

DERLEME

Oksidan ve antioksidan sistemlerin kadın fertilitésine etkileri The effects of oxidants and antioxidants parameters on female fertility

Esra Nur Tola

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Isparta, Türkiye.

Özet

Organizmada fizyolojik süreçte önemi olan oksidan ve antioksidan sistemlerin kadın reproduktivitesi üzerinde pek çok rolleri gösterilmiştir. Oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin oksidan parametreler lehine bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres kadınlarda infertilite etyopatogenezinde önemli rol oynar. Polikistik over sendromu, endometriozis ve açıklanamayan infertilite gibi reproduktif hastalıkların oluşmasında oksidatif stresin rol aldığı gösterilmiştir. Bu derlemede reaktif oksijen radikallerinin kadın reproduktivitesindeki fizyolojik ve patolojik etkilerini ve in vitro fertilizasyon yöntemlerinde fertilizasyon başarısına olan etkilerini son literatür bilgileri ışığında sunacağız. Antioksidan desteği serbest radikal üretimini kontrol altına alarak infertilite ile ilgili reproduktif hastalıkların tedavisinde etkili olabilir. Aynı şekilde in vitro fertilizasyon yöntemlerinde kültür mediumlarına antioksidan desteği bu yöntemlerin başarısını arttırmada kullanılabilir. Oksidatif stresin kadın fertilitésine olan etkilerinin daha iyi anlaşılması için randomize kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres; kadın infertilitesi; in vitro fertilizasyon.

Abstract

It has been demonstrated that many effects of oxidants and antioxidant systems which have essential roles in physiological processes on female reproductivity. Oxidative stress that is defined as an imbalance between oxidant and antioxidant systems has been identified to play an important role in female infertility. Oxidative stress can lead to a number of reproductive diseases such as polycystic ovary syndrome, endometriosis and unexplained infertility. This article will review the current literature on the physiologic and pathological effects of reactive oxygen species in the female reproductive system and its effects on the success of in vitro fertilization methods. Antioxidant supplementation may be effective in the treatment of the reproductive disease by controlling the production of the free radicals. Furthermore, antioxidant supplementation of in vitro fertilization culture media can increase the likelihood for the success. Future randomized controlled clinical trials are necessary to understand the effects of oxidative stress in female fertility.

Keywords: Oxidative stress; female infertility; in vitro fertilization.

Giriş

Organizmada fizyolojik şartlarda oluşabilen ve yüksek derecede reaktif, stabil olmayan moleküller olan serbest radikallerin oluşması ve bunların antioksidan sistemler tarafından kaldırılma hızı denge içindedir. Bu denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Oksidatif stres (OS) bu dengenin serbest radikaller lehine bozulması olarak tanımlanır (1). Fizyolojik düzeyde, serbest radikallerin folikülogenez, oosit maturasyonu, ovulasyon, implantasyon ve embriyo gelişiminde önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Fazla miktarda serbest radikal üretiminin ise kadın fertilitési üzerine olumsuz etkileri gösterilmiştir (1). Polikistik over sendromu, endometriozis ve açıklanamayan infertilite etyopatogenezinde aşırı serbest radikal üretiminin olduğu kanıtlanmıştır. Buradan yola çıkarak infertil hastalara antioksidan maddelerin oral veya intravenöz olarak verilmesi ya da in vitro fertilizasyona (IVF) giden hastaların kültür mediumlarına antioksidan maddelerin eklenmesi fertilité oranlarını ve IVF başarısını artırabilir.

Serbest radikaller

Serbest radikaller fizyolojik şartlarda hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşabilen yüksek derecede reaktif, stabil olmayan moleküllerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan reaktif oksijen türleridir (2). Reaktif oksijen türleri (ROT), oksijenin tüketimi sırasındaki tepkimeler sürecinde oluşur (3). Başlıca ROT'lar süperoksit radikali (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalidir (OH⁻).

Serbest radikaller fazla miktarda olduğu zaman proteinlerde, nükleik asitlerde hasara yol açar. Lipidlerde peroksidasyona neden olarak hücre fonksiyonları bozarlar. Lipid peroksitleri malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşür.

