



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ

ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ- ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΣΚΗΣΗ

Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες στο ωοθυλακικό υγρό με διατροφικούς δείκτες και παραμέτρους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής: Μελέτη σε δείγμα γυναικών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης

Σοφία Σατολιά



Αθήνα, 2018



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ

ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ- ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΣΚΗΣΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γιαννακούρης Νίκος (Επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας-Φυσιολογίας,
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Νομικός Τζώρτζης

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας,
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Κοντογιάννη Μερόπη

Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Διατροφής,
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ο/Η Σοφία Σατολιά

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Αφιερωμένο σε όλες τις γυναίκες που προσπαθούν να ζήσουν το «θαύμα» της ζωής, την
απόκτηση ενός παιδιού...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νίκο Γιαννακούρη, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας-Φυσιολογίας στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής (ΤΕΔΔ) του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για την ανάθεση της διατριβής και την πολύτιμη βοήθειά του, καθώς επίσης και τον κ. Τζώρτζη Νομικό, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας στο ΤΕΔΔ του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για τη συνεχή στήριξή του κατά τη διάρκεια των μετρήσεων που διεξήχθησαν στο εργαστήριο αλλά και για το βιβλιογραφικό υλικό που μου προσέφερε. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Καραγιάννη Δημήτρη, διαιτολόγο και υποψήφιο διδάκτορα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για τη συνεργασία του και τη βοήθειά του.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλες αυτές τις γυναίκες που μας παρείχαν πληροφορίες έτσι ώστε να διεξαχθούν αρκετές μελέτες που θα ενίσχυαν την ήδη υπάρχουσα γνώση.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου αλλά και στο μωρό που περιμένω διότι μου κρατούσε συντροφιά όλες τις ώρες που αφιέρωσα για τη συγγραφή της εν λόγω διατριβής.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	9
Abstract.....	11
Κατάλογος Πινάκων.....	13
Κατάλογος Σχημάτων.....	14
Συντομογραφίες.....	15
Εισαγωγή.....	16
Κεφάλαιο 1. Οξειδωτικό στρες	16
1.1. Ελεύθερες ρίζες, δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου	17
1.2. Μηχανισμοί της οξειδωτικής βλάβης που δημιουργείται στα κύτταρα.....	17
1.3. Αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών	18
Κεφάλαιο 2. Οξειδωτικό στρες και αναπαραγωγή	19
2.1. Οξειδωτικό στρες και γυναικεία αναπαραγωγή	19
2.2. Οξειδωτικό στρες και γυναικεία υπογονιμότητα	20
2.3. Οξειδωτικό στρες και εξωσωματική γονιμοποίηση.....	19
Κεφάλαιο 3. Υπογονιμότητα και αντιοξειδωτικά	21
3.1. Ορισμός της υπογονιμότητας	21
3.2. Αντιοξειδωτικά και γυναικεία αναπαραγωγή	22
3.3. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών στις ενδομήτριες αλλαγές.....	22
3.4. Αντιοξειδωτικοί δείκτες στο ωοθηλακικό υγρό.....	23
3.4.1 Σελήνιο	23
3.4.1.1. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	24
3.4.1.2 GPx3.....	24
3.5. Ο ρόλος της GPx στην εξωσωματική γονιμοποίηση	25
3.6. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)	27
Κεφάλαιο 4. Εξωσωματική γονιμοποίηση	29
4.1. Ορισμός εξωσωματικής γονιμοποίησης.....	29
4.2. Ιστορικά- επιδημιολογικά- στατιστικά στοιχεία.....	29

4.3. Αίτια που οδηγούν στην εξωσωματική γονιμοποίηση).....	30
4.3.1. Διαταραχές ωορρηξίας.....	30
4.3.2. Ενδομητρίωση.....	30
4.3.3. Πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια	30
4.3.4. Ανωμαλίες σπέρματος.....	31
4.3.5. Ανεξήγητη υπογονιμότητα	31
4.3.6. Ινομύωματα μήτρας	31
4.3.7. Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS)	31
4.4. Στάδια εξωσωματικής γονιμοποίησης	31
4.4.1. Προκαταρκτικός έλεγχος.....	32
4.4.2. Διέγερση ωοθηκών	32
4.4.3. Ωοληψία	32
4.4.4. Γονιμοποίηση	33
4.4.5. Εμβρυομεταφορά.....	33
4.4.6. Τεστ κυήσεως.....	33
4.4.7. Πιθανές επιπλοκές στα προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης	33
Κεφάλαιο 5. Διατροφή και γονιμότητα	34
5.1. Μακροθρεπτικά συστατικά.....	35
5.1.1. Υδατάνθρακες.....	35
5.1.2. Πρωτεΐνες	36
5.1.3. Λίπη	37
5.2. Μικροθρεπτικά συστατικά	38
5.2.1. Φυλλικό οξύ.....	39
5.2.2. Σίδηρος	40
Κεφάλαιο 6. Πειραματικό μέρος.....	42
6.1. Σκοπός μελέτης.....	42
6.2. Μεθοδολογία	42
6.2.1. Δείγμα και τοποθεσία.....	42

