antioxidant. Význam má při ochraně lipidů membrán a jaderné DNA před oxidačním poškozením (Stratil a Kubáň 2018). Melatonin také pozitivně ovlivňuje hladinu enzymů antioxidační ochrany. Ve farmakologických dávkách může vychytávat hydroxylové radikály (Štípek 2000). Jeho výhodou jsou jeho amfifilní vlastnosti (je silně hydrofobní i hydrofilní), díky nimž dokáže snadno chránit všechny buněčné struktury (Stratil a Kubáň 2018).

Kyselina lipoová je především kofaktorem pyruvátdehydrogenázového a α -ketoglutarátdehydrogenázového komplexu. Působí však také jako universální antioxidant, který je schopen reagovat s alkylperoxylovými radikály (RO^{\bullet}), HO^{\bullet} , $\text{O}_2^{\bullet-}$ či NO^{\bullet} (Štípek 2000). Dokáže také regenerovat ostatní antioxidanty. Redukovaná dihydrolipoová kyselina působí jako redukční činidlo a redukuje např. GSSG na GSH, dehydroaskorbát na askorbát nebo α -tokoferylradikál na α -tokoferol (Stratil a Kubáň 2018).

Glutathion, který byl již zmíněn výše v souvislosti s glutathionperoxidázou, je velmi významným redoxním pufrem. Existuje v redukované formě (GSH) a v oxidované formě – dvě molekuly glutathionu tvoří glutathionsulfid (GSSG). Jeho úlohou je regenerovat askorbát a tokoferol a udržovat v buňce redukované prostředí. Jak již bylo zmíněno, glutathion je substrátem pro glutathionperoxidázy, pomocí nichž je schopen odstraňovat volné radikály (Štípek 2000; Racek a Holeček 1999).

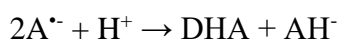
Ubichinon (koenzym Q) je znám především pro svoji přítomnost v mitochondriích, kde funguje jako elektronový přenašeč v elektronovém transportním řetězci. Působí však i v jiných membránách, kde dokáže regenerovat tokoferol, který ochraňuje lipidy v membránách proti oxidaci (Stratil a Kubáň 2018; Štípek 2000).



Močová kyselina (urát) je konečným produktem metabolismu purinů, které převážně pocházejí z nukleových kyselin. Urát je hojně obsažen v tělních tekutinách, kde má významnou antioxidační funkci. Zneškodňuje ROO^{\bullet} , HO^{\bullet} , OONO^- či HClO . Dokáže navázat železo a měď, a zabránit tak jejich reakci s volnými radikály. Při reakci s HO^{\bullet} může být generován urátový

radikál, který může být škodlivý prostřednictvím inhibice určitých enzymů (Stratil a Kubáň 2018; Štípek 2000).

Askorbová kyselina (vitamin C, askorbát) je velmi důležitou látkou, přijímanou v potravě, hrající roli v mnoha enzymových reakcích jako kofaktor či kosubstrát. Je také velmi důležitým redukčním činidlem. Dokáže redukovat železo a měď, což se uplatňuje např. při vstřebávání železa v tenkém střevě. Askorbát dokáže redukovat spoustu typů RONS (HO^\bullet , O_2^\bullet , NO_2^\bullet či HClO). V redukčních reakcích se sám oxiduje, ztrácí elektron a vzniká dehydroaskorbát nebo askorbylový radikál, který obsahuje nepárový elektron ve vysoce delokalizovaném π -systému, takže je mnohem méně reaktivní, než je u radikálů běžné. Askorbyl (2A^\bullet) se dokáže snadno regenerovat za tvorby jedné molekuly redukovaného askorbátu (AH^-) a jedné molekuly dehydroaskorbátu (DHA).



Dehydroaskorbát je následně regenerován za účasti GSH, pouze však intercelulárním prostorem. V extracelulárním prostoru se dehydroaskorbát může hromadit. Askorbát má výrazně nižší jednoelektronový redukční potenciál než ostatní antioxidanty, dokáže je tedy regenerovat jejich redukcí – např. močovinu, tokoferol, vitamin E (Stratil a Kubáň 2018; Štípek 2000).

Vitamin E (tokoferol) je významný v ochraně biomembrán díky své lipofilní povaze. Nejsilnějším antioxidantem je ze skupiny tokoferolů **α -tokoferol**. Přeměňuje alkylperoxidové radikály (LOO^\bullet) na hydroperoxydy dříve, než stačí reagovat s dalšími mastnými kyselinami či proteiny membrán. Tokoferol se sám mění na tokoferolový radikál, který musí být regenerován. Děje se tak např. za účasti askorbátu, urátu či glutathionu (Stratil a Kubáň 2018; Štípek 2000).

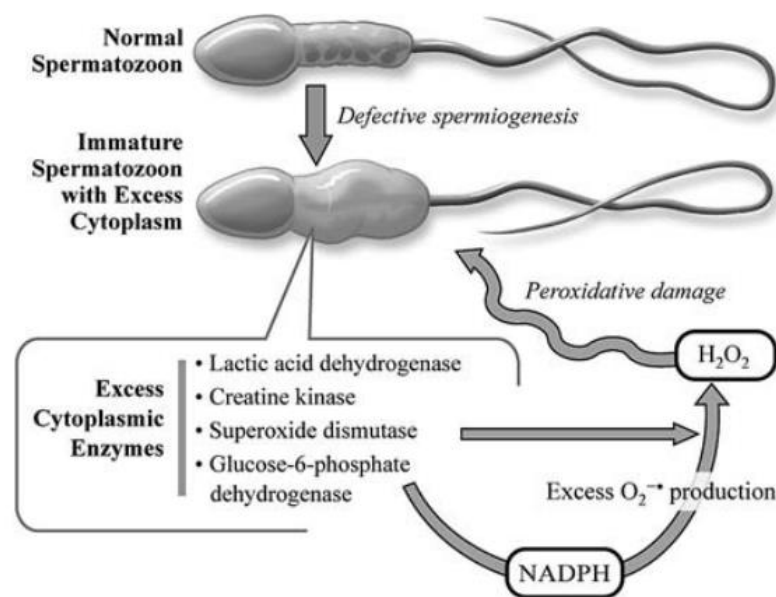
3. Volné radikály a antioxidanty a jejich role ve spermatogenezi a oplození

3.1. Zdroje ROS v semenné plazmě

Nejfrekventovanějším z volných radikálů v savčím spermatu je superoxidový anion (O_2^\bullet), který funguje jako prekursor pro další formy ROS (viz kapitola 2.1.), např. hydroxylový radikál nebo peroxyinitrit. Významným zdrojem superoxidového aniontu je opět mitochondriální elektronový transportní řetězec. Spermie jsou známy pro vysoký obsah mitochondrií z důvodu velké spotřeby ATP, která je využita pro pohyb spermie (Griveau a Le Lannou 1997). Nejvyšší hladiny ROS byly naměřeny u dozrávajících spermií s abnormální morfologií. Bylo také prokázáno, že přítomnost těchto spermií může mít vliv na poškození již zralých spermií nebo

dokonce epitelu semenotvorných kanálků, což může být jedním z důvodů neplodnosti (Gil-Guzman et al. 2001). Nedo zralé spermie jsou charakteristické zadržováním reziduální cytoplazmy, která obsahuje více mitochondrií stejně jako větší množství NADPH oxidáz, čímž dochází ke zvýšené produkci ROS (Rengan et al. 2012). Said et al. (2005) ve svých studiích prokázali negativní korelaci mezi produkcí ROS a počtem zdravých spermií s neporušenou morfologií. Ve stejné studii byla prokázána pozitivní korelace mezi produkcí ROS a počtem spermií s různými morfologickými odchylkami (reziduální cytoplazma, deformace hlavičky nebo krčku apod.).

Semenná plazma obsahuje velké množství leukocytů. Tyto leukocyty jsou zde největšími producenty ROS (viz kapitola 2.2.2.). Již bylo zmíněno, že určité typy leukocytů v reakci na infekci, zánět či přítomnost cizorodých látek produkují ROS. V semenné plazmě k těmto leukocytům patří hlavně granulocyty a makrofágy. Pokud je hladina těchto leukocytů udržována v normě ($1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$; dle údajů WHO), spermie nejsou nijak poškozovány, neboť je hladina ROS v rovnováze s antioxidačními systémy (viz kapitola 2.4.). Lobascio et al. (2015) prokázali pozitivní korelaci mezi zvýšeným počtem leukocytů (a tím i zvýšenou hladinou ROS) a počtem spermií s poškozenou DNA. Dále prokázali, že zvýšený počet leukocytů snižuje pohyblivost a koncentraci spermií v semenné plazmě. Mupfiga et al. (2013) prokázali, že leukocytospermické (se zvýšenou hladinou leukocytů) vzorky ejakulátu měly nejen vyšší obsah ROS, ale byla také zaznamenána vysoká aktivita kaspáz, což vede k fragmentaci DNA a apoptóze buněk.



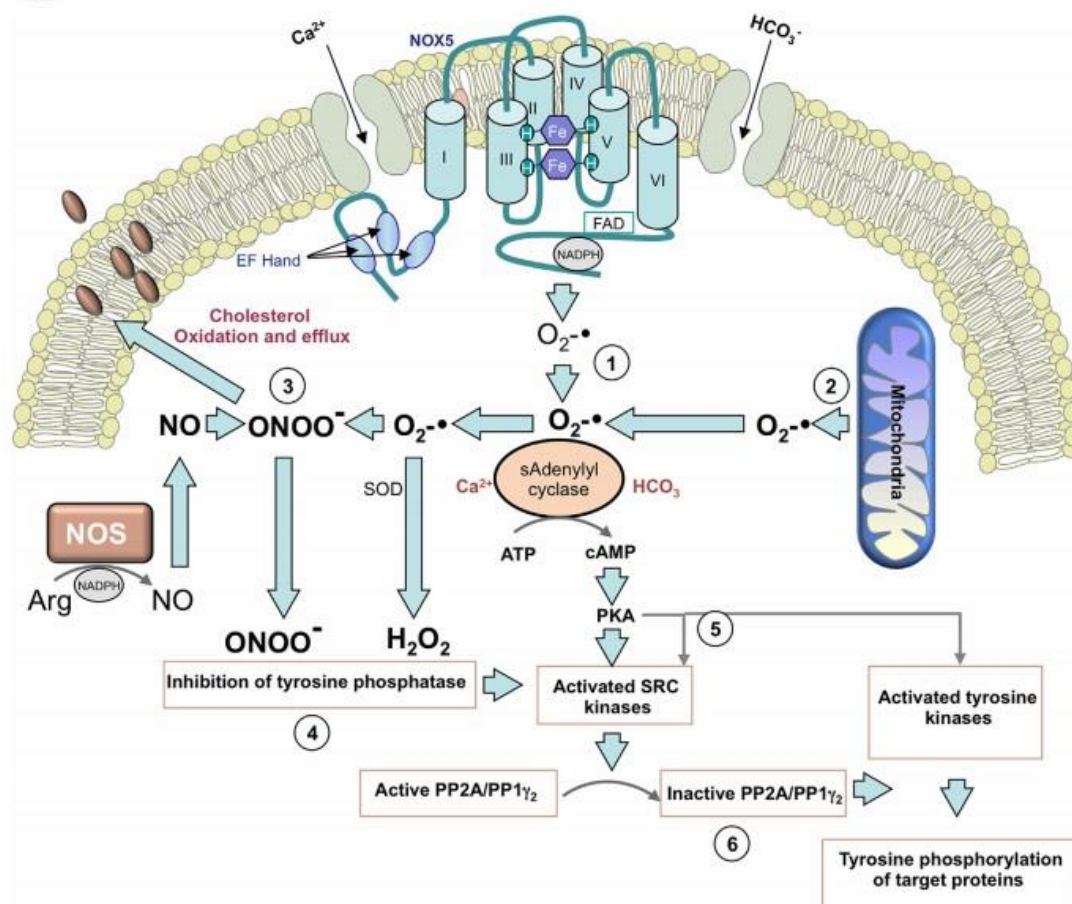
Obr. 3: Produkce ROS a mechanismus poškození vlivem ROS ve spermiích s abnormální morfologií (Agarwal et al. 2008)

Ke zvyšování hladiny ROS v semenné plazmě přispívají i další vnější faktory vyplývající ze životního stylu jedince. U člověka hraje velkou roli konzumace alkoholu. Talebi et al. (2011) ve své studii prokázali, že konzumace alkoholu způsobuje větší míru chromatinových abnormalit u spermií a snižuje celkovou pohyblivost spermií. Problém vzniká i při samotném rozkladu ethanolu, jehož produktem NADPH. Nárůst hladiny NADPH zvyšuje aktivitu mitochondriálního elektronového transportního řetězce, a tím se zvyšuje i riziko vzniku ROS. U jedinců konzumujících alkohol nadměrné míře byla také prokázána velice nízká hladina antioxidantů. Dále byl zaznamenán pokles testosteronu pravděpodobně z důvodu poškození tkáně Leydigových buněk, které se podílejí na jejich syntéze a sekreci, a Sertoliniho buněk, které působí jako podpůrné buňky (Maneesh et al. 2006). Dalším faktorem zvýšení tvorby ROS a zároveň snížení antioxidantů je kouření, které mimo jiné také snižuje pohyblivost spermií či může narušit jejich morfologii. Byl také prokázán zvýšený obsah leukocytů v semenné plazmě, neboť imunita reaguje na škodlivé metabolity zánětlivou reakcí (Saleh et al. 2002).

3.2. Fyziologické funkce ROS a antioxidantů ve spermatogenezi a oplození

Dříve byly ROS považované pouze za škodlivé vůči spermiím. Pozdější studie ukázaly, že správná hladina ROS může mít mnoho fyziologických funkcí. Již v roce 1989 Aitken et al. ve svých experimentech objevili, že spermie využívají jisté množství ROS k navázání na zonu pellucidu vajíčka. Zjistili, že tato reakce je vratná pomocí vitamínu E, který je známým antioxidantem.

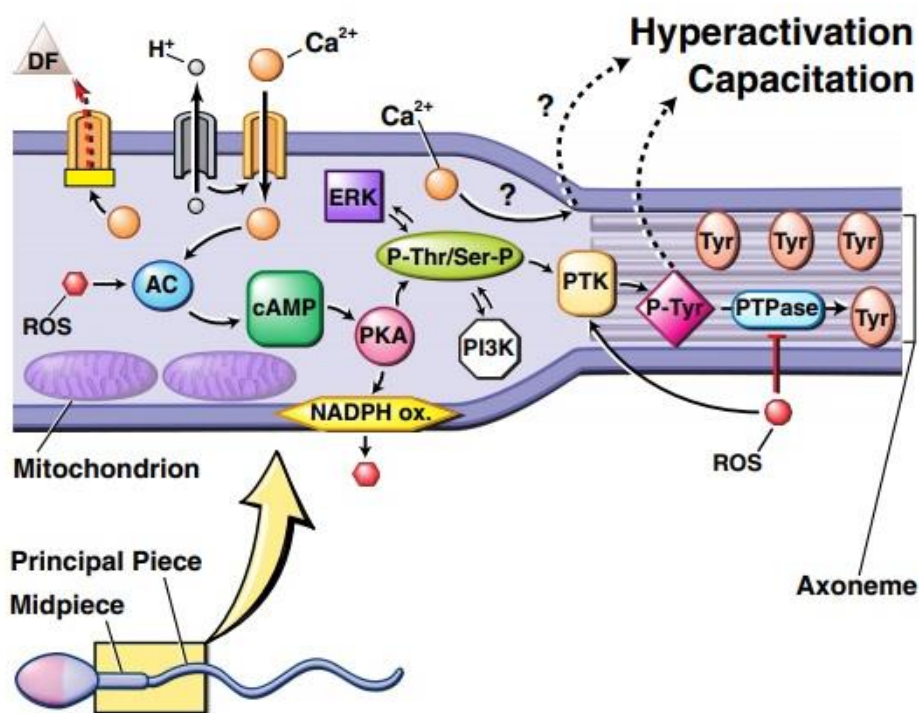
Později bylo zjištěno mnohem více reakcí, ve kterých hrají ROS důležitou roli. Například v uspořádání chromatinu spermií, které přispívá k jeho ochraně před poškozením. Histony typické pro somatické buňky jsou zde nahrazeny nízkomolekulárními nukleárními proteiny – protaminy – které jsou navázané přímo na nukleové kyseliny. Thiolové skupiny, které jsou součástí těchto proteinů, se oxidují a jednotlivé proteiny mezi sebou tvoří disulfidové můstky (Saowaros a Panyim 1979). ROS přispívají k vytváření disulfidových můstků tím, že působí jako oxidační činidlo thiolových skupin. Bylo taktéž prokázáno, že v cytoplazmě oocytu se nachází např. glutathion, který, jak již bylo zmíněno v kapitole 2.4., působí jako antioxidant a rozrušuje disulfidové můstky za účelem rozvolnění chromatinu (Rousseaux a Rousseaux-Prevost 1995).



Obr. 4: Schéma redoxních reakcí doprovázejících kapacitaci spermii. Membrána spermie je hyperpolarizována zvýšením koncentrace vápenatých iontů (Ca^{2+}) a hydrogenuhličitanových anionů (HCO_3^-), které spolu se superoxidovými aniony ($\text{O}_2^{\bullet-}$), vznikajícími činností mitochondrií a NADPH oxidáz (NOX), aktivují enzym adenylátcyklázu. Dále je pomocí cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) aktivována proteinkináza A (PKA). Následně jsou aktivovány proteinové tyrosinkinázy (PTK) a zároveň prostřednictvím peroxynitrátu a hydrogenperoxidu inhibovány proteinové tyrosinfosfatázy. Výsledkem je tyrosinová fosforylace proteinů (Aitken 2017).

ROS jsou také důležité při chemických reakcích doprovázejících kapacitaci spermii (viz. obr. 4 a 5) Ke kapacitaci spermii dochází až v reprodukčních orgánech ženy. Kapacitace zajistí spermii vyšší motilitu (tj. hyperaktivace) a buněčnou odpověď na chemotaktické signály. Kapacitaci způsobují chemické změny uvnitř spermie. Iničiační reakcí je vylučování cholesterolu obsaženého v membráně, tudíž se membrána stává pružnější pro průnik přes stěnu oocyty. Dojde k otevření iontových kanálů a uvnitř buňky vzrůstá koncentrace Ca^+ a HCO_3^- a dochází k hyperpolarizaci membrány. Vzrůst HCO_3^- v buňce přispívá ke zvýšení pH a vytváří tím vhodné prostředí pro vznik ROS. Bylo prokázáno, že při zamezení proudění HCO_3^- do buňky je zablokována tvorba ROS. ROS jsou společně s Ca^{2+} důležité pro aktivaci adenylátcyklázy (AC), konkrétně $\text{O}_2^{\bullet-}$ oxiduje její thiolovou skupinu. Následně dochází ke

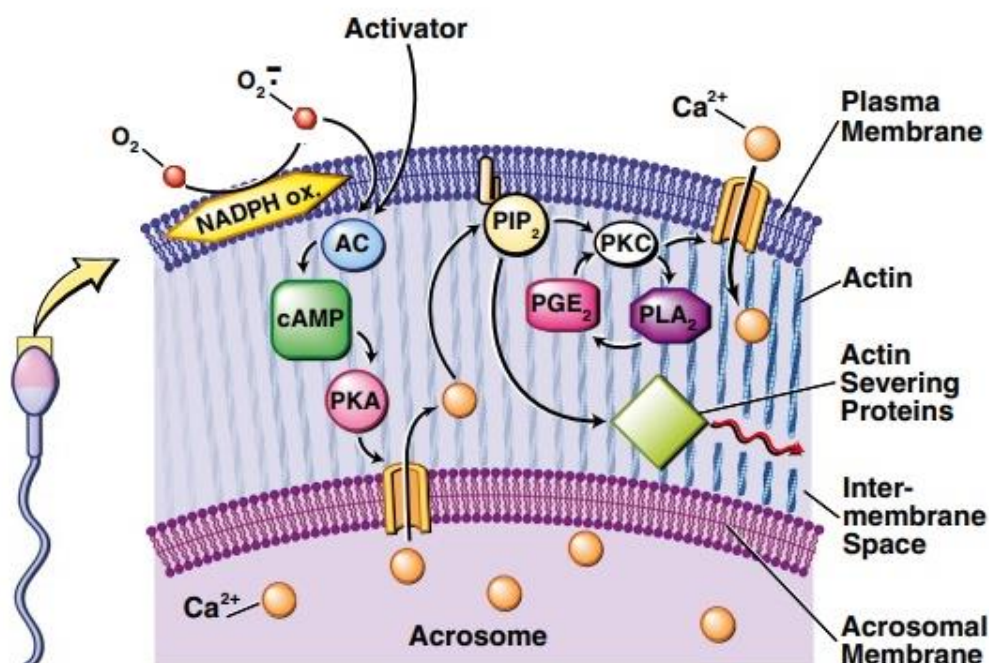
zvýšení koncentrace cAMP, který aktivuje proteinkinázu A (PKA). Výsledkem je fosforylace tyrosinových řetězců určitých proteinů, které jsou součástí obalu cytoskeletu bičíku (axonema) pomocí proteinové tyrosinfosfatázy (PTK), což způsobuje hyperaktivaci spermie (viz obr. 4; Aitken et al. 1998; Visconti et al. 2002). De Lamirande a Gagnon (1995) otestovali důležitost $O_2^{\cdot-}$ při kapacitaci spermii tak, že do inkubačního média přidali SOD a zablokovali tím vznik $O_2^{\cdot-}$. Blokováním $O_2^{\cdot-}$ nedochází k hyperaktivaci a přidáním SOD k již hyperaktivovaným spermii může být hyperaktivace dokonce přerušena. Aitken et al. (1995) potvrdili, že především H_2O_2 stimuluje fosforylaci tyrosinu aktivací proteinové tyrosinkinázy (PTK) a zároveň inhibicí proteinové tyrosinfosfatázy (PTPase), a tím se významně podílí na procesu kapacitace spermii. Ve stejné studii také dokázali, že přítomnost katalázy, rozkládající H_2O_2 , naopak inhibuje fosforylaci tyrosinu. Bylo prokázáno, že bez přítomnosti $O_2^{\cdot-}$ ke kapacitaci spermii nedochází. ROS se také podílí na oxidaci cholesterolu, který je následně odstraněn z membrán (Boerke et al. 2013). NO^{\cdot} pozitivně ovlivňuje hyperaktivaci spermii. Bylo zjištěno, že přítomnost inhibitorů NO^{\cdot} naopak samotnou hyperaktivaci inhibuje (Yeoman et al. 1998).



