UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Lucie Hušková

Využití antioxidantů pro zlepšení kvality savčích oocytů

Utilization of antioxidants to enhance the quality of mammalian oocytes

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Lucie Němcová, Ph.D.

Praha 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Při psaní byla použitá AI k překladu některých slov.

V Praze dne 29. 04. 2025 Lucie Hušková

Poděkování:

Chtěla bych moc poděkovat mé školitelce paní Ing. Lucii Němcové, Ph.D. za její pomoc, ochotu a trpělivost při práci se mnou. Také bych chtěla poděkovat svým kamarádům za jejich morální podporu.

ABSTRAKT

V oocytech během maturace vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS), ty za fyziologických podmínek zastávají signalizační funkci, ale pokud se nahromadí, zhoršují jejich kvalitu a šanci na fertilizaci. Způsobují jedno i dvou řetězcové zlomy v DNA a chybné párování bází při replikaci, také peroxidují lipidy biomembrán a tím mohou způsobit apoptózu. Vznik ROS v oocytu ovlivňuje kromě přirozených metabolických procesů několik faktorů, jako je světlo v laboratoři, koncentrace kyslíku a pH kultivačního média. ROS jsou odstraňovány antioxidanty, které se chovají jako donor elektronu, redukují ROS a zamezují tak vzniku oxidativního stresu (OS). Antioxidanty (AOX) se dělí na enzymatické (například superoxid dismutáza, kataláza a glutathion peroxidáza), které jsou vytvářeny v lidském těle a neenzymatické (například vitamín C a E, glutathion, polyfenoly), které jsou získávány z potravy, především zeleniny a ovoce. Oocyt je v lidském těle součástí oocyt-kumulárního komplexu (COC), ten produkuje antioxidanty, které jsou oocytem využívané. *In vitro* maturace oocytů (IVM) je laboratorní technika používána při asistované reprodukci. V IVM podmínkách dochází k tvorbě velkého množství ROS a dochází tak snadno k OS, dodáváním antioxidantů do média maturujících oocytů je možné zlepšit jejich kvalitu a šanci na fertilizaci.

Klíčová slova:

Oocyt, IVM, ROS, antioxidant, oxidativní stres, vývojová kompetence

ABSTRACT

During oocyte maturation, reactive oxygen species (ROS) are produced. Under physiological conditions, ROS have a signaling function, but when they accumulate, they deteriorate oocyte quality and reduce the chances of fertilization. ROS can cause both single- and double-strand breaks in DNA, incorrect base pairing during replication, and lipid peroxidation, which can lead to apoptosis. In addition to natural metabolic processes, the generation of ROS in the oocyte is influenced by several other factors, such as light in the laboratory, oxygen concentration and pH of the culture médium. ROS are removed by antioxidants (AOX), which act as electron donors, they reduce ROS and thus prevent oxidative stress (OS). AOX are divided into enzymatic (such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase), which are produced in the human body, and non-enzymatic (such as vitamins C and E, glutathione and polyphenols), which are obtained from food, primarily from vegetables and fruits. The oocyte in the human body is a part of the oocyte-cumulus complex (COC), which produces AOX utilized by the oocyte. In vitro maturation of oocytes (IVM) is a laboratory technique used in assisted reproduction. Under IVM conditions a large amount of ROS is produced, leading to OS. By adding AOX to the culture of maturing oocytes, it is possible to improve their quality and chances of fertilization.

Key words:

Oocyte, IVM, ROS, antioxidant, oxidative stress, developmental competence

Seznam zkratek:

AA	Kyselina askorbová	Ascorbic acid
AOX	Antioxidant	Antioxidant
ARE	Antioxidační responzivní prvky	Antioxidant response elements
ART	Asistovaná reprodukce	Assisted reproduction technology
ATP	Adenosintrifosfát	Adenosine triphosphate
BHA	Butylhydroxyanizol	Butylated hydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluen	Butylated hydroxytoluene
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát	Cyclic adenosine monophosphate
CAPA-IVM	Kapacitační *in vitro* maturace	Capacitation *in vitro* maturation
CAT	Kataláza	Catalase
CC	Kumulární buňka	Cumulus cell
CeO_2-NPs	Nanočástice oxidu ceru	Cerium oxide nanoparticles
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát	Cyclic guanosine monophosphate
COC	Oocyt-kumulární komplex	Cumulus-oocyte complex
CpdI	Sloučenina 1	Compound 1
Cu/ZnSOD	Měďo-zinková superoxid dismutáza	Copper-zinc superoxide dismutase
Cys	Cystein	Cysteine
DSB	Dvouřetězcové zlomy	Double-strand break
ER	Endoplazmatické retikulum	Endoplasmatic reticulum
eSOD	Extracelulární superoxid dismutáza	Extracellular superoxide dismutase
FET	Přímý elektronový transport	Forward electron transport
FMN	Flavinmononukleotid	Flavin mononukleotide
FSH	Folikul stimulující hormon	Follicle-stimulating hormone
GC	Granulózní buňka	Granulosa cell
GnRH	Gonadotropin uvolňující hormon	Gonadotropin-releasing hormone
GnRHa	Agonista gonadotropin uvolňujícího hormonu	Gonadotropin-releasing hormone agonist
GPx	Glutation peroxidáza	Glutathione peroxidase
GSH	Glutation	Glutathione
GV	Zárodečný váček	Germinal vesicle
GVBD	Rozpad zárodečného váčku	Germinal vesicle breakdown
hCG	Lidský choriový gonadotropin	Human chorionic gonadotropin

IVF	*In vitro* fertilizace	*In vitro* fertilization
IVM	*In vitro* maturace	*In vitro* maturation
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KI	Komplex I	Complex I
KIII	Komplex III	Complex III
LH	Luteinizační hormon	Luteinizing hormone
MII	Meióza II	Meiosis II
MnSOD	Manganová superoxid dismutáza	Manganese superoxide dismutase
mtDNA	Mitochondriální DNA	Mitochondrial DNA
NAC	N-acetylcystein	N-acetylcysteine
NAD^+	Oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu	Oxidized from of nicotinamide adenin dinucleotide
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid	Nicotinamide Adenin dinucleotide
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát	Nicotinamide Adenin dinucleotide phosphate
NDGA	Kyselina nordihydroguaiaretová	Nordihydroguaiaretic acid
NRF2	Nuclear factor-E2-related factor 2	Nuclear factor-E2-related factor 2
OHSS	Ovariální hyperstimulační syndrom	Ovarian hyperstymulation syndrome
OS	Oxidativní stres	Oxidative stress
p62	Seguestozom 1	Sequestosome 1
PCO	Polycystické ovárie	Polycystc ovary
PCOS	Polycystický ovariální syndrom	Polycystic ovary syndrome
PDE3A	Fosfodiesteráza 3A	Phosphodiesterase 3A
PDI	Protein disulfidová izomeráza	Protein disulfide isomerase
Q	Ubichinon	Ubiquinone
RET	Reverzní elektronový transport	Reverse electron transport
ROS	Reaktivní formy kyslíku	Reactive oxygen species
SeMet	Selenomethionin	Selenomethionine
SkQ1	Plastochinondecyltrifenylfosfonium	Plastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium
SOD	Superoxid dismutáza	Superoxide dismutase
SSB	Jednořetězcové zlomy	Single-strand break
TBHQ	Tertbutylhydrochinon	Tert-butylhydroquinone

TNFα	Faktor nádorové nekrózy α	Tumor necrosis factor α
Vit-E	Vitamín E	Vitamin E
ZnO-NPs	Nanočástice oxidu zinečnatého	Zinc oxide nanoparticles
ZP	Zona pellucida	Zona pellucida

Obsah

1 Úvod 1
2 Reaktivní formy kyslíku 1
2.1 Vznik ROS v oocytu 2
2.2 Oxidativní stres 3
2.2.1 Poškození DNA 4
2.2.2 Peroxidace lipidů 4
2.2.3 Poškození proteinů 5
2.3 NRF2 signální dráha 5
3 Antioxidanty 5
3.1 Enzymatické AOX 6
3.1.1 Superoxid dismutáza 6
3.1.2 Glutation peroxidáza 6
3.1.3 Kataláza 7
3.2 Neenzymatické AOX 8
3.2.1 Přírodní 8
3.2.2 Syntetické 9
4 Oogeneze 10
4.1 Jaderná maturace 11
4.2 Cytoplazmatická maturace 12
4.3 IVM 12
5 Efekt vybraných AOX na IVM 15
5.1 Koenzym Q10 16
5.2 Melatonin 16
5.3 Resveratrol 16
5.4 Kvercetin 17
5.5 Vitamin C 17
5.6 Vitamin E 17
5.7 Nobiletin 18
5.8 N-acetylcystein 18
5.9 SkQ1 18
5.10 ZnO-NPs 19
5.11 CeO_2-NPs 19
6 Závěr 19
7 Použitá literatura 21

1 Úvod

Reaktivní formy kyslíku jsou molekuly s vysokou reaktivitou, které vznikají v buňce především během metabolických procesů, jejich vznik indukuje i spoustu dalších faktorů, jako je kouření, stravování, věk a životní styl. Pokud nejsou ROS pod kontrolou AOX systému, dochází k jejich hromadění a vzniku OS. OS se považuje za jednu z příčin stárnutí organismu. Množství OS je také jedním z faktorů snižující kvalitu oocytů a tím i jejich šanci na oplození. IVM je metoda, která v poslední době zažívá rozvoj, oproti standardní *in vitro* fertilizaci (IVF) je ale zatím méně účinná, a proto nebyla dosud tak často využívána u žen podstupujících asistovanou reprodukci (ART). Účinnost IVM může být, ale podstatně zvýšena upravením protokolu IVM (například přidání pre-maturačního kroku před samotnou maturací) a upravením složení média, ve které jsou oocyty maturovány. Jedním z možných přídavků do média jsou antioxidanty, díky jejich schopnosti redukovat ROS a předcházet nebo minimalizovat oxidativní poškození a udržovat tak správnou funkci mitochondrií. Mnoho AOX již bylo vyzkoušeno na různých zvířecích modelech, a i na člověku, ve správné koncentraci je spousta z nich schopná vylepšit kvalitu oocytů.

Cílem bakalářské práce je shrnout poznatky o vlivu oxidačního stresu na vývojový potenciál samičí pohlavní buňky a využití látek s antioxidačními účinky při *in vitro* maturacích oocytů

2 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku jsou molekuly obsahující kyslík, které mají ve své valenční vrstvě alespoň jeden nespárovaný elektron a díky tomu jsou vysoce reaktivní a nestabilní, s výjimkou H_2O_2 který je stabilní. Mezi hlavní ROS se řadí OH•, H_2O_2, a superoxidový anion O^{2-}, dále taky peroxylové radikály ROO•, peroxynitrit $ONOO^-$ a singletový kyslík. O_2^- vzniká při reakci elektronu s molekulárním kyslíkem a sám není oproti ostatním ROS moc reaktivní, dismutací O_2^- ale dochází k tvorbě H_2O_2 (shrnuto Dröge, 2002), ten sám o sobě není nestabilní, ale pokud není odstraněn, vede k tvorbě velice reaktivního OH•. Hlavním způsobem vzniku OH• v buňce je Fentonova reakce (Mello Filho et al., 1984), kde peroxid vodíku reaguje s celulárním Fe^{II+}:

$$Fe^{II+} + H_2O_2 \rightarrow OH\bullet + OH^- + Fe^{III+}$$

ROS jsou v lidském těle udržovány pod kontrolou antioxidanty, které zamezují jejich nahromadění a vzniku OS.

2.1 Vznik ROS v oocytu

Vzniku ROS v buňce nelze zabránit, vznikají totiž skrz přirozené metabolické procesy a jejich přítomnost je v určité koncentraci i potřebná. Za největší produkci ROS v buňce jsou mitochondrie. Uvádí se, že konkrétně Komplex I (KI) a III (KIII) elektron transportního řetězce jsou zodpovědné za vznik většiny ROS produkovaných buňkou, komplex II se na jejich produkci také podílí, ale v nižším množství. Elektron transportní řetězec se skládá ze 4 komplexů umístěných v membráně matrix, dochází v něm k transportu elektronu z komplexu I a II do komplexu III a z něj do IV, kde je jeho finálním akceptorem kyslík. Pohyb elektronu v komplexech vede k pumpování protonů komplexy I, III a IV z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru. Tímto způsobem je udržovaná nízká koncentrace protonů v matrix a naopak vysoká v mezimebránovém prostoru, vytváří se tak protonový gradient a to umožňuje ATP syntáze syntetizovat adenosinmonofosfát (ATP) (Nolfi-Donegan et al., 2020).