6.2.2. Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη	42
6.2.3. Διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης	43
6.2.4. Ερωτηματολόγια	45
6.2.4.1. Γενικό ερωτηματολόγιο	45
6.2.4.2. Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQ)	45
6.2.4.3. Ερωτηματολόγιο STAI-Gr. X-1 (State-Trait anxiety inventory)	47
6.3. Προσδιορισμός δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)	47
6.4. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	50
6.5. Στατιστική ανάλυση	52
Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα.....	53
7.1. Χαρακτηριστικά δείγματος.....	53
7.2. Συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης ομάδων τροφίμων με τη δραστικότητα της GPx3 και την TAC στο ωοθυλακικό υγρό.....	60
Κεφάλαιο 8. Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	62
Βιβλιογραφία	65

Περίληψη

Σκοπός: Να αξιολογηθεί η σχέση ανάμεσα σε αντιοξειδωτικούς δείκτες (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, GPx3 και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, TAC) σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού (ΩΥ) γυναικών που ακολουθούν θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης (in vitro fertilization, IVF) με διατροφικούς παράγοντες και με την έκβαση της IVF.

Μεθοδολογία: Στη μελέτη συμμετείχαν 86 μη-παχύσαρκες υπογόνιμες γυναίκες (ηλικίας 25-41 ετών), οι οποίες υποβλήθηκαν σε IVF σε μία Κλινική Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής στην Αθήνα, για τις οποίες συλλέχθηκαν δείγματα ΩΥ. Οι συμμετέχουσες συμπλήρωσαν ερωτηματολόγια σχετικά με τον τρόπο ζωής και τα βασικά δημογραφικά-κλινικά χαρακτηριστικά, καθώς και ένα σταθμισμένο ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων βάσει του οποίου αξιολογήθηκε η συνήθης διαιτητική πρόσληψη και η κατανάλωση ομάδων τροφίμων. Σε δείγματα ΩΥ που απομονώθηκε από το επικρατούν ωοθυλάκιο κάθε γυναίκας προσδιορίστηκαν η δραστικότητα της GPx3 και η TAC του ΩΥ, και διερευνήθηκε η ύπαρξη διαφορών ανάλογα με τις τελικές εκβάσεις της IVF (κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση) με τη χρήση παραμετρικών τεστ. Για τις συσχετίσεις μεταξύ της κατανάλωσης ομάδων τροφίμων και των GPx3 και TAC στο ΩΥ χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman rho.

Αποτελέσματα: Συνολικά, σε 34 γυναίκες (39.5%) επετεύχθη κλινική εγκυμοσύνη και 32 (37.2%) είχαν ζώσα γέννηση. Οι γυναίκες με κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση είχαν υψηλότερη παραγωγή ωαρίων/εμβρύων, καθώς και ωαρίων/εμβρύων καλής ποιότητας (όλα τα $p < 0.05$), ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την ηλικία, τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά ή τις συνήθειες του τρόπου ζωής (πρόσληψη ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών, χρήση διατροφικών συμπληρωμάτων, φυσική δραστηριότητα, κάπνισμα, επίπεδα άγχους) μεταξύ των γυναικών με θετική ή αρνητική έκβαση της IVF. Συγκριτικά με τις γυναίκες που έμειναν έγκυες, σε εκείνες στις οποίες δεν επετεύχθη κλινική εγκυμοσύνη δεν βρέθηκε να διαφέρει η δραστικότητα της GPx3 στο ΩΥ (7.3 ± 3.4 έναντι 7.3 ± 2.9 U/L, $p = 0.99$) καθώς και η TAC του ΩΥ (0.33 ± 0.1 έναντι 0.37 ± 0.1 mMolTrolox, $p = 0.09$). Όπως αναμενόταν, οι GPx3 και TAC συσχετίζονταν σημαντικά και θετικά μεταξύ τους ($\rho = 0.68$, $p < 0.01$). Βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης γάλακτος και γιαουρτιού με πλήρη λιπαρά και της δραστικότητας της GPx3 στο ΩΥ ($\rho = -0.24$, $p = 0.03$), ενώ αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε και σε σχέση με την TAC του ΩΥ, χωρίς ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό να είναι στατιστικώς σημαντικό ($\rho = -0.19$, $p = 0.08$). Επιπλέον, αντίθετα από ότι ίσως αναμενόταν, η κατανάλωση

ελαιόλαδου βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά με τη δραστικότητα της GPx3 ($\rho = -0.22$, $p = 0.04$), ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την TAC. Καμία συσχέτιση μεταξύ της GPx3 ή της TAC και της κατανάλωσης άλλων ομάδων τροφίμων (δημητριακών, φρούτων, λαχανικών, κρέατος κλπ.) δεν παρατηρήθηκε.