Obr. 5: Schéma regulace kapacitace a hyperaktivace spermii. Vápenaté ionty (Ca^{2+}) spolu s ROS aktivují adenylátcyklázu (AC). Cyklický adenosinmonofosfát aktivuje proteinkinázu A (PKA). Následně proběhne fosforylace threoninu a serinu (P-Thr/Ser-P) a aktivace proteinové tyrosinkinázy (PTK). Zároveň je prostřednictvím ROS inhibována proteinová tyrosinfosfatáza (PTPase). Výsledkem je fosforylace tyrosinu (P-Tyr) v proteinech cytoskeletu bičíku (Du Plessis et al. 2015).

Následuje akrosomová reakce, která bez předcházející kapacitace spermií nemůže proběhnout. Akrosomová reakce je zahájena kontaktem spermie se zónou pellucidou. Reakce je zahájena v místě na hlavičce spermie, které se nazývá akrosom. Akrosom je buněčná organela, která má původ v Golgiho aparátu a obsahuje proteolytické enzymy, které umožní průnik spermie do vajíčka (Kittnar et al. 2020). Cytoplazmatická membrána je propojena s oocytem díky ZP3 ligandu (zona pellucida sperm-binding protein 3), který je součástí zóny pellucidy. Akrosom následně exocytózou vylučuje enzymy akrosin a hyaluronidázu. Ichikawa et al. (1999) ve své studii prokázali, že nižší neškodné hladiny ROS mají pozitivní vliv na průběh akrosomální reakce, naproti tomu vyšší hladiny ROS měly inhibiční efekt. Později bylo zjištěno, že ROS stimulují aktivaci enzymu fosfolipáza A2 (PLA₂), který je důležitý pro degradaci spermatické membrány katalýzou mastných kyselin. Zvýší se fluidita spermatické membrány, což je velmi důležité pro následující fúzi s membránou oocytu (Griveau et al. 1995). ROS opět přispívají i v dalších krocích aktivační kaskády fosfolipázy A2; stimulují například aktivitu proteinkinázy C (PKC), která se podílí na aktivaci fosfolipázy A2 (Gopalakrishna et al. 2013). Jak již bylo zmíněno, ROS inhibují proteinové tyrosinfosfatázy, čímž udržují fosfolipázu A2 aktivní (viz obr. 6).

Acrosome Reaction



Obr. č. 6: Schéma regulace akrosomové reakce spermií. Akrosomová reakce začíná zvýšením Ca^{2+} , což způsobí štěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP_2) a následnou aktivaci proteinkinázy C (PKC), což způsobí další nárůst koncentrace Ca^{2+} . Je aktivována fosfolipáza A2 (PLA₂), která degraduje spermatickou membránu katalýzou mastných kyselin (Du Plessis et al. 2015).

3.3. Negativní vliv oxidačního stresu na spermatogenezi a oplození

Jako pro každou jinou buňku, je i pro spermie důležitá iontová rovnováha, aby se spermie správně vyvinuly a byly schopné oplození. Narušení této rovnováhy vede k oxidačnímu stresu, který má za následky různá poškození spermie, které mohou vést až k neplodnosti. Neplodnost je dnes globálním problémem společnosti. Podle WHO jsou za neplodné považovány páry, které nejsou schopni počít potomka po 12 měsících pravidelného nechráněného pohlavního styku. Z dat vyplývá, že se celosvětově jedná přibližně o 15 % párů, přičemž ve 20–30 % případů jsou za čistě neplodné považováni muži. Snížená schopnost oplodnění u mužů může vést k neschopnosti početí potomka až v 50 % případů (Agarwal et al. 2015). Podle mnoha opakovaných výzkumů bylo zjištěno, že neplodnost silně koreluje se zvýšenou hladinou ROS (Agarwal et al. 2006).

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, nízké hladiny ROS jsou velmi důležité pro správný vývoj spermií, kapacitaci, akrosomovou reakci apod. Nicméně zvýšená hladina ROS, při které antioxidanty nestačí oxidované formy neutralizovat, může vést k poškození DNA v jádře či v mitochondrii, což má za následek další buněčné defekty (Sawyer et al. 2003). Zranitelnost spermií vůči ROS také vyplývá z obsahu polynenasycených mastných kyselin (PUFA) v membránách, které jsou na poškození ROS velmi citlivé (viz kapitola 2.3), což následně může mít vliv na celou buňku (Koppers et al. 2008).

Peroxidace lipidů vlivem zvýšené hladiny ROS má vliv na plazmatickou membránu spermie, která je charakteristická pro vysoký obsah lipidů. Reakce začíná vytržením atomu vodíku z nenasycené mastné kyseliny a následnou reakcí s kyslíkem vznikne peroxylový radikál, který atakuje sousední mastné kyseliny, a tak se reakce řetězově šíří po celé plazmatické membráně. Jejich oxidací se mění vlastnosti membrány, především se snižuje její fluidita a zvyšuje propustnost pro ionty, které se hromadí uvnitř buňky (Wong-Ekkabut et al. 2007). Tato skutečnost může značně zkomplikovat oplození vajíčka nemožností fúze spermie a oocyty (Potts et al. 2000).

Poškození DNA spermie je jedním z nejzávažnějších příčin neplodnosti. Může vést ke ztrátě funkce určitých proteinů kódovaných v poškozené DNA, a tím narušit morfologii a funkčnost spermie. Významnou roli hraje opět peroxidace lipidů, při které vznikají elektrofilní aldehydy např. malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE) či akrolein, které dokážou zapříčinit výrazné poškození DNA. 4-HNE a akrolein napadají hlavně mitochondrie a způsobí tím únik superoxidových anionů, a tím se oxidační stres ještě více zvýší. Naruší se tak

mitochondriální membránový potenciál a může dojít až k apoptóze buňky prostřednictvím aktivace příslušných kaspáz (Aitken et al. 2012). Prostřednictvím ROS mohou být báze DNA oxidované, čímž mohou vznikat různé jednořetězcové či dvouřetězcové zlomy DNA. Významným znakem poškozené DNA je tvorba 8-oxoguaninu, jehož přítomnost je zároveň spojována s poškozenou morfologií a motilitou spermií a nízkou koncentrací spermií v semenné plazmě (Guz et al. 2013). Ještě více nebezpečné jsou pro buňku mutace v mitochondriální DNA (mtDNA), neboť v mitochondriích probíhá velmi důležitá tvorba ATP oxidační fosforylací, kódována právě mtDNA a jakákoliv mutace může tento proces narušit. Jak již bylo zmíněno, narušení elektronového transportního řetězce vede k úniku ROS, které mohou v buňce způsobit další defekty (peroxidaci lipidů, poškození jaderné DNA atd.) a nedostatek produkce ATP snižuje motilitu spermií (Feng et al. 2008). Poškození DNA je závažným problémem, který snižuje úspěšnost mnoha metod umělého oplodnění, neboť embryo s narušeným DNA se nemůže vyvíjet a dochází k potratu (Simon et al. 2013).

ROS mají schopnost modifikovat proteiny neenzymatickými redoxními reakcemi. Tyto modifikace mohou zapříčinit změny konformace proteinů, od kterých se odvíjí např. nefunkčnost enzymů nebo chyby v interakcích proteinů. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, některé změny proteinů jsou nutné ke kapacitaci a zvýšené motilitě spermií (hyperaktivace). Pro nastartování těchto změn je nutná omezená hladina ROS. Pokud je hladina ROS zvýšena, může dojít k nežádoucím proteinovým modifikacím, které mohou vést k poškození funkčnosti spermie a celkové neplodnosti. Velmi citlivé na oxidaci jsou thiolové skupiny (-SH), které po oxidaci tvoří disulfidové můstky (-SS-), čímž se mohou měnit vlastnosti proteinu. ROS tak mohou zasáhnout do průběhu různých reakcí a přerušit je. Příkladem může být enzym glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, který působí jako klíčový enzym v glykolýze. Tento enzym může být deaktivován právě oxidací thiolové skupiny vlivem ROS; glykolýza a další na ni navazující děje (Krebsův cyklus, oxidační fosforylace) jsou pozastaveny, což se v buňce projeví poklesem ATP, který koreluje se sníženou motilitou spermií (De Lamirande et al. 1992; Elkina et al. 2011). Oxidace thiolových skupin je ve správné míře nutná u protaminů, které zajišťují správnou strukturu spermatického chromatinu. Redukce či nadměrná oxidace tuto strukturu narušuje a může dojít k následnému poškození DNA (Zini et al. 2001). Další významnou modifikací je nitrace tyrosinu, způsobená NO^{\bullet} nebo OONO^{\bullet} , která taktéž mění funkčnost proteinu. Problém opět nastává u enzymů glykolýzy (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, enoláza) a Krebsova cyklu (akonitáza, malátdehydrogenáza apod.), což má opět vliv na pokles ATP a motility spermií (Vignini et al. 2006). Bylo zjištěno, že nitrací

může být modifikován i α -tubulin v bičíku, což má opět negativní vliv na motilitu spermie (Landino et al. 2004).

Závěrem k této kapitole shrnuji, jaké konkrétní defekty, mající vliv na plodnost, mohou u spermii vzniknout důsledkem výše uvedených negativních vlivů ROS. Nejzávažnější poruchou, která brání úspěšnému oplození, je abnormální morfologie u spermii (teratozoospermie). Spermie, u kterých se vyskytly defekty v oblasti hlavičky či krčku, měly zároveň i zvýšenou produkci ROS (Aziz et al. 2004). Mechanismus těchto defektů dosud nebyl zcela objasněn. Nejběžnější poruchou je nízká koncentrace spermii v ejakulátu (oligozoospermie), na což může mít vliv apoptóza spermii v důsledku zvýšené hladiny ROS. Kaspázy zajišťující apoptózu jsou spuštěny přítomností peroxidovaných lipidů (MDA, 4-HNE) nebo poškozením mitochondrií, které uvolňují nadměrné množství ROS (viz výše; Aitken et al. 2012). Dalším problémem je astenozoospermie, neboli snížená motilita spermii. Hyperaktivace neboli zvýšení motility spermii je na přítomnosti ROS závislé, neboť ROS jsou důležité pro fosforylaci tyrosinu proteinů cytoskeletu bičíku (viz výše). Pro motilitu je důležité také ATP vznikající jako produkt oxidační fosforylace v mitochondriích, proto narušení struktury mitochondrie a elektronového transportního řetězce má pro spermie fatální důsledky (Amaral et al. 2007). Změna fluidity membrány vlivem peroxidace membránových lipidů (viz výše) má negativní vliv na fúzi membrány spermie a vajíčka (Potts et al. 2000). Vůbec neproblematičtější je poškození DNA vlivem oxidačního stresu. Poškození DNA má běžně negativní vliv na oplození a v tomto případě nepomáhají ani metody umělého oplodnění, neboť embryo s poškozenou DNA se nemůže vyvinout (Simon et al. 2013).

V koncentraci volných radikálů a antioxidantů ve varlatech hraje podstatnou roli i věk, což bylo prokázáno ve studiích na myších. Myši jsou vhodným objektem studia změn podmínek v organismu s přibývajícím věkem, neboť jejich život je poměrně krátký a stárnutí rychlé. Ukázalo se, že s přibývajícím věkem ve varlatech klesá antioxidační aktivita enzymů, a naopak narůstá koncentrace markerů oxidačního stresu (Salomon et al. 2013). Uvažuje se, že narůstající oxidační stres vlivem stárnutí může mít vliv na funkci Leydigových buněk a snížit jejich produkci testosteronu (Luo et al. 2006)

4. Volné radikály a antioxidanty a jejich role v tvorbě folikulů, ovulačním a endometriálním cyklu a graviditě

4.1. Zdroje ROS ve vaječnicích a děloze

ROS jsou produkovány v mnoha částech reprodukční soustavy. Jejich hladinu do jisté míry ovlivňují gonadotropní hormony (folikulostimulační hormon, luteinizační hormon atd.). ROS přispívají nebo jsou podmínkou průběhu určitých chemických reakcí a fyziologických dějů, které představím v následující kapitole. Potenciální zdroji ROS jsou ve vaječnicích, folikulech a žlutém tělísku makrofágy a neutrofily (Loukides et al. 1990; Brännström et al. 1993). Proto bývá někdy mechanismus ovulace přirovnáván k zánětlivé reakci, i díky tomu, že se kromě ROS účastí i prostaglandiny a cytokiny (Espey 1980).

ROS jsou vedlejšími produkty metabolismu buněk, které tvoří steroidní hormony. V biosyntéze steroidních hormonů se zapojuje mitochondriální cytochrom P450, který je zodpovědný za oxidačně-redukční reakce. Zdrojem elektronů je kofaktor NADPH, přičemž případný únik těchto elektronů způsobí vznik superoxidového anionu a dalších ROS (Hanukoglu 2006). Únik elektronů z elektronového transportního řetězce a vznik superoxidových radikálů je i zde možný jako v každé jiné buňce. V ochraně granulózních buněk před superoxidovými radikály hraje velkou roli Mn-SOD. Příliš velká hladina ROS má na tvorbu steroidních hormonů inhibiční efekt (Sugino 2005). Velmi důležitý je obsah antioxidantů ve folikulární tekutině, obklopující oocyt ve folikulu, které eliminují ROS vyplavované právě granulózními buňkami, kde probíhá intenzivní syntéza steroidních hormonů, a leukocyty, které jsou ve folikulární tekutině přítomny. Většina antioxidantů ve folikulární tekutině je neenzymatického typu, např. vitaminy C a E, glutathion (GSH) nebo hypotaurin a taurin (Behrman et al. 2001).

4.2. Ovlivnění tvorby ROS hormony

ROS jsou úzce provázány s produkcí a funkcí různých hormonů v ženské reprodukční soustavě. U primordiálních folikulů, které nepokračují do ovulace, ROS snižují citlivost k folikulostimulačnímu hormonu, a tím zastaví jejich vývoj a následně způsobí atrezii těchto folikulů. Naopak folikulostimulační hormon stimuluje tvorbu glutathionu, a tím chrání antrální folikuly před oxidačním stresem (Tsai-Turton a Luderer 2006).

Velmi podobně působí hormon estradiol, který je produkován granulózními buňkami. Bylo prokázáno, že estradiol má antioxidační účinky, a brání tak vzniku oxidačního stresu a atrezii folikulů (Lund et al. 1999). Luteinizační hormon, který nastartuje samotnou ovulaci a

tvorbu žlutého tělíska, nepůsobí přímo na ROS a naopak. Na luteinizační hormon reagují granulocyty, které ROS produkují, především superoxidový anion (Shirai et al. 2002).

ROS jsou úzce provázány s produkcí progesteronu žlutým tělískem. Hladina ROS a produkce progesteronu spolu negativně korelují. Bylo prokázáno, že vysoká hladina ROS inhibuje produkci progesteronu prostřednictvím inhibice cytochromu c a dalších enzymů, které hrají v syntéze steroidních hormonů roli (Endo et al. 1993). Antioxidanty mají na produkci progesteronu opačný efekt, což má význam při graviditě, kdy antioxidanty udržují žluté tělísko aktivní a chrání ho před zánikem (Carlson et al. 1995).

4.3. Fyziologické role ROS a antioxidantů v tvorbě folikulů, ovulačním a endometriálním cyklu a graviditě

Podobně jako v reprodukční soustavě muže hráli ROS důležitou roli ve správném vývoji spermií a následně jejich kapacitaci a akrozomové reakci, i v ženské reprodukční soustavě je tvorba ROS esenciální pro spoustu důležitých dějů. Například se podílejí na vývoji folikulů a následně ovulaci. Hrají také velkou roli v metabolismu žlutého tělíska, řídí jeho vznik i luteolýzu. Správná hladina ROS a antioxidantů je také velmi důležitá v graviditě a načasování porodu.

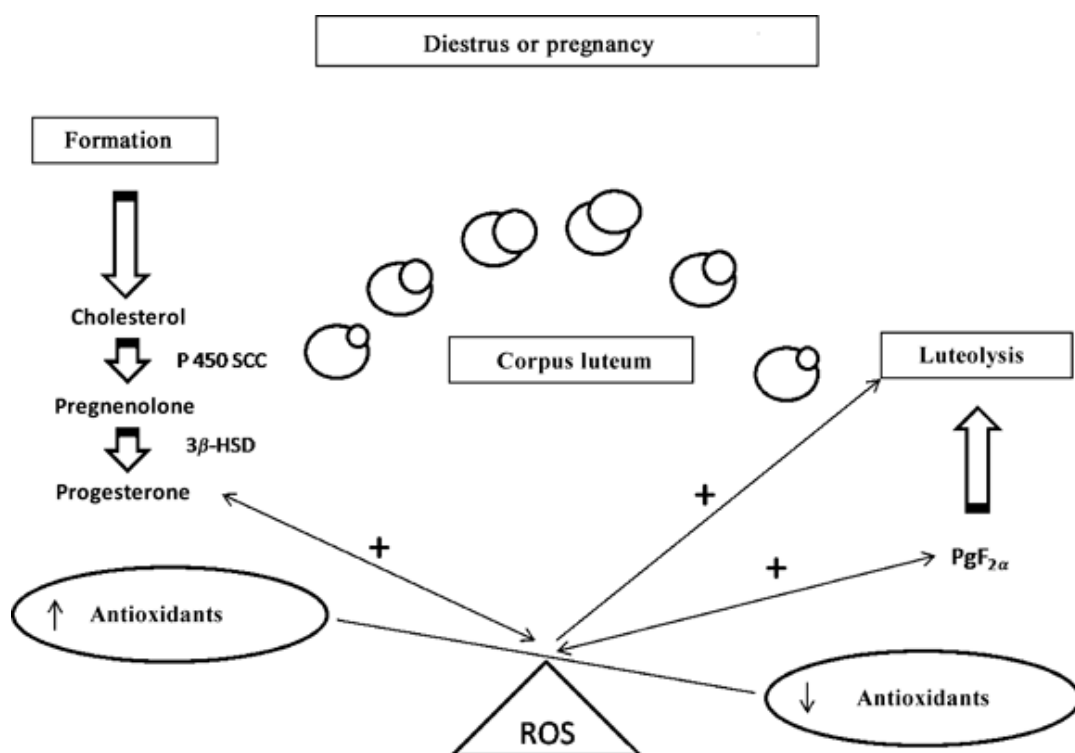
4.3.1. Role ROS a antioxidantů ve vývoji folikulů a ovulaci

Tvorba ROS začíná už v nezralých pre-ovulačních oocytech, u kterých je pozastavena meióza. Pro opětovné nastartování meiózy je třeba právě nárůst hladiny ROS. Do té doby blokuje pokračování meiózy antioxidanty (Takami et al. 1999). ROS, které pokračování meiózy nastartují, pocházejí z intenzivní syntézy steroidních hormonů granulózními buňkami. Následně během proliferační fáze menstruačního cyklu, které se také říká folikulární, probíhá další vývoj primordiálních folikulů a je vybráno jen několik málo dominantních folikulů, které pokračují do ovulační fáze menstruačního cyklu. Zbytek folikulů podstoupí atrézii neboli zánik, který je způsoben ztrátou citlivosti ke folikulostimulačnímu hormonu (FSH) vinou vysoké hladiny ROS. Granulózní buňky přestanou produkovat steroidní hormony, a naopak se zvýší produkce ROS a dojde k apoptóze folikulů. Pro vývoj folikulu jsou velmi důležité hladiny antioxidantů jako je SOD a glutathion, které ho chrání před zánikem (Tilly a Tilly 1995; Tsai-Turton a Luderer 2006). Atrézii folikulu také zabraňuje přítomnost kyseliny askorbové (vitamin C) v granulózních buňkách a její antioxidační aktivita (Behrman et al. 1996).

Ovulace bývá přirovnávána k zánětlivé reakci, neboť součástí tohoto procesu je nárůst prostaglandinů a cytokinů a účastní se proteolytické enzymy a ROS jako mediátory této reakce. Bylo prokázáno, že v přítomnosti vysokých hladin SOD dochází k narušení ovulace (Miyazaki et al. 1991). ROS jsou pravděpodobně zodpovědné za prasknutí folikulu, ačkoliv mechanismus této reakce nebyl ještě zcela objasněn. Předpokládá se, že ROS indukují produkci prostaglandinů a aktivaci proteolytických enzymů (Sugino et al. 2001). Zdroje ROS se nachází v samotném folikulu, mohou jimi být leukocyty a endoteliální buňky (Loukides et al. 1990). Bylo dokonce prokázáno, že granulocyty obsahují receptory pro luteinizační hormon, který stimuluje produkci superoxidových aniontů nutnou pro nastartování ovulace (Shirai et al. 2002). Endoteliální buňky tvoří superoxidové radikály prostřednictvím xantinoxidázy. Důležitost xantinoxidázy v endoteliálních cévách bylo dokázáno přidáním jejího inhibitoru, allopurinolu, který následně inhiboval celou ovulaci (Miyazaki et al. 1989). Důležitá je také měnící se hladina SOD během ovulace. SOD musí být dostatečné množství, aby nevznikl takový oxidační stres, který by oocyt mohl poškodit. Produkce SOD byla prokázána v kumulárních buňkách, které k oocytu těsně přiléhají a dále ve folikulární tekutině, která oocyt též obklopuje (Matos et al. 2009).