V Komplexu I (NADH:ubichinon oxireduktáza) je elektrony přenesené z nikotinamidadenindinukleotidu (NADH) přes flavin-mononukleotid (FMN) a železosirná centra na ubichinon (Q). V KI jsou dvě místa produkce ROS, první z nich je I_F, to je vazebné místo pro NADH, kde plně redukovaný FMN způsobuje redukci kyslíku na O_2^-. Tento způsob vzniku ROS se nazývá přímý elektronový transport (FET) a je závislí na koncentraci NADH (vysoká koncentrace NAD^+ přímý přenos elektronu inhibuje) a přítomnosti endogenních inhibitorů Q vazebného místa jako je rotenon, které zabraňují přenos elektronů na ubichinon (jejich přítomnost FET stimuluje) (Kussmaul & Hirst, 2006). Další způsob tvorby ROS komplexem I je reverzní elektronový transport (RET), kde dojde k úniku elektronu v místě mezi FMN a vazebném místě pro Q I_Q, vzniká pak O_2^- nebo H_2O_2. RET a jeho produkty jsou závislé na několika faktorech, jako jsou typ substrátu, přítomnost inhibitorů (rotenon RET inhibuje), množství redukované formy Q, poměr $NADH/NAD^+$ a gradientu pH v rámci mitochondrie. RET sice produkuje vysoké množství ROS *in vitro*, ale za fyziologických podmínek toto množství bude nižší (Treberg et al., 2011). Rodríguez-Nuevo et al., (2022) uvádějí, že před maturační oocyty mají částečně utlumený komplex I, který nabývá plnou funkci až během maturace, pro primární oocyty by pak komplex I nepředstavoval tak vysoký zdroj ROS jako pro ostatní buňky. Komplex II (sukcinát-dehydrogenáza) je schopen tvořit ROS díky RET i FET. V místě II_F dochází k oxidaci sukcinátu na fumarát a přenosu elektronu skrz komplex na Q. V případě, že je v mitochondrii vysoké množství redukovaného Q a malé množství sukcinátu může dojít v místě II_F k vzniku H_2O_2 a O_2^- (Quinlan et al., 2012). Cytochrom-BC1 komplex neboli Komplex III, vytváří O_2^- ve vazebném místě pro redukovaný Q, množství vzniklého

superoxidu je pak závislé na poměru mezi QH_2/Q. KIII produkuje velké množství ROS *in vitro*, za fyziologických podmínek se bude množství lišit (Dröse & Brandt, 2008).

ROS také mohou vznikat působením vnějších vlivů, například ozářením ionizačním zářením, to způsobuje ionizaci vody, zvýšenou respiraci a produkci ATP v mitochondriích a nejspíše i zvýšení aktivity komplexů I, III a IV, tím dojde k zvětšení množství produkovaného OH^- a O_2^- (Yamamori et al., 2012). Kouření je další faktor zvyšující množství ROS v organismu, jenom samotný cigaretový kouř totiž kromě ostatních látek podporující produkci ROS obsahuje i ROS samotné. Hlavně aktivním, ale i pasivním kouřením tak dochází k jejich vdechování do plic, filtry však mohou výrazně snižovat jejich vdechované množství z kouře (Goel et al., 2017; Zhao & and Hopke, 2012). Aktivní kouření u matek bylo v oocytech spojeno se zvýšením obsahu ROS ve folikulární tekutině, zvýšení frekvence peroxidace lipidů ve folikulární tekutině a snížení množství AOX (Paszkowski, 2002), kouření tak přispívá k zvýšení OS a snížení šance na oplození u žen podstupujících IVF (Galanti et al., 2023). Pasivní kouření takový efekt, ale ve většině případů nemá, v publikaci Wesselink et al., (2019) uvádějí, že pasivní kouření mělo u žen horší vliv na oplození jen tehdy, když byly vystaveny cigaretovému kouři často (například v domácnosti). Věk také ovlivňuje produkci ROS, se zvyšujícím se věkem, totiž dochází k hromadění delecí a mutací mitochondriálního DNA (mtDNA), které způsobují vznik mitochondriálních dysfunkcí, to vede k zvýšené produkci ROS. Pro oocyty je tak věk matky důležitým faktorem, který určuje jejich kvalitu (Barritt et al., 2000; Chan et al., 2005). Obezita také hraje roli v nárůstu množství ROS a rovnou několika způsoby, kromě látek podporujících tvorbu ROS přijímaných nesprávným stravováním, tuková tkáň obsahuje zvýšené množství cytokininů, zejména faktoru nádorové nekrózy α (TNFα). Cytokininy svým působením tvoří volné radikály (Hahn et al., 2014). Dochází také k vzniku mitochondriálních dysfunkcí a k snížení aktivity antioxidantů (Chattopadhyay et al., 2015).

2.2 Oxidativní stres

Oxidativní stres vzniká, když dojde k porušení balancu mezi ROS/antioxidant což vede k nahromaděním ROS. OS pak v DNA způsobuje zlomy, crosslinking bází a také zprostředkovává jejich modifikace. Byl také spojen se vznikem neurodegenerativních nemocí jako je Alzheimer a schizofrenie, kardiovaskulárních poruch, rakoviny (shrnuto Dröge, 2002; Nichols et al., 2017) Oxidativní stres je mimo jiné navíc zodpovědný za vznik morfologických a fyziologických změn v oocytu a celkově tím přispívá k zhoršení jejich kvality. V savčích oocytech tak působením ROS může dojít k příliš velkému měknutí (Jia et al., 2018) nebo tvrdnutí zony pellucidy (Goud et al., 2004), také může být ovlivněno i sestavení dělícího

vřeténka, kde dochází k jeho zkracování či prodlužování, nebo dokonce i k jeho rozpadu, může také dojít i k špatnému řazení chromozomů na ekvatoriální rovině (Al-Zubaidi et al., 2020). ROS tak mohou vést k snížení šance na oplození, infertilitě, vzniku nekvalitních blastocyst a embryí a zvyšování šance na tvorbu aneuploidií, je tak žádoucí v maturačních médiích oocytů OS minimalizovat (Yang et al., 2023).

2.2.1 Poškození DNA

ROS mají schopnost modifikovat báze DNA, nejnáchylnější z nich na oxidaci je guanin, kvůli jeho nejnižšímu redoxnímu potenciálu ze všech DNA bází (Crespo-Hernández et al., 2007). OH• a ROO• reagují preferenčně s C8 guaninu, jelikož je na této pozici nejnižší bariérová energie na překonání, za vzniku 8-oxoguaninu nebo 8-hydroxoguaninu, ten pak tvoří komplex s vodou a přesmykává se na 8-oxoguanin (Jena & Mishra, 2005). Při replikaci pak nastává problém se špatným přiřazením báze, místo cytosinu totiž může naproti 8-oxoGuaninu nebo 8-hydroxoGuaninu DNA polymeráza přiřadit adenosin v *syn* konformaci, jestli nedojde k opravě, tak při následné replikaci dochází k mutaci – Guanosin -> Tyrosin (Cheng et al., 1992; Shibutani et al., 1991). V DNA také působením ROS dochází k jedno (Hoffmann & Meneghini, 1979) či dvou řetězcovým zlomům (DSB)(Siddiqi & Bothe, 1987). K jedno řetězcovým zlomům (SSB) DNA dochází mnohem častěji a jsou způsobené především hromaděním H_2O_2 nebo superoxidovým radikálem. O_2^- s DNA nereaguje tak ochotně, ale je schopný produkovat OH•. Peroxid v buňce reaguje s Fe^{2+} ionty přítomnými v intracelulárním prostoru Fentonovou reakcí za vzniku hydroxylového radikálu (Mello Filho et al., 1984). Vzniklý OH• poté oxiduje deoxyribózu na C3' pozici a dochází k vzniku fragmentů DNA (5'-fosfát, 3'-fosfát nebo 3'-fosfoglykolát), tím dojde k SSB (Hertzberg & Dervan, 1984). Vznikem dvou SSB blízko sebe na opačných vláknech DNA pak může dojít i k DSB, k tomu ale dochází jen s nízkou frekvencí (Siddiqi & Bothe, 1987).

2.2.2 Peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů je způsobená především jejich reakcí s OH• a ROO• Ty reagují s nenasycenými mastnými kyselinami lipidů biologických membrán a dochází ke spuštění řetězové reakce, která má za následek vznik více radikálů a oxidaci většího množství lipidů. Jedním z produktů peroxidace je 4-hydroxynonenal, který byl u savčích oocytů přímo spojen s modifikací tubulinů (α, β, γ), vznikem poruch dělícího vřeténka a tím způsobeným zvýšeným množství chromozomálních aberací při meióze (Mihalas et al., 2017). Peroxidace lipidů také může způsobovat snížení fluidity biomembrán a jejich ztenčování (Yadav et al., 2019). Dále

také způsobuje inhibici funkce Ca^{2+} ATPázy v endoplazmatickém retikulu (Kukreja et al., 1988), porušení funkce ATPázy může vést k vylití Ca^{2+} iontů do cytozolu a indukci apoptózy.

2.2.3 Poškození proteinů

Proteiny mohou být oxidované na několika místech, jako jsou karboxylové skupiny, aromatická jádra a thyolové skupiny. Jejich oxidace vede ke změně jejich struktury, funkce a agregaci. Poškozené proteiny jsou značené ubikvitinem a vedené do proteasomu na jejich degradaci (shrnuto Juan et al., 2021).

2.3 NRF2 signální dráha

KEAP1/NRF2/ARE signální dráha má schopnost detekovat OS a je zodpovědná za zprostředkování antioxidační a detoxifikační odpovědi na ROS a celkově na oxidační stres. Je složena ze tří hlavních komponentů KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (Itoh et al., 1999), NRF2 (nuclear factor-E2-related factor 2) a ARE (antioxidační responzivní prvky). NRF2 je transkripční faktor, nachází se nejpočetněji v buňkách svalů, ledvin, jater a plic, nachází se tedy v buňkách, které jsou hodně vystavené OS díky jejich vysoké metabolické aktivitě (Moi et al., 1994). V rámci COC se NRF2 nachází v cytoplazmě granulózních buněk (GC), které tak syntetizují antioxidanty pro minimalizaci OS v celém COC (Akino et al., 2018). V buňkách, kde nedochází k poškození oxidanty s takovou frekvencí, jsou NRF2 degradovány. K jejich degradaci dochází díky KEAP1 proteinům, které jsou umístěny v membráně. KEAP1 cíleně tvoří komplex s Neh2 doménou NRF2, což dále vede k jeho ubikvitinaci a degradaci v proteazomu (Zhang & Hannink, 2003). NRF2 a KEAP1 komplex je spojený ve dvou vazebných místech, pokud dojde k OS, nebo působením antioxidantů a aktivátorů jako je dimetylfumarát (Akino et al., 2018) tak se inhibitory jako je sequestozom 1 (p62), podílí na jejich disociaci. V případě, že dojde k navýšení exprese p62, dochází k jeho navázání do jednoho z vazebných míst KEAP1, což vede k destabilizaci KEAP1-NRF2 komplexu a uvolnění NRF2 (Horie et al., 2021). NRF2 následně translokuje do jádra, kde soutěží s regulátory o aktivaci ARE. Pokud je koncentrace NRF2 v jádru dostatečně vysoká, dojde k jeho vazbě na promotory, tím se spustí transkripce antioxidantů a detoxifikačních látek (Dhakshinamoorthy et al., 2005).

3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky endogenního a exogenního původu s enzymatickým nebo neenzymatickým charakterem. Účastní se redoxních reakcí, chovají se jako donor elektronu a tím způsobují přechod ROS na stabilní molekuly. Jsou tak nezbytné k správnému chodu buňky, udržení ROS homeostázy a tím zamezení vzniku oxidačního stresu. K syntéze endogenních

AOX dochází v buňce hlavně působením NRF2 transkripčního faktoru, který spouští transkripci řady AOX a detoxifikačních látek (T. Nguyen et al., 2000), exogenní AOX už v lidském těle syntetizované nejsou a musí být přijímány z potravy, především z ovoce a zeleniny.

3.1 Enzymatické AOX

Mezi enzymatické antioxidanty se řadí superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza (GPx) a kataláza (CAT). Fungují jako katalyzátory a jsou hlavní součást buněčné odpovědi na oxidativní stres, kvůli jejich velké afinitě a efektivitě v eliminaci ROS.

3.1.1 Superoxid dismutáza

SOD mají funkci v redoxní přeměně O_2^- v reakci:

$$2\ O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

V lidském těle se SOD vyskytuje ve třech formách (Cu/ZnSOD) obsahující měď a zinek, manganová (MnSOD) a extracelulární (eSOD). Cu/ZnSOD se nachází v nejvyšším množství v cytosolu. Jedná se o homodimer a v jejím aktivním místě obsahuje měď a zinek, oba s oxidačním číslem II+. Zinek má spíše strukturní funkci a na samotné reakci se nepodílí, na rozdíl od mědi, která je v rámci katalýzy součástí dvou reakcí:

$$SOD\text{-}Cu^{II+} + O_2^- \rightarrow SOD\text{-}Cu^{I+} + O_2$$

$$SOD\text{-}Cu^{I+} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow SOD\text{-}Cu^{II+} + H_2O_2$$

kde v první reakci dochází k redukci mědi v enzymu a oxidaci superoxidového radikálu na kyslík. Ve druhé reakci je pak měď zpět oxidována na Cu^{II+} dalším superoxidem za vzniku peroxidu vodíku (Klug-Roth et al., 1973), který je poté odstraňován GPx a CAT. Lidská MnSOD se nachází v mitochondriální matrix, jedná se o tetramer, ve kterém každá podjednotka obsahuje jeden Mn s oxidačním číslem III+. Funguje na stejném redoxním principu jako Cu/ZnSOD (Borgstahl et al., 1992). Extracelulární SOD je nejméně početná ze všech SOD a její výskyt je nejvyšší ve specifických tkáních (Marklund, 1984). Sekvenčně je velice podobná Cu/Zn SOD, ale s tím rozdílem, že se jedná o tetramer spojený disulfidickými SH můstky. ESOD existuje ve dvou formách, enzymaticky aktivní a neaktivní, které se od sebe navzájem liší v umístění SH můstku (Petersen et al., 2003).