Antioksidan mekanizmalar

Vücutta endojen veya eksojen yol ile oluşan ROT'ları ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Antioksidanlar eksojen ve endojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılır.

Başlıca endojen antioksidanlar:

Süperoksit Dismutaz (SOD) ile O₂⁻, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşür. İnsan hücrelerinde 3 çeşit SOD tanımlanmıştır (3). Bakır ve çinko iyonu içeren SOD (CuZn-SOD), manganez iyonu içeren SOD (Mn-SOD), ekstraselüler SOD (EC-SOD).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) H₂O₂ ve yağ asidi peroksitlerinin (ROOH-) indirgenmesinde rol oynar. Selenyum bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki çeşit GSH-Px bulunur.

Glutasyon (GSH), GSH-Px, glutasyon redüktaz (GSH-R), GSH transferaz enzimlerinin kofaktörüdür. GSH-Px enzimi ROOH'ları ve H₂O₂'i metabolize ederken GSH okside olur ve okside GSH (GSSG) oluşur. GSSG hücrelere toksiktir ve GSH-R enzimi aracılığı ile GSH'a indirgenir ve böylece hücrede GSH/GSSG oranı sabit tutulmaya çalışılır (4). GSH/GSSG oranı, iyi bir oksidatif stres göstergesidir (5, 6) GSH, oosit ve embriyolarda bulunan major enzimatik antioksidandır (7). Zigotun morula ve blastokist aşamasına gelmesinde önemli rolleri vardır (8).

Sistein ve sisteamin, oositin GSH içeriğini artırır (7). Taurin, hipotaurin ve transferin tubal ve foliküler sıvıda bulunur ve embriyoyu OS'den korur (9).

Oksidatif stresin kadın fertilitesindeki rolü

ROT'ların ve antioksidanların kadın üreme sisteminde folikülogenez, oosit maturasyonu, luteal regresyon, ovulasyon, fertilizasyon, yaşa bağlı fertilitede azalmada ve embriyo gelişimi gibi fizyolojik süreçlerde rolleri vardır (10).

Folikülogenez ve oksidatif stres

Reproduktif dönemin başlangıcında her kadının overlerinde toplam 400-500 bin tane primordial folikül bulunur. Primordial folikül mayoz I profaz aşamasında primer oosit ve etrafında granuloza hücrelerinden oluşur. Her siklusta büyümeye başlayan yaklaşık 10-15 tane primordial folikülden sadece bir tanesi mayoz I'i tamamlayarak dominans kazanır ve folikül gelişimini tamamlar. Mayoz I'e ilerlemenin ROT'lardaki artma ve antioksidanlardaki inhibisyonla ile başlatılması (11-13) preovuluar ROT üretimini düzenlenmesinin ovuluar süreçte önemli olduğunu gösterir. Siklik ROT üretimi otoimmün prematür overyan yetmezlikle ilişkilendirilen ooforite katkıda bulunabilir (11). Fertilizasyon süreci ile mayoz II'ye ilerleme ise antioksidan sistemler tarafından başlatılır (11).

Büyüyen foliküllerde steroid üretiminde artma sitokrom p450 sisteminde artışa bu da ROT oluşumuna (özellikle H₂O₂) neden olur (14). Folikülde oluşan ROT'lar folikülün apoptozisini indüklerken GSH ve folikül stimulan hormon antiapoptotik aktivite gösterir. Transferrin, demir bağlayan bir proteindir ve fenton reaksiyonunu engelleyerek OH- oluşumunu azaltır. Briggs ve ark.transferrin ve reseptörlerinin granuloza hücrelerinde olduğunu ve matur foliküllerde daha fazla olduğunu göstermişler (15). Foliküler gelişim sırasında oluşan hipoksi, foliküler anjiogenezi stimule eder. Anjiogenez foliküler gelişim için önemlidir. ROT'lar anjiogenetik cevapta sinyal iletilici veya intraselüler mesajcılar olarak rol alır. Basini ve ark. hipoksinin granuloza hücrelerinde ROT üretimini module etmesini değerlendirmiş hipoksik ve anoksik ortamlarda ROT

üretimini azaldığını, SOD ve peroksidaz üretimini arttığını bulmuşlardır. Katalaz da ise değişiklik saptamamışlardır (16).