Po tom, co Graafův folikul praská a oocyt se uvolňuje a pokračuje do vejcovodu, vzniká žluté tělísko, které produkuje hormon progesteron a estradiol. Vlivem progesteronu se mění hladina jak ROS, tak i antioxidačně působících SOD. V luteální fázi jsou hladiny ROS nízké, za což jsou zodpovědné především zvýšené hladiny Cu,Zn-SOD, vitamínu C a karotenoidů. Žluté tělísko tak zůstává aktivní (Peltier et al. 2006). Pokles aktivity SOD, a naopak nárůst hladiny ROS má luteolytický efekt. Sugino et al. (1999) prokázal, že superoxidové radikály inhibují produkci progesteronu luteálními buňkami. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ stimuluje produkci ROS nejen v luteálních buňkách, ale i ve fagocytech, čímž přispívá k inhibici produkce progesteronu (Tanaka et al. 2000). Prostaglandin $F_{2\alpha}$ je považován za velmi důležitý faktor způsobující zvýšení hladiny ROS. Naopak ROS dokážou aktivovat fosfolipázu A2 a expresi cyclooxygenázy-2, což jsou klíčové enzymy při syntéze prostaglandin $F_{2\alpha}$. ROS a prostaglandin $F_{2\alpha}$ jsou vzájemně provázány a vzájemně se ovlivňují (Nakamura a Sakamoto 2001). Luteolýzu také doprovází pokles krevního průtoku, což aktivuje xantin-xantinoxidázový systém, který tvoří velké množství ROS a způsobuje defekty tkání (Sugino et al. 1993). Makrofágy produkují jak ROS, tak i cytokiny (faktor nádorové nekrózy α , interleukiny). Obojí přispívá k inhibici tvorby progesteronu a luteolýze (Bagavandoss et al. 1989; Telleria et al. 1998; Sugino et al. 1996a). Luteolýza zahrnuje apoptický zánik buněk žlutého tělíska, který je způsoben vysokou

hladinou ROS a zároveň nízkou hladinou Cu,Zn-SOD (viz obr. 7; Nakamura a Sakamoto 2001). K apoptóze dochází rozpadem mitochondrií vlivem ROS a uvolněním cytochromu c do cytoplazmy, kde aktivuje příslušné kaspázy zodpovědné za nastartování řízené apoptózy (Cai a Jones 1998). K luteolýze neboli rozpadu žlutého tělíska dochází pouze pokud nedojde ke graviditě. Když žluté tělísko zanikne, dojde k poklesu progesteronu, což je důležitý signál, že ke graviditě nedošlo a je stimulován vývoj dalších folikulů a tělo se připravuje na další ovulaci (Kittnar et al. 2020).



Obr. 7: Role ROS v regulaci žlutého tělíska. Syntéza progesteronu je doprovázena generací ROS. Během tvorby žlutého tělíska jsou hladiny antioxidantů vyšší a aktivita ROS naopak klesá. Při luteolýze nastává opačná situace – hladina antioxidantů se snižuje a za působení prostaglandinu F_{2α} (PgF_{2α}) a zánětlivých faktorů vzrůstá aktivita ROS (Rizzo et al. 2012).

Pokud ale dojde ke graviditě, je nutné, aby žluté tělísko nezaniklo a dále produkovalo progesteron. Je tedy nutné zabránit zvýšení hladiny ROS, které inhibují produkci progesteronu a následně zapříčiní rozpad žlutého tělíska. Již bylo zmíněno, že v ovlivnění hladiny ROS hrají roli Cu,Zn-SOD. V případě gravidity je exprese Cu,Zn-SOD stimulována přítomností humánního choriogonadotropinu (hCG), který produkují buňky trofoblastu s dalšími placentárními hormony (Sugino et al. 2000; Takiguchi et al. 2000). Vyšší hladina Cu,Zn SOD tedy udržuje žluté tělísko funkční a progesteron je dále produkován. Vedle cytosolové Cu,Zn-SOD žluté tělísko produkuje i mitochondriální Mn-SOD. Bylo zjištěno, že na rozdíl od Cu,Zn-SOD, které při regresi žlutého tělíska klesají, Mn-SOD naopak narůstá. Jako vysvětlení se nabízí indukce exprese Mn-SOD zánětlivou reakcí nebo přítomností cytokinů (Warner et al. 1996). V regresní fázi se zvýší počet makrofágů, které produkují cytokiny, což vysvětluje současný nárůst Mn-SOD (Brännström et al. 1994). Důležitými antioxidanty ve žlutém tělísku jsou β -karoten, vitamin C či vitamin E. β -karoten nejprve chrání vaječníky a dělohu před oxidačním poškozením, a poté udržuje vhodné prostředí pro vývoj embrya v těhotenství. Přítomnost vitaminu C doprovází vznik žlutého tělíska a jeho koncentrace klesají při luteolýze (Miszkiel et al.1999).

4.3.2. Role ROS a antioxidantů v endometriálním cyklu

Ovulační cyklus doprovází ještě endometriální neboli děložní cyklus, kdy se mění povrchová vrstva děložní sliznice (endometrium) vlivem ovariálních hormonů – estrogeny, progesteron (Kittnar et al. 2020). Progesteron stimuluje decidualizaci endometria, která je důležitá pro následnou implantaci embrya v případě gravidity. Pokud ke graviditě nedojde, žluté tělísko zaniká a produkce progesteronu poklesne, je to signál k nekróze a vyloučení endometria (Sugino et al. 2007).

Sugino et al. (1996b) prokázal, že decidualizaci endometria doprovázejí zvýšené hladiny Cu,Zn-SOD a Mn-SOD. Vyšší aktivita Cu,Zn-SOD a Mn-SOD v buňkách endometriálního stromatu byla prokázána od proliferační fáze do střední sekreční fáze. Dále byla aktivita těchto enzymů prokázána v rané fázi gravidity. Během decidualizace se ve stromálních buňkách zvýší metabolismus, což má za následek i zvýšení produkce superoxidového anionu mitochondriemi. Nárůst Mn-SOD je nutný, aby touto cestou nevznikl oxidační stres (Karube-Harada et al. 2001).

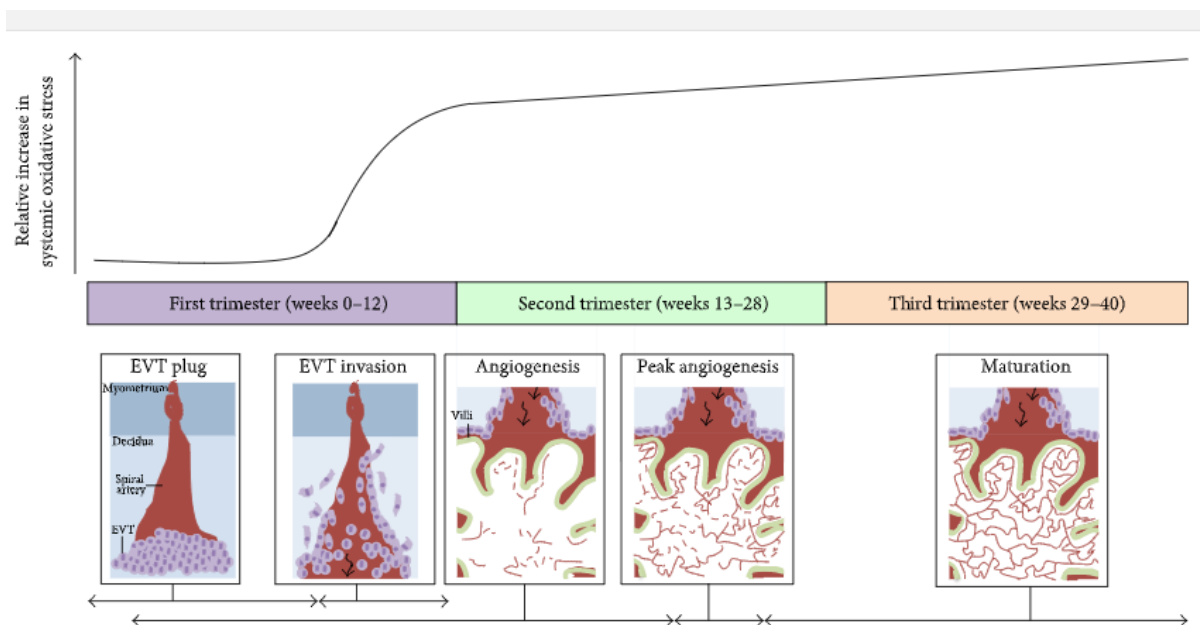
Sugino et al. (2004) prokázal, že ROS regulují menstruaci. Po poklesu Cu,Zn-SOD a Mn-SOD v pozdní sekreční fázi naopak vlivem poklesu progesteronu vzroste hladina ROS, které stimulují tvorbu prostaglandinu $F_{2\alpha}$. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ má vasokonstriční účinky, které způsobí

nekrózu povrchové vrstvy endometria, která se následně odlučuje menstruačním krvácením (Baird et al. 1996).

4.3.3. Role ROS a antioxidantů v graviditě a riziko potratu

Nebezpečí oxidačního stresu v graviditě pramení ze zvýšení intenzity metabolismu placenty. Do placenty se také dostává kyslík z krevního oběhu matky a v placentě tak vzniká gradient rozdílných parciálních tlaků (pO_2) mezi plodem a tělem matky. Během prvních 8 týdnů gravidity se plod nachází v hypoxickém prostředí, a až poté začne krev matky proudit do intervilózního prostoru. Následně se zahájením proudění mateřské krve do placenty proběhne reoxygenace. Kyslíkové napětí tedy velmi rychle vzroste na konci prvního trimestru. Tento nárůst je rovněž doprovázen nárůstem aktivity antioxidantních enzymů. Markerem oxidačního stresu je také přítomnost heat shock proteinu 70 (HSP 70), který je schopný před oxidačním stresem ochránit proteiny a DNA (Jauniaux et al. 2000).

Syntéza SOD trofoblastem je zahájena až po 11. týdnu gravidity (počátek druhého trimestru), do té doby prevence oxidačního stresu závisí pouze na primárně nízkých hladinách ROS a placentární antioxidantní ochraně. Proto je plod v raných stádiích gravidity (cca první trimestr) náchylný k oxidačnímu stresu (Watson et al. 1998). Pokud k oxidačnímu stresu dojde, například z důvodu předčasného proudění mateřské krve do placenty, kdy ještě není vytvořena dostatečná antioxidantní ochrana, může dojít ke spontánnímu potratu. Hempstock et al. (2003) srovnali přítomnost určitých markerů oxidačního stresu (heat shock protein 70, N-Tyr zbytky, peroxidované lipidy) u vzorku tkání získané z potracených plodů a u kontrolních vzorků. Nejvyšší míra oxidačního stresu byla zaznamenána u plodů, u kterých byl potrat prokázán po méně než 77 dnech gravidity, tedy v prvním trimestru. Oxidační stres způsobuje degeneraci syncytiotrofoblastu. Pokud je poškození tkáně rozsáhlé, může dojít k spontánnímu potratu. Když nedojde k většímu poškození, může se syncytiotrofoblast regenerovat prostřednictvím diferenciace cytotrofoblastických buněk a vytvořením nové vrstvy syncytiotrofoblastu. V tomto případě může dojít k tzv. zamlklému potratu, kdy plod odumírá, přestože placenta regeneruje a není spolu s odumřelým plodem vypuzena ven z těla. Většina potratů v raném stádiu gravidity je spojována s nedostatečnou placentární antioxidantní ochranou (Liu et al. 2006).



Obr. 8: Během prvního trimestru je hladina kyslíku velmi nízká. Je stimulována proliferace trofoblastu. Mateřská krev ještě neproudí do placenty, neboť jí v tom brání „zátká“ tvořená extravilózním trofoblastem. Zvýšení oxidačního stresu koresponduje s migrací extravilózního trofoblastu, „zátká“ se uvolní a dochází k tvorbě klků a angiogenezi. Krevní oběh matky začíná být propojován s plodem. (Periera et al. 2015)

ROS nemají v graviditě pouze negativní vliv, naopak působí jako signální molekuly a účastní se redoxních reakcí. Mají také vazodilatační účinky na placentu, např. u oxid dusnatého (NO^*) byly prokázány vasodilatační účinky (Myatt et al. 1991). Iniciují apoptózu rozpadem mitochondrií za uvolnění cytochromu c do cytosolu, kde aktivuje apoptické kaspázy (Cain et al. 2002). Apoptóza je důležitým jevem pro správný průběh embryogeneze a organogeneze (Pierce et al. 1991). Během implantace embrya je apoptóza zprostředkovaná makrofágy esenciální při remodelaci tkání (Abrahams et al. 2004). Makrofágy také plod produkci ROS a cytokinů chrání před případnými infekcemi nebo bakteriemi (Singh et al. 2005).

Velmi důležité ve vývoji placenty a plodu jsou právě signalizační účinky ROS. Již bylo zmíněno, že na počátku gravidity převládají hypoxické podmínky, které stimulují proliferaci trofoblastu, který je základem pro vznik placenty (viz obr. 8; Caniggia et al. 2000). Hypoxie také reguluje expresi placentárního růstového faktoru (PlGF) a vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), pocházející z trofoblastu, které zajišťují placentární angiogenezi. Na konci prvního trimestru dojde k nárůstu koncentrace ROS, což koresponduje s invází mimoklčového (extravilózního) trofoblastu a následnou angiogenezí (tvorba nových cév; viz obr. 8). Oxidační stres může způsobit nedostatečnou vaskularizaci a následné poškození až

zánik plodu, z důvodu nedostatečné výměny živin a odpadních látek mezi matčinou krví a plodem (Jauniaux et al. 2000; Pereira et al. 2015).

ROS hrají svou roli i při porodu, kdy narůstá syntéza cytokinů v myometriu a děložním čípku. Neutrofily a makrofágy migrují právě do těchto tkání, kde způsobí zánětlivou reakci, kterou doprovází tvorba především superoxidového anionu kombinací hypoxantinu s xantinovou oxidázou. Masumoto et al. (1990) prokázal, že superoxidový anion zapříčiní zvýšení intracelulárního Ca^{2+} v buňkách myometria, které je nutné pro myometriální kontrakci. Těsně před porodem klesá koncentrace progesteronu, a naopak estrogen narůstá. Estrogen podporuje generaci ROS svými prozánětlivými účinky. ROS a estrogen způsobují myometriální kontrakce a involuci dělohy, tj. zmenšení dělohy po porodu (Jenkin a Young 2004).

4.4. Patologie v ovulaci a graviditě spojené s vlivem ROS

Jak již bylo popsáno v předchozí kapitole, ROS působí v ženské reprodukční soustavě jako mediátory různých reakcí a fyziologických dějů. Vysoké hladiny ROS mohou ale naopak uškodit a mohou rozvinout různé patologie, které ovlivňují nejen funkčnost reprodukční soustavy, ale například i implantaci a vývoj embrya, neboť mohou zasáhnout do transkripce modifikací různých transkripčních faktorů či negativně ovlivnit genovou expresi. Oxidační stres může vyústit v různé nemoci a poruchy reprodukční soustavy, které mohou souviset s neplodností.

4.4.1. Negativní vliv ROS

Nevyrovnané hladiny ROS a antioxidantů ve folikulární tekutině mohou mít negativní vliv na dozrávání oocytů. Folikulární tekutina obsahuje různé typy leukocytů, které produkují ROS. Dále sem mohou unikat ROS z granulóznic buněk jako produkt metabolismu steroidních hormonů. Zvýšená hladina ROS ve folikulární tekutině může negativně ovlivnit i oplození *in vitro* (IVF; Attaran et al. 2000; Oyawoye et al. 2003). Borowiecka et al. (2012) srovnali hladinu peroxidace lipidů a dalších markerů oxidačního stresu u žen, kterým se podařilo pomocí IVF otěhotnět a žen, které neotěhotněly. U netěhotných žen byla zaznamenána dvojnásobně vyšší hladina markerů oxidačního stresu.

Během vývoje a zrání folikulů jsou v ochraně oocytů před oxidačním stresem důležité nejen antioxidanty obsažené ve folikulární tekutině, ale i bariéra tvořená buňkami *theca interna*, která chrání před průnikem ROS z krve do folikulu (Shiotani et al. 1991). Již bylo zmíněno, že určitá hladina ROS stimuluje dokončení meiózy a dozrávání oocytů. Pokud je ve folikulární

tekutině příliš vysoký obsah SOD, úspěšnost oplození klesá, neboť oocyty nedozrávají (Sabatini et al. 1999).

Hlavním zdrojem ROS v děloze a vaječnicích jsou leukocyty (Zeller et al. 1987). Oxidační stres v peritoneální tekutině může mít též závažné důsledky a může se rozvinout až v endometriózu (viz dále). Oxidační stres v souvislosti s endometriózou negativně ovlivňuje i motilitu spermií, což může způsobit neplodnost (Mansour et al. 2009).

Negativní vliv oxidačního stresu spočívá především v poškození DNA. Jeden z nejvýznamnějších produktů oxidace DNA je 8-oxoguanosin. Zvýšené hladiny 8-oxoguanosinu v granulóznicích a kumulárních buňkách negativně korelovaly s kvalitou oocytů a úspěšností oplození (Seino et al. 2002).

4.4.2. Syndrom polycystických ovárií

Syndrom polycystických ovárií (PCOS) spočívá v hyperandrogenismu (nadměrné vyplavování androgenů), narušení ovulačního a menstruačního cyklu a vzniku polycystických ovárií. Onemocnění často doprovází i problémy s akné, růst ochlupení na místech, která nejsou pro ženy obvyklá, zvýšení produktivity inzulínu atd. (Karadeniz et al. 2008). Nemoc je často spojována s obezitou, rezistencí buněk vůči inzulínu či vysokým tlakem. Často se vedle ní můžou rozvinout i poruchy kardiovaskulární soustavy či diabetes mellitus 2. typu (Hardiman et al. 2003; Setji et al. 2006).

Syndrom polycystických ovárií se vyznačuje mitochondriálními poruchami, které vedou k vysoké produkci ROS. Hyperglykemie indukuje zvýšení produkce ROS mononukleárními buňkami, které aktivují uvolňování TNF- α a nárůst zánětlivého transkripčního faktoru NF-kappa B. Vzniklý oxidační stres ještě více zvyšuje rezistenci vůči inzulínu (Costello et al. 2007).

Správný vývoj oocytů je kritický pro oplození a vývoj embrya. U pacientek s diagnostikovaným syndromem polycystických ovárií, které podstoupily umělé oplodnění, byla úspěšnost oplození nízká. Kvalitu oocytů ovlivňuje endokrinní prostředí uvnitř folikulu, přičemž pro PCOS je typická zvýšená hladina testosteronu, která narušuje vývoj oocytů (Teissier et al. 2000).

4.4.3. Preeklampsie

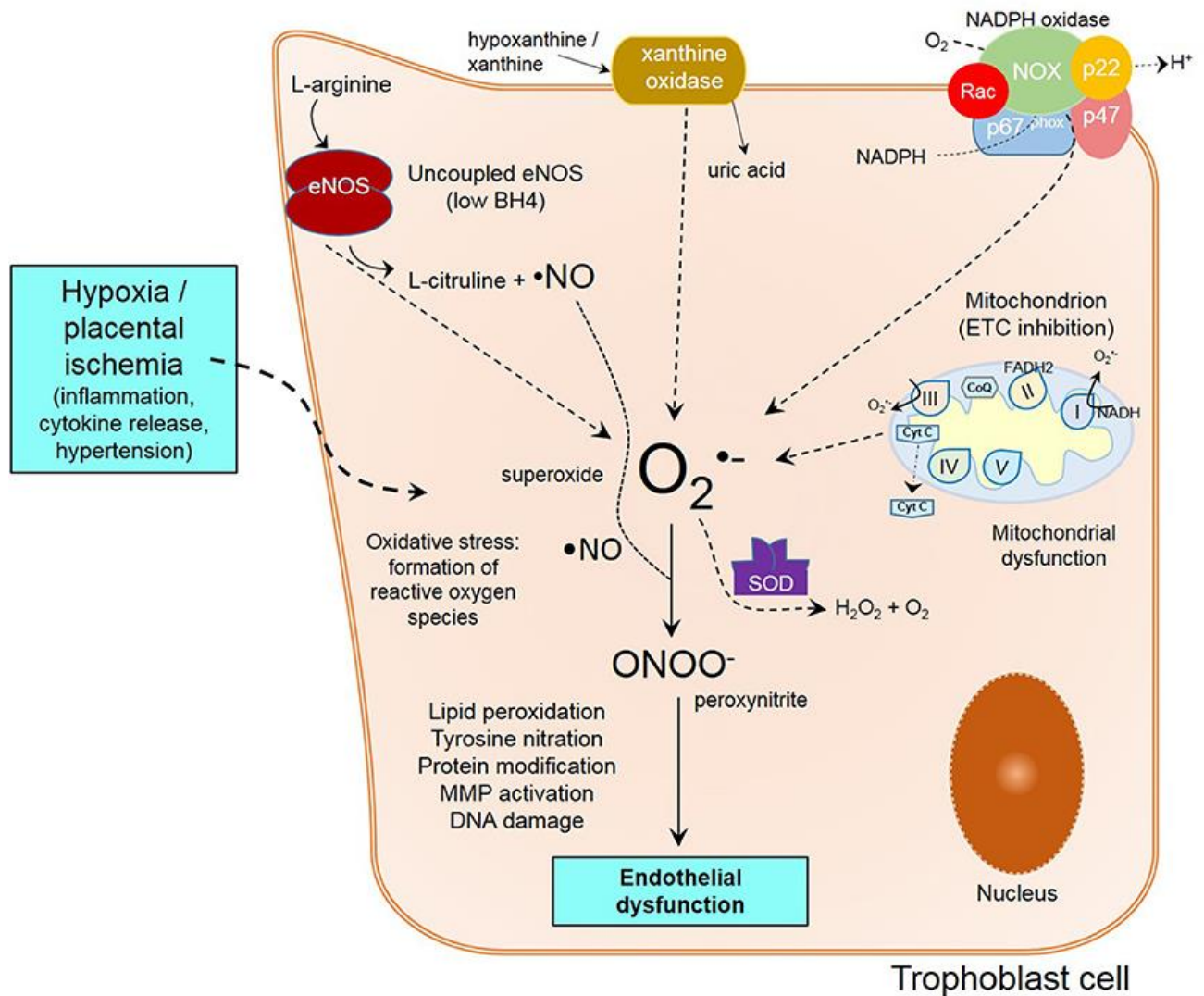
Preeklampsie se projevuje vysokým tlakem a proteinurií (výskyt proteinů v moči). Může se rozvinout během těhotenství, a to během 20. týdne či později. Projevuje se fokálním vazospazmem (křečovitě zúžení cév) a následnou nerovnováhou mezi vasokonstrikcí

a vasodilatací. Faktory poškození vznikají vlivem nedostatečného prokrvení placenty, což je pak kritické jak pro vývoj a růst plodu, tak i pro samotnou matku. Narušená funkce cév negativně ovlivňuje prokrvení ostatních orgánů (Sánchez-Aranguren et al. 2014).