3.1.2 Glutation peroxidáza

Na katalýze přeměny H_2O_2 na vodu se podílý glutation peroxidáza, ta se vyskytuje v mnoha isoformách napříč organismy, u člověka jich bylo pozorovaných 8. GPx1 až 4 a GPx6 se u člověka řadí mezi selenoproteiny (Kryukov et al., 2003) a ke katalýze používají selen, celá reakce probíhá ve třech hlavních krocích:

$$(GPx\text{-}SeH) + H_2O_2 \rightarrow (GPx\text{-}SeOH) + H_2O$$

$$(GPx\text{-}SeOH) + GSH \rightarrow (GPx\text{-}Se\text{-}SG) + H_2O$$

$$(GPx\text{-}Se\text{-}SG) + GSH \rightarrow (GPx\text{-}SeH) + GS\text{-}SG$$

GPx je na začátku reakce ve své aktivní formě GPx-SeH, GPx je tedy aktivovaná navázáním selenolové skupiny -SeH, která tvoří i její aktivní místo. Během první reakce dochází k dočasnému přenosu protonu z GPx-SeH na Gln38 GPx za vzniku GPx-Se^-, proton z Gln38 je pak přenesen na H_2O_2 a tím dojde k jeho rozštěpení za vzniku vody a selenenové kyseliny GPx-SeOH. Zbylé dvě reakce už popisují regeneraci enzymu. V druhé reakci GPx-SeOH a glutation (GSH) tvoří komplex GPx-Se-SG, který je ve třetí reakci působením dalšího GSH redukován zpět na GPx-SeH, glutation je v této reakci oxidovaný na glutation disulfid GS-SG (Prabhakar et al., 2005). GPx7 a 8 jsou oba monomery a strukturně si jsou velice podobné, také fungují odlišně od ostatních GPx, v jejich aktivním centru je místo selenocysteinu cystein, nazývají se proto CysGPx. Obě CysGPx se nachází v endoplazmatickém retikulu (ER) (V. D. Nguyen et al., 2011), kde je tvořeno vysoké množství H_2O_2, to je způsobené enzymy Ero1, které tvoří disulfidické můstky a v aerobním prostředí dochází jejich působením k redukci kyslíku za vzniku H_2O_2 (Gross et al., 2006). Přesný mechanismus reakce CysGPx ještě není úplně objasněný, ale dochází v rámci něj k oxidaci protein disulfidové izomerázy (PDI) pomocí H_2O_2 za vzniku vody, PDI pak slouží ke skládání denaturovaných proteinů a k tvorbě a rušení disuflidických můstků v ER. CysGPx dokáží oxidovat i GSH, ale ne tak efektivně jako PDI, to je způsobeno tím, že postrádají smyčku, která určuje specifitu vůči GSH (V. D. Nguyen et al., 2011). GPx5 se liší od všech ostatních GPx, její výskyt je primárně ve spermiích, které jsou vystavené velkému množství ROS, a tudíž je její přítomnost nezbytná pro udržení jejich správné funkce. Stejně jako CysGPx, GPx5 nepoužívá primárně GSH jako substrát a je nezávislá na selenu, její přesné působení je ale ještě neznámé (Taylor et al., 2013).

3.1.3 Kataláza

Kataláza se u člověka nachází jako tetramer, její aktivní místo tvořeno hemem, také obsahuje vazebné místo pro nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH). CAT katalyzuje redukci H_2O_2 v reakci:

$$CAT(Por\text{-}Fe^{III+}) + H_2O_2 \rightarrow CAT(Por^{\cdot+}\text{-}Fe^{IV+}{=}O) + H_2O$$

$$CAT(Por^{\cdot+}\text{-}Fe^{IV+}{=}O) + H_2O_2 \rightarrow CAT(Por\text{-}Fe^{III+}) + H_2O + O_2$$

V rámci první reakce dochází k redukci H_2O_2 na vodu a oxidaci železa uvnitř CAT tím vzniká oxoferryl porfyrinový kationtový radikál CAT($Por^{\cdot+}$-Fe^{IV+} =O), ten se nazývá tzv. Compound I Cpd I.Cpd I reaguje s dalším H_2O_2, ten ho redukuje a dochází tak k jeho regeneraci

zpět na CAT (Alfonso-Prieto et al., 2009). Cpd I se v buňce hromadí a dochází k jeho přeměně jednoelektronovou redukcí na neaktivní formu CAT, ta je pomocí NADPH vázaného na CAT redukována zpět na aktivní formu (Kirkman et al., 1987).

3.2 Neenzymatické AOX

3.2.1 Přírodní

Existuje mnoho různých neenzymatických AOX, řadí se mezi ně látky jako jsou vitamíny C a E, koenzym Q10, GSH, melatonin, polyfenoly a karotenoidy. Významným neenzymatickým AOX je vitamín C neboli kyselina askorbová (AA), ve vysokém množství se nachází v ovoci a zelenině. AA je rozpustná ve vodě a má schopnost redukovat superoxidový radikál a ROO• a oxidovat OH•, to je umožněno díky jejímu výskytu v několika formách existujících v různém oxidačním stavu, nejefektivnější z nich proti ROS je samotná AA a její redukovaná verze askorbát (Cabelli & Bielski, 1983). AA funguje ve spolupráci s vitamínem E, slouží k regeneraci jeho radikálové formy zpět do aktivní podoby (Packer et al., 1979). Vitamín E je také exogenní AOX, je rozpustný v tucích a je do těla nejvíce přijímán prostřednictvím rostlinných olejů (Harris et al., 1950). Je vysoce efektivní v zabraňování peroxidace lipidů, umožňuje to jeho vysoká afinita k lipidperoxylovým radikálům. S radikály je schopen reagovat a většinu z nich zneškodnit ještě předtím, než dojde k samotné peroxidaci a zahájení řetězové reakce peroxidace, v reakci vzniká radikál vitamínu E, ten je neaktivní a je nutné ho regenerovat. K ostatním ROS vitamín E už ale tak vysokou afinitu nemá (Niki & Noguchi, 2004). Koenzym Q10 (ubichinon) se nachází v mitochondriích a je součástí elektron transportního řetězce. Funguje také jako endogenní AOX, chová se jako donor vodíku a oxiduje tak ROS, především peroxylové a superoxidové radikály (Frei et al., 1990). V reakci s ROS vzniká ubisemichinonový radikál, který pokud není regenerovaný zpět na ubichinon, se chová jako prooxidant, pokud dochází k jeho reakci s kyslíkem, tvoří peroxylový radikál (Maroz et al., 2009). Dalším endogenním AOX je GSH, při jeho reakci s ROS dochází k přenosu vodíku preferenčně z jeho thiolové skupiny na ROS a vzniká GSH radikál. GSH je všestranný AOX a dokáže ochotně reagovat s celou řadou ROS, nejochotněji však reaguje s OH• (Galano & Raúl Alvarez-Idaboy, 2011). Melatonin je také jeden z endogenních AOX, v lidském těle je syntetizován ze serotoninu. Funguje jako hormon, podílý se na řízení biologických rytmů a cyklu spánku a bdění (Lewy et al., 1992), kromě toho má také AOX vlastnosti (Poeggeler et al., 1994). Velkou skupinu AOX tvoří polyfenoly, ty jsou dále rozděleny na flavonoidy, fenolové kyseliny, lignany a stilbeny. Obecně se jedná se o sloučeniny, obsahující několik fenolových skupin. Fenolové kyseliny a flavonoidy jsou přítomné ve vysokém množství u

mnoha druhů ovoce a zeleniny, hodně se vyskytují v červeném ovoci jako jsou jahody, borůvky a ostružiny, ve kterých často fungují jako pigmenty (Häkkinen et al., 1999). Lignany mají nejvyšší výskyt v lněných semínkách (Meagher & Beecher, 2000) a stilbeny se nachází ve vínu, ale jen v malých koncentracích, takže nejsou tak velikou součástí diety jako ostatní polyfenoly (Sun et al., 2006).

3.2.2 Syntetické

Syntetické antioxidanty jsou často přidávané jako aditiva do jídla nebo kosmetiky. Jedním z nejznámějších z nich je butylhydroxytoluen (BHT). BHT je silný AOX a je podle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin v množství 0,25 mg/kg váhy za den bezpečný ke konzumaci bez vzniku žádných vedlejších účinků (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2012). Působením tepla a UV záření, je ale schopen reagovat s kyslíkem, tím dochází k tvorbě reaktivních metabolitů, které jsou toxičtější než samotný BHT a byly spojeny se vznikem rakoviny (Dai et al., 2023). BHT strukturně podobný AOX je butylhydroxyanizol (BHA), ten slouží jako přídavek do jídla. Bezpečné množství BHA ke konzumaci bylo stanoveno jako 1,00 mg/kg váhy za den (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2011). BHT a BHA se v těle hromadí, když jejich koncentrace přesáhne určitého bezpečného množství, tak mohou být toxické. Na modelu myších buněk, toxicita BHA spočívala ve zvýšení množství cytosolického Ca^{2+}, což vedlo buď k zvýšení produkce ROS mitochondrií nebo indukci apoptózy. BHT zase způsobuje neapoptotickou smrt buňky (Mizobuchi et al., 2022). Tert-butylhydrochinon (TBHQ) je plně syntetický AOX, přidávaný často do tuků a olejů. Přijatelné denní množství bez vzniku vedlejších účinků TBHQ je 0,7 mg/kg váhy. Ve vyšším množství, než bylo uvedeno, může být toxický, podle EFSA ale není karcinogenní a nejcitlivější na jeho účinky jsou psy (Authority (EFSA), 2004). Stále dochází k vyvoji nových derivátů existujících syntetických AOX, které jsou schopné dosahovat lepších výsledků v odstraňování ROS (Yehye et al., 2012). Existuje mnoho dalších plně syntetických AOX a je i mnoho přírodních AOX, které jsou syntetizované v laboratoři pro jejich lepší dostupnost, jedním z nich je kyselina nordihydroguaiaretová (NDGA). NDGA se nachází v přírodě, ale bývá často uměle syntetizována, její přidání dokáže zabránit senesceci a vadnutí rostlin a ovoce, je tak možné ji využít pro prodloužení jejich života po sběru (Li et al., 2023). NDGA má také terapeutické účinky, bylo dokázáno že je schopná zvyšovat Ca^{2+} koncentraci v cytosolu rakovinných buněk (v uvedené studii se jednalo o rakovinu prostaty) a zpomalovat nebo zabraňovat tak jejich proliferaci (Huang et al., 2004). Má také neuroprotektivní účinky díky její schopnosti stabilizovat koncentraci Ca^{2+} (Goodman et

al., 1994). U myší bylo zjištěno, že je ale ve vyšších koncentracích hepatotoxická (Lambert et al., 2002).

4 Oogeneze

Oocyty zahajují svůj vývoj už během embryonálního stádia vývoje člověka. Celý proces začíná diferenciací oogonií z primordiálních zárodečných buněk. Diferencované oogonie se kolem druhého měsíce embryonálního vývoje začínají mitoticky dělit, postupně se tak zvyšuje jejich množství a jejich maxima je dosaženo v pátém měsíci, kdy se jich u člověka naakumuluje kolem 7 milionů, poté ustává mitóza a začíná degenerace zárodečných buněk, jejich množství se od této doby už jen postupně snižuje. Po sedmém měsíci pak dochází k hromadné degradaci oogonií, které se do té doby ještě nediferencovaly na primární oocyty. Při narození se zárodečných buněk u člověka nachází okolo 2 milionů a jejich množství dále klesá, před první ovulací jich už zbývá jen okolo 300 000 (Baker, 1963). Počet zárodečných buněk se ale značně liší mezi jednotlivci a mohou se tak vyskytovat ve výrazně nižším množství (Forabosco & Sforza, 2007). Primární oocyty tedy vznikají z oogonií a následně vstupují do prvního meiotického dělení. V rámci meiózy se primární oocyt dostane do diplotenní fáze profáze I, kde se meióza zastaví a znovu pokročí až na začátku ovulace, kde dojde k jejich maturaci a vzniku sekundárních oocytů. Další nezbytná součást oogeneze je nárůst množství mitochondrií v buňkách. V oogoniích postupně dochází k replikaci mtDNA a v primárních oocytech je už 317 000±184 000 kopií mtDNA. Počet kopií mtDNA při přechodu do meiózy II (MII) opět trochu stoupá, ale moc výrazně se nemění a opět začíná narůstat až po fertilizaci. Vysoké množství mitochondrií je důležité pro správné fungování oocytu, buněčné dělení a stavba dělícího vřeténka jsou totiž energeticky vysoce náročné procesy, které vyžadují velké množství ATP. Mitochondrie se také společně s ER podílejí na udržování koncentrace Ca^{2+} iontů v buňce, nízký počet mitochondrií je spojený se sníženou kvalitou oocytů, ovariální insuficiencí (May-Panloup et al., 2005) a infertilitou.