Oosit maturasyonu ve oksidatif stres

Oosit gelişmesinde CuZn-SOD enziminin germinal vezikül ve metafaz II aşamasında, GSH-Px ve Mn-SOD enzimlerinin ise sadece metafaz II aşamasında olması savunma mekanizmalarının oosit maturasyonunda önemli olduğunu gösterir.

GSH'nin preimplantasyonel gelişme için gerekli olan oosit stoplazmik maturasyonunda kritik olduğu tanımlanmıştır (17). GSH matur oositlerde viabilite için iyi bir biokimyasal belirteçtir. Hamster oositlerinden alınan örneklerde metafaz II fazındaki oositlerde GSH konsantrasyonu matur olmayan germinal vezikül aşamasındaki oositlerdeki GSH konsantrasyonuna göre 2 kat daha fazladır (18). Oositlerin olgunlaşmasında in vitro GSH uygulamasının olumlu etkileri rapor edilmiştir (19). Oosit GSH sentezi düşük moleküler ağırlıklı tiol bileşikler (sistein, sisteamin, β merkaptotanol) ile stimule edilir. In vitro maturasyon süresinde koyun oositlerine sisteamin desteğinin morula ve blastokist gelişimini arttırdığı, β merkaptotanol ve sisteamin desteğinin GSH sentezini arttırdığı, peroksidaz içeriğini azalttığı bulunmuştur (20). Hayvanlarda yapılan çalışmalarda β-karotenin stoplazmik maturasyonu artırdığı bulunmuştur (21).

Corpus luteum fonksiyonu ve oksidatif stres

Corpus luteumda ROT üretimi olur. Midluteal fazda corpus luteumda progesteron ve CuZn-SOD düzeyleri artarken, regresyon fazında azalma izlenir. Regresyon fazında ROT düzeyleri (11) ve Mn-SOD düzeyleri artar. Regresyon fazında CuZn-SOD düzeylerinin azalması bu fazda yükselen lipid peroksit düzeylerini açıklayabilir. CuZn-SOD düzeyinin düşüklüğü over kan akımında azalma ya da prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) veya makrofaj düzeylerinde artma ile açıklanabilir (11). Çünkü PGF_{2α}, süperoksit anyon üretimini stimule eder ve azalmış over kan akımında ROT üretiminde artma meydana gelir. Regresyon fazında Mn-SOD konsantrasyonlarının artması ROT'ları temizlemek için olabilir. Corpus luteumun komplet yıkımı ile Mn-SOD düzeyleri düşer ve hücre hızla apoptozise gider. Bir başka deyişle Mn-SOD luteal hücreleri OS'den korur. Corpus luteumda yüksek düzeyde β-karoten (22), vitamin C ve vitamin E tespit edilmiştir.

Ovulasyondaki rolü

Ovulasyonun olması için preovuluar folikülde üretilen ROT önemlidir (23). Ovulasyon için gerekli olan luteinize hormon pikinden sonra oluşan inflamatuvar prekürsörler ROT'ların oluşumuna neden olur. Diğer bir ifadeyle inflamatuvar prekürsörlerin azlığı ovulasyonu kötü yönde etkiler (24).

Yaşla bağlı fertilitede azalma ve oksidatif stres

Serbest radikaller yaşla beraber olan fertilitede azalmadan sorumlu tutulmaktadır. Foliküler sıvıda yaş ilerledikçe serbest radikal miktarının arttığı bulunmuştur (25). Yaş arttıkça artan ROT miktarı mitokondrial DNA'ya zarar vererek oosit kalitesinin düşmesine neden olur (7). DNA hasarının biomarkeri olan 8 hidroksi deoksi guanozin (8-OHdG) (26) yaşlı oositlerde daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Yine yaşla beraber granuloza ve kumulus hücrelerinde apoptozis artar (27).