Preeklampsie je v prvním trimestru spojována s narušenou invazí trofoblastu. Důsledkem je nedostatečná remodelace mateřských spirálních tepen a následný pokles krevního toku do placenty, což negativně ovlivňuje zásobení plodu kyslíkem a živinami (Lim et al. 1997). Za účelem tento nedostatek kompenzovat, a tedy zvýšit krevní průtok se v mateřském krevním oběhu, se zvyšuje tlak na konci druhého a ve třetím trimestru (Redman 1991). Důsledkem jsou endoteliální a vaskulární poruchy způsobené změnami v mechanismech, kterými jsou řízeny endoteliální buňky. Ischmicko-reperfúzní poškození navíc přispívá zvýšení koncentrace ROS a vzniku zánětlivých reakcí, které mají vliv nejen na placentu a plod, ale i na krevní oběh matky. Oxidační stres vyústí v apoptickou kaskádu v trofoblastu a fragmenty bazální membrány syncytioblastu se uvolňují do mateřského krevního oběhu, kde spouští imunitní odpověď, kterou doprovází vznik superoxidového anionu (Meziani et al. 2006).

Oxidační stres je spojovaný se sekrecí antiangiogenetických faktorů, například sFlt-1, inhibitoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), jenž je zásadní pro tvorbu a růst nových cév a jejich funkčnost, a placentárního růstového faktoru (PlGF). Oba faktory jsou zásadní pro správný vývoj placenty (Murphy et al. 2013). H_2O_2 je jedním z ROS, které působí přímo na cévy jako vasokonstriktor a jehož hladina je u pacientek trpících preeklampsii zvýšená. Naopak NO^* působí protichůdně jako vasodilatátor, navozuje relaxaci hladkého svalstva a posiluje krevní oběh (Seligman et al. 1994). NO^* je syntetizován NO syntázami (NOS) a v preeklampsii je hlavním problémem inhibice endoteliální NO syntázy (eNOS) prostřednictvím ROS (Farrow et al. 2008). Poklesu NO^* přispívá i nadprodukce superoxidového anionu ($O_2^{\cdot-}$), protože spolu reagují za vzniku peroxynitritu (viz kapitola 2.1.). Peroxynitrit ($ONOO^-$) je velmi reaktivní substancí, způsobuje peroxidaci lipidů, oxidaci DNA a proteinů. Nejčastější je nitrace tyrosinu, kdy vzniká 3-nitrotyrosin (Radi 2004). Zvýšený výskyt 3-nitrotyrosinu bývá častý během poruch oběhové soustavy, včetně preeklampsie (Sánchez-Aranuren et al. 2014). Dále probíhá nitrace p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase), která snižuje její katalytickou aktivitu, což může negativně ovlivnit implantaci a růst plodu (Webster et al. 2006). Uvažuje se, že peroxynitrit též přispívá k narušení endoteliálních funkcí blokací tvorby NO^* . Nedostatek NO^* , který, jak již bylo zmíněno, má vasodilatační účinky, je považován za klíčový faktor endoteliální dysfunkce a je zodpovědný za hlavní příznaky

preeklampsie – silnou vasokonstrikci a vysoký tlak. Vysoký tlak je kompenzačním mechanismem při nízkém průtoku krve při vasokonstrikci cév (Matsubara et al. 2010).



Obr. 9: Mechanismy endotheliální dysfunkce v preeklampsii. Narušená invaze trofoblastu způsobí remodelaci spirálních artérií následovanou ischemicko-reperfúzním poškozením a zánětlivou reakcí. Hlavní roli ve vzniklém oxidačním stresu hraje superoxidový anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), který pochází z různých zdrojů (mitochondrie, reakce NADPH oxidáz, xantinoxidáza, leukocyty). Reakcí superoxidového anionu ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a NO^{\bullet} vzniká peroxinitrit (ONOO^-), který poškozují proteiny, DNA, způsobuje peroxidaci lipidů a přispívá k endotheliální dysfunkci (Sánchez-Aranguren et al. 2014).

Nadprodukce superoxidového anionu ($O_2^{\cdot-}$), který omezuje NO^{\cdot} , je způsobena ischemicko-reperfúzním poškozením a přeměnou xantindehydrogenázy na xantinoxidázu. Xantinoxidáza přeměňuje xantin nebo hypoxantin na kyselinu močovou za vzniku vedlejšího produktu – superoxidového anionu ($O_2^{\cdot-}$; viz obr. 9). V placentě situaci komplikuje ještě obsah železa, které se přes placentu dostává z krevního oběhu matky do plodu. Placenta absorpci železa omezuje tím, že ho buď ukládá do tkání nebo vrací zpět do krevního oběhu matky. Nebezpečí přítomnost železa plyne z Fentonovy reakce, při které vznikají potenciálně nebezpečnější hydroxylové radikály (OH^{\cdot} ; Cao et al. 2013; Many et al. 2000). Dalším zdrojem superoxidového anionu ($O_2^{\cdot-}$) jsou NADPH oxidázy. Bylo prokázáno, že v syncytiotrofoblastu je exprese isoformy NADPH oxidázy NOX1 zesílena u pacientek s diagnostikovanou preeklampsií (Cui et al. 2006).

Pro rozvinutí preeklampsie je zásadní konec prvního trimestru. V tomto období těhotenství je nejdůležitější, aby ve chvíli, kdy narůstá oxidační stres vlivem toku mateřské krve do intervilózního prostoru, byla antioxidační ochrana dostatečná. Podávání antioxidantů v pozdějším období těhotenství pacientkám v léčbě preeklampsie nepomohlo (Burton a Jauniaux 2004; Rumbold et al. 2008).

4.4.4. Gestační diabetes mellitus

Gestační diabetes mellitus je celkem běžnou komplikací v těhotenství. Spočívá v intoleranci k uhlovodíkům a je diagnostikován většinou okolo 20. týdne těhotenství. Během těhotenství klesá citlivost periferních tkání k inzulinu, což je způsobeno nadměrným vylučováním hormonů. Citlivost tkání k inzulinu koreluje především s hladinou humánního choriogonadotropinu (hCG), která spolu s citlivostí na inzulin klesá na konci prvního trimestru. Vzniká hyperglykemie a v reakci na ní začnou pankreatické beta buňky produkovat ještě více inzulinu (Correa et al. 2014).

Pacientkám, kterým byl gestační diabetes mellitus (GDM) diagnostikován, hrozí rozvinutí ještě dalších patologií např. hypertenze, preeklampsie (viz kapitola 4.4.3; Shah et al. 2008) či kardiovaskulární poruchy. GDM spontánně mizí během šestinedělí, avšak pravděpodobnost, že se v budoucnu rozvine diabetes mellitus druhého typu, se zvyšuje (Teede et al. 2011). Prodělání GDM má krátkodobé i dlouhodobější důsledky i pro dítě. Může vyústit v makrosomii (tj. váha novorozence při porodu vyšší než 4500 g) způsobenou vysokou glykemií, kvůli které může dojít ke komplikacím při porodu. Novorozenec může těsně po porodu trpět hypoglykemií, hypokalcemií či hyperbilirubinemií (Hod et al. 1991). V budoucnu

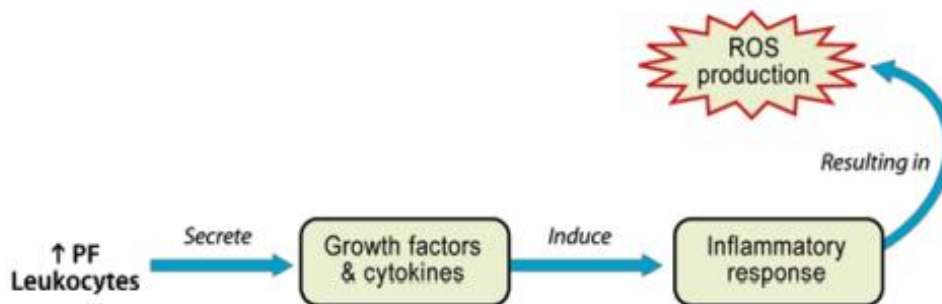
může mít dítě větší sklony k obezitě, může se u něj rozvinout glukózová intolerance až diabetes či kardiovaskulární poruchy (Silverman et al. 1991).

Oxidační stres hraje důležitou roli v rozvinutí GDM. U pacientek s diagnostikovaným GDM byla zaznamenána vyšší hladina markerů oxidačního stresu jako je xantinoxidáza a malondialdehyd a zároveň snížená antioxidační aktivita (Biri et al. 2006). Oxidační stres může v těle působit jako důsledek dlouhodobější hyperglykémie, která způsobuje neenzymatickou glykaci plazmatických enzymů (Tames et al. 1992). Výskyt nitrotyrosinu indikuje přítomnost peroxynitritu (ONOO⁻), který vzniká interakcí superoxidového anionu (O₂⁻) a NO[•].

4.4.5. Endometrióza

Endometrióza je chronickou, benigní, zánětlivou nemocí, kdy je endometriální tkáň implantována na jiném místě než v děloze. Nejčastěji ve vaječnicích či peritoneální dutině. Nejpravděpodobnějším vysvětlením pro implantaci endometriální tkáň mimo dělohu je retrográdní menstruace, kdy se menstruační krev dostává do vaječníku a do peritoneální dutiny. Endometrióza se projevuje bolestmi v podbřišku, dyspareunií, dysmenorheou a může vést až k neplodnosti (Macer et al. 2012).

U žen, kterým byla diagnostikována endometrióza, byl zaznamenán vyšší obsah zánětlivých cytokinů (např. TNF- α , IL-6). Pro tyto cytokiny je typické, že podporují buněčné dělení, tvorbu endometriálních adhezí a angiogenezi. Ektopické endometriální buňky si tak vytváří prostředí, ve kterém mohou přetrvat (Pizzo et al. 2002). V ektopických endometriálních buňkách je produkce estradiolu, který stimuluje proliferaci a spouští zánětlivé reakce, značně vyšší (Hudelist et al. 2007). Naopak ektopické endometriální buňky nereagují na progesteron, který účinky estradiolu reguluje, z důvodu chybějícího progesteronového receptoru (Attia et al. 2000). Produkované cytokiny spustí zánětlivou reakci prostřednictvím makrofágů, které produkují ROS a RNS (viz obr. 10; Mier-Cabrena et al. 2011).



Obr. 10: Vznik ROS při endometrióze. Leukocyty v peritoneální tekutině (PF) produkují růstové faktory a cytokiny, které spustí zánětlivou reakci. Výsledkem je tvorba ROS (upraveno podle Agarwal et al. 2017)

Endometrióza souvisí se zvýšeným oxidačním stresem v peritoneální tekutině (viz obr. 10). U pacientů, kterým byla diagnostikována endometrióza, můžeme v peritoneální tekutině najít zvýšený počet oxidačních markerů. Kromě již zmiňovaných cytokinů, které stimulují produkci ROS makrofágy, jsou typické zvýšené koncentrace malondialdehydu (MDA), angiogenetické faktory (např. VEGF) a oxidované LDL částice (Meir-Cabrena et al. 2011; Rong et al. 2002). Dalším markerem oxidačního stresu jsou heat shock proteiny 70 (HSP70), které chrání buňky před apoptózou a stimulují produkci zánětlivých cytokininů a růstových faktorů, a tím podporují proliferaci a růst endometriální tkáně (Khan et al. 2008). V endometriálních lézích byla také detekována zvýšená exprese transkripčního faktoru NF-kappa B, který též podporuje zánětlivé reakce (cytokiny IL-6, TNF- α a IL- β), buněčnou proliferaci a angiogenezi a zároveň chrání buňky před apoptózou. NF-kappa B jsou pravděpodobně aktivovány fragmentací HSP70 (Chehna-Patel et al. 2011).

Dalším problémem způsobeným retrográdní menstruací je následná akumulace železa v endometriálních lézích, což znamená další tvorbu ROS prostřednictvím Fentonovy reakce. Koncentrace volného železa pozitivně korelovala s peroxidací lipidů a poškozením DNA (výskyt 8-oxo-2'-deoxyguanosinu), oocytů či embryí (Yamaguchi et al. 2008). Oxidační stres v peritoneální dutině má negativní vliv i na spermie, kde byla také zaznamenána fragmentace či poškození DNA (Mansour et al. 2009). Oxidační stres je považován za hlavní faktor snižující neplodnost při endometrióze. Pro otestování efektu oxidačního stresu využili Tamura et al. (2014) podání agonisty gonadotropin uvolňujícího hormon (GnRHa) pacientkám s diagnostikovanou endometriózou. Závěrem bylo, že úspěšnost implantace embrya a těhotenství je značně vyšší u pacientek, kterým byly podány GnRHa než u kontrolní skupiny. Souladu s původní hypotézou byl u pacientek, kterým byly podány GnRHa, zaznamenán také pokles markerů oxidačního stresu, konkrétně TNF- α . Zmírnění negativních vlivů oxidačního

stresu prostřednictvím GnRHa tedy vedlo ke zlepšení plodností a těhotenství. Pozitivně může působit i podání desferoxaminu, který absorbuje železo, a tím zmírňuje tvorbu ROS Fentonovou reakcí (Defrère et al. 2008)

Pacientky s diagnostikovanou endometriózou mají v peritoneální tekutině nižší koncentrace antioxidantů. U žen s rozvinutou endometriózou byl zaznamenán snížený příjem vitamínů A, C, E, a dále prvků mědi a zinku ve srovnání se zdravými ženami. Zvýšení příjmu těchto látek dokáže snížit oxidační stres, což bylo pozorováno prostřednictvím snížené koncentrace markerů oxidačního stresu (Mier-Cabrera et al. 2009).

4.4.6. Neplodnost spojená s oxidačním stresem

Uvažuje se, že oxidační stres a nedostatečná antioxidační ochrana, může zapříčinit neplodnost právě v případech, kdy patofyziologická příčina neplodnosti nebyla odhalena a jde o tzv. idiopatickou (nevysvětlenou) neplodnost. Idiopatická neplodnost je diagnostikována, pokud se páru nepodařilo otěhotnět po 12 měsících pravidelného nechráněného pohlavního styku a zároveň u ženy nebyla objevena žádná porucha ovulace či hormonální nerovnováha a stejně tak negativní vlivy ze strany muže byly vyloučeny. U párů, které jsou označovány jako neplodné, byla diagnostikována právě idiopatická neplodnost v 15 % případů. Většinou se týká žen ve starším reprodukčním věku (Aboulghar et al. 2003; Smith et al. 2003).

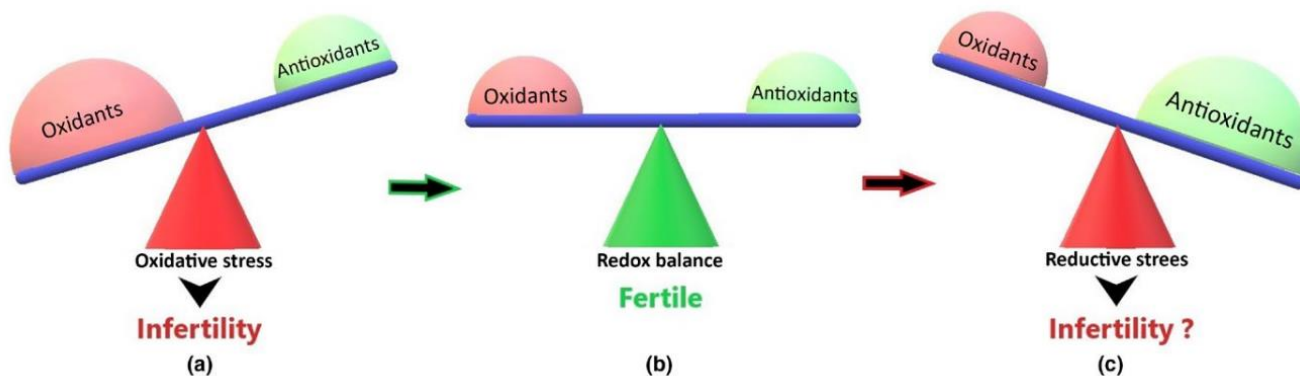
Na přítomnost oxidačního stresu u pacientek s diagnostikovanou idiopatickou neplodností poukazuje vyšší hladina malondialdehydu (MDA) – markeru peroxidace lipidů, a zároveň snížená hladina antioxidantů, např. glutathionu (GSH) a vitamínu E (Polak et al. 1999; Wang et al. 1997). Klíčovou roli v ženském reprodukčním traktu hraje kyselina listová neboli vitamin B9. Hladina kyseliny ovlivňuje metabolismus homocysteinu konkrétně enzym 5,10-methylentetrahydrofolát reduktázu (MTHFR), který katalyzuje přeměnu homocysteinu na methionin. Methionin je dále přeměněn na *S*-adenosylmethionin, které je donorem methylu při methylaci DNA, lipidů a proteinů (Yamada et al. 2005). Obsah homocysteinu v plazmě tedy ovlivňuje hladina kyseliny listové a pokud je jí nedostatek, nastanou defekty v genech, které vyústí v nestabilní enzymatickou aktivitu a hyperhomocysteinemii. Narušený metabolismus kyseliny listové má negativní důsledky pro správný vývoj oocytů a endometria (Altmäe et al. 2010). Vysoká hladina homocysteinu indukuje produkci ROS prostřednictvím inhibice antioxidačních enzymů jako SOD a GPx (Weiss et al. 2005). Hyperhomocysteinemie je také spojována s vyšší neúspěšností umělého oplodnění a s potraty (Pacchiarotti et al. 2007).

Oxidační stres může negativně ovlivnit vývoj a zrání a následně celkovou kvalitu oocytů a do jisté míry predikuje úspěšnost oplození (Borowiecka et al. 2012). Attran et al. (2000) ve své studii zjistil, že oxidační stres ve folikulární tekutině může zabránit oplodnění i při *in vitro* metodě. Ženy s nižšími koncentracemi ROS ve folikulární tekutině mají větší šanci na úspěšnost oplodnění.

Z pokusu na myších vyplynulo, že vystavení dozrávajících oocytů oxidačnímu stresu způsobuje defekty v organizaci mikrotubulů při tvorbě dělicího vřeténka, a to následně narušuje rozchod chromozomů v metafázi II. Následně se oocyty s chromozomálními abnormalitami nemohou správně vyvinout (Choi et al. 2007; Tarin et al. 1996, Amale et al. 2011). Dalším problémem je apoptóza oocytů, kterou vyvolá uvolnění cytochromu c do cytoplazmy, jako důsledek rozpadu mitochondrií vlivem oxidačního stresu (Orrenius et al. 2007). Poškození oocytu volnými radikály při vývoji se dá obejít *in vitro* dozráváním oocytu, kdy můžeme médium ošetřit určitou dávkou antioxidantů a předejít tak oxidačnímu stresu (Tareq et al. 2012; Romero et al. 2020). Nedostatek antioxidantů v peritoneální dutině a následný oxidační stres snižuje šanci na oplození omezením pohyblivosti spermií (Wang et al. 1997). Následně má vliv na implantaci a časný vývoj embrya (Guerin et al. 2001). Některým negativním vlivům oxidačního stresu se dá předejít zvýšením hladiny antioxidantů prostřednictvím podávání léků. V některých případech lze neplodnost obejít metodami umělého oplození. Obojím se budu zabývat v následujících kapitolách.

5. Léčba neplodnosti pomocí podávání antioxidantů a jejich využití v metodách umělého oplodnění

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi ROS a antioxidanty. Hlavní úkolem antioxidantů je neutralizace ROS, podrobněji jsou funkce jednotlivých antioxidantů popsány v kapitole 2.3. Zvýšením antioxidantů v krvi můžeme zmírnit oxidační stres. Orálně můžeme přijímat pouze neenzymatické antioxidanty, které jsou buď přírodními látkami vyskytující se v ovoci a zelenině nebo jsou obsaženy v lécích. Příkladem neenzymatických antioxidantů jsou vitamin C (kyselina askorbová), vitamin E (tokoferol), pyruvát, glutathion, L-karnitin, taurin, hypotaurin, zinek, selen a β -karoten.