S vývojem oocytu je spojený vývoj folikulu, kterým je oocyt obklopený. Folikulární vývoj stejně jako oogeneze začíná už v embryonálním stádiu vývoje, ačkoliv trochu později. Ze začátku se folikul skládá z jedné vrstvy plochých granulózních buněk, tvořících primordiální folikul. Postupem času dochází k vzniku primárního folikulu, to zahrnuje změnu tvaru GC z plochých na kubické, jejich replikaci a navýšení množství vrstev obklopujících oocyt, samotný folikul se také zvětšuje, aby dal prostor pro růst oocytu, ale i poté co dojde k zastavení růstu oocytu, se folikul bude nadále zvětšovat. Postupně se začíná diferencovat také zona pellicuda (ZP), což je vrstva buněk, která je mezi oocytem a GC (Lintern-Moore et al., 1974; Motta et

al., 1994). S přibývajícím množstvím buněk také přibývá množství receptorů pro folikul stimulující hormon (FSH), kterým je růst folikulu v této části vývoje řízen, také dochází k tvorbě mnoha spojů mezi jednotlivými buňkami a oocytem (Jeppesen et al., 2012). Dalším vývojovým krokem je stálý přírůst GC, diferenciace thekálních buněk na povrchu folikulu, diferenciace GC na buňky kumulární (CC) a buňky stěnové granulózy, k diferenciaci CC kolem oocytu dochází působením faktorů produkovaných oocytem (Li et al., 2000). Následuje formace antra, tedy vznik antrálního folikulu, kumulární buňky se od sebe začínají oddělovat, umožňuje to sekrece folikulární tekutiny do mezibuněčného prostoru řízená GC, vzniká tak dutina, která je vyplněná folikulární tekutinou, postupem vývoje dochází k jejímu zvětšování (Motta et al., 1994). V této fázi také dochází působením FSH k expresi receptorů na luteinizační hormon (LH) na thekálních i granulózních buňkách a postupnému snižování počtu FSH receptorů, vývoj předovulačního folikulu je od této doby řízen hlavně díky působení LH (Jeppesen et al., 2012). V posledním stádium folikulogeneze vzniká z antrálního folikulu Graafův folikul, v něm už je antrum plně vyvinuté a ZP je obklopena několika vrstvami buněk tvořící coronu radiatu (Motta et al., 1994). V Graafově folikulu se nachází sekundární oocyt, který čeká na ovulaci. Většina folikulů se ve vaječníku nachází v primordiálním stádiu, před ovulací se jich několik začne zvětšovat a z nich jeden vybraný maturaci dokončí, zbytek podléhá atrézii, což je apoptotický proces, řízený hormony a zahrnující ztrátu FSH receptorů. (Chikazawa et al., 1986).

4.1 Jaderná maturace

Maturace oocytů je stimulována hormony produkovanými hypotalamem pro zahájení ovulace, jejich působením dochází k dokončení prvního meiotického dělení a jeho následném zastavení v metafázi II, primární oocyt se při tomto procesu dělí na sekundární oocyt a první pólové tělísko. Maturace se dělí na jadernou a cytoplazmatickou. Během jaderné maturace dochází ke kondenzaci chromatinu a rozpadu zárodečného váčku (GVBD). Zárodečný váček (GV) obklopuje jádro oocytu a tvoří jadernou membránu, jeho rozpad umožní uvolnění chromozomů do cytoplazmy a pokročení meiózy. GVBD je zahájeno zvýšením koncentrace LH, samotné oocyty savců na něj ale receptory nemají, místo toho LH působí skrz thekální a granulózní buňky, které jsou součástí COC (Peng et al., 1991). Buňky stěnové granulózy přes kumulární buňky dodávají prostřednictvím buněčných spojů cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) do oocytu a podporují tak udržování zastavení meiozy inhibicí fosfodiesterázy (PDE3A), která je zodpovědná za degradaci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Pokud jsou tedy kanály mezi buňkami otevřené tak je v oocytu vysoká koncentrace cAMP a cGMP a

PDE3A je inhibována. Po vazbě LH na receptory na granulózních buňkách dojde k fosforylaci a uzavření buněčných spojů, to vede k snížení koncentrace cGMP v oocytu i v granulózních buňkách, aktivaci PDE3A, jí katalyzovanou degradaci cAMP (Norris et al., 2009). Vysoká koncentrace cAMP udržuje aktivní protein kinázu A, ta udržuje cyklin dependentní kinázu 1 ve fosforylovaném stavu a zabraňuje tím složení a aktivaci maturaci podporujícího faktoru a tím i pokročení meiozy, snížení koncentrace cAMP tak vede k jejímu pokročení do metafáze II (Newhall et al., 2006), kde nastává další zastavení až do oplození nebo vyloučení oocytu.

4.2 Cytoplazmatická maturace

Cytoplazmatická maturace není tak dobře definovaná, ale dochází v ní mimo jiné k reorganizaci mikrotubulů a mikrofilament a díky tomu umožněné migraci a strukturním a funkčním změnám v organelách v rámci oocytu. V období zárodečného váčku se mitochondrie nachází nejvíce koncentrované v perinukleárním prostoru, nejspíše proto aby ATP bylo tvořeno co nejblíže k vznikajícímu dělícímu vřeténku, po jeho rozpadu dochází k jejich migraci a více homogennímu rozmístění mitochondrií po celém oocytu, jejich pohyb je umožněn mikrotubuly (Takahashi et al., 2016; Trebichalská et al., 2020). Část mitochondrií se od začátku maturace postupně hromadí kolem endoplazmatického retikula, kde s ním dále interagují a do druhého zastavení meiózy se s ER pak spojují a vytvářejí komplexy. Další organely, které jsou značně ovlivněné v průběhu cytoplazmatické maturace jsou Golgiho aparáty, postupně totiž dochází k jejich degradaci, nebo přeměně na kortikální granule (Sathananthan et al., 1985), ty jsou poté nezbytné pro to, aby došlo ke správné fertilizaci oocytu a také zabraňují polyspermii (Sathananthan & Trounson, 1982).

4.3 IVM

IVM je rozvíjející se laboratorní technika, která je součástí asistované reprodukční technologie (ART), v poslední době je účinnost IVM předmětem mnoha testů. Výhoda IVM oproti standardnímu IVF je, že dochází k administraci minimálního nebo i žádného množství gonadotropinů, u IVF se jedná konkrétně o lidský choriový gonadotropin (hCG), FSH a gonadotropin uvolňující hormon (GnRH) antagonisty, k přípravě oocytů před jejich odebráním do *ex vivo* média. Lze tak předejít vzniku nežádoucích účinků hormonové stimulace, jako je vznik ovariálního hyperstimulačního syndromu (OHSS) u žen (Walls et al., 2015).

Na vznik OHSS při ovariální stimulaci jsou náchylné zejména ženy s polycystickými ováriemi (PCO) a s polycystickým ovariálním syndromem (PCOS), Zhong et al., (2012) uvádějí, že se OHSS vyvinulo u 15,8 % žen s PCOS a u 11,1 % žen s PCO, zatímco u žen s normálními ováriemy jen u 5,4 %. Na frekvenci vzniku OHSS působením gonadotropinů hCG

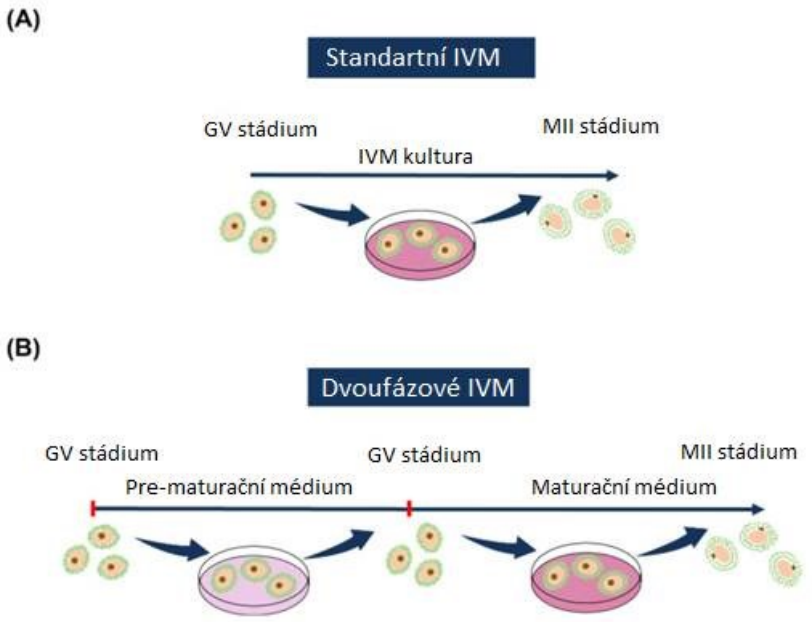
a GnRH agonisty (GnRHa), jakožto finálních spouštěčů maturace oocytů u žen náchylných na vznik OHSS podstupujících IVF bylo zaměřeno spoustu studií. Sun et al., (2021) uvádějí, že z 2699 žen s PCOS podstupující IVF se u 24,8 % vyvinul OHSS při stimulaci s hCG. Krishna et al., (2016) zaznamenaly vznik OHSS u 37,6 % žen s PCOS podstupujících IVF po stimulaci s hCG, také v jejich studii zjistily, že při použití GnRHa místo hCG nedošlo k vzniku OHSS ani u jedné z těchto žen. Při použití GnRHa také zaznamenaly větší množství oplozených oocytů a embryí. Použití alternativních ovariálních stimulantů místo hCG u žen náchylných na vznik OHSS bylo podrobeno i studii Abbara et al., (2018), ty porovnaly vliv hCG, GnRHa a kisspeptinu, u žen s administrovaným hCG se OHSS projevil nejčastěji. Vzhledem k nižší frekvenci vzniku OHSS se GnRHa jeví jako šetrnější varianta hormonu k ovariální stimulaci. Klíčovou otázkou pak je, jestli je schopen dosahovat stejných, nebo dokonce i lepších výsledků v produkci vyššího množství oplozených oocytů a množství embryí než hCG. Ve výše zmíněné studii Krishna et al., (2016), použití GnRHa vedlo k zvýšení množství tvorby embryí a frekvenci oplození. V jiné studii Zhou et al., (2022) podrobily ženy s malým rizikem vzniku OHSS stimulaci GnRHa a hCG. Použití GnRHa vedlo k srovnatelnému, ale nižšímu množství vzniku embryí (53,5 % vs 57,9 %) než při použití hCG, frekvence oplození byla také nižší (78,9 % vs 81,8 %). Použití hCG a GnRHa dohromady vedlo k navýšení množství embryí (74,6 %) a porodů (32,6 %) oproti samotným hormonům odděleně. Kombinace obou je tedy zdánlivě nejúčinnější.

Během standardní IVM mohou být oocyty připravovány před odebráním do média *ex vivo* podáváním FSH (několik dní před odebráním), hCG (kolem 36 hodin před odebráním) nebo jejich kombinací, IVM ale hormonální přípravu nevyžaduje. COC jsou poté odebrány do kultivačního média v GV stádiu, kde je hormony indukovaná jejich maturace. Na to, jestli existuje rozdíl mezi účinnosti v IVM s a bez hormonální přípravy se zaměřil Lin et al., (2020), uvádějí, že z 129 žen s hCG přípravou a 195 bez ní, měla hCG skupina vyšší množství maturovaných oocytů (52,68 % vs 48,56 %), rozdíl ale nebyl statisticky významný a množství úspěšných porodů bylo u obou srovnatelné. Jejich výsledky tak naznačují, že příprava gonadotropiny není nutná k IVM a je možné se bez ní obejít i bez významných ztrát na efektivitě. IVM tak může potencionálně představovat vhodnou metodu zejména pro ženy náchylné na vznik OHSS.

Účinnost IVM je ale stále předmětem debaty a napříč studiemi se výsledky liší, obecně však použití standardního IVM vede k nižší porodnosti a produkci embryí než při použití IVF. Zheng et al., (2021) porovnaly IVM oocytů předem nestimulovaných hCG se standardním IVF, z celkového množství 351 žen s PCOS IVM podstoupilo 175 a IVF 176. Při IVM pak došlo k

úspěšnému porodu u 22,3 % a při IVF k 50,6 %, u IVF skupiny se navíc vyvinul OHSS u 6,3 % žen. Walls et al., (2015) uvádějí, že k živému porodu došlo s použití IVM oocytů u 18,8 % z 56 žen a s IVF 31,0 % z 65 žen s PCOS, v jejich publikaci tak bylo efektivnější IVF v množství úspěšných porodů. Braam et al., (2019) zase uvádějí, že bylo dosaženo 55 % frekvence oplození při stimulaci oocytů nízkým množstvím hCG a FSH u žen náchylných na OHSS podstupujících IVM. Stimulací nedošlo k vzniku OHSS ani u jedné ženy a množství porodů bylo 5,3 % což je oproti ostatním výsledkům IVM poměrně nízký počet. Ve studii také pozorovaly zvýšenou efektivitu IVF po předchozím nezdařeném IVM, spojení metod by tak mohlo vést k vylepšení výsledků. Toto bylo dále podrobeno výzkumu Xu et al., (2024), v jejich publikaci popisují, že u žen s PCOS po nezdařeném nestimulovaném IVM má IVF (79 žen) o něco vyšší ale srovnatelné výsledky s IVF (237 žen) v počtu úspěšných porodů (55,6 % vs 48,6 %). OHSS se pak vyvinul u 5,1 % vs 7,6 %. standardní IVM tedy nedosahuje tak dobrých výsledků jako IVF. IVM je ale stále vyvíjející se metoda, složení IVM kultivačních médií podstupují stálou optimalizaci a její výsledky tak mají potencionál se zlepšovat.