Takahashi ve ark. ROT'lara maruziyetin oositte kalsiyum homeostasisini bozarak oosit gelişmesinde azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır (28). Carbone ve ark.yaşlı kadınlarda katalaz aktivitesinin düşük, SOD aktivitesinin yüksek olduğunu, gençlerde ise GSH transferaz aktivitesinin yüksek olduğunu bulmuşlar (29).

Oksidatif stres ve infertilite

İnfertilite 1 yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalmamaması durumudur. Oksidatif stresin fertilitayı olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Oksidatif stres fertilizasyon, implantasyon ve erken embriyo gelişimini etkileyebilir. Fertilizasyondan önce oksidatif strese maruz kalmak anormal zigot oluşumunu arttırır. Gamet füzyonu sırasında ROT aktivitesi inhibe edilmiş, antioksidan üretimi özellikle SOD üretimi arttırılmıştır. Yüksek GSH düzeyleri mayotik iğ oluşumunda yardımcı olur. Farelerde sirt 3 geni, preimplantasyonel embriyo gelişiminde embriyoyu oksidatif stresin hasarlarına karşı korur. Sirt 3'de azalma ROT'ların mitokondrial üretimini körükler. Sonuçta embriyoların preimplantasyonel gelişiminde duraksama meydana gelir (30). Endometriozis, polikistik over sendromu, açıklanamayan infertilite gibi pek çok reproduktif hastalıkta oksidatif stresin rolü kanıtlanmıştır (31).

Oksidatif stres ve in vitro fertilizasyon

Gebelik sonuçlarını artırmak için oosit, sperm ve embriyonun manipule edilebileceği birçok teknik tanımlanmıştır. Bunlardan en çok kullanılanları in vitro fertilizasyon ve embriyo transferi ve intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) prosedürüdür. Oksidatif stres IVF başarısında önemli bir faktördür.

Oosit ve granuloza hücreleri metabolik bir birliktelik oluşturur. Granuloza hücreleri oositin gelişim ve maturasyonu ve fertilizasyon için faydalıdır (32) ve antioksidanları üreterek oositi oksidatif stresin indüklediği apoptozisten korurlar.

Foliküler sıvı, granuloza ve teka hücrelerinin sekretuar aktivitesinin ve plazma içeriğinin transferinin net sonucudur (33). Oosit foliküler sıvı çevresinde gelişir. Foliküler sıvı, oosit kalitesini, sperm ile etkileşimini, implantasyonu ve embriyonik gelişimi etkiler (34). Foliküler sıvıda antioksidanların yokluğu ROT seviyelerinde artışa neden olur (35). Foliküler sıvı ve granuloza hücreleri oositle yakın ilişkide olduklarından bunların incelenmesi ile elde edilen sonuçlar IVF başarısını tespit etmede kullanılabilir.

Granuloza hücrelerinde oksidatif stres ve fertilizasyona etkisi

Paszkowski ve ark.'larının yaptığı çalışmada (36) granuloza hücrelerinde antioksidanların azalmasının kötü oosit kalitesini gösterdiği bulunmuştur. Granuloza hücrelerindeki artırılmış ROT üretiminin (37) düşük oosit fertilizasyon kabiliyeti, düşük embriyo kalitesi ve azalmış implantasyon oranları ile ilişkisi gösterilmiştir. Matos ve ark. (38) yaptıkları çalışmada granuloza hücrelerinde CuZn-SOD düzeylerine bakarak fertilizasyon başarısını tahmin etmeyi öngörmüşlerdir.

ROT'ların seviyelerinin daha fazla tamponlanabildiği grade B ve grade C oosite sahip bireylerde embriyo oluşumunun, oksidan ajanların tamponlanamadığı bireylerdekilere nazaran istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir. Seino ve ark. granuloza hücrelerindeki 8-OHdG düzeyinin oosit kalitesi, embriyo kalitesi ve fertilizasyon oranları ile negatif korelasyon gösterdiğini bulmuşlar (39).