Obr. č. 11: Vliv oxidantů (ROS) a antioxidantů na neplodnost. Oxidační stres (a) nastává, když ROS převažují nad antioxidanty a může způsobit neplodnost. Ideální stav je, když jsou hladiny ROS a antioxidantů vyrovnané (b). Naopak pokud výrazně převažují antioxidanty (c), může tato nerovnováha také vyústit v neplodnost (Henkel et al. 2019).

Naopak převaha antioxidantů nad ROS může organismu také uškodit (viz obr. 11). ROS mají totiž v určitém množství, které nepřekračuje antioxidační kapacitu, význam v určitých fyziologických procesech. Většinou hrají roli signálních molekul (viz kapitoly 3.2. a 4.3.). Proto je při léčbě neplodnosti podáváním antioxidantů důležité věnovat pozornost i správnému dávkování. Někdy totiž může přemíra antioxidantů mít naopak prooxidační účinky a může napáchat podobné škody jako samotný oxidační stres (Chen et al. 2008; Clément et al. 2001). V léčbě neplodnosti, kdy byla pacientům orálně podávána kombinace vitamínu C a E, β -karotenu, zinku a selenu, bylo zjištěno, že konkrétně vitamin C má schopnost rozrušovat disulfidové můstky v protaminech (viz kapitola 3.2.), což způsobuje dekonenzaci DNA ve spermiích. Tato skutečnost může vést k asymetrické kondenzaci chromozomů, což může následně vést k potratu (Ménézo et al. 2007).

V předchozích kapitolách byl popsán vliv oxidačního stresu na reprodukční soustavu. Oxidační stres v reprodukčních orgánech může zapříčinit neplodnost. K léčbě některých typů neplodnosti se využívá podávání antioxidantů za účelem snížení oxidačního stresu.

5.1. Léčba neplodnosti antioxidanty u mužů

Oxidační stres v reprodukční soustavě muže má negativní vliv hlavně na vývoj spermií, u kterých způsobuje poškození ve struktuře DNA, snižují pohyblivost jejich a poškozují integritu spermatické membrány (podrobněji popsáno v kapitole 3.3.; Ross et al. 2010). Neplodní muži mají ve srovnání se zdravými muži sníženou antioxidační kapacitu v spermatu (Lewis et al. 1997).

Neenzymatické antioxidanty, jako jsou vitaminy C a E, kyselina listová, zinek, selen, karnitin či karoteinoidy byly využity jako léky ke snížení vysokých koncentrací ROS ve spermatu. Vysoký příjem antioxidantů v potravě měl na spermie pozitivní vliv. Ve srovnání s muži, kteří měli příjem antioxidantů nižší, se kvalita spermií po požívání antioxidantů značně zlepšila (Silver et al. 2005; Young et al. 2008).

5.1.1. Vitamin C

Vitamin C neboli kyselinu askorbovou si lidské tělo nevyrobí samo enzymaticky, ale musíme ho přijímat v potravě. Vitamin C byl ve nalezen v semenné plazmě u zdravých mužů ve vyšší koncentraci než u neplodných mužů, a proto uvažujeme o důležitosti jeho antioxidačních vlastností. Bylo prokázáno, že vitamin C má příznivé účinky na motilitu spermií. Verma a Kanwar (1998) prokázali, že inkubace spermií v médiu s určitou koncentrací vitamínu C po určitý čas může zlepšit motilitu spermií. Donnelly et al. (1999) dokázal podobnou metodou protektivní vliv vitamínu C na sperma. Nedostatek vitamínu C bývá také spojován se zvýšenými koncentracemi markeru poškození DNA 8-oxo-2'-deoxyguanosinu. Pokud se koncentrace vitamínu C v semenné plazmě zvýšila, koncentrace 8-oxo-2'-deoxyguanosinu naopak poklesla (Fraga et al. 1991). Orální podávání vitamínu C bylo testováno přímo na neplodných pacientech, kteří neměli diagnostikovanou žádnou infekční nemoc nebo varikokélu, která by jim způsobovala neplodnost. Byla jim diagnostikována oligozoospermie, snížená motilita a narušená morfologie u jistého procenta spermií. Následně jim bylo po 2 měsíce podáváno 2000 mg vitamínu C denně. Po ukončení léčby se všechny tři aspekty – motilita, morfologie a počet spermií – zlepšily (Akmal et al. 2006). Častěji se ale využívá spíše kombinace více účinných látek, např. kombinace vitamínu C a E. Greco et al. (2005a) se podařilo pomocí orálního podávání kombinace vitamínu C a E mužům, diagnostikovaným jako neplodné, prokázat účinnost v redukci fragmentace DNA spermií. Na motilitu, morfologii a koncentraci spermií v ejakulátu v této studii neměly podané vitaminy přílišný vliv.

5.1.2. Vitamin E

Vitamin E představuje vlastně celou skupinu látek, které se jinak nazývají tokoferoly. Nejdůležitější z nich je α -tokoferol. Jako antioxidant je vitamin E důležitý při ochraně buněčných membrán a proteinů před oxidačními vlivy ROS. Může ochránit také DNA před oxidačním poškozením. Funkce vitamínu E je úzce provázána se selenem a účinnost vitamínu E často závisí na hladině selenu. Selen je zase úzce spojen se selen-dependentní glutathion peroxidázou, důležitým antioxidačním enzymem, který zodpovídá za dismutaci H_2O_2 na vodu (Brigelius-Flohé a Traber 1999).

Suleiman et al. (1996) testovali účinky orálního podávání vitamínu E na pacienty trpící asthenozoospermii (sníženou motilitou spermií). Se sníženou motilitou je často spojována i vyšší koncentrace malondialdehydu (MDA), který naznačuje peroxidaci lipidů. Po podávání vitamínu E po dobu 6 měsíců při dávce 300 mg denně byla zaznamenána snížená hladina MDA a zároveň zlepšená motilita spermií. Podobné účinky byly zaznamenány i ve studiích, kde využili vitamin E v kombinaci se selenem. Následně se u pacientů zlepšila i pravděpodobnost k oplození a těhotenství (Keskes-Ammar et al. 2003; Moslemi a Tavanbakhsh 2011).

5.1.3. L-karnitin

L-karnitin je antioxidantem, který je nejhojnější v nadvarlatech, kde zajišťuje motilitu spermií. Bylo prokázáno, že iniciace motility v nadvarlatech je propojena s nárůstem hladiny L-karnitinu v nadvarletí a zároveň L-acetyl-karnitinu přímo ve spermiích. L-karnitin zajišťuje přenos acetyl-CoA do mitochondrie, kde probíhají další reakce (Krebsův cyklus, oxidační fosforylace), při kterých vzniká ATP nutné k pohybu spermií (Jeulin a Lewin 1996). Micic et al. (2019) prokázali, že L-karnitin může pomoci při léčbě neplodnosti. Motilita spermií u neplodných pacientů se zlepšila po 6 měsících užívání léků, který obsahoval kombinaci L-karnitinu a L-acetyl-karnitinu. K velmi podobným výsledkům vedlo spoustu dalších studií s podobným designem. Kromě motility se po léčbě často zlepšila zároveň i koncentrace spermií (Lenzi et al. 2003; Busetto et al. 2018).

5.1.4. Karotenoidy

Karotenoidy většinou pracují provázaně s vitamínem E a selenem. V semenné plazmě má ze skupiny karotenoidů největší vliv lykopen, který se zde vyskytuje ještě ve vyšší koncentraci než β -karoten (Klebanov et al. 1998). Gupta a Kumar (2002) prokázali, že podávání lykopenu neplodným pacientům může po třech měsících zvýšit koncentraci spermií a zlepšit motilitu.

5.1.5. Glutathion

Glutathion je velmi důležitým kofaktorem antioxidantního enzymu glutathionperoxidázy. Glutathion úzce spolupracuje s vitamínem E a selenem. Nedostatek glutathionu či selenu tak může mít za důsledek defekty v morfologii spermií (Ursini et al. 1999). Při léčbě se většinou podává *N*-acetyl-L-cystein, který je prekurzorem glutathionu. Safarinejad a Safarinejad (2009) prokázali, že po podávání *N*-acetyl-L-cysteinu a selenu se u spermií neplodných pacientů zlepšily všechny parametry – normální morfologie, koncentrace a motilita spermií.

5.1.6. Koenzym Q10

Koenzym Q10 také známý jako ubiquinon zastává své místo v elektronovém transportním řetězci, kde se účastní dýchacího řetězce. Kromě toho působí i antioxidantně. V mnoha studiích byl testován jeho vliv na kvalitu spermií u neplodných pacientů. Safarinejad et al. (2012) prokázali jeho velmi pozitivní účinky na všechny parametry spermií. Po 28týdenní léčbě se u pacientů zlepšila morfologie, koncentrace i motilita spermií. Nadjarzadeh et al. (2014) prokázali, že podávání koenzymu Q10 má pozitivní vliv nejen přímo na kvalitu spermií, ale i na koncentraci dalších antioxidantních enzymů. Ukázalo se, že po tříměsíční léčbě se u pacientů zvýšily hladiny katalázy a superoxidodismutázy (SOD).

5.1.7. Kombinovaná léčba

Mnohem častěji je uplatňována léčba, která kombinuje více antioxidantů. Některé kombinace jsou výhodnější než podávání antioxidantů samostatně, jelikož působí synergisticky. Například velmi častou kombinací je vitamin E a selen. Moslemi a Tavanbakhsh (2011) zjistili, že kombinace vitamínu E a selenu má pozitivní vliv zlepšení motility spermií u asthezoospermických pacientů. U studie, kde bylo kombinováno 5 různých látek s antioxidantními účinky (vitaminy A, C a E, zinek a *N*-acetyl-L-cystein), se oligospermickým pacientům zvýšila koncentrace spermií v ejakulátu až 20x oproti kontrolní skupině. Na jiné parametry ale léčba neměla vliv a nevzrostl ani počet těhotenství během 12 měsíců po ukončení léčby (Galatioto et al. 2008). V kombinaci, kde dominoval hlavně zinek, který byl podáván společně s vitaminy C a E, bylo zaznamenáno zlepšení hlavně co se týče koncentrace markerů oxidačního stresu (TNF- α , MDA) a fragmentace DNA, neboť podávání zinku podporuje expresi Cu,Zn-SOD. Vitaminy E a C mají též protektivní vliv na DNA (Omu et al. 2008). V některých studiích se pokusili skombinovat mnohem více antioxidantů. Arafá et al. (2020) použili kombinaci L-karnitinu, L-acetyl-karnitinu, N-acetyl-cysteinu, koenzymu Q10, selenu, vitamínu C, vitamínu E a lykopenu k léčbě pacientů, kteří byli diagnostikováni jako neplodní. U pacientů se po tříměsíční léčbě zlepšila koncentrace, motilita i morfologie spermií a snížila se fragmentace DNA.

5.2. Léčba neplodnosti pomocí antioxidantů u ženy

Podání antioxidantů může určitě redukovat oxidační stres v reprodukčních orgánech, ale nikdy není jisté, zda se zvýší šance otěhotnět. Navýšení orálního příjmu antioxidantů může mít být součástí léčby různých onemocnění reprodukčního traktu, které doprovází oxidační stres, například endometriózy či syndromu polycystických ovárií.

5.2.1. Léčba endometriózy

Při endometrióze vzniká oxidační stres kvůli velké zánětlivé reakci. Zvyšuje se počet makrofágů, kteří produkují ROS a zároveň je u žen trpících endometriózou zaznamenána snížená hladina antioxidantů (Mier-Cabrera et al. 2011; Szczepańska et al. 2003). Neplodnosti, která může doprovázet endometriózu, přispívá více faktorů, ale ROS jsou pravděpodobně tím nejdůležitějším z nich. Oxidační stres může narušit hormonální rovnováhu, ovulaci či vývoj folikulů (Cahill et al. 1997). Negativně ovlivňují kvalitu oocyty a embrya a komplikují implantaci embrya, což se negativně odráží na výsledcích *in vitro* oplodnění (IVF; Kao et al. 2003; Garrido et al. 2000).

Mier-Cabrera et al. (2009) srovnali koncentrace antioxidantů mezi pacientkami s endometriózou a zdravými pacientkami a ukázalo se, že pacientky s diagnostikovanou endometriózou mají hladiny antioxidantů mnohem nižší, což přispívá zvýšenému oxidačnímu stresu. Následně těmto pacientkám podávali kombinaci vitamínu A, C a E po dva měsíce. Ukázalo se, že se oxidační stres vlivem antioxidantů snížil. Durak et al. (2013) prokázal, že po podávání vitamínu C se snížila koncentrace NK buněk (natural killer cells) a následně se i zmenšila velikost endometriálních cyst. Santanam et al. (2013) ve své studii podávali pacientkám s diagnostikovanou endometriózou kombinaci vitamínu C a E po dobu 8 týdnů. Na konci léčby bylo u necelé poloviny pacientek zaznamenáno zmírnění bolestí v pánevní oblasti. Po změření markerů zánětlivé reakce (interleukiny, T-lymfocyty atd.) v peritoneální tekutině bylo zjištěno, že jejich koncentrace jsou po léčbě značně nižší. Podobně na mediátory zánětlivé reakce (IL-6, TNF- α , prostaglandin E2) působí podávání omega-3 mastných kyselin, které jejich koncentraci snižují. U pacientů se též snížila míra bolest v pánevní oblasti. Proto je vyplavení zánětlivých mediátorů dáváno často do souvislosti s bolestmi v pánevní oblasti (Novembri et al. 2011).

Podávání antioxidantů při léčbě endometriózy slouží spíše k prevenci, zabraňuje většímu rozvoji nemoci, dokáže snížit zánětlivou reakci v reprodukčním traktu, a tím pádem redukuje oxidační stres. Antioxidanty také pomáhají ke zmírnění bolestí v pánevní oblasti, které endometriózu doprovázejí. V žádné ze studií nebyl zatím prokázán přímý vliv antioxidantů na léčbu neplodnosti v souvislosti s endometriózou.

5.2.2. Léčba syndromu polycystických ovárií

Syndrom polycystických ovárií (PCOS) je hormonální porucha, která se vyznačuje hyperandrogenismem, tzn. nadprodukcí testosteronu. Dále může souviset s obezitou, diabetem mellitus nebo se můžou vedle PCOS rozvinout ještě kardiovaskulární poruchy. Neplodnost jako součást PCOS je způsobena především hyperandrogenismem, kdy hormonální nerovnováha narušuje ovulační a menstruační cyklus a způsobuje hyperinzulinaci. Narušený je vývoj folikulů následně vede k neplodnosti (Goodarzi et al. 2011).

Bylo zjištěno, že u pacientek trpících PCOS velmi zlepšuje ovulaci a zvyšuje pravděpodobnost otěhotnění podávání L-karnitinu. Zlepšil se také metabolismus lipidů a glukózy, což vedlo ke snížení hmotnosti u pacientek (Ismail et al. 2014). Samimi et al. (2016) zaznamenal po 12 týdnech podávání L-karnitinu snížení váhy pacientek a zároveň snížení glukózy v krvi, avšak léčba neovlivnila metabolismus lipidů a tvorbu testosteronu. Kalhori et al. (2019) se podařilo prokázat dokonce i pokles koncentrací testosteronu, IL-6, MDA a TNF- α u myši, které měly příznaky podobné PCOS.

N-acetyl-L-cystein (NAC) byl v mnoha studiích využit jako prostředek pro zlepšení podmínek při PCOS. NAC byl ve více studiích použit jako adjuvans společně s klomifen citrátem, který se využívá k vyvolání ovulace u pacientek s PCOS. Studie se shodovaly v účincích NAC na redukci insulinové rezistence a hladiny glukózy v krvi (Fulghesu et al. 2002; Gayatri et al. 2010; Javanmanesh et al. 2016). Bylo také prokázáno, že NAC může mít pozitivní vliv na vyvolání ovulace a pravděpodobnost otěhotnění (Maged et al. 2015; Nemati et al. 2017).

Folát neboli kyselina listová (vitamin B9), jak již bylo zmíněno v kapitole 4.4.6., ovlivňuje hladinu homocysteinu v krvi. Nadměrná hladina homocysteinu v krvi (hyperhomocysteinemie) je často spojována s kardiovaskulárními onemocněními, které doprovázejí PCOS (Grodnitskaya a Kurtser 2012). Bylo prokázáno, že podávání kyseliny listové pomáhá redukovat faktory zánětlivých reakcí a markery oxidačního stresu (Bahmani et al. 2014). Asemi et al. (2014) prokázali, že podáváním folátu se může snížit rezistence vůči insulinu, a tím pádem i koncentrace glukózy.

5.3. Využití antioxidantů v metodách umělého oplodnění

Antioxidantů se také využívá v technologiích asistované reprodukce pro snížení oxidačního stresu a vytvoření příznivějších podmínek pro oplodnění. Při technikách asistované reprodukce se gamety dostávají mimo přirozené prostředí, proto je vhodné vytvořit pro ně co nejpříznivější umělé prostředí, kde bude oxidační stres regulován, aby nebyly poškozeny. Antioxidantů se může využít i jako léků, které jsou pacientům podávány orálně, a tím se může zlepšit kvalita gamet a zvýšit šance na úspěšné oplození.

5.3.1. Zdroje oxidačního stresu v technikách asistované reprodukce

Při manipulaci s gametami v rámci asistované reprodukce může vznikat oxidační stres, jednak z důvodu odebrání gamet z přirozeného prostředí, kde je zajištěna antioxidační ochrana, a jednak z důvodu exogenních zdrojů ROS. Vystavení gamet viditelnému záření může zvýšit tvorbu ROS. Takenaka et al. (2007) testovali účinky viditelného záření na myších a křeččích oocytech a ukázalo se, že lepší vývoj zygoty následoval u těch, které nebyly vystaveny záření. Li et al. (2015) zjistili, že míra poškození koreluje s časem, po který byly oocyty světlu vystaveny. Problematické je též hyperoxické *in vitro* prostředí. Kasterstein et al. (2013) potvrdili, že v média se zvýšeným pO₂ mají na gamety a embrya negativní vliv. Inkubace embryí v prostředí s nižší koncentrací O₂ (mezi 5 a 7 %) měla příznivý vliv na vývoj embryí (Rinaudo et al. 2006; Kitagawa et al. 2004). Jako velmi problematický se jeví obsah železa nebo mědi v médiu, z důvodu Fentonovy reakci, při které vzniká velmi škodlivý hydroxylový radikál, proto se kromě antioxidantů vyplatí do média přidávat i cheláty (Orsi et al. 2001). Dalším problémem jsou změny teplot a s tím související i změny pH, které ovlivňují buněčnou homeostázu a mohou narušit metabolismus (syntézu proteinů, funkci mitochondrií a cytoskeletu). Hlavní roli hraje koncentrace vodíkových iontů (H⁺), která může narušit motilitu spermií, zraní oocytů a pozdější vývoj embrya (Will et al. 2011). Teplota může být zvýšena prostřednictvím centrifugace, která se běžně provádí při oddělování spermií od zbytku semenné plazmy. Ukázalo se, že míra poškození je závislá na čase a rychlosti centrifugace (Shekarriz et al. 1995). Dalším úskalím je kryoprezervace, kdy jsou gamety značně oslabeny a může být narušena jejich struktura a integrita. Při vzniku oxidačního stresu mají například spermie po rozmražení poškozené DNA a sníženou motilitu (Thomson et al. 2009; Zribi et al. 2010).

Je tedy nutné hladinu oxidačního stresu regulovat pomocí přidání antioxidantů. Antioxidanty jsou nejčastěji přidávány do média, ve kterém jsou odebrané spermie uchovávány nebo používají jako kryoprotektiva při zmrazování gamet. Někdy mohou být podávány orálně

určitý čas před provedením zákroku, aby se zlepšila kvalita gamet a zvýšila se tam pravděpodobnost početí.

5.3.2. Využití antioxidantů pro zlepšení parametrů spermií při technikách asistované reprodukce

Pro zvýšení úspěšnosti umělého oplodnění je důležité redukovat faktory, které způsobují oxidační stres a znevýhodňují tak spermie a snižují jejich potenciál pro oplodnění. Z pokusů na zvířatech bylo prokázáno, že pokud jsou spermie během inkubace vystaveny faktorům oxidačního stresu, úspěšnost metod asistované reprodukce se snižuje. Bittner et al. (2018) pozorovali účinky H₂O₂ na spermie skotu při inkubaci a následně zaznamenali vyšší míru poškození DNA embrya a opoždění jeho vývoje. Li et al. (2020) zase testovali účinky kryoprezervace na myší sperma a následně pozorovali poškození DNA, které značně omezilo až znemožnilo oplození. Deng et al. (2019) srovnali pomocí meta-analýzy vliv indexu fragmentace DNA (DFI) spermií na úspěšnost asistované reprodukce. Vysoké DFI mělo negativní vliv na kvalitu embrya a šanci otěhotnět.

Mezi antioxidanty, které jsou přidávány do média, ve kterém jsou spermie uchovávány, patří například kataláza. Přidání katalázy redukuje fragmentaci DNA spermií a usnadňuje průběh akrozomové reakce (Chi et al. 2008). Při kryoprezervaci se více osvědčilo přidání kombinace katalázy a SOD než přidání pouze jednoho z enzymů. Kombinace těchto enzymů chrání plazmatickou membránu před peroxidací a zajišťuje jim lepší motilitu a viabilitu po rozmražení (Rossi et al. 2001). Eidan (2016) zkoumal účinky dvou různých kombinací na býčí sperma při kryoprezervaci. U jedné skupiny použil kombinaci vitamínu C a katalázy a u druhé vitamínu C a redukovaného glutathionu. V obou skupinách bylo pozorováno značné zlepšení motility a viability spermií a integrity cytoplazmatické membrány a akrosomu. U kombinace vitamínu C a katalázy se také snížily koncentrace markeru oxidačního stresu MDA.