Dvoufázové IVM (Obr. 1) je relativně nová metoda, která dosahuje lepších výsledků v míře maturovaných oocytů a jejich kvalitě než standardní IVM. Skládá se ze dvou fází, první je pre-maturační fáze, COC jsou odebrány a umístěny na pre-maturační médium (médium může obsahovat například C-typ natriuretický peptid), kde dochází k jejich inkubaci (typicky se inkubují 24 hodin). V druhé fázi jsou po inkubaci přemístěné do maturační médium, kde nastává samotná maturace (Sánchez et al., 2017). Sanchez et al., (2019) prozkoumali rozdíl mezi účinností standardního IVM a dvoufázového kapacitačního IVM (CAPA-IVM). Při použití CAPA-IVM byly oocyty kultivovány 24 hodin v pre-maturačním médiu obsahujícím C-typ natriuretický peptid. Využití CAPA-IVM výrazně zvýšilo úspěšnost maturace oocytů oproti standardnímu IVM (62 % vs 48 %) a produkci kvalitních embryí. Množství úspěšných porodů u žen s PCOS při použití CAPA-IVM vyšlo ve studii Vuong et al., (2025) 38,3 %, což je na poměry IVM relativně vysoké číslo, také zjistili, že aplikace FSH před odběrem oocytů do pre-maturačního média nepomohlo k vyšší porodnosti (31,7 %), použití gonadotropinů u CAPA-IVM tak není nutné a vede spíše k nižšímu množství porodů. V publikaci Vuong et al., (2020) uvádějí, že při použití CAPA-IVM proti kontrole došlo k zvýšení míry maturace (63,6 % vs 49,4 %) a množství živých porodů (47,5 % vs 32,0 %) u žen s PCOS. Úspěšnost CAPA-IVM v zvýšení míry maturace a v zvýšení množství živých porodů oproti standardní IVM je tedy výrazně vyšší, přesto je to ale poměrně nová metoda a v produkci kvalitních embryí a dosažení živého porodu, ještě nebyla u člověka tak dobře prozkoumaná, bylo by tak dobré ji podrobit více testování.



Obr. 1 – (A) standardní IVM - oocyty jsou odebrány v GV stádiu a maturovány na maturačním médiu do MII stádia. (B) dvoufázová IVM - oocyty jsou odebrány v GV stádiu a umístěny do pre-maturačního média, kde dochází k jejich inkubaci, poté jsou přemístěné a maturované v maturačním médiu do MII stádia (Upraveno z Yang et al., 2021).

5 Efekt vybraných AOX na IVM

V IVM podmínkách dochází k zvýšenému množství vzniku ROS v oocytu. Jejich vznik je v IVM podmínkách ovlivněn mnoho exogenními faktory, jedním z nich je koncentrace kyslíku. Ve folikulární tekutině v lidském těle je obsah rozpuštěného kyslíku okolo 1,5 % - 6,7 % (Redding et al., 2008), ale v IVM podmínkách je běžně používaná koncentrace kyslíku 5 % nebo 20 %. Vystavení oocytů vyššímu množství kyslíku, než je za fyziologických podmínek běžné, by tak mohlo vést k zvýšení produkce ROS. Studie zaměřené na kvalitu oocytů, produkovaných embryí a množství živých porodů u člověka naznačují, že optimálnější koncentrace kyslíku, zejména v brzkých stádiích vývoje, je skutečně 5 % (Boumerdassi et al., 2024; Herbemont et al., 2021; Kasterstein et al., 2013). Světlo laboratoře, v závislosti na jeho intenzitě a době vystavení oocytů, také může zvyšovat množství produkce ROS, čímž dochází k snížení míry maturace oocytů narušením dělícího vřeténka u savců (Zhang et al., 2020). Vzhledem k tomu, že v IVM podmínkách jsou oocyty vystavené mnoho faktorům spojených s navýšením produkce ROS, je přidání antioxidantů na jejich maturační média prospěšné k

udržení balancu mezi ROS/antioxidant, zamezení OS a tím zlepšení výsledků IVM. Na IVM médiích bylo již testováno mnoho AOX, kromě níže podrobněji zmíněných se jedná například o lykopen (Sidi et al., 2022), tanin (Yin et al., 2021), kyselina listová (Z. Yang et al., 2024) a mnoho dalších.

5.1 Koenzym Q10

Jak už bylo výše zmíněno, koenzym Q10 je přenašeč elektronu v elektron transportním řetězci a také neenzymatický endogenní antioxidant. Testování jeho vlivu na zlepšení výsledků IVM bylo provedeno Ma et al., (2020), v jejich studii vytvořili maturační médium s přidaným množstvím 50 µmol/L koenzymu Q10. Vyšlo jim, že u žen podstupujících IVM ve věku 38 - 46 let došlo k zvýšení míry zrání oocytů oproti kontrole (82,6 % vs 63,0 %), také došlo ke snížení frekvence vzniku chromozomálních aneuploidií (4,1 % vs 7,0 %). Pozitivní dopady koenzymu Q10 na IVM oocytů byly také zaznamenány u skotu, kde došlo ke snížení apoptózy u oocytů (Ruiz-Conca et al., 2022). Na druhou stranu, Maside et al., (2019) nezaznamenali pozitivní vliv na IVM a fertilizaci oocytů prasat po přidáním exogenního koenzymu do maturačního média.

5.2 Melatonin

Melatonin je hormon a endogenní antioxidant, který může být syntetizován přímo v lidských kumulózních buňkách. Jeho přítomnost v maturačních médiích vede k snížení frekvence vzniku mitochondriálních dysfunkcí a redukci množství Ca^{2+} v cytoplazmě oocytů (Y.-J. Liu et al., 2019), také má v publikaci Wei et al., (2013) pozitivní vliv na podporu jaderné maturace při použité koncentraci 1 nM u oocytů rozmrazených po vitrifikaci podstupujících IVM. Yang et al., (2023) uvádějí, že melatonin v porovnání s kontrolou snížil množství ROS v oocytu a vzniku aneuploidií, zvýšil poměr kvalitních embryí u žen starších 35 let (33,33 % vs 50,00 %), a produkci ATP mitochondriemi. Ve studii Rodrigues-Cunha et al., (2016), měl melatonin také vliv na zvýšení produkce Cu/ZnSOD v COC.

5.3 Resveratrol

Účinek resveratrolu na lidské a myší oocyty byl popsán v publikaci M.-J. Liu et al., (2018). Autoři resveratrol přidali v koncentracích 0,1 µM, 1 µM a 10 µM do IVM médií oocytů žen ve věku 38 – 45 let. Pozorovali, že při použití koncentrace 1 µM resveratrolu je v porovnání s kontrolou vyšší míra maturovaných oocytů. Resveratrol také přispíval k omezení špatné formace dělícího vřeténka a podporoval správné napojení chromozomů na mikrotubuly, tím může snižovat míru aneuploidie. Stejné pozitivní změny pozorovali i u myších oocytů (koncentrace resveratrolu byla 1 µM), kde navíc došlo k zvýšení míry transkripce SOD1 a CAT.

V publikaci Jia et al., (2018) popisují pozitivní efekt resveratrolu na zmírnění měknutí zony pellucidy a podporu jejího opětovného tvrdnutí u oocytů obézních myší, neoptimální tuhost zony pellucidy přispívá k neschopnosti oplození. Resveratrol má tak celkově kladný dopad na zvýšení kvality oocytů u starších myší (48 – 52 týdnů) a žen (38 – 45 let).

5.4 Kvercetin

Kvercetin je exogenní antioxidant ze skupiny flavonoidů, Cao et al., (2020) uvádějí, že jeho přidáním (10 µM) do maturačního média, došlo k zvýšení míry maturace oocytů oproti kontrole (71,4 % vs 51,8 %) a zvýšení míry oplození (76,2 % vs 62,2 %). Autoři také pozorovali téměř dvojnásobné zvýšení tvorby blastocyst a zvýšené množství kvalitních blastocyst (28,6 % vs 15,7 %) u žen ve věku 22 – 42 let. Pozitivní změny zaznamenali i u starších myší, kde vedl k zvýšení transkripce antioxidantů, snížení množství mitochondriálních dysfunkcí a apoptózy u oocytů.

5.5 Vitamin C

U skotu působení vitamínu C (kyselina askorbová) na IVM oocyty bylo podrobeno studii Wang et al., (2024), jejich výsledky ukázaly, že přidáním 50 µM AA do maturačního média došlo k nejvyššímu zvýšení míry maturace oocytů oproti kontrole (82,27 % vs 72,96 %), na zvýšení míry rýhování měla zase nejvyšší vliv koncentrace 20 µg/mL (67,95 % vs 63,55 %). Žádná z použitých koncentrací však nenapomohla k zvýšení tvorby blastocyst. Podobných výsledků dosáhli i Dalvit et al., (2005), s tím rozdílem, že e své publikaci nepopisují zvýšenou míru maturace oocytů skotu (použitá koncentrace AA byla 5 mmol/l). Nohalez et al., (2018) uvádějí, že u prasečích oocytů nedošlo přidáním 50 µg/mL AA k změně v míře maturace a oplození oocytů, došlo však k zvýšení přežití při rozmrazení oocytů po vitrifikaci. AA tedy nemá příliš pozitivní vliv na IVM u prasečích oocytů.

5.6 Vitamin E

Tao et al., (2010) otestovali vliv maturačního média obsahujícího vitamín E (vit-E) (použité koncentrace 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM) na maturaci prasečích oocytů zbavených kumulárních buněk. V jejich studii vyšlo, že vit-E v žádné koncentraci statisticky významně neovlivňoval míru maturace a rýhování prasečích oocytů, docházelo však k zvýšení míry vzniku blastocyst u všech použitých koncentracích v porovnání s kontrolou. S tím souhlasí výsledky Tareq et al., (2012), v jejich experimentech aplikací 1 mM vit-E do maturačního média nedošlo k statisticky relevantní změně míry maturace oocytů a vzniku blastocyst oproti kontrole. Při použití kombinace vit-E a L-selenomethioninu (SeMet) (koncentrace 5µg/l) ale

došlo v porovnání s kontrolou k zvýšení míry maturace oocytů (85,1 % vs 67,6 %) a zvýšení tvorby blastocyst (27,1 % vs 19,0 %). Samotný SeMet je ale schopen výrazně zvyšovat jak míru maturace oocytů (80,2 % vs 67,6 %), tak tvorbu blastocyst (25,0 % vs 19,0 %). Kombinace Vit-E a SeMet, nebo samotný SeMet, ale ne samotný Vit E, jsou tak použitelné pro zlepšení kvality oocytů a zvýšení podílu maturovaných oocytů.

5.7 Nobiletin

Nobiletin je flavonoid s nejvyšším výskytem u citrusů. Jeho efekt v různých koncentracích (10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) na IVM oocytů skotu byl zkoumán Cajas et al., (2020). V koncentracích 25 µM a 50 µM nobiletinu došlo k zvýšení míry jaderné a cytoplazmatické maturace, podpoře migrace mitochondrií v rámci cytoplazmatické maturace, snížení množství ROS ale i GSH (nízké množství GSH bylo nejspíš způsobené jeho spotřebováním při eliminaci ROS), také došlo k zvýšení mitochondriální aktivity v oocytech a zvýšené tvorbě blastocyst. Zbylé použité koncentrace (10 µM a 100 µM) nobiletinu nevyvolaly statisticky významné změny na IVM oocytů. Feng et al., (2025) při studii vlivu nobiletinu (koncentrace 25µM) na IVM prasečích oocytů, došli k podobným závěrům týkajících se zvýšení kvality oocytů, redukci OS a snížení apoptózy oocytů, ale v rozporu s předchozí studií zaznamenaly zvýšené množství GSH.

5.8 N-acetylcystein

N-acetylcystein (NAC) je syntetický AOX. V experimentu Sun et al., (2021), přidání 1 mM NAC do maturačního média kravských oocytů vedlo v porovnání s kontrolou k zvýšení množství maturovaných oocytů (83,06 % vs 79,03 %), počtu kvalitních dvoubuněčných stádií embrya (92,93 %vs 88,30 %), blastocyst (41,69 % vs 37,15 %) a zvýšení množství transkribovaného GSH. Vyšší koncentrace (10 mM) měla ale negativní vliv na oocyty. V publikaci Gago et al., (2024) v množství 1mM NAC, byl schopný oproti kontrole zvýšit frekvenci správného uspořádání dělících vřetének a správnému seřazení chromozomů na ekvatoriální rovině (94,39 % vs 83,33 % a 85,71 % vs 80,95 %). NAC také snížil množství špatně sestavených dělících vřetének u oocytů skotu.

5.9 SkQ1

SkQ1 (plastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium) je syntetický antioxidant, přednostně působící v mitochondriích, kde je schopný zabraňovat peroxidaci fosfolipidů v membránách. Jako efektivní AOX funguje už ve velice nízkém množství a ve vyšším množství (1 µM) působí jako silný prooxidant (Antonenko et al., 2008). V publikaci Li et al., (2024)

uvádějí, že koncentrace 0,01 µM SkQ1 měla proti kontrole pozitivní vliv na zvýšení míry maturace myších oocytů, v následné IVF docházelo k zvýšení počtu dělících se embryí a tvorby blastocyst, došlo také k zvýšení transkripce AOX a snížení míry mitochondriálních dysfunkcí. Ve vyšším množství měl SkQ1 ale negativní vliv. Ve studii je dále uvedeno, že nižší množství SkQ1 než bylo použito by mohlo dosahovat ještě lepších výsledků.