Foliküler sıvıda oksidatif stres ve fertilizasyona etkisi

Paszkowski ve ark. yaptıkları çalışmada fertilize oositlerin foliküler sıvısında GSH-Px aktivitesini daha yüksek bulmuşlardır (40). Oyawoye ve ark. IVF'e giden 63 hasta ile yaptıkları çalışmalarında fertilize olan oositlerin foliküler sıvısında total antioksidan kapasitenin (TAK) yüksek olduğunu bulmuşlar ve yüksek TAK seviyesinin fertilizasyon potansiyelini tahmin etmede kullanılabileceğinin öne sürmüşlerdir (35). Attaran ve ark.IVF'e giden 53 hastada foliküler sıvıda TAK ve ROT seviyelerine bakmışlar.Gebe kalanlarda foliküler sıvıda ROT seviyelerinin yüksek saptamışlar, TAK'da ise anlamlı fark saptamamışlardır. Sonuç olarak fizyolojik düzeyde foliküler sıvı ROT düzeyi IVF başarısı tahmininde gösterge olabileceğini ifade etmişlerdir (41). Buradan yola çıkarak intrafoliküler ROT seviyeleri IVF başarısının tahmininde kullanılabilir. Bedaiwy ve ark.çalışmalarında foliküler sıvıda düşük ROT, yüksek TAK seviyelerinin IVF başarısında prediktif olduğunu bulmuşlar. Liu J ve ark. (42) MDA ile fertilizasyon, toplanan oosit sayısı, matur oosit, iyi kalite embriyo arasında negatif korelasyon, apoptozis indeksi arasında pozitif korelasyon bulmuşlardır. Pasqualotto ve ark.yaptıkları çalışmada lipid peroksidasyonu ve TAK düzeyini gebelik oranları ile korele bulmuşlar ama fertilizasyon ile arasında anlamlı bir korelasyon saptamamışlardır (43). Homosistein prooksidan bir ajandır ve DNA, RNA'nın metilasyonu sırasında metioninin demetilasyonu ile oluşur. Ebisch ve ark.IVF'e giden hastaların foliküler sıvısında homosistein, GSH, sistein, sisteinil glisin miktarlarını ölçmüşler.Homosistein miktarı ile embriyo kalitesi arasında negatif korelasyon göstermişlerdir (44).

Oosit- embriyo kalitesi ve oksidatif stres

Yardımcı üreme tekniklerinde elde edilen başarı oranları gamet ve embriyo kalitesi tarafından etkilenir. Foliküler sıvıda ROT'ların fizyolojik miktarları sağlıklı oosit gelişimi için göstergedir (41). Foliküler sıvıda saniyede 107 fotondan az ROT seviyeleri negatif IVF parametreleri ile ilişkili bulunmuştur. Fakat OS durumu oosit kalitesini dolayısıyla fertilizasyonu bozar. Tamura ve ark. (45) yaptığı bir çalışmada; bir önceki gebe kalmamayan IVF siklusunda dejenere oosit sayısı %30'dan fazla olan kadınlarda folikül sıvısında 8-OHdG düzeyini anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Melatonin kullanımının intrafoliküler oksidatif hasarı azalttığını ve fertilizasyon ve gebelik oranlarını arttırdığını bulmuşlardır. Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (46) fragmante embriyolar ile nonfragmante embriyolar kıyaslandığında fragmante embriyolarda H2O2 ve oksidan düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur.

IVF kültür mediumları üzerine serbest radikallerin etkileri

IVF kültür mediumlarında yüksek ROT düzeyleri ile kötü embriyo gelişimi, yüksek fragmantasyon, morfolojik olarak anormal blastokist oluşumu ve düşük fertilizasyon oranları ilişkili bulunmuştur (47). Kültür mediumlarında yüksek ROT üretimi ile kötü oosit kalitesi ilişkili olabilir (36).

Güncel yaklaşımlar

Oksidatif stresin kadın fertilitesi üzerine olan olumsuz etkilerinden yola çıkarak antioksidan ajanlar verilerek oksidatif parametrelerin düzeyinin azaltılabileceği ve sonuçta fertilitenin artırılabilceği hipotezi ortaya konmuştur. Nitekim, antioksidan elementlerden selenyum ve melatonin gibi maddelerin canlılara verilmesi ile GSH ve GSH-Px aktivitesi düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (48). E vitamini takviyeli diyetle beslenen bireylerde yapılan çalışmalarda idrardaki peroksidasyon ürünlerinin azaldığı bildirilmiştir (49). Antioksidan elementler bakımından zengin meyve diyetiyle beslenen kadınlarda da oksidatif stres parametrelerinin kontrol grubuna nazaran daha düşük olduğu bildirilmiştir (50, 51).