O vitamínu C se mluví, jako o antioxidantu, který chrání hlavně cytoplazmatickou membránu před oxidačním poškozením a brání tvorbě hydroxylového radikálu, který poškozuje proteiny a mastné kyseliny ve větší míře než ostatní volné radikály. Sám o sobě může být velmi účinný. Již bylo zmíněno v kapitole 5.1.1., že i jeho orální podávání pacientům může zlepšit parametry spermií a plodnost. Orální podávání může být zahájeno před asistovanou reprodukcí a zvýšit šance na její úspěšnost. Vitamin C se častěji podává v kombinaci s dalšími látkami. Greco et al. (2005b) podávali kombinaci vitamínu C a E (1 g vitamínu C a 1 g vitamínu E denně) po dobu dvou měsíců. Vybrali si pacienty, kteří měli zvýšené procento fragmentovaného DNA a pokus oplodnění metodou ICSI byl u nich neúspěšný. Po léčbě u nich byla zaznamenána

vyšší míra těhotenství a úspěšné implantace. Pozitivní výsledky mělo i přidání vitamínu C do média při kryoprezervaci spermií, které redukovalo fragmentaci DNA (Branco et al. 2010) a zlepšilo motilitu spermií po rozmražení (Jenkins et al. 2011). Kombinace katalázy a vitamínu C jako kryoprotektivum se také osvědčila při prevenci oxidačního poškození (Li et al. 2010).

Orální podávání vitamínu E v několika studiích zlepšilo četnost úspěšných IVF zákroků (Kessopoulou et al. 1995; Geva et al. 1996; Matorras et al. 2020). Pozitivní vliv vitamínu E na sperma spočívá v ochraně membrán před oxidačním poškozením a zachování motility, která zvyšuje šanci oplození (Suleiman et al. 1996). Vitamínu E se taky využívá jako kryoprotektiva k ochraně zmražených spermií před oxidačním stresem, který by mohl následně poškodit jejich motilitu. Taylor et al. (2009) prokázal, že u vzorků, kde byl přidán vitamin E, byla motilita po rozmražení výrazně zlepšena oproti vzorkům, kde vitamin E přidán nebyl. Fragmentace DNA však ovlivněna nebyla.

Několik studií testovalo účinky orálního podávání kombinace zinku, D-aspartátu a koenzymu Q10 na kvalitu spermií. Ukázalo se, že tato kombinace chrání spermie před fragmentací DNA a peroxidací lipidů a následně zlepšuje výsledky IVF (Talevi et al. 2013; Gualtieri et al. 2014). Giacone et al. (2017) zkoušeli použít stejnou kombinaci látek i pro inkubaci spermií. U inkubovaných spermií byla zaznamenána zlepšená motilita a snížená peroxidace lipidů a fragmentace DNA.

Jako nejvýhodnější se jeví orální podávání kombinací více antioxidantů. Testován byl například lék Fertilit, který obsahoval vitaminy C a E, kyselinu listovou, zinek, selen, *N*-acetyl-L-cystein, L-karnitin, citrulin, redukovaný glutathion, lykopen a koenzym Q10. Po léčbě byla zaznamenána zvýšená motilita, koncentrace a celková kvalita spermií, což zvyšuje pravděpodobnost početí pomocí IVF (Wirleitner et al. 2012). Podobně byl hodnocen i lék Fertimax2, obsahující vitaminy C a E, zinek, selen, L-karnitin, kyselinu listovou a koenzym Q10 (Kacem et al. 2014).

Samotného L-karnitinu se také užívá jako kryoprotektiva. Banihani et al. (2014) zaznamenali u spermií zlepšení motility, viability a redukci oxidačního poškození DNA. Jako kryoprotektivum se osvědčil i koenzym Q10, jehož přidání do média prokazatelně snížilo oxidační poškození DNA a lipidů (Yousefian et al. 2018). V mnoha studiích byl zjištěn pozitivní vliv melatoninu jako kryoprotektiva. Po přidání melatoninu byla u spermií zlepšena motilita a viabilita (Deng et al. 2017) a oxidační poškození DNA bylo sníženo (Succu et al.

2011). Též bylo prokázáno, že přítomnost melatoninu stimuluje aktivitu antioxidantních enzymů jako je SOD, kataláza a GPx (Deng et al. 2017; Appiah et al. 2019).

5.3.3. Využití antioxidantů pro zlepšení kvality oocytů, *in vitro* dozrávání oocytů a přizpůsobení kultivačního média v *in vitro* oplodnění

U pacientek s diagnostikovanou idiopatickou neplodností a po neúspěšné asistované reprodukci se využívá léčba podáváním antioxidantů pro zmírnění oxidačního stresu v těle a zlepšení kvality oocytů. V případech, kdy léčba nepomáhá se může přistoupit na metodu dozrání oocytu *in vitro*. Důležitá je redoxní rovnováha v kultivačním médiu, ve kterém jsou oocyty inkubovány a následně oplodňovány. Složení kultivačního média má tak vliv i na časný vývoj embrya, než je implantováno do dělohy.

Nejjednodušší cestou za zvýšením pravděpodobnosti otěhotnění je orální podávání antioxidantů pacientkám. Toho se využívá i v technikách asistované reprodukce. Ve zvýšení úspěšnosti *in vitro* oplodnění se uplatnilo orální podávání vitamínu C (Crha et al. 2003). Jiné studie, ve kterých pacientkám také podávali vitamíny C nebo E však tvrdí, že míra úspěšných oplodnění se příliš nezvýšila (Cicek et al. 2012; Griesinger et al. 2002).

Po orálním podáváním kombinace myo-inositolu a kyseliny listové se snížil počet nedozrálých oocytů u žen trpících PCOS, což zlepšilo podmínky při odebrání oocytů (Ciotta et al. 2011). Canosa et al. (2020) testovali stejnou kombinaci u obézních pacientek, které však netrpěli PCOS, přesto došli k podobným závěrům – orální podávání kombinace myo-inositolu a kyseliny listové má příznivé účinky na kvalitu oocytu a zvyšuje úspěšnost IVF. Účinek této kombinace na pozitivní výsledky IVF může být ještě více umocněn přidáním vitamínu D₃ (Bezerra Espinola et al. 2021).

Inkubace v médiu s antioxidanty se uplatňuje při společné kultivaci spermie a oocytu a následném časném vývoji embryí, než jsou zavedeny do dělohy. Na kvalitu embryí a časný vývoj blastocysty má pozitivní vliv přidání vitamínu C a E do inkubačního média (Wang et al. 2002). Olson a Seidel (2000) vyhodnotili, že samotný vitamin E měl dokonce lepší vliv na vývoj blastocysty než kombinace vitamínu C a E. Tareq et al. (2012) testovali účinky kombinace selenu a vitamínu E na prasečích oocytech a zaznamenali zlepšené dozrávání oocytů a zvýšený počet úspěšně oplozených oocytů. Abdelrazik et al. (2009) testovali vliv L-karnitinu na myší embrya a ukázalo se, že L-karnitin chrání embrya před oxidačním poškozením DNA i po přidání H₂O₂. L-karnitin má tedy zjevný pozitivní vliv na raný vývoj embrya.

Důležitým antioxidantem obsaženým ve folikulární tekutině, kde zajišťuje dozrávání oocytů, je melatonin. Manjunatha et al. (2009) přidali melatonin v kombinaci s taurinem do média s buvolími oocyty a embryi. *In vitro* produkce embryí byla nejvyšší při kombinaci obou látek, větší vliv měl však melatonin. Melatonin bývá také využíván v *in vitro* dozrávání oocytu přidáním do kultivačního média. Tato metoda je využívána u pacientek, které trpí PCOS. Melatonin u těchto pacientek zvyšuje možnost dozrání oocytu a úspěšnost oplodnění a implantace embrya (Kim et al. 2013). Espino et al. (2019) podávali pacientkám s idiopatickou neplodností melatonin orálně a též zaznamenali zlepšení kvality oocytů a zvýšení pravděpodobnosti otěhotnění. V *in vitro* dozrávání oocytů pocházejících z folikulární tekutiny s nízkou koncentrací antioxidantů se uplatnilo i přidání koenzymu Q10 do kultivačního média (Romero et al. 2020).

Závěr

Volné radikály zastávají velmi důležité funkce v obou reprodukčních soustavách, samčí i samičí. Hrají důležitou roli ve vývoji gamet. U spermií se uplatňují v kondenzaci chromatinu, kdy umožňují tvorbu disulfidových můstků v protaminech, které DNA chrání. Dále se jako signální molekuly podílí na kapacitaci, hyperaktivaci a akrosomové reakci. Zajišťují také přizpůsobení fluidity membrány spermie pro snadnou fúzi s membránou oocyty. Bez přítomnosti volných radikálů by k oplození vůbec nemohlo dojít. Při vývoji oocytů se volné radikály podílí na opětovném nastartování meiózy a dozrání oocyty, ale také na řízené apoptóze (atrézii) folikulů, které nepokračují do ovulace. Volné radikály se pravděpodobně podílí na nastartování ovulace stimulací proteolytických enzymů, které způsobí prasknutí folikulu a uvolnění oocyty. Koncentrace volných radikálů úzce souvisí s metabolismem žlutého tělíska a cílené zvýšení jejich koncentrace zajišťuje luteolýzu (rozpad žlutého tělíska). Naopak pokud jsou koncentrace volných radikálů snižovány, je to signál, že došlo k oplození vajíčka a graviditě. Volné radikály hrají roli i v endometriálním cyklu. Jejich koncentrace ovlivňuje v proliferační fázi decidualizaci endometria a v ischemické fázi zajišťuje nekrózu povrchové vrstvy endometria. Volné radikály mají signalizační funkci i během gravidity například v regulaci tvorby placenty a angiogenezi. Při porodu se pak podílejí na myometriálních kontrakcích. V neposlední řadě jsou důležitou součástí imunitních reakcí, které mají význam nejen pro reprodukční soustavu, ale i pro celý organismus.

Jelikož jsou volné radikály velmi reaktivními molekulami, dokážou jejich vysoké koncentrace organismu uškodit. Proto musí být v těle dostatečná koncentrace antioxidantů, která působení volných radikálů reguluje a chrání organismus před vznikem oxidačního stresu. V reprodukční soustavě je velmi důležitá přítomnost antioxidantů v semenné plazmě a ve folikulární a peritoneální tekutině, aby ochránila spermie a oocyty před poškozením volnými radikály. U spermií je zásadní poškození motility důsledkem oxidačních modifikací proteinů, které jsou důležité pro hyperaktivaci spermií a tvorbu ATP, která je pro pohyb spermií zásadní. Dalším problémem je indukce apoptózy oxidačním stresem, která má za následek nízkou koncentraci spermií v semenné plazmě. Volné radikály dokážou velice rychle poškodit různé molekuly. U spermií je zásadní poškození cytoplazmatické membrány peroxidací lipidů, která mění její fluiditu a může znemožnit fúzi spermie s membránou oocyty. Nejzásadnějším problémem, který postihuje nejen spermie a oocyty, ale i vzniklé embryo, je oxidační poškození DNA, které ve všech případech znemožní další vývoj. Nesprávná koncentrace volných radikálů

může inhibovat ovulaci a narušit metabolismus steroidních hormonů, které vývoj oocytů a ovulaci řídí.

Oxidační stres je spojovaný s různými patologiemi reprodukčního traktu. Doprovází varikokélu, syndrom polycystických ovárií, endometriózu či preeklampsii. Z důvodu narušení vývoje gamet a vytvoření nepříznivého prostředí pro oplození je oxidační stres považován za faktor neplodnosti. Proto se v současné době léčba těchto patologií spojených s oxidačním stresem soustřeďuje na antioxidanty. V mnoha studiích bylo prokázáno, že orálním podáváním antioxidantů jako je vitamin C a E, L-karnitin, karotenoidy, koenzym Q10, kyselina listová, melatonin nebo prvků selenu a zinku, které podporují antioxidační reakce, můžeme docílit zmírnění oxidačního stresu. Podávání antioxidantů mužům, kteří mají sníženou plodnost nebo jsou dokonce neplodní, může zlepšit parametry spermií jako je motilita, normální morfologie a koncentrace v ejakulátu. Pravděpodobnost oplodnění se se zlepšením těchto parametrů zvyšuje. U žen je léčba o něco složitější a podávání antioxidantů nemusí zajistit plodnost. Uplatnilo se však při částečné léčbě endometriózy, kdy antioxidanty zmírnily zánětlivé reakce, a tím pádem i bolest, kterou pacientky zažívaly. U syndromu polycystických ovárií se též zmírnily zánětlivé reakce a zlepšila se citlivost na inzulin, kterou tato nemoc narušuje. Pacientky však byly stále neschopné otěhotnět.

Ve většina případů neplodnosti se přistupuje na různé metody asistované reprodukce. Pokud ovšem gamety vyjmeme z jejich přirozeného prostředí, hrozí jim oxidační stres způsobený například vystavením světlu, změnou teploty nebo vlivem pH a složení kultivačního média. V současné době se proto využívá antioxidantů přidáním do kultivačního média. Antioxidanty jako je kataláza, glutathion, SOD, vitamin C a E, L-karnitin nebo melatonin chrání v kultivačním médiu gamety a následně vzniklé embryo před oxidačním stresem, který by mohl poškodit jejich DNA a znemožnit další vývoj. Při narušeném dozrávání oocytu se může přistoupit na dozrání oocytů *in vitro*, kdy se kultivačního média také přidávají antioxidanty, které zajistí jeho správný vývoj. Antioxidanty jsou využívány jako kryoprotektiva. V této oblasti se velmi dobře uplatnily vitamin C a E, koenzym Q10 a L-karnitin, které dokážou ochránit DNA gamet před fragmentací. V neposlední řadě se jako součást asistované reprodukce využívá antioxidantů jako léků. Mohou být podávány orálně před zákrokem, aby se co nejvíce zlepšily parametry spermií a oocytů a šance na úspěšné oplodnění se zvýšila.

Volné radikály a antioxidanty jsou velmi důležitou a neodmyslitelnou součástí funkčního zdravého metabolismu. Jelikož účinky volných radikálů mohou být ve vyšších koncentracích velmi zrádné a mohou rozvinout různé patologie, tělo je musí udržovat ve správné hladině

pomocí antioxidantů. Velká zodpovědnost je ale také na nás samotných. Oxidačnímu stresu se dá předcházet zdravým životním stylem a přijímáním dostatku antioxidantů v potravě. Naopak konzumace alkoholu nebo kouření může oxidační stres vyvolat. Oxidační stres může mít na naše tělo neblahé následky a může zmařit život nejen nám, ale i našim potenciálním potomkům.

Seznam literatury

- Abdelrazik, H., Sharma, R., Mahfouz, R., & Agarwal, A. (2009). L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertility and sterility*, *91*(2), 589-596.
- Aboulghar, M. A., Mansour, R. T., Serour, G. I., & Al-Inany, H. G. (2003). Diagnosis and management of unexplained infertility: an update. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *267*(4), 177-188.
- Abrahams, V. M., Kim, Y. M., Straszewski, S. L., Romero, R., & Mor, G. (2004). Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *American journal of reproductive immunology*, *51*(4), 275-282.
- Agarwal, A., Sharma, R., Gupta, S., Harlev, A., Ahmad, G., Du Plessis, S. S., Esteves, S. C., Wang, S. M., & Durairajanayagam, D. (Eds.). (2017). *Oxidative stress in human reproduction: shedding light on a complicated phenomenon*. Springer. ISBN 978-3-319-48427-3
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology*, *13*(1), 1-9.
- Agarwal, A., Sharma, R. K., Nallella, K. P., Thomas Jr, A. J., Alvarez, J. G., & Sikka, S. C. (2006). Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and sterility*, *86*(4), 878-885.
- Agarwal, A., Gupta, S., Sekhon, L., & Shah, R. (2008). Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*, *10*(8), 1375-1404.
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology*, *3*(1), 1-21.
- Aitken, R. J., Harkiss, D., Knox, W., Paterson, M., & Irvine, D. S. (1998). A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *Journal of Cell Science*, *111*(5), 645-656.
- Aitken, R. J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D. W., & Van Duin, M. (1995). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science*, *108*(5), 2017-2025.

- Aitken, R. J., Clarkson, J. S., & Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of reproduction*, *41*(1), 183-197.
- Aitken, R. J., Whiting, S., De Iuliis, G. N., McClymont, S., Mitchell, L. A., & Baker, M. A. (2012). Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(39), 33048-33060.
- Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular reproduction and development*, *84*(10), 1039-1052.
- Akmal, M., Qadri, J. Q., Al-Waili, N. S., Thangal, S., Haq, A., & Saloom, K. Y. (2006). Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. *Journal of medicinal food*, *9*(3), 440-442.
- Altmäe, S., Stavreus-Evers, A., Ruiz, J. R., Laanpere, M., Syvänen, T., Yngve, A., Salumets, A. & Nilsson, T. K. (2010). Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. *Fertility and sterility*, *94*(1), 130-137.
- Amale, M. H., Shahne, A. Z., Abavisani, A., & Nasrollahi, S. (2011). Effects of inhibiting nitric oxide synthase on cumulus expansion and nuclear maturation of sheep oocytes. *Czech Journal of Animal Science*, *56*(6), 284-291.
- Amaral, A., Ramalho-Santos, J., & St John, J. C. (2007). The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Human Reproduction*, *22*(6), 1585-1596.
- Appiah, M. O., He, B., Lu, W., & Wang, J. (2019). Antioxidative effect of melatonin on cryopreserved chicken semen. *Cryobiology*, *89*, 90-95.
- Arafa, M., Agarwal, A., Majzoub, A., Panner Selvam, M. K., Baskaran, S., Henkel, R., & Elbardisi, H. (2020). Efficacy of antioxidant supplementation on conventional and advanced sperm function tests in patients with idiopathic male infertility. *Antioxidants*, *9*(3), 219.
- Asemi, Z., Karamali, M., & Esmailzadeh, A. (2014). Metabolic response to folate supplementation in overweight women with polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Molecular nutrition & food research*, *58*(7), 1465-1473.

- Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., Goldberg, J. M., Miller, K. F., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2000). The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *International journal of fertility and women's medicine*, 45(5), 314-320.
- Attia, G. R., Zeitoun, K., Edwards, D., Johns, A., Carr, B. R., & Bulun, S. E. (2000). Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(8), 2897-2902.
- Aziz, N., Saleh, R. A., Sharma, R. K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas Jr, A. J., & Agarwal, A. (2004). Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and sterility*, 81(2), 349-354.
- Babior, B. M. (1978). Oxygen-Dependent Microbial Killing by Phagocytes: (First of Two Parts). *New England Journal of Medicine*, 298(12), 659-668.
- Bagavandoss, P., Wiggins, R. C., Kunkel, S. L., Remick, D. G., & Keyes, P. L. (1989). Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits. *Biology of Reproduction*, 42(2), 367-376.
- Bahmani, F., Karamali, M., Shakeri, H., & Asemi, Z. (2014). The effects of folate supplementation on inflammatory factors and biomarkers of oxidative stress in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clinical endocrinology*, 81(4), 582-587.
- Baird, D. T., Cameron, S. T., Critchley, H. O. D., Drudy, T. A., Howe, A., Jones, R. L., Lea, R. G., & Kelly, R. W. (1996). Prostaglandins and menstruation. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 70(1), 15-17.
- Banihani, S., Agarwal, A., Sharma, R., & Bayachou, M. (2014). Cryoprotective effect of l-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa. *Andrologia*, 46(6), 637-641.
- Behrman, H. R., Preston, S. L., Aten, R. F., Rinaudo, P., & Zreik, T. G. (1996). Hormone induction of ascorbic acid transport in immature granulosa cells. *Endocrinology*, 137(10), 4316-4321.
- Behrman, H. R., Kodaman, P. H., Preston, S. L., & Gao, S. (2001). Oxidative stress and the ovary. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 8(1), S40-S42.

- Bezerra Espinola, M. S., Bilotta, G., & Aragona, C. (2021). Positive effect of a new supplementation of vitamin D3 with myo-inositol, folic acid and melatonin on IVF outcomes: a prospective randomized and controlled pilot study. *Gynecological Endocrinology*, 37(3), 251-254.
- Billiar, T. R. (1995). Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Annals of surgery*, 221(4), 339.
- Biri, A., Onan, A., Devrim, E., Babacan, F., Kavutcu, M. U. S. T. A. F. A., & Durak, I. (2006). Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta*, 27(2-3), 327-332.
- Bittner, L., Wyck, S., Herrera, C., Siuda, M., Wrenzycki, C., Van Loon, B., & Bollwein, H. (2018). Negative effects of oxidative stress in bovine spermatozoa on in vitro development and DNA integrity of embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(10), 1359-1368.
- Boerke, A., Brouwers, J. F., Olkkonen, V. M., van de Lest, C. H., Sostaric, E., Schoevers, E. J., Helms, J. B., & Gadella, B. M. (2013). Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. *Biology of reproduction*, 88(1), 1-18.
- Borowiecka, M., Wojsiat, J., Polac, I., Radwan, M., Radwan, P., & Zbikowska, H. M. (2012). Oxidative stress markers in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Systems biology in reproductive medicine*, 58(6), 301-305.
- Boveris, A., & Cadenas, E. (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS letters*, 54(3), 311-314.
- Branco, C. S., Garcez, M. E., Pasqualotto, F. F., Erdtman, B., & Salvador, M. (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 60(2), 235-237.
- Brännström, M., Giesecke, L., Moore, I. C., van den Heuvel, C. J., & Robertson, S. A. (1994). Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy. *Biology of reproduction*, 50(5), 1161-1167.
- Brännström, M., Mayrhofer, G., & Robertson, S. A. (1993). Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. *Biology of reproduction*, 48(2), 277-286.