5.10 ZnO-NPs

ZnO-NPs jsou nanočástice (částice pod 100 nm) skládající se z oxidu zinečnatého. Mohou být plně syntetizované za použití chemikálií nebo takzvaně „zeleně" za pomoci rostlinných extraktů, mají vysokou AOX a antibakteriální schopnost (E et al., 2024; Soren et al., 2018). Správná koncentrace ZnO-NPs je důležitá pro jejich bezpečné fungování, v publikaci Camaioni et al., (2021) uvádějí, že množství 5 µg/ml ZnO-NPs začalo být toxické a zabraňovalo expanzi COC u myší. Efekt ZnO-NPs na IVM kravských oocytů byl zkoumán ve studii Quintão et al., (2024), kde bylo zjištěno, že přidání ZnO-NPs do maturačního média oocytů vedlo k snížení množství ROS přítomných v oocytech a embryích, ale na zvýšení míry maturace oocytů a množství vzniklých blastocyst neměly žádný pozitivní efekt ani v jedné z použitých koncentrací (1,0 µg/mL a 1,5 µg/mL).

5.11 CeO_2-NPs

Nanočástice oxidu ceru (CeO_2-NPs) jsou silným AOX schopným odstraňovat velké množství ROS (Rubio et al., 2016). V publikaci Ariu et al., (2017) uvádějí, že přidání CeO_2-NPs v žádné z použitých koncentrací (44 µg/mL, 88 µg/mL a 220 µg/mL) do maturačního média nevedlo k zvýšení míry maturace oocytů skotu, ani k snížení množství ROS přítomných v oocytech. Při použití koncentrace 44 µg/mL došlo ale k zvýšení míry vzniku blastocyst oproti kontrole (35,8 % vs 12,5 %), také došlo k snížení transkripce pro-apoptotických proteinů. CeO_2-NPs tak byly schopné v koncentraci 44 µg/mL snížit míru apoptózy a zvýšit míru tvorby blastocyst.

6 Závěr

Výsledky IVM jsou závislé na složení maturačního média a postupem času dochází k jejich zlepšování. Přidáváním antioxidantů do IVM média oocytů je možné výrazně zlepšit její výsledky, AOX mají totiž schopnost snižovat množství nadměrně produkovaných ROS v *ex vivo* podmínkách. Antioxidanty tak mají potenciál minimalizovat vznik deformací dělícího vřeténka a vzniku aneuploidií způsobených OS, tím přispívají k celkovému zlepšení kvality

oocytů. Výsledky studií zaměřených na použití AOX v IVM médiích oocytů skutečně ukazují, že došlo k zvýšení efektivity IVM, která je v některých případech už i srovnatelné s IVF.

Vzhledem k špatné dostupnosti lidských oocytů pro laboratorní účely, je ale efekt určitých antioxidantů prozkoumaný jen na zvířecích modelech, kde v specifických koncentracích pro daný AOX většinou vedou k zlepšení kvality oocytů. V budoucnu by tedy bylo ideální prozkoumat efekt antioxidantů, které mají již potvrzený pozitivní vliv na vývojovou kompetenci oocytů u laboratorních zvířat i na člověku.

Se zlepšujícími se výsledky by mohlo v budoucnu dojít k častějšímu praktikování IVM pro ženy podstupující ART, přestože IVM zatím není tak účinná jako IVF tak její výhoda spočívá v eliminaci risku vzniku OHSS, nižší ceně a menší časové náročnosti.

7 Použitá literatura

* označuje sekundární citaci

Abbara, A., Islam, R., Clarke, S. a., Jeffers, L., Christopoulos, G., Comninos, A. n., Salim, R., Lavery, S. a., Vuong, T. n. l., Humaidan, P., Kelsey, T. w., Trew, G. h., & Dhillo, W. s. (2018). Clinical parameters of ovarian hyperstimulation syndrome following different hormonal triggers of oocyte maturation in IVF treatment. *Clinical Endocrinology*, *88*(6), 920–927. https://doi.org/10.1111/cen.13569

Akino, N., Wada-Hiraike, O., Terao, H., Honjoh, H., Isono, W., Fu, H., Hirano, M., Miyamoto, Y., Tanikawa, M., Harada, M., Hirata, T., Hirota, Y., Koga, K., Oda, K., Kawana, K., Fujii, T., & Osuga, Y. (2018). Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *470*, 96–104. https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.10.002

Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., & Rovira, C. (2009). The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(33), 11751–11761. https://doi.org/10.1021/ja9018572

Al-Zubaidi, U., Adhikari, D., Cinar, O., Zhang, Q.-H., Yuen, W. S., Murphy, M. P., Rombauts, L., Robker, R. L., & Carroll, J. (2020). Mitochondria-targeted therapeutics, MitoQ and BGP-15, reverse aging-associated meiotic spindle defects in mouse and human oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *36*(3), 771–784. https://doi.org/10.1093/humrep/deaa300

Antonenko, Y. N., Avetisyan, A. V., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Chertkov, V. A., Domnina, L. V., Ivanova, O. Yu., Izyumov, D. S., Khailova, L. S., Klishin, S. S., Korshunova, G. A., Lyamzaev, K. G., Muntyan, M. S., Nepryakhina, O. K., Pashkovskaya, A. A., Pletjushkina, O. Yu., Pustovidko, A. V., Roginsky, V. A., Rokitskaya, T. I., … Skulachev, V. P. (2008). Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: Synthesis and in vitro studies. *Biochemistry (Moscow)*, *73*(12), 1273–1287. https://doi.org/10.1134/S0006297908120018

Ariu, F., Bogliolo, L., Pinna, A., Malfatti, L., Innocenzi, P., Falchi, L., Bebbere, D., & Ledda, S. (2017). Cerium oxide nanoparticles (CeO2 NPs) improve the developmental competence of in vitro-matured prepubertal ovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, *29*(5), 1046. https://doi.org/10.1071/RD15521

Authority (EFSA), E. F. S. (2004). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to tertiary-butylhydroquinone (TBHQ). *EFSA Journal*, *2*(10), 84. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.84

Baker, T. G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *158*(972), 417–433. https://doi.org/10.1098/rspb.1963.0055

Barritt, J. A., Cohen, J., & Brenner, C. A. (2000). Mitochondrial DNA point mutation in human oocytes is associated with maternal age. *Reproductive BioMedicine Online*, *1*(3), 96–100. https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61946-3

Borgstahl, G. E. O., Parge, H. E., Hickey, M. J., Beyer, W. F., Hallewell, R. A., & Tainer, J. A. (1992). The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell*, *71*(1), 107–118. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90270-M

Boumerdassi, Y., Labrosse, J., Hammami, F., Dahoun, M., Bouyer, J., O'Neill, L., Sarandi, S., Peigné, M., Cedrin, I., Grynberg, M., & Sifer, C. (2024). Impact of oxygen tension during in vitro maturation: A sibling-oocyte prospective double-blinded study. *Fertility and Sterility*, *121*(4), 615–621. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.12.014

Braam, S. C., Consten, D., Smeenk, J. M. J., Cohlen, B. J., Curfs, M. H. J. M., Hamilton, C. J. C. M., Repping, S., Mol, B. W. J., & de Bruin, J. P. (2019). In Vitro maturation of oocytes in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome-A prospective multicenter cohort study. *International Journal of Fertility & Sterility*, *13*(1), 38–44. https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5452

Cabelli, D. E., & Bielski, B. H. J. (1983). Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO2/O2- (hydroperoxyl/superoxide) radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study. *The Journal of Physical Chemistry*, *87*(10), 1809–1812. https://doi.org/10.1021/j100233a031

Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., Ladrón de Guevara, M., Millán de la Blanca, M. G., Ramos-Ibeas, P., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., & González, E. M. (2020). Antioxidant nobiletin enhances oocyte maturation and subsequent embryo development and quality. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5340. https://doi.org/10.3390/ijms21155340

Camaioni, A., Massimiani, M., Lacconi, V., Magrini, A., Salustri, A., Sotiriou, G. A., Singh, D., Bitounis, D., Bocca, B., Pino, A., Barone, F., Prota, V., Iavicoli, I., Scimeca, M., Bonanno, E., Cassee, F. R., Demokritou, P., Pietroiusti, A., & Campagnolo, L. (2021). Silica encapsulation of ZnO nanoparticles reduces their toxicity for cumulus cell-oocyte-complex expansion. *Particle and Fibre Toxicology*, *18*, 33. https://doi.org/10.1186/s12989-021-00424-z

Cao, Y., Zhao, H., Wang, Z., Zhang, C., Bian, Y., Liu, X., Zhang, C., Zhang, X., & Zhao, Y. (2020). Quercetin promotes in vitro maturation of oocytes from humans and aged mice. *Cell Death & Disease*, *11*(11), 965. https://doi.org/10.1038/s41419-020-03183-5

Crespo-Hernández, C. E., Close, D. M., Gorb, L., & Leszczynski, J. (2007). Determination of redox potentials for the Watson−Crick base pairs, DNA nucleosides, and relevant nucleoside analogues. *The Journal of Physical Chemistry B*, *111*(19), 5386–5395. https://doi.org/10.1021/jp0684224

Dai, S., Yu, C., Liang, M., Cheng, H., Li, W., Lai, F., Ma, L., & Liu, X. (2023). Oxidation characteristics and thermal stability of Butylated hydroxytoluene. *Arabian Journal of Chemistry*, *16*(8), 104932. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104932

Dalvit, G., Llanes, S., Descalzo, A., Insani, M., Beconi, M., & Cetica, P. (2005). Effect of Alpha-Tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reproduction in Domestic Animals*, *40*(2), 93–97. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00522.x

Dhakshinamoorthy, S., Jain, A. K., Bloom, D. A., & Jaiswal, A. K. (2005). Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(17), 16891–16900. https://doi.org/10.1074/jbc.M500166200

*Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, *82*(1), 47–95. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001

Dröse, S., & Brandt, U. (2008). The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome *bc*1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(31), 21649–21654. https://doi.org/10.1074/jbc.M803236200

E, B., Sivalingam, A. M., Alex, A., & Neha, B. (2024). In vitro antioxidant activity of green-synthesized zinc oxide (ZnO) nanoparticles utilizing extracts from allium sativum. *Cureus*, *16*(2), e55184. https://doi.org/10.7759/cureus.55184

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2011). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive. *EFSA Journal*, *9*(10), 2392. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2392

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2012). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. *EFSA Journal*, *10*(3), 2588. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2588

Feng, Z., Song, J., Lin, C., Wu, S., Wang, Y., Hui, Q., Pan, Y., Zou, Y., Zeng, C., Guo, J., & Pei, Y. (2025). Enhancing porcine oocyte quality and embryo development through natural antioxidants. *Theriogenology*, *232*, 96–108. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.11.002

Forabosco, A., & Sforza, C. (2007). Establishment of ovarian reserve: A quantitative morphometric study of the developing human ovary. *Fertility and Sterility*, *88*(3), 675–683. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.11.191

Frei, B., Kim, M. C., & Ames, B. N. (1990). Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(12), 4879–4883. https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4879

Gago, S., Diaz-Muñoz, J., & Mogas, T. (2024). Impact of N-acetyl-L-cysteine on spindle morphology and reactive oxygen species in vitrified/warmed in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, *59*(S3), e14619. https://doi.org/10.1111/rda.14619

Galano, A., & Raúl Alvarez-Idaboy, J. (2011). Glutathione: Mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *RSC Advances*, *1*(9), 1763–1771. https://doi.org/10.1039/C1RA00474C

Galanti, F., Licata, E., Paciotti, G., Gallo, M., Riccio, S., Miriello, D., Dal Lago, A., Meneghini, C., Fabiani, C., Antonaci, D., Schiavi, M. C., Scudo, M., Salacone, P., Sebastianelli, A., Battaglia, F. A., & Rago, R. (2023). Impact of different typologies of smoking on ovarian reserve and oocyte quality in women performing ICSI cycles: An observational prospective study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *27*(11), 5190–5199. https://doi.org/10.26355/eurrev_202306_32637

Goel, R., Bitzer, Z., Reilly, S. M., Trushin, N., Foulds, J., Muscat, J., Liao, J., Elias, R. J., & Richie, J. P. (2017). Variation in free radical yields from U.S. marketed cigarettes. *Chemical Research in Toxicology*, *30*(4), 1038–1045. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00359

Goodman, Y., Steiner, M. R., Steiner, S. M., & Mattson, M. P. (1994). Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid β-peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Research*, *654*(1), 171–176. https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91586-5

Goud, P. T., Goud, A. P., Abu-Soud, H. M., & Diamond, M. P. (2004). Role of NADPH and hydrogen peroxide in modulating oxidative stress and oocyte aging. *Fertility and Sterility*, *82*, S111. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.07.281

Gross, E., Sevier, C. S., Heldman, N., Vitu, E., Bentzur, M., Kaiser, C. A., Thorpe, C., & Fass, D. (2006). Generating disulfides enzymatically: Reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(2), 299–304. https://doi.org/10.1073/pnas.0506448103