Düşük kaliteli oosite sahip bireylerin antioksidan maddeler açısından zengin diyetler ile beslenmeleri veya tablet formlarını almaları sonucunda hem fertilizasyon hem de IVF başarılarında artış gözlemlenebilir. Melatonin ile tedavi edilen hastalarda dejenere oosit sayısında anlamlı azalma, fertilize embriyo sayısında ise anlamlı artma tespit edilmiştir. Paraoxonase-1 oksidatif stresin indüklediği inflamasyona karşı olan bir ajandır. Marsillach ve ark. (52) kadın infertilitesinde paraoxonase-1'in OS'nin indüklediği inflamasyona karşı koruyucu olduğunu bulmuşlardır. Oral vitamin ve mineral desteğinin serum GSH, vitamin C ve vitamin E konsantrasyonlarında artışa neden olduğu ve bu antioksidanların IVF sonuçlarında önemli rol oynadığı bulunmuştur (53). Metalik katyonlar ROT formasyonunu stimule ederek OS'nin eksojen kaynağı olarak rol oynarlar. IVF kültür mediumlarında EDTA ve transferrin gibi metal şelatörler ile ROT üretimi düzeltilebilir (9). Görünür ışık, DNA hasarına neden olarak ROT oluşumuna neden olur (9). IVF' de oksidatif stresin fertilizasyona olan negatif etkilerinden korunmak için daha güvenli prosedürlerin kullanılması ile fertilizasyon oranları artırılabilir. Oosite Oosite OS'nin kötü etkileri kültür mediumlarına lipofilik ve hidrosolubl antioksidan eklenmesi ile iyileştirilebilir (54).

Tartışma ve Sonuç

Oksidatif stres serbest radikallerin aşırı yapımıdır. Serbest radikallerin fizyolojik miktarlarının kadın üremesinde oosit maturasyonundan fertilizasyona kadar pek çok süreçte önemli rolleri vardır. Oksidatif stresin oosit kalitesini, fertilizasyonu, implantasyonu ve erken embriyo gelişimini olumsuz yönde etkileyerek fertilitate üzerinde olumsuz bir rol oynadığı bilinmektedir.

Sonuçta oksidatif stresin üreme ve gelişme patolojisi ile ilişkili bir durum olduğu düşünülmektedir. Üreme ve fertilizasyonun düzenlenmesinde serbest radikaller ve antioksidanların önemi dikkate alınmalıdır. Oksidatif stresin fertilitedeki rolü ortaya konuldukça antioksidan tedaviler ile fertilitate oranları artırılabilir.

Kaynaklar

1. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42: 1634-1650.
2. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 2007; 18: 567-579.
3. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3: 43.
4. Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest.* 1999; 29: 238-245.
5. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev.* 2004; 104: 6255-6285.
6. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 625-635.
7. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012; 10: 49.
8. de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53: 761-771.
9. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 2001; 7: 175-189.
10. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2006; 18: 325-32.
11. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig.* 2001; 8: 40-42.
12. Takami M, Preston SL, Behrman HR. Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278: 646-650.
13. Takami M, Preston SL, Toyloy VA, Behrman HR. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol.* 1999; 276: 684-688.
14. Ortega-Camarillo C, Guzman-Grenfell AM, Hicks JJ. Oxidation of gonadotrophin (PMSG) by oxygen free radicals alters its structure and hormonal activity. *Mol Reprod Dev.* 1999; 52: 264-268.
15. Briggs DA, Sharp DJ, Miller D, Gosden RG. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de-novo expression by granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5: 1107-1114.