- Brigelius-Flohé, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, *13*(10), 1145-1155.
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2004). Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, *11*(6), 342-352.
- Busetto, G. M., Agarwal, A., Virmani, A., Antonini, G., Ragonesi, G., Del Giudice, F., Micic, S., Gentile, V., & De Berardinis, E. (2018). Effect of metabolic and antioxidant supplementation on sperm parameters in oligo-astheno-teratozoospermia, with and without varicocele: A double-blind placebo-controlled study. *Andrologia*, *50*(3), e12927.
- Cahill, D. J., Wardle, P. G., Maile, L. A., Harlow, C. R., & Hull, M. G. R. (1997). Ovarian dysfunction in endometriosis-associated and unexplained infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *14*(10), 554-557.
- Cai, J., & Jones, D. P. (1998). Superoxide in apoptosis: mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(19), 11401-11404.
- Cain, K., Bratton, S. B., & Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, *84*(2-3), 203-214.
- Caniggia, I., Winter, J., Lye, S. J., & Post, M. (2000). Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*, *21*, S25-S30.
- Canosa, S., Paschero, C., Carosso, A., Leoncini, S., Mercaldo, N., Gennarelli, G., Benedetto, C., & Revelli, A. (2020). Effect of a Combination of Myo-Inositol, Alpha-Lipoic Acid, and Folic Acid on Oocyte Morphology and Embryo Morphokinetics in non-PCOS Overweight/Obese Patients Undergoing IVF: A Pilot, Prospective, Randomized Study. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(9), 2949.
- Cao, C., & O'Brien, K. O. (2013). Pregnancy and iron homeostasis: an update. *Nutrition reviews*, *71*(1), 35-51.
- Carlson, J. C., Sawada, M., Boone, D. L., & Stauffer, J. M. (1995). Stimulation of progesterone secretion in dispersed cells of rat corpora lutea by antioxidants. *Steroids*, *60*(3), 272-276.
- Cicek, N., Eryilmaz, O. G., Sarikaya, E., Gulerman, C., & Genc, Y. (2012). Vitamin E effect on controlled ovarian stimulation of unexplained infertile women. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *29*(4), 325-328.

- Ciotta, L., Stracquadiano, M., Pagano, I., Carbonaro, A., Palumbo, M., & Gulino, F. (2011). Effects of myo-inositol supplementation on oocyte's quality in PCOS patients: a double blind trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *15*(5), 509-514.
- Clément, M. V., Ramalingam, J., Long, L. H., & Halliwell, B. (2001). The in vitro cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide. *Antioxidants and redox signaling*, *3*(1), 157-163.
- Correa, P. J., Vargas, J. F., Sen, S., & Illanes, S. E. (2014). Prediction of gestational diabetes early in pregnancy: targeting the long-term complications. *Gynecologic and obstetric investigation*, *77*(3), 145-149.
- Costello, M. F., Shrestha, B., Eden, J., Johnson, N. P., & Sjoblom, P. (2007). Metformin versus oral contraceptive pill in polycystic ovary syndrome: a Cochrane review. *Human Reproduction*, *22*(5), 1200-1209.
- Crha, I., Hrubá, D., Ventruba, P., Fiala, J., Totusek, J., & Visnova, H. (2003). Ascorbic acid and infertility treatment. *Central European Journal of public health*, *11*(2), 63-67.
- Cui, X. L., Brockman, D., Campos, B., & Myatt, L. (2006). Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia. *Placenta*, *27*(4-5), 422-431.
- De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of andrology*, *13*(5), 379-386.
- De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1995). Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, *18*(3), 487-495.
- Defrère, S., Lousse, J. C., Gonzalez-Ramos, R., Colette, S., Donnez, J., & Van Langendonck, A. (2008). Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *Molecular human reproduction*, *14*(7), 377-385.
- Deng, C., Li, T., Xie, Y., Guo, Y., Yang, Q. Y., Liang, X., Deng, C. H., & Liu, G. H. (2019). Sperm DNA fragmentation index influences assisted reproductive technology outcome: A systematic review and meta-analysis combined with a retrospective cohort study. *Andrologia*, *51*(6), e13263.
- Deng, S. L., Sun, T. C., Yu, K., Wang, Z. P., Zhang, B. L., Zhang, Y., Wang, X. X., Lian, Z. X., & Liu, Y. X. (2017). Melatonin reduces oxidative damage and upregulates heat shock

protein 90 expression in cryopreserved human semen. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 347-354.

Donnelly, E. T., McClure, N., & Lewis, S. E. (1999). The effect of ascorbate and α -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, 14(5), 505-512.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82, 47-96

Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Halabi, J., & Tvrda, E. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(4), 509-520.

Durak, Y., Kokcu, A., Kefeli, M., Bildircin, D., Çelik, H., & Alper, T. (2013). Effect of vitamin C on the growth of experimentally induced endometriotic cysts. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 39(7), 1253-1258.

Eidan, S. M. (2016). Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender. *Animal reproduction science*, 167, 1-7.

Elbim, C. (2005). Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp*, 53, 199-206.

Elkina, Y. L., Atroshchenko, M. M., Bragina, E. E., Muronetz, V. I., & Schmalhausen, E. V. (2011). Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases sperm motility. *Biochemistry (Moscow)*, 76(2), 268-272.

Endo, T., Aten, R. F., Leykin, L., & Behrman, H. R. (1993). Hydrogen peroxide evokes antisteroidogenic and antigonadotropic actions in human granulosa luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 76(2), 337-342.

Espey, L. L. (1980). Ovulation as an inflammatory reaction—a hypothesis. *Biology of reproduction*, 22(1), 73-106.

Espino, J., Macedo, M., Lozano, G., Ortiz, Á., Rodríguez, C., Rodríguez, A. B., & Bejarano, I. (2019). Impact of melatonin supplementation in women with unexplained infertility undergoing fertility treatment. *Antioxidants*, 8(9), 338.

- Farrow, K. N., Lakshminrusimha, S., Reda, W. J., Wedgwood, S., Czech, L., Gugino, S. F., Davis J. M., Russell, J. A., & Steinhorn, R. H. (2008). Superoxide dismutase restores eNOS expression and function in resistance pulmonary arteries from neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(6), L979-L987.
- Feng, C. Q., Song, Y. B., Zou, Y. G., & Mao, X. M. (2008). Mutation of MTCYB and MTATP6 is associated with asthenospermia. *Zhonghua nan ke xue = National Journal of Andrology*, 14(4), 321-323.
- Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Shigenaga, M. K., Helbock, H. J., Jacob, R. A., & Ames, B. N. (1991). Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 11003-11006.
- Fulghesu, A. M., Ciampelli, M., Muzj, G., Belosi, C., Selvaggi, L., Ayala, G. F., & Lanzone, A. (2002). N-acetyl-cysteine treatment improves insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*, 77(6), 1128-1135.
- Galatioto, G. P., Gravina, G. L., Angelozzi, G., Sacchetti, A., Innominato, P. F., Pace, G., Ranieri, G., & Vicentini, C. (2008). May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele?. *World journal of urology*, 26(1), 97-102.
- Garrido, N., Navarro, J., Remohí, J., Simón, C., & Pellicer, A. (2000). Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Human reproduction update*, 6(1), 67-74.
- Gayatri, K., Kumar, J. S., & Kumar, B. B. (2010). Metformin and N-acetyl Cysteine in Polycystic Ovarian Syndrome—A Comparative Study. *Indian Journal of clinical medicine*, 1, 7-13.
- Geva, E., Bartoov, B., Zabludovsky, N., Lessing, J. B., Lerner-Geva, L., & Amit, A. (1996). The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. *Fertility and Sterility*, 66(3), 430-434.
- Giacone, F., Condorelli, R. A., Mongioi, L. M., Bullara, V., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2017). In vitro effects of zinc, D-aspartic acid, and coenzyme-Q10 on sperm function. *Endocrine*, 56(2), 408-415.

- Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Alvarez, J. G., Thomas Jr, A. J., & Agarwal, A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction*, *16*(9), 1922-1930.
- Goodarzi, M. O., Dumesic, D. A., Chazenbalk, G., & Azziz, R. (2011). Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature reviews endocrinology*, *7*(4), 219-231.
- Gopalakrishna, R., McNeill, T. H., Elhiani, A. A., & Gundimeda, U. (2013). Methods for studying oxidative regulation of protein kinase C. *Methods in enzymology*, *528*, 79-98.
- Greco, E., Romano, S., Iacobelli, M., Ferrero, S., Baroni, E., Minasi, M. G., Ubaldi, F., Rienzi, L., & Tesarik, J. (2005b). ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reproduction*, *20*(9), 2590-2594.
- Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., & Tesarik, J. (2005a). Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *Journal of andrology*, *26*(3), 349-353.
- Griesinger, G., Franke, K., Kinast, C., Kutzelnigg, A., Riedinger, S., Kulin, S., Kaali, S. G., & Feichtinger, W. (2002). Ascorbic acid supplement during luteal phase in IVF. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *19*(4), 164-168.
- Griveau, J. F., & Lannou, D. L. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International journal of andrology*, *20*(2), 61-69.
- Griveau, J. F., Renard, P., & Lannou, D. L. (1995). Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. *International journal of andrology*, *18*(2), 67-74.
- Grodnitskaya, E. E., & Kurtser, M. A. (2012). Homocysteine metabolism in polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, *28*(3), 186-189.
- Gualtieri, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Rizos, D., Longobardi, S., & Talevi, R. (2014). Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology*, *82*(4), 592-598.
- Guerin, P., El Mouatassim, S., & Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*, *7*(2), 175-189.

- Gupta, N. P., & Kumar, R. (2002). Lycopene therapy in idiopathic male infertility—a preliminary report. *International Urology and Nephrology*, *34*(3), 369-372.
- Guz, J., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., Zarakowska, E., Siomek, A., Szpila, A., Kotzbach, M., Kotzbach, R., & Olinski, R. (2013). Comparison of oxidative stress/DNA damage in semen and blood of fertile and infertile men. *PLoS One*, *8*(7), e68490.
- Haber, F., & Weiss, J. (1932). Über die katalyse des hydroperoxydes. *Naturwissenschaften*, *20*(51), 948-950.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA, ISBN 978-0-19-871747-8
- Hanukoglu, I. (2006). Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug metabolism reviews*, *38*(1-2), 171-196.
- Hardiman, P., Pillay, O. S., & Atiomo, W. (2003). Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *The lancet*, *361*(9371), 1810-1812.
- Hempstock, J., Jauniaux, E., Greenwold, N., & Burton, G. J. (2003). The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Human pathology*, *34*(12), 1265-1275.
- Henkel, R., Sandhu, I. S., & Agarwal, A. (2019). The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility?. *Andrologia*, *51*(1), e13162.
- Hod, M., Merlob, P., Friedman, S., Schoenfeld, A., & Ovadia, J. (1991). Gestational diabetes mellitus: a survey of perinatal complications in the 1980s. *Diabetes*, *40*(Supplement 2), 74-78.
- Hudelist, G., Czerwenka, K., Keckstein, J., Haas, C., Fink-Retter, A., Gschwantler-Kaulich, D., Kubista, E., & Singer, C. F. (2007). Expression of aromatase and estrogen sulfotransferase in eutopic and ectopic endometrium: evidence for unbalanced estradiol production in endometriosis. *Reproductive Sciences*, *14*(8), 798-805.
- Chehna-Patel, N., Warty, N., Sachdeva, G., & Khole, V. (2011). Proteolytic tailoring of the heat shock protein 70 and its implications in the pathogenesis of endometriosis. *Fertility and sterility*, *95*(5), 1560-1567.
- Chen, Q., Espey, M. G., Sun, A. Y., Pooput, C., Kirk, K. L., Krishna, M. C., Khosh, D. B., Drisko, J., & Levine, M. (2008). Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and

decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), 11105-11109.

Chi, H. J., Kim, J. H., Ryu, C. S., Lee, J. Y., Park, J. S., Chung, D. Y., Choi, S. Y., Kim, M. H., Chun, E. K., & Roh, S. I. (2008). Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 23(5), 1023-1028.

Choi, W. J., Banerjee, J., Falcone, T., Bena, J., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2007). Oxidative stress and tumor necrosis factor- α -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertility and sterility*, 88(4), 1220-1231.

Ichikawa, T., Oeda, T., Ohmori, H., & Schill, W. B. (1999). Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa. *International journal of andrology*, 22(1), 37-42.

Ikebe, S. I., Tanaka, M., Ohno, K., Sato, W., Hattori, K., Kondo, T., Mizuno, Y., & Ozawa, T. (1990). Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. *Biochemical and biophysical research communications*, 170(3), 1044-1048.

Ismail, A. M., Hamed, A. H., Saso, S., & Thabet, H. H. (2014). Adding L-carnitine to clomiphene resistant PCOS women improves the quality of ovulation and the pregnancy rate. A randomized clinical trial. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 180, 148-152.

Jauniaux, E., Watson, A. L., Hempstock, J., Bao, Y. P., Skepper, J. N., & Burton, G. J. (2000). Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: a possible factor in human early pregnancy failure. *The American journal of pathology*, 157(6), 2111-2122.

Javanmanesh, F., Kashanian, M., Rahimi, M., & Sheikhsari, N. (2016). A comparison between the effects of metformin and N-acetyl cysteine (NAC) on some metabolic and endocrine characteristics of women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 32(4), 285-289.

Jenkin, G., & Young, I. R. (2004). Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Animal reproduction science*, 82, 567-581.

- Jenkins, T. G., Aston, K. I., & Carrell, D. T. (2011). Supplementation of cryomedium with ascorbic acid–2-glucoside (AA2G) improves human sperm post-thaw motility. *Fertility and sterility*, *95*(6), 2001-2004.
- Jeulin, C., & Lewin, L. M. (1996). Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, *2*(2), 87-102.
- Kacem, O., Harzallah, M., Zedini, C., Zidi, I., Meddeb, S., Fékih, M., Saidi, H., Chaib, A., Boughizane, S., Ali, H. B., Bibi, M., Saad, A., Khairi, H., & Ajina, M. (2014). Beneficial effect of an oral antioxidant supplementation (Fertimax2) on IVF-ICSI outcomes: a preliminary clinical study. *Advances in Reproductive Sciences*, *2*, 47-56.
- Kalhari, Z., Mehranjani, M. S., Azadbakht, M., & Shariatzadeh, M. A. (2019). L-Carnitine improves endocrine function and folliculogenesis by reducing inflammation, oxidative stress and apoptosis in mice following induction of polycystic ovary syndrome. *Reproduction, Fertility and Development*, *31*(2), 282-293.
- Kao, L. C., Germeyer, A., Tulac, S., Lobo, S., Yang, J. P., Taylor, R. N., Osteen, K., Lessey, B. A., & Giudice, L. C. (2003). Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology*, *144*(7), 2870-2881.
- Karadeniz, M., Erdoğan, M., Tamsel, S., Zengi, A., Alper, G. E., Çağlayan, O., Saygılı, F., & Yılmaz, C. (2008). Oxidative stress markers in young patients with polycystic ovary syndrome, the relationship between insulin resistances. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, *116*(04), 231-235.
- Karube-Harada, A., Sugino, N., Kashida, S., Takiguchi, S., Takayama, H., Yamagata, Y., Nakamura, Y., & Kato, H. (2001). Induction of manganese superoxide dismutase by tumour necrosis factor- α in human endometrial stromal cells. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, *7*(11), 1065-1072.
- Kasterstein, E., Strassburger, D., Komarovsky, D., Bern, O., Komsky, A., Raziel, A., Friedler, S., & Ron-El, R. (2013). The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *30*(8), 1073-1079.
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, *149*(1), 43-50.

Keskes-Ammar, L., Feki-Chakroun, N., Rebai, T., Sahnoun, Z., Ghazzi, H., Hammami, S., Zghal, K., Fki, H., Damak, J. & Bahloul, A. (2003). Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Archives of andrology*, 49(2), 83-94.

Kessopoulou, E., Powers, H. J., Sharma, K. K., Pearson, M. J., Russell, J. M., Cooke, I. D., & Barratt, C. L. (1995). A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertility and Sterility*, 64(4), 825-831.

Khan, K. N., Kitajima, M., Imamura, T., Hiraki, K., Fujishita, A., Sekine, I., Ishimaru, T., & Masuzaki, H. (2008). Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriosis by human heat-shock protein 70. *Human reproduction*, 23(10), 2210-2219.

Kim, M. K., Park, E. A., Kim, H. J., Choi, W. Y., Cho, J. H., Lee, W. S., Cha, K. Y., Kim, Y. S., Lee, D. R., & Yoon, T. K. (2013). Does supplementation of in-vitro culture medium with melatonin improve IVF outcome in PCOS?. *Reproductive biomedicine online*, 26(1), 22-29.

Kitagawa, Y., Suzuki, K., Yoneda, A., & Watanabe, T. (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 62(7), 1186-1197.

Kittnar, O. (2020). *Lékařská fyziologie* (2., přepracované a doplněné vydání). Grada Publishing, ISBN: 978-80-247-3068-4

Klebanov, G. I., Kapitanov, A. B., Teselkin, Y. O., Babenkova, I. V., Zhambalova, B. A., Lyubitsky, O. B., Nesterova, O. A., Vasil'eva, O. V., Popov, I. N., Lewin, G., & Vladimirov, Y. A. (1998). The antioxidant properties of lycopene. *Membrane & cell biology*, 12(2), 287-300.

Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(8), 3199-3207.

Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 333-343.

- Landino, L. M., Iwig, J. S., Kennett, K. L., & Moynihan, K. L. (2004). Repair of peroxynitrite damage to tubulin by the thioredoxin reductase system. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(4), 497-506.
- Lenzi, A., Lombardo, F., Sgrò, P., Salacone, P., Caponecchia, L., Dondero, F., & Gandini, L. (2003). Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertility and sterility*, 79(2), 292-300.
- Lewis, S. E. M., Sterling, E. S. L., Young, I. S., & Thompson, W. (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and sterility*, 67(1), 142-147.
- Li, M. W., & Lloyd, K. K. (2020). DNA fragmentation index (DFI) as a measure of sperm quality and fertility in mice. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
- Li, R., Liu, Y., Pedersen, H. S., & Callesen, H. (2015). Effect of ambient light exposure of media and embryos on development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos. *Zygote*, 23(3), 378.
- Li, Z., Lin, Q., Liu, R., Xiao, W., & Liu, W. (2010). Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *Journal of andrology*, 31(5), 437-444.
- Lim, K. H., Zhou, Y., Janatpour, M., McMaster, M., Bass, K., Chun, S. H., & Fisher, S. J. (1997). Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *The American journal of pathology*, 151(6), 1809.
- Liu, A. X., Jin, F., Zhang, W. W., Zhou, T. H., Zhou, C. Y., Yao, W. M., Qian, Y. L., & Huang, H. F. (2006). Proteomic analysis on the alteration of protein expression in the placental villous tissue of early pregnancy loss. *Biology of reproduction*, 75(3), 414-420.
- Lobascio, A. M., De Felici, M., Anibaldi, M., Greco, P., Minasi, M. G., & Greco, E. (2015). Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology*, 3(2), 265-270.
- Loschen, G., & Flohe, L. (1971). Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS letters*, 18(2), 261-264.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., & Flohé, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS letters*, 42(1), 68-72.

- Loukides, J. A., Loy, R. A., Edwards, R., Honig, J., Visintin, I., & Polan, M. L. (1990). Human follicular fluids contain tissue macrophages. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *71*(5), 1363-1367.
- Lund, S. A., Murdoch, J., Van Kirk, E. A., & Murdoch, W. J. (1999). Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. *Biology of reproduction*, *61*(2), 388-392.
- Luo, L., Chen, H., Trush, M. A., Show, M. D., Anway, M. D., & Zirkin, B. R. (2006). Aging and the brown Norway rat leydig cell antioxidant defense system. *Journal of andrology*, *27*(2), 240-247.
- Macer, M. L., & Taylor, H. S. (2012). Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, *39*(4), 535-549.
- Maged, A. M., Elsayah, H., Abdelhafez, A., Bakry, A., & Mostafa, W. A. (2015). The adjuvant effect of metformin and N-acetylcysteine to clomiphene citrate in induction of ovulation in patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Gynecological endocrinology*, *31*(8), 635-638.
- Maneesh, M., Dutta, S., Chakrabarti, A., & Vasudevan, D. M. (2006). Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian journal of physiology and pharmacology*, *50*(3), 291.
- Manjunatha, B. M., Devaraj, M., Gupta, P. S. P., Ravindra, J. P., & Nandi, S. (2009). Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, *44*(1), 12-16.
- Mansour, G., Aziz, N., Sharma, R., Falcone, T., Goldberg, J., & Agarwal, A. (2009). The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. *Fertility and sterility*, *92*(1), 61-67.
- Many, A., Hubel, C. A., Fisher, S. J., Roberts, J. M., & Zhou, Y. (2000). Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *The American journal of pathology*, *156*(1), 321-331.
- Masumoto, N., Tasaka, K., Miyake, A., & Tanizawa, O. (1990). Superoxide anion increases intracellular free calcium in human myometrial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(36), 22533-22536.