Hahn, W. S., Kuzmicic, J., Burrill, J. S., Donoghue, M. A., Foncea, R., Jensen, M. D., Lavandero, S., Arriaga, E. A., & Bernlohr, D. A. (2014). Proinflammatory cytokines differentially regulate adipocyte mitochondrial metabolism, oxidative stress, and dynamics. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *306*(9), E1033–E1045. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00422.2013

Häkkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J., & Törrönen, R. (1999). Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, *32*(5), 345–353. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00095-2

Harris, P. L., Quaife, M. L., & Swanson, W. J. (1950). Vitamin E content of foods. *The Journal of Nutrition*, *40*(3), 367–381. https://doi.org/10.1093/jn/40.3.367

Herbemont, C., Labrosse, J., Bennani-Smires, B., Cedrin-Durnerin, I., Peigne, M., Sermondade, N., Sarandi, S., Vivot, A., Vicaut, E., Talib, Z., Grynberg, M., & Sifer, C. (2021). Impact of oxygen tension according to embryo stage of development: A prospective randomized study. *Scientific Reports*, *11*(1), 22313. https://doi.org/10.1038/s41598-021-01488-9

Hertzberg, R. P., & Dervan, P. B. (1984). Cleavage of DNA with methidiumpropyl-EDTA-iron(II): Reaction conditions and product analyses. *Biochemistry*, *23*(17), 3934–3945. https://doi.org/10.1021/bi00312a022

Hoffmann, M. E., & Meneghini, R. (1979). DNA strand breaks in mammalian cells exposed to light in the presence of riboflavin and tryptophan. *Photochemistry and Photobiology*, *29*(2), 299–303. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07052.x

Horie, Y., Suzuki, T., Inoue, J., Iso, T., Wells, G., Moore, T. W., Mizushima, T., Dinkova-Kostova, A. T., Kasai, T., Kamei, T., Koshiba, S., & Yamamoto, M. (2021). Molecular basis for the disruption of Keap1–Nrf2 interaction via hinge & latch mechanism. *Communications Biology*, *4*, 576. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02100-6

Huang, J.-K., Chen, W.-C., Huang, C.-J., Hsu, S.-S., Chen, J.-S., Cheng, H.-H., Chang, H.-T., Jiann, B.-P., & Jan, C.-R. (2004). Nordihydroguaiaretic acid-induced Ca2+ handling and cytotoxicity in human prostate cancer cells. *Life Sciences*, *75*(19), 2341–2351. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.04.043

Chan, C. C. W., Liu, V. W. S., Lau, E. Y. L., Yeung, W. S. B., Ng, E. H. Y., & Ho, P. C. (2005).

Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes. *Molecular Human Reproduction*, *11*(12), 843–846. https://doi.org/10.1093/molehr/gah243

Chattopadhyay, M., Khemka, V. K., Chatterjee, G., Ganguly, A., Mukhopadhyay, S., & Chakrabarti, S. (2015). Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *399*(1), 95–103. https://doi.org/10.1007/s11010-014-2236-7

Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., & Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(1), 166–172. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48474-8

Chikazawa, K., Araki, S., & Tamada, T. (1986). Morphological and edocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *62*(2), 305–313. https://doi.org/10.1210/jcem-62-2-305

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., & Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development*, *13*(1), 76–86.

Jena, N. R., & Mishra, P. C. (2005). Mechanisms of formation of 8-Oxoguanine due to reactions of one and two $OH^{\bullet}$ radicals and the H_2O_2 molecule with guanine: A quantum computational study. *The Journal of Physical Chemistry B*, *109*(29), 14205–14218. https://doi.org/10.1021/jp050646j

Jeppesen, J. V., Kristensen, S. G., Nielsen, M. E., Humaidan, P., Dal Canto, M., Fadini, R., Schmidt, K. T., Ernst, E., & Yding Andersen, C. (2012). LH-Receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(8), E1524–E1531. https://doi.org/10.1210/jc.2012-1427

Jia, Z., Feng, Z., Wang, L., Li, H., Wang, H., Xu, D., Zhao, X., Feng, D., & Feng, X. (2018). Resveratrol reverses the adverse effects of a diet-induced obese murine model on oocyte quality and zona pellucida softening. *Food & Function*, *9*(5), 2623–2633. https://doi.org/10.1039/C8FO00149A

*Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4642. https://doi.org/10.3390/ijms22094642

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. https://doi.org/10.1007/s10815-013-0032-z

Kirkman, H. N., Galiano, S., & Gaetani, G. F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(2), 660–666. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)75835-9

Klug-Roth, Dina., Fridovich, Irwin., & Rabani, Joesph. (1973). Pulse radiolytic investigations of superoxide catalyzed disproportionation. Mechanism for bovine superoxide dismutase. *Journal of the American Chemical Society*, *95*(9), 2786–2790. https://doi.org/10.1021/ja00790a007

Krishna, D., Dhoble, S., Praneesh, G., Rathore, S., Upadhaya, A., & Rao, K. (2016). Gonadotropin-releasing hormone agonist trigger is a better alternative than human chorionic gonadotropin in PCOS undergoing IVF cycles for an OHSS Free Clinic: A Randomized control trial. *Journal of Human Reproductive Sciences*, *9*(3), 164–172. https://doi.org/10.4103/0974-1208.192056

Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigó, R., & Gladyshev, V. N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, *300*(5624), 1439–1443. https://doi.org/10.1126/science.1083516

Kukreja, R. C., Okabe, E., Schrier, G. M., & Hess, M. L. (1988). Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca2+-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *261*(2), 447–457. https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90361-X

Kussmaul, L., & Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(20), 7607–7612. https://doi.org/10.1073/pnas.0510977103

Lambert, J. D., Zhao, D., Meyers, R. O., Kuester, R. K., Timmermann, B. N., & Dorr, R. T. (2002).

Nordihydroguaiaretic acid: Hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicon*, *40*(12), 1701–1708. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00203-9

Lewy, A. J., Ahmed, S., Jackson, J. M. L., & Sack, R. L. (1992). Melatonin shifts human orcadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiology International*, *9*(5), 380–392. https://doi.org/10.3109/07420529209064550

Li, K., Xu, R., Cao, J., & Jiang, W. (2023). Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) maintains the postharvest quality of fresh daylily flower buds (*Hemerocallis citrina)* by enhancing antioxidant metabolism and regulating phytohormone equilibrium. *Postharvest Biology and Technology*, *200*, 112326. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112326

Li, R., Norman, R. J., Armstrong, D. T., & Gilchrist, R. B. (2000). Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells1. *Biology of Reproduction*, *63*(3), 839–845. https://doi.org/10.1095/biolreprod63.3.839

Li, Z., Zhang, Y., Cao, J., Xing, X., Liang, Y., Zhang, Y., Tang, X., Lin, S., Wu, Z., Li, Z., & Huang, S. (2024). Supplementation of SkQ1 increases mouse in vitro oocyte maturation and subsequent embryonic development by reducing oxidative stress. *Pharmaceuticals*, *17*(4), 455. https://doi.org/10.3390/ph17040455

Lin, Y., Zheng, X., Ma, C., Li, X., Zhang, X., Yang, P., Xu, J., & Zhu, J. (2020). Human chorionic gonadotropin priming does not improve pregnancy outcomes of PCOS-IVM cycles. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 279. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00279

Lintern-Moore, S., Peters, H., Moore, G. P. M., & Faber, M. (1974). Follicular development in the infant human ovary. *Reproduction*, *39*(1), 53–64. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0390053

Liu, M.-J., Sun, A.-G., Zhao, S.-G., Liu, H., Ma, S.-Y., Li, M., Huai, Y.-X., Zhao, H., & Liu, H.-B. (2018). Resveratrol improves in vitro maturation of oocytes in aged mice and humans. *Fertility and Sterility*, *109*(5), 900–907. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.020

Liu, Y.-J., Ji, D., Liu, Z.-B., Wang, T.-J., Xie, F.-F., Zhang, Z.-G., Wei, Z.-L., Zhou, P., & Cao, Y.-X. (2019). Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and decreases excessive intracellular Ca2+ levels in immature human oocytes. *Life Sciences*, *235*, 116810. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116810

Ma, L., Cai, L., Hu, M., Wang, J., Xie, J., Xing, Y., Shen, J., Cui, Y., Liu, X. J., & Liu, J. (2020). Coenzyme Q10 supplementation of human oocyte in vitro maturation reduces postmeiotic aneuploidies. *Fertility and Sterility*, *114*(2), 331–337. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.04.002

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747. https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727

Marklund, S. L. (1984). Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *Journal of Clinical Investigation*, *74*(4), 1398–1403.

Maroz, A., Anderson, R. F., Smith, R. A. J., & Murphy, M. P. (2009). Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: Implications for in vivo antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, *46*(1), 105–109. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.033

Maside, C., Martinez, C. A., Cambra, J. M., Lucas, X., Martinez, E. A., Gil, M. A., Rodriguez-Martinez, H., Parrilla, I., & Cuello, C. (2019). Supplementation with exogenous coenzyme Q10 to media for in vitro maturation and embryo culture fails to promote the developmental competence of porcine embryos. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *54*(4), 72–77. https://doi.org/10.1111/rda.13486

May-Panloup, P., Chrétien, M. F., Jacques, C., Vasseur, C., Malthièry, Y., & Reynier, P. (2005). Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, *20*(3), 593–597. https://doi.org/10.1093/humrep/deh667

Meagher, L. P., & Beecher, G. R. (2000). Assessment of data on the lignan content of foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *13*(6), 935–947. https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0932

Mello Filho, A. C., Hoffmann, M. E., & Meneghini, R. (1984). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemical Journal*, *218*(1), 273–275.

Mihalas, B. P., De Iuliis, G. N., Redgrove, K. A., McLaughlin, E. A., & Nixon, B. (2017). The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal contributes to oxidative stress-mediated deterioration

of the ageing oocyte. *Scientific Reports*, *7*, 6247. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06372-z
Mizobuchi, M., Ishidoh, K., & Kamemura, N. (2022). A comparison of cell death mechanisms of antioxidants, butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Drug and Chemical Toxicology*, *45*(4), 1899–1906. https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1894701
Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., & Kan, Y. W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(21), 9926–9930.
Motta, P. M., Makabe, S., Naguro, T., & Correr, S. (1994). Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Archives of Histology and Cytology*, *57*(4), 369–394. https://doi.org/10.1679/aohc.57.369
Newhall, K. J., Criniti, A. R., Cheah, C. S., Smith, K. C., Kafer, K. E., Burkart, A. D., & McKnight, G. S. (2006). Dynamic anchoring of PKA is essential during oocyte maturation. *Current biology : CB*, *16*(3), 321–327. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.12.031
Nguyen, T., Huang, H. C., & Pickett, C. B. (2000). Transcriptional regulation of the antioxidant response element. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(20), 15466–15473. https://doi.org/10.1074/jbc.M000361200
Nguyen, V. D., Saaranen, M. J., Karala, A.-R., Lappi, A.-K., Wang, L., Raykhel, I. B., Alanen, H. I., Salo, K. E. H., Wang, C., & Ruddock, L. W. (2011). Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *Journal of Molecular Biology*, *406*(3), 503–515. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.039
Nichols, H. B., Anderson, C., White, A. J., Milne, G. L., & Sandler, D. P. (2017). Oxidative stress and breast cancer risk in premenopausal women. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, *28*(5), 667–674. https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000685
Niki, E., & Noguchi, N. (2004). Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Accounts of Chemical Research*, *37*(1), 45–51. https://doi.org/10.1021/ar030069m
Nohalez, A., Martinez, C. A., Parrilla, I., Roca, J., Gil, M. A., Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A., & Cuello, C. (2018). Exogenous ascorbic acid enhances vitrification survival of porcine in vitro-developed blastocysts but fails to improve the in vitro embryo production outcomes. *Theriogenology*, *113*, 113–119. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.014
Nolfi-Donegan, D., Braganza, A., & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*, *37*, 101674. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674
Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., & Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, *136*(11), 1869–1878. https://doi.org/10.1242/dev.035238
Packer, J. E., Slater, T. F., & Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, *278*(5706), 737–738. https://doi.org/10.1038/278737a0
Paszkowski, T. (2002). Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Human Reproduction*, *17*(4), 921–925. https://doi.org/10.1093/humrep/17.4.921
Peng, X.-R., Hsueh, A. J. W., Lapolt, P. S., Bjersing, L., & Ny, T. (1991). Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, *129*(6), 3200–3207. https://doi.org/10.1210/endo-129-6-3200
Petersen, S. V., Oury, T. D., Valnickova, Z., Thøgersen, I. B., Højrup, P., Crapo, J. D., & Enghild, J. J. (2003). The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: One sequence and two structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(24), 13875–13880. https://doi.org/10.1073/pnas.2436143100
Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R. J., Tan, D.-X., Chen, L.-D., Manchester, L. C., & Barlow-Walden, L. R. (1994). Melatonin—a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *738*(1), 419–420. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21831.x

Prabhakar, R., Vreven, T., Morokuma, K., & Musaev, D. G. (2005). Elucidation of the mechanism of selenoprotein glutathione peroxidase (GPx)-catalyzed hydrogen peroxide reduction by two glutathione molecules: A density functional study. *Biochemistry*, *44*(35), 11864–11871. https://doi.org/10.1021/bi050815q