16. Basini G, Grasselli F, Bianco F, Tirelli M, Tamanini C. Effect of reduced oxygen tension on reactive oxygen species production and activity of antioxidant enzymes in swine granulosa cells. *Biofactors*. 2004; 20: 61-69.
17. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*. 2008; 14: 345-357.
18. Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev*. 2003; 64: 106-112.
19. Curnow EC, Ryan JP, Saunders DM, Hayes ES. In vitro developmental potential of macaque oocytes, derived from unstimulated ovaries, following maturation in the presence of glutathione ethyl ester. *Hum Reprod*. 2010; 25: 2465-2474.
20. de Matos DG, Gasparini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*. 2002; 57: 1443-1451.
21. Ikeda S, Kitagawa M, Imai H, Yamada M. The roles of vitamin A for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *J Reprod Dev*. 2005; 51: 23-35.
22. Rodgers RJ, Lavranos TC, Rodgers HF, Young FM, Vella CA. The physiology of the ovary: maturation of ovarian granulosa cells and a novel role for antioxidants in the corpus luteum. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995; 53: 241-246.
23. Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009; 21: 219-222.
24. Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 1462-1467.
25. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S, Reznick AZ, Ishai D, Lahav-Baratz S, Shiloh H, Koifman M, Dirnfeld M. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004; 82 Suppl 3: 1171-1176.
26. Salmon AB, Richardson A, Perez VI. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radic Biol Med*. 2010; 48: 642-655.
27. Sadraie SH, Saito H, Kaneko T, Saito T, Hiroi M. Effects of aging on ovarian fecundity in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *J Assist Reprod Genet*. 2000; 17: 168-173.
28. Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol Reprod Dev*. 2003; 66: 143-152.
29. Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod*. 2003; 9: 639-643.
30. Kawamura Y, Uchijima Y, Horike N, Tonami K, Nishiyama K, Amano T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. *J Clin Invest*. 2010; 120: 2817-2828.
31. Wang Y, Sharma RK, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertil Steril*. 1997; 68: 826-830.
32. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev*. 2002; 61: 414-424.
33. Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7: 40.
34. Jana SK, K NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reprod Toxicol*. 2010; 29: 447-451.
35. Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod*. 2003; 18: 2270-2274.
36. Paszkowski T, Clarke RN. Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Hum Reprod*. 1996; 11: 2493-2495.
37. Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, Virant Klun I, Bokal EV. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet*. 2007; 24: 91-97.
38. Matos L, Stevenson D, Gomes F, Silva-Carvalho JL, Almeida H. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15: 411-419.
39. Seino T, Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Kurachi H. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril*. 2002; 77: 1184-1190.
40. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta*. 1995; 236: 173-180.
41. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med*. 2000; 45: 314-320.
42. Liu J, Li Y. [Effect of oxidative stress and apoptosis in granulosa cells on the outcome of IVF-ET]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010; 35: 990-994.

43. Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril*. 2004; 81: 973-976.
44. Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers-Theunissen RP. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod*. 2006; 21: 1725-1733.
45. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*. 2008; 44 (3): 280-287.
46. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*. 1998; 13: 998-1002.
47. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, Thornton J, Agarwal A. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*. 2004; 82: 593-600.
48. Whanger PD. Selenium and the brain: a review. *Nutr Neurosci*. 2001; 4: 81-97.
49. Acevedo CG, Carrasco G, Burotto M, Rojas S, Bravo I. Ethanol inhibits L-arginine uptake and enhances NO formation in human placenta. *Life Sci*. 2001; 68: 2893-903.
50. Alberg A. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology*. 2002; 180: 121-137.
51. Allaire C. Endometriosis and infertility: a review. *J Reprod Med*. 2006; 51: 164-168.
52. Marsillach J, Checa MA, Pedro-Botet J, Carreras R, Joven J, Camps J. Paraoxonase-1 in female infertility: a possible role against oxidative stress-induced inflammation. *Fertil Steril*. 2010; 94: 1132-1134.
53. Ozkaya MO, Naziroglu M. Multivitamin and mineral supplementation modulates oxidative stress and antioxidant vitamin levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010; 94: 2465-2466.
54. Martín-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera E, Alvarez IS. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008; 17: 652-661.