- Matorras, R., Pérez-Sanz, J., Corcóstegui, B., Pérez-Ruiz, I., Malaina, I., Quevedo, S., Aspichueta, F., Crisol, L., Martínez-Indart, L., Prieto, B., & Expósito, A. (2020). Effect of vitamin E administered to men in infertile couples on sperm and assisted reproduction outcomes: a double-blind randomized study. *F&S Reports*, *1*(3), 219-226.
- Matos, L., Stevenson, D., Gomes, F., Silva-Carvalho, J. L., & Almeida, H. (2009). Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Molecular human reproduction*, *15*(7), 411-419.
- Matsubara, K., Matsubara, Y., Hyodo, S., Katayama, T., & Ito, M. (2010). Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *36*(2), 239-247.
- Ménézo, Y. J., Hazout, A., Panteix, G., Robert, F., Rollet, J., Cohen-Bacrie, P., Chapuis, F., Clément, P., & Benkhalifa, M. (2007). Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reproductive biomedicine online*, *14*(4), 418-421.
- Meziani, F., Tesse, A., David, E., Martinez, M. C., Wangesteen, R., Schneider, F., & Andriantsitohaina, R. (2006). Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility. *The American journal of pathology*, *169*(4), 1473-1483.
- Micic, S., Lalic, N., Djordjevic, D., Bojanic, N., Bogavac-Stanojevic, N., Busetto, G. M., Virmani, A., & Agarwal, A. (2019). Double-blind, randomised, placebo-controlled trial on the effect of L-carnitine and L-acetylcarnitine on sperm parameters in men with idiopathic oligoasthenozoospermia. *Andrologia*, *51*(6), e13267.
- Mier-Cabrera, J., Jiménez-Zamudio, L., García-Latorre, E., Cruz-Orozco, O., & Hernández-Guerrero, C. (2011). Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *118*(1), 6-16.
- Mier-Cabrera, J., Aburto-Soto, T., Burrola-Méndez, S., Jiménez-Zamudio, L., Tolentino, M. C., Casanueva, E., & Hernández-Guerrero, C. (2009). Women with endometriosis improved their peripheral antioxidant markers after the application of a high antioxidant diet. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *7*(1), 1-11.

- Miszkiel, G., Skarzynski, D., Bogacki, M., & Kotwica, J. (1999). Concentrations of catecholamines, ascorbic acid, progesterone and oxytocin in the corpora lutea of cyclic and pregnant cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 39(4), 509-516.
- Miyazaki, T., Sueoka, K., Dharmarajan, A. M., Atlas, S. J., Bulkley, G. B., & Wallach, E. E. (1991). Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *Reproduction*, 91(1), 207-212.
- Miyazaki, T., Kuo, T. C., Dharmarajan, A. M., Atlas, S. J., & Wallach, E. E. (1989). In vivo administration of allopurinol affects ovulation and early embryonic development in rabbits. *American journal of obstetrics and gynecology*, 161(6), 1709-1714.
- Moslemi, M. K., & Tavanbakhsh, S. (2011). Selenium–vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *International journal of general medicine*, 4, 99.
- Mupfiga, C., Fisher, D., Kruger, T., & Henkel, R. (2013). The relationship between seminal leukocytes, oxidative status in the ejaculate, and apoptotic markers in human spermatozoa. *Systems biology in reproductive medicine*, 59(6), 304-311.
- Murphy, S. R., LaMarca, B. B. D., Parrish, M., Cockrell, K., & Granger, J. P. (2013). Control of soluble fms-like tyrosine-1 (sFlt-1) production response to placental ischemia/hypoxia: role of tumor necrosis factor- α . *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(2), R130-R135.
- Myatt, L., Brewer, A., & Brockman, D. E. (1991). The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation. *American journal of obstetrics and gynecology*, 164(2), 687-692.
- Nadjarzadeh, A., Shidfar, F., Amirjannati, N., Vafa, M. R., Motevalian, S. A., Gohari, M. R., Nazeri Kakhki, S. A., Akhondi, M. M., & Sadeghi, M. R. (2014). Effect of Coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. *Andrologia*, 46(2), 177-183.
- Nakamura, T., & Sakamoto, K. (2001). Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 284(1), 203-210.

- Nemati, M., Nemati, S., Taheri, A. M., & Heidari, B. (2017). Comparison of metformin and N-acetyl cysteine, as an adjuvant to clomiphene citrate, in clomiphene-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 46(7), 579-585.
- Novembri, R., Luisi, S., Carrarelli, P., Ciani, V., de Pascalis, F., & Petraglia, F. (2011). Omega 3 fatty acids counteract IL-8 and prostaglandin E2 secretion induced by TNF- α in cultured endometrial stromal cells. *Journal of Endometriosis*, 3(1), 34-39.
- Olson, S. E., & Seidel Jr, G. E. (2000). Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biology of Reproduction*, 62(2), 248-252.
- Omu, A. E., Al-Azemi, M. K., Kehinde, E. O., Anim, J. T., Oriowo, M. A., & Mathew, T. C. (2008). Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Medical Principles and Practice*, 17(2), 108-116.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 143-183.
- Orsi, N. M., & Leese, H. J. (2001). Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 59(1), 44-53.
- Oyawoye, O., Abdel Gadir, A., Garner, A., Constantinovici, N., Perrett, C., & Hardiman, P. (2003). Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Human reproduction*, 18(11), 2270-2274.
- Pacchiarotti, A., Mohamed, M. A., Micara, G., Linari, A., Tranquilli, D., Espinola, S. B., & Aragona, C. (2007). The possible role of hyperhomocysteinemia on IVF outcome. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 24(10), 459-462.
- Peltier, M., Tee, S., & Smulian, J. (2006). Does progesterone lower innate immunity to pathogens associated with preterm birth?. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 195(6), S69.

- Pereira, R. D., De Long, N. E., Wang, R. C., Yazdi, F. T., Holloway, A. C., & Raha, S. (2015). Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling. *BioMed research international*, 2015.
- Pierce, G. B., Parchment, R. E., & Lewellyn, A. L. (1991). Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation*, 46(3), 181-186.
- Pizzo, A., Salmeri, F. M., Ardita, F. V., Sofo, V., Tripepi, M., & Marsico, S. (2002). Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecologic and obstetric investigation*, 54(2), 82-87.
- Polak, G., Rola, R., Gogacz, M., Koziół-Montewka, M., & Kotarski, J. (1999). Malonyldialdehyde and total antioxidant status in the peritoneal fluid of infertile women. *Ginekologia polska*, 70(3), 135-140.
- Potts, R. J., Notarianni, L. J., & Jefferies, T. M. (2000). Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 447(2), 249-256.
- Racek, J., & Holeček, V. (1999). Enzymy a volné radikály. *Chemické listy*, 93, 774-780.
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4003-4008.
- Redman, C. W. G. (1991). Pre-eclampsia and the placenta. *Placenta*, 12(4), 301-308.
- Rengan, A. K., Agarwal, A., van der Linde, M., & du Plessis, S. S. (2012). An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 1-8.
- Rinaudo, P. F., Giritharan, G., Talbi, S., Dobson, A. T., & Schultz, R. M. (2006). Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertility and sterility*, 86(4), 1252-1265.
- Rizzo, A., Roscino, M. T., Binetti, F., & Sciorsci, R. L. (2012). Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2), 344-352.
- Romero, S., Pella, R., Zorrilla, I., Berrío, P., Escudero, F., Pérez, Y., García, M., Gonzalez, C., & Orihuela, P. (2020). Coenzyme Q10 improves the in vitro maturation of oocytes exposed to

the intrafollicular environment of patients on fertility treatment. *JBRA assisted reproduction*, 24(3), 283.

Rong, R., Ramachandran, S., Santanam, N., Murphy, A. A., & Parthasarathy, S. (2002). Induction of monocyte chemotactic protein-1 in peritoneal mesothelial and endometrial cells by oxidized low-density lipoprotein and peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertility and sterility*, 78(4), 843-848.

Ross, C., Morriss, A., Khairy, M., Khalaf, Y., Braude, P., Coomarasamy, A., & El-Toukhy, T. (2010). A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 20(6), 711-723.

Rossi, T., Mazzilli, F., Delfino, M., & Dondero, F. (2001). Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. *Cell and tissue banking*, 2(1), 9-13.

Rousseaux, J., & Rousseaux-Prevost, R. (1995). Molecular localization of free thiols in human sperm chromatin. *Biology of reproduction*, 52(5), 1066-1072.

Rumbold, A., Duley, L., Crowther, C. A., & Haslam, R. R. (2008). Antioxidants for preventing pre-eclampsia. *Cochrane database of systematic reviews*, (1).

Sabatini, L., Wilson, C., Lower, A., Al-Shawaf, T., & Grudzinkas, J. G. (1999). Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 72(6), 1027-1034.

Safarinejad, M. R., Safarinejad, S., Shafiei, N., & Safarinejad, S. (2012). Effects of the reduced form of coenzyme Q10 (ubiquinol) on semen parameters in men with idiopathic infertility: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *The Journal of urology*, 188(2), 526-531.

Safarinejad, M. R., & Safarinejad, S. (2009). Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *The Journal of urology*, 181(2), 741-751.

Said, T. M., Aziz, N., Sharma, R. K., Lewis-Jones, I., Thomas Jr, A. J., & Agarwal, A. (2005). Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian journal of andrology*, 7(2), 121-126.

- Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Nelson, D. R., & Thomas Jr, A. J. (2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertility and sterility*, 78(3), 491-499.
- Salomon, T. B., Hackenhaar, F. S., Almeida, A. C., Schüller, A. K., Alabarse, P. V. G., Ehrenbrink, G., & Benfato, M. S. (2013). Oxidative stress in testis of animals during aging with and without reproductive activity. *Experimental gerontology*, 48(9), 940-946.
- Samimi, M., Jamilian, M., Ebrahimi, F. A., Rahimi, M., Tajbakhsh, B., & Asemi, Z. (2016). Oral carnitine supplementation reduces body weight and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical endocrinology*, 84(6), 851-857.
- Sánchez-Aranguren, L. C., Prada, C. E., Riaño-Medina, C. E., & Lopez, M. (2014). Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Frontiers in physiology*, 5, 372.
- Santanam, N., Kavtaradze, N., Murphy, A., Dominguez, C., & Parthasarathy, S. (2013). Antioxidant supplementation reduces endometriosis-related pelvic pain in humans. *Translational Research*, 161(3), 189-195.
- Saowaros, W., & Panyim, S. (1979). The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia*, 35(2), 191-192.
- Sawyer, D. E., Mercer, B. G., Wiklendt, A. M., & Aitken, R. J. (2003). Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 529(1-2), 21-34.
- Seino, T., Saito, H., Kaneko, T., Takahashi, T., Kawachiya, S., & Kurachi, H. (2002). Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertility and sterility*, 77(6), 1184-1190.
- Seligman, S. P., Buyon, J. P., Clancy, R. M., Young, B. K., & Abramson, S. B. (1994). The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 171(4), 944-948.
- Setji, T. L., Holland, N. D., Sanders, L. L., Pereira, K. C., Diehl, A. M., & Brown, A. J. (2006). Nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic fatty liver disease in young women with

polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(5), 1741-1747.

Shah, B. R., Retnakaran, R., & Booth, G. L. (2008). Increased risk of cardiovascular disease in young women following gestational diabetes mellitus. *Diabetes care*, 31(8), 1668-1669.

Shekarriz, M., DeWire, D. M., Thomas Jr, A. J., & Agarwal, A. (1995). A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *European urology*, 28, 31-31.

Shiotani, M., Noda, Y., Narimoto, K., Imai, K., Takahide, M., Fujimoto, K., & Ogawa, K. (1991). Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Human reproduction*, 6(10), 1349-1353.

Shirai, F., Kawaguchi, M., Yutsudo, M., & Dohi, Y. (2002). Human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes at the ovulatory period are in an activated state. *Molecular and cellular endocrinology*, 196(1-2), 21-28.

Silva, A. N., & Lima, L. C. F. (2015). The association between physical exercise and Reactive Oxygen Species (ROS) production. *Journal of Sports Medicine & Doping Studies*, 5, 1-7.

Silver, E. W., Eskenazi, B., Evenson, D. P., Block, G., Young, S., & Wyrobek, A. J. (2005). Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *Journal of andrology*, 26(4), 550-556.

Silverman, B. L., Rizzo, T., Green, O. C., Cho, N. H., Winter, R. J., Ogata, E. S., Richards, G. E., & Metzger, B. E. (1991). Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes*, 40(Supplement 2), 121-125.

Simon, L., Proutski, I., Stevenson, M., Jennings, D., McManus, J., Lutton, D., & Lewis, S. E. M. (2013). Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reproductive biomedicine online*, 26(1), 68-78.

Singh, U., Nicholson, G., Urban, B. C., Sargent, I. L., Kishore, U., & Bernal, A. L. (2005). Immunological properties of human decidual macrophages—a possible role in intrauterine immunity. *Reproduction*, 129(5), 631-637.

Smith, S., Pfeifer, S. M., & Collins, J. A. (2003). Diagnosis and management of female infertility. *Jama*, 290(13), 1767-1770.

- Sohal, R. S., & Sohal, B. H. (1991). Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mechanisms of ageing and development*, 57(2), 187-202.
- Sohal, R. S., Arnold, L. A., & Sohal, B. H. (1990). Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 495-500.
- Stratil, P., & Kubáň, V. (2018). *Reaktivní kyslíkové radikály, přírodní antioxidanty a jejich zdravotní účinky*. 2 THETA. ISBN 978-80-86380-91-9.
- Succu, S., Berlinguer, F., Pasciu, V., Satta, V., Leoni, G. G., & Naitana, S. (2011). Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *Journal of pineal research*, 50(3), 310-318.
- Sugino, N. (2007). The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. *Placenta*, 28, S133-S136.
- Sugino, N., Shimamura, K., Takiguchi, S., Tamura, H., Ono, M., Nakata, M., Nakamura, Y., Ogino, K., Uda, T., & Kato, H. (1996b). Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Human Reproduction*, 11(5), 1073-1078.
- Sugino, N., Shimamura, K., Tamura, H., Ono, M., Nakamura, Y., Ogino, K., & Kato, H. (1996a). Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinology*, 137(2), 749-754.
- Sugino, N., Nakamura, Y., Okuno, N., Ishimatu, M., Teyama, T., & Kato, H. (1993). Effects of ovarian ischemia-reperfusion on luteal function in pregnant rats. *Biology of reproduction*, 49(2), 354-358.
- Sugino, N., Karube-Harada, A., Kashida, S., Takiguchi, S., & Kato, H. (2001). Reactive oxygen species stimulate prostaglandin F₂ α production in human endometrial stromal cells in vitro. *Human reproduction*, 16(9), 1797-1801.
- Sugino, N., Takiguchi, S., Kashida, S., Karube, A., Nakamura, Y., & Kato, H. (2000). Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Molecular human reproduction*, 6(1), 19-25.
- Sugino, N., Takiguchi, S., Kashida, S., Takayama, H., Yamagata, Y., Nakamura, Y., & Kato, H. (1999). Suppression of intracellular superoxide dismutase activity by antisense

oligonucleotides causes inhibition of progesterone production by rat luteal cells. *Biology of reproduction*, 61(4), 1133-1138.

Sugino, N., Karube-Harada, A., Taketani, T., Sakata, A., & Nakamura, Y. (2004). Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F₂ α production through nuclear factor- κ B activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. *Journal of Reproduction and Development*, 50(2), 215-225.

Sugino, N. (2005). Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reproductive medicine and biology*, 4(1), 31-44.

Suleiman, S. A., Ali, M. E., Zaki, Z. M. S., El-Malik, E. M. A., & Nasr, M. A. (1996). Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of andrology*, 17(5), 530-537.

Szczepańska, M., Koźlik, J., Skrzypczak, J., & Mikołajczyk, M. (2003). Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertility and sterility*, 79(6), 1288-1293.

Štípek, S. (2000). *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Grada. ISBN 80-716-9704-4.

Takami, M., Preston, S. L., Toyloy, V. A., & Behrman, H. R. (1999). Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 276(4), E684-E688.

Takenaka, M., Horiuchi, T., & Yanagimachi, R. (2007). Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36), 14289-14293.

Takiguchi, S., Sugino, N., Kashida, S., Yamagata, Y., Nakamura, Y., & Kato, H. (2000). Rescue of the corpus luteum and an increase in luteal superoxide dismutase expression induced by placental luteotropins in the rat: action of testosterone without conversion to estrogen. *Biology of reproduction*, 62(2), 398-403.

Talebi, A. R., Sarcheshmeh, A. A., Khalili, M. A., & Tabibnejad, N. (2011). Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol*, 45(4), 403-409.

Talevi, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Longobardi, S., & Gualtieri, R. (2013). Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human

sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 1-10.

Tames, F. J., Mackness, M. I., Arrol, S., Laing, I., & Durrington, P. N. (1992). Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis*, 93(3), 237-244.

Tamura, H., Takasaki, A., Nakamura, Y., Numa, F., & Sugino, N. (2014). A pilot study to search possible mechanisms of ultralong gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in IVF-ET patients with endometriosis. *Journal of ovarian research*, 7(1), 1-6.

Tanaka, M., Miyazaki, T., Tanigaki, S., Kasai, K., Minegishi, K., Miyakoshi, K., Ishimoto, H., & Yoshimura, Y. (2000). Participation of reactive oxygen species in PGF₂α-induced apoptosis in rat luteal cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120(2), 239-245.

Tareq, K. M. A., Akter, Q. S., Khandoker, M. A. M. Y., & Tsujii, H. (2012). Selenium and vitamin E improve the in vitro maturation, fertilization and culture to blastocyst of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*.

Tarin, J. J., Vendrell, F. J., Ten, J., Blanes, R., Van Blerkom, J., & Cano, A. (1996). The oxidizing agent tertiary butyl hydroperoxide induces disturbances in spindle organization, c-meiosis, and aneuploidy in mouse oocytes. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2(12), 895-901.

Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., & Burton, P. (2009). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive biomedicine online*, 18(2), 184-189.

Teede, H. J., Harrison, C. L., Teh, W. T., Paul, E., & Allan, C. A. (2011). Gestational diabetes: development of an early risk prediction tool to facilitate opportunities for prevention. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 51(6), 499-504.

Teissier, M. P., Chable, H., Paulhac, S., & Aubard, Y. (2000). Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. *Human Reproduction*, 15(12), 2471-2477.

- Telleria, C. M., Ou, J., Sugino, N., Ferguson, S., & Gibori, G. (1998). The expression of interleukin-6 in the pregnant rat corpus luteum and its regulation by progesterone and glucocorticoid. *Endocrinology*, *139*(8), 3597-3605.
- Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Zieschang, J. A., & Clark, A. M. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, *24*(9), 2061-2070.
- Tilly, J. L., & Tilly, K. I. (1995). Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, *136*(1), 242-252.
- Tsai-Turton, M., & Luderer, U. (2006). Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles. *Endocrinology*, *147*(3), 1224-1236.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., & Flohé, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, *285*(5432), 1393-1396.
- Verma, A., & Kanwar, K. C. (1998). Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: an in vitro analysis. *Andrologia*, *30*(6), 325-329.
- Vignini, A., Nanetti, L., Buldreghini, E., Moroni, C., Ricciardo-Lamonica, G., Mantero, F., Boscaro, M., Mazzanti, L., & Balercia, G. (2006). The production of peroxynitrite by human spermatozoa may affect sperm motility through the formation of protein nitrotyrosine. *Fertility and sterility*, *85*(4), 947-953.
- Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., & Diekman, A. B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of reproductive immunology*, *53*(1-2), 133-150.
- Wang, X., Falcone, T., Attaran, M., Goldberg, J. M., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2002). Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and sterility*, *78*(6), 1272-1277.
- Wang, X., & Robinson, P. J. (1997). Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *Journal of neurochemistry*, *68*(2), 443-456.

- Wang, Y., Sharma, R. K., Falcone, T., Goldberg, J., & Agarwal, A. (1997). Importance portance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertility and Sterility*, 68(5), 826-830.
- Warner, B. B., Stuart, L., Gebb, S., & Wispé, J. R. (1996). Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 271(1), L150-L158.
- Watson, A. L., Skepper, J. N., Jauniaux, E., & Burton, G. J. (1998). Susceptibility of human placental syncytiotrophoblastic mitochondria to oxygen-mediated damage in relation to gestational age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(5), 1697-1705.
- Webster, R. P., Brockman, D., & Myatt, L. (2006). Nitration of p38 MAPK in the placenta: association of nitration with reduced catalytic activity of p38 MAPK in pre-eclampsia. *Molecular human reproduction*, 12(11), 677-685.
- Weiss, N. (2005). Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Current drug metabolism*, 6(1), 27-36.
- Weiss, S. J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *New England Journal of Medicine*, 320(6), 365-376.
- Will, M. A., Clark, N. A., & Swain, J. E. (2011). Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(8), 711-724.
- Wirleitner, B., Vanderzwalmen, P., Stecher, A., Spitzer, D., Schuff, M., Schwerda, D., Bach, M., Schechinger, B., & Zech, N. H. (2012). Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility, sperm count, and nuclear vacuolization. *Int J Vitam Nutr Res*, 82(6), 391-398.
- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I. M., Tieleman, D. P., & Monticelli, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophysical journal*, 93(12), 4225-4236.
- Yamada, K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., & Matthews, R. G. (2005). Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(30), 10454-10459.
- Yamaguchi, K., Mandai, M., Toyokuni, S., Hamanishi, J., Higuchi, T., Takakura, K., & Fujii, S. (2008). Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a

possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clinical Cancer Research*, 14(1), 32-40.

Yeoman, R. R., Jones, W. D., & Rizk, B. M. (1998). Evidence for nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. *Journal of andrology*, 19(1), 58-64.

Young, S. S., Eskenazi, B., Marchetti, F. M., Block, G., & Wyrobek, A. J. (2008). The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. *Human reproduction*, 23(5), 1014-1022.

Yousefian, I., Emamverdi, M., Karamzadeh-Dehaghani, A., Sabzian-Melei, R., Zhandi, M., & Zare-Shahneh, A. (2018). Attenuation of cryopreservation-induced oxidative stress by antioxidant: impact of Coenzyme Q10 on the quality of post-thawed buck spermatozoa. *Cryobiology*, 81, 88-93.

Zeller, J. M., Henig, I., Radwanska, E., & Dmowski, W. P. (1987). Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *American journal of reproductive immunology and microbiology*, 13(3), 78-82.

Zini, A., Kamal, K. M., & Phang, D. (2001). Free thiols in human spermatozoa: correlation with sperm DNA integrity. *Urology*, 58(1), 80-84.

Zribi, N., Chakroun, N. F., El Euch, H., Gargouri, J., Bahloul, A., & Keskes, L. A. (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and sterility*, 93(1), 159-166.