Quinlan, C. L., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., Treberg, J. R., Ackrell, B. A., & Brand, M. D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(32), 27255–27264. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374629

Quintão, C. C. R., Saraiva, N. Z., Oliveira, C. S., Paris, E. C., Camargo, L. S. A., Brandão, H. M., & Munk, M. (2024). Antioxidant effects and compatibility of zinc oxide nanoparticles during in vitro maturation of bovine oocytes and subsequent embryo development. *Theriogenology*, *230*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.08.033

Redding, G. P., Bronlund, J. E., & Hart, A. L. (2008). Theoretical investigation into the dissolved oxygen levels in follicular fluid of the developing human follicle using mathematical modelling. *Reproduction, Fertility, and Development*, *20*(3), 408–417. https://doi.org/10.1071/rd07190

Rodrigues-Cunha, M. C., Mesquita, L. G., Bressan, F., Collado, M. del, Balieiro, J. C. C., Schwarz, K. R. L., de Castro, F. C., Watanabe, O. Y., Watanabe, Y. F., de Alencar Coelho, L., & Leal, C. L. V. (2016). Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. *Theriogenology*, *86*(7), 1685–1694. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.026

Rodríguez-Nuevo, A., Torres-Sanchez, A., Duran, J. M., De Guirior, C., Martínez-Zamora, M. A., & Böke, E. (2022). Oocytes maintain ROS-free mitochondrial metabolism by suppressing complex I. *Nature*, *607*(7920), 756–761. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04979-5

Rubio, L., Annangi, B., Vila, L., Hernández, A., & Marcos, R. (2016). Antioxidant and anti-genotoxic properties of cerium oxide nanoparticles in a pulmonary-like cell system. *Archives of Toxicology*, *90*(2), 269–278. https://doi.org/10.1007/s00204-015-1468-y

Ruiz-Conca, M., Gardela, J., Mogas, T., López-Béjar, M., & Álvarez-Rodríguez, M. (2022). Apoptosis and glucocorticoid-related genes mRNA expression is modulated by coenzyme Q10 supplementation during in vitro maturation and vitrification of bovine oocytes and cumulus cells. *Theriogenology*, *192*, 62–72. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.030

Sanchez, F., Le, A. H., Ho, V. N. A., Romero, S., Van Ranst, H., De Vos, M., Gilchrist, R. B., Ho, T. M., Vuong, L. N., & Smitz, J. (2019). Biphasic in vitro maturation (CAPA-IVM) specifically improves the developmental capacity of oocytes from small antral follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *36*(10), 2135–2144. https://doi.org/10.1007/s10815-019-01551-5

Sánchez, F., Lolicato, F., Romero, S., De Vos, M., Van Ranst, H., Verheyen, G., Anckaert, E., & Smitz, J. E. J. (2017). An improved IVM method for cumulus-oocyte complexes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients enhances oocyte competence and embryo yield. *Human Reproduction*, *32*(10), 2056–2068. https://doi.org/10.1093/humrep/dex262

Sathananthan, A. H., Ng, S. C., Chia, C. M., Law, H. Y., Edirisinghe, W. R., & Ratnam, S. S. (1985). The origin and distribution of cortical granules in human oocytes with reference to golgi, nucleolar, and microfilament activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *442*(1), 251–264. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb37526.x

Sathananthan, A. H., & Trounson, A. O. (1982). Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. *Gamete Research*, *6*(3), 225–234. https://doi.org/10.1002/mrd.1120060306

Shibutani, S., Takeshita, M., & Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, *349*(6308), 431–434. https://doi.org/10.1038/349431a0

Siddiqi, M. A., & Bothe, E. (1987). Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: Dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiation Research*, *112*(3), 449. https://doi.org/10.2307/3577098

Sidi, S., Pascottini, O. B., Angel-Velez, D., Azari-Dolatabad, N., Pavani, K. C., Residiwati, G., Meese, T., Van Nieuwerburgh, F., Kambai Bawa, E., Alikidon Voh, A., Olusegun Ayo, J., & Van Soom, A. (2022). Lycopene supplementation to serum-free maturation medium improves in vitro bovine embryo development and quality and modulates embryonic transcriptomic profile.

Antioxidants (Basel, Switzerland), *11*(2), 344. https://doi.org/10.3390/antiox11020344

Soren, S., Kumar, S., Mishra, S., Jena, P. K., Verma, S. K., & Parhi, P. (2018). Evaluation of antibacterial and antioxidant potential of the zinc oxide nanoparticles synthesized by aqueous and polyol method. *Microbial Pathogenesis*, *119*, 145–151. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.048

Sun, B., Ma, Y., Li, L., Hu, L., Wang, F., Zhang, Y., Dai, S., & Sun, Y. (2021). Factors associated with ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) severity in women with polycystic ovary syndrome undergoing IVF/ICSI. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 615957. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.615957

Sun, B., Ribes, A. M., Leandro, M. C., Belchior, A. P., & Spranger, M. I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1), 382–390. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.002

Sun, W.-S., Jang, H., Park, M.-R., Oh, K. B., Lee, H., Hwang, S., Xu, L.-J., Hwang, I.-S., & Lee, J.-W. (2021). N-acetyl-L-cysteine improves the developmental competence of bovine oocytes and embryos cultured in vitro by attenuating oxidative damage and apoptosis. *Antioxidants*, *10*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/antiox10060860

Takahashi, Y., Hashimoto, S., Yamochi, T., Goto, H., Yamanaka, M., Amo, A., Matsumoto, H., Inoue, M., Ito, K., Nakaoka, Y., Suzuki, N., & Morimoto, Y. (2016). Dynamic changes in mitochondrial distribution in human oocytes during meiotic maturation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *33*(7), 929–938. https://doi.org/10.1007/s10815-016-0716-2

Tao, Y., Chen, H., Tian, N., Huo, D., Li, G., Zhang, Y., Liu, Y., Fang, F., Ding, J., & Zhang, X. (2010). Effects of l-ascorbic acid, α-tocopherol and co-culture on in vitro developmental potential of porcine cumulus cells free oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, *45*(1), 19–25. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01129.x

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*, *58*(6), 621–628. https://doi.org/10.1262/jrd.2012-064

Taylor, A., Robson, A., Houghton, B. C., Jepson, C. A., Ford, W. C. L., & Frayne, J. (2013). Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation. *Human Reproduction*, *28*(9), 2332–2342. https://doi.org/10.1093/humrep/det237

Treberg, J. R., Quinlan, C. L., & Brand, M. D. (2011). Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(31), 27103–27110. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252502

Trebichalská, Z., Kyjovská, D., Kloudová, S., Otevřel, P., Hampl, A., & Holubcová, Z. (2020). Cytoplasmic maturation in human oocytes: An ultrastructural study †. *Biology of Reproduction*, *104*(1), 106–116. https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa174

Vuong, L. N., Ho, V. N. A., Le, A. H., Nguyen, N. T., Pham, T. D., Nguyen, M. H. N., Le, H. L., Le, T. K., Ha, A. N., Le, X. T. H., Pham, H. H., Tran, C. T., Huynh, B. G., Smitz, J. E. J., Gilchrist, R. B., & Ho, T. M. (2025). Hormone-free vs. follicle-stimulating hormone-primed infertility treatment of women with polycystic ovary syndrome using biphasic in vitro maturation: A randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, *123*(2), 253–261. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.09.010

Vuong, L. N., Le, A. H., Ho, V. N. A., Pham, T. D., Sanchez, F., Romero, S., De Vos, M., Ho, T. M., Gilchrist, R. B., & Smitz, J. (2020). Live births after oocyte in vitro maturation with a prematuration step in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *37*(2), 347–357. https://doi.org/10.1007/s10815-019-01677-6

Walls, M. L., Hunter, T., Ryan, J. P., Keelan, J. A., Nathan, E., & Hart, R. J. (2015). In vitro maturation as an alternative to standard in vitro fertilization for patients diagnosed with polycystic ovaries: A comparative analysis of fresh, frozen and cumulative cycle outcomes. *Human Reproduction*, *30*(1), 88–96. https://doi.org/10.1093/humrep/deu248

Wang, Y., Wang, A., Liu, H., Yang, R., Zhang, B., Tang, B., Li, Z., & Zhang, X. (2024). Vitamin C improves oocyte in vitro maturation and potentially changes embryo quality in cattle. *Veterinary*

Sciences, *11*(8), 372. https://doi.org/10.3390/vetsci11080372

Wei, D., Zhang, C., Xie, J., Song, X., Yin, B., Liu, Q., Hu, L., Hao, H., Geng, J., & Wang, P. (2013). Supplementation with low concentrations of melatonin improves nuclear maturation of human oocytes in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *30*(7), 933–938. https://doi.org/10.1007/s10815-013-0021-2

Wesselink, A. K., Hatch, E. E., Rothman, K. J., Mikkelsen, E. M., Aschengrau, A., & Wise, L. A. (2019). Prospective study of cigarette smoking and fecundability. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *34*(3), 558–567. https://doi.org/10.1093/humrep/dey372

Xu, Y.-L., Guo, W., Hao, Y.-X., Yang, S., Li, R., Zheng, X.-Y., & Qiao, J. (2024). Outcomes of subsequent IVF cycles among women with PCOS after the first unstimulated IVM treatment: A single-center matched retrospective case-control study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, *37*(1), 2425756. https://doi.org/10.1080/14767058.2024.2425756

Yadav, D. K., Kumar, S., Choi, E.-H., Chaudhary, S., & Kim, M.-H. (2019). Molecular dynamic simulations of oxidized skin lipid bilayer and permeability of reactive oxygen species. *Scientific Reports*, *9*, 4496. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40913-y

Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., & Inanami, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*(2), 260–270. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033

Yang, D., Mu, Y., Wang, J., Zou, W., Zou, H., Yang, H., Zhang, C., Fan, Y., Zhang, H., Zhang, H., Chen, B., & Zhang, Z. (2023). Melatonin enhances the developmental potential of immature oocytes from older reproductive-aged women by improving mitochondrial function. *Heliyon*, *9*(9), e19366. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19366

Yang, H., Kolben, T., Meister, S., Paul, C., van Dorp, J., Eren, S., Kuhn, C., Rahmeh, M., Mahner, S., Jeschke, U., & von Schönfeldt, V. (2021). Factors influencing the in vitro maturation (IVM) of human oocyte. *Biomedicines*, *9*(12), 1904. https://doi.org/10.3390/biomedicines9121904

Yang, Z., Wei, Y., Fu, Y., Wang, X., Shen, W., Shi, A., Zhang, H., Li, H., Song, X., Wang, J., Jin, M., Zheng, H., Tao, J., & Wang, Y. (2024). Folic acids promote in vitro maturation of bovine oocytes by inhibition of ferroptosis via upregulated glutathione and downregulated Fe2+ accumulation. *Animal Reproduction Science*, *270*, 107605. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107605

Yehye, W. A., Abdul Rahman, N., A. Alhadi, A., Khaledi, H., Ng, S. W., & Ariffin, A. (2012). Butylated hydroxytoluene analogs: Synthesis and evaluation of their multipotent antioxidant activities. *Molecules*, *17*(7), 7645–7665. https://doi.org/10.3390/molecules17077645

Yin, Z., Sun, J.-T., Cui, H.-D., Jiang, C.-Q., Zhang, Y.-T., Lee, S., Liu, Z.-H., & Jin, J.-X. (2021). Tannin supplementation improves oocyte cytoplasmic maturation and subsequent embryo development in pigs. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *10*(10), 1594. https://doi.org/10.3390/antiox10101594

Zhang, D. D., & Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(22), 8137–8151. https://doi.org/10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003

Zhang, H., Yan, K., Sui, L., Nie, J., Cui, K., Liu, J., Zhang, H., Yang, X., Lu, K., & Liang, X. (2020). Constant light exposure causes oocyte meiotic defects and quality deterioration in mice. *Environmental Pollution*, *267*, 115467. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115467

Zhao, J., & and Hopke, P. K. (2012). Concentration of reactive oxygen species (ROS) in mainstream and sidestream cigarette smoke. *Aerosol Science and Technology*, *46*(2), 191–197. https://doi.org/10.1080/02786826.2011.617795

Zheng, X., Guo, W., Zeng, L., Zheng, D., Yang, S., Xu, Y., Wang, L., Wang, R., Mol, B. W., Li, R., & Qiao, J. (2021). In vitro maturation without gonadotropins versus in vitro fertilization with hyperstimulation in women with polycystic ovary syndrome: A non-inferiority randomized controlled trial. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *37*(2), 242–253.

https://doi.org/10.1093/humrep/deab243
Zhong, Y.-P., Ying, Y., Wu, H.-T., Zhou, C.-Q., Xu, Y.-W., Wang, Q., Li, J., Shen, X.-T., & Li, J. (2012). Comparison of endocrine profile and in vitro fertilization outcome in patients with PCOS, ovulatory PCO, or normal ovaries. *International Journal of Endocrinology*, *2012*, 492803. https://doi.org/10.1155/2012/492803
Zhou, C., Yang, X., Wang, Y., Xi, J., Pan, H., Wang, M., Zhou, Y., & Xiao, Y. (2022). Ovulation triggering with hCG alone, GnRH agonist alone or in combination? A randomized controlled trial in advanced-age women undergoing IVF/ICSI cycles. *Human Reproduction*, *37*(8), 1795–1805. https://doi.org/10.1093/humrep/deac114