Συμπεράσματα: Η αντιοξειδωτική ικανότητα σε δείγματα ΩΥ υπογόνιμων γυναικών που ακολουθούν θεραπεία IVF δεν φαίνεται να συσχετίζεται με τις τελικές εκβάσεις της IVF (κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση). Η αυξημένη πρόσληψη γάλακτος και γιαουρτιού με πλήρη λιπαρά φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα στο ΩΥ, εύρημα που αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Λέξεις κλειδιά: Υπογονιμότητα, εξωσωματική γονιμοποίηση, οξειδωτικό στρες, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, διαιτητική πρόσληψη.

Abstract

Aim: To evaluate the relationship between antioxidant markers (glutathione peroxidase, GPx3 and total antioxidant capacity, TAC) in follicular fluid (FF) samples of women undergoing in vitro fertilization (IVF) treatment with dietary factors and IVF clinical outcomes.

Methodology: The study involved 86 non-obese subfertile women (aged 25-41 years) who underwent a first IVF treatment in an Assisted Conception Unit in Athens, for whom FF samples were collected. At enrollment, participants completed a detailed questionnaire, including various information on demographic, clinical and lifestyle factors, and a validated food frequency questionnaire to estimate habitual dietary intake and consumption of food groups. In FF specimens isolated from the dominant follicle of each woman, the activity of GPx3 and the TAC was determined, and differences by IVF clinical endpoints (clinical pregnancy and live birth) were assessed using parametric tests. Correlations between dietary and antioxidant markers in FF were assessed using Spearman's rho.

Results: Overall, 34 women (39.5%) achieved clinical pregnancy and 32 (37.2%) had a live birth. Women with clinical pregnancy and live birth had a higher yield of total and mature oocytes, and produced more embryos and embryos of high quality (all $p < 0.05$); however, there were no differences in age, body mass index or in lifestyle factors (total energy and macronutrients intake, use of dietary supplements, physical activity, smoking, stress levels) between women with a positive and negative IVF outcome. Compared with women achieving clinical pregnancy, women without a pregnancy and live birth were not found to have a different GPx3 activity in FF (7.3 ± 3.4 vs. 7.3 ± 2.9 U/L, $p = 0.99$) or a different TAC of FF (0.33 ± 0.1 vs. 0.37 ± 0.1 mMolTrolox, $p = 0.09$). As expected, GPx3 and TAC correlated significantly and positively with each other ($\rho = 0.68$, $p < 0.01$). A negative correlation was observed between the consumption of full-fat milk and yogurt and the activity of GPx3 in FF ($\rho = -0.24$, $p = 0.03$), while a negative correlation was also observed with respect to the TAC, although this result did not reach statistical significance ($\rho = -0.19$, $p = 0.08$). In addition, contrary to what might have been expected, olive oil consumption was found to be negatively correlated with GPx3 activity ($\rho = -0.22$, $p = 0.04$), while no correlation was observed with TAC. No correlation between GPx3 or TAC and the consumption of other food groups (cereals, fruit, vegetables, meat, etc.) was observed.

Conclusion: Follicular fluid antioxidant capacity in women undergoing IVF treatment does not seem to correlate with final IVF clinical outcomes (clinical pregnancy and live birth). Increased intake of full-fat milk and yogurt may be associated with reduced antioxidant capacity in FF, a finding that is worth exploring further.

Key words: Infertility, in-vitro fertilization, oxidative stress, glutathione peroxidase, total antioxidant capacity, dietary intake.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ελεύθερες ρίζες, ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα, ενδογενή μη ενζυμικά και εξωγενή αντιοξειδωτικά της διατροφής	18
Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των γυναικών που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) με βάση το πρωτόκολλο ωοθηκικής διέγερσης.	54
Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των γυναικών που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) με βάση την έκβαση της IVF.....	57
Πίνακας 4. Τιμές συντελεστή συσχέτισης Spearman (ρ) για τις συσχετίσεις ανάμεσα στην κατανάλωση ομάδων τροφίμων και τη δραστηριότητα της GPx3 και την TAC στο ωοθυλακικό υγρό	60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Επίπεδα SOD, GPx, IL-6, PON 1, 8-Isoprostane στο αίμα πριν και μετά την ένεσης FSH / hMG	27
--	-----------

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

GPx	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
mRNA	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
FSH	Θυλακιοτρόπος ορμόνη
hMG-CoA	Ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (Human Menopausal Gonadotropin)
IL-6	Ιντερλευκίνη 6
PON-1	Παραοξειδάση 1
TAC	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
b-hCG	Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη
WHO	Παγκόσμιος οργανισμός υγείας
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
GnRH	εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αναπαραγωγή είναι η κινητήριος δύναμη για τη συνέχιση της ύπαρξης ζωής επάνω στον πλανήτη. Πολλά ζευγάρια όμως στις μέρες μας δυσκολεύονται να αποκτήσουν παιδιά για διάφορους λόγους, οι οποίοι θα αναφερθούν στα παρακάτω κεφάλαια.

Η εξωσωματική γονιμοποίηση (in vitro fertilization, IVF) είναι μια μέθοδος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που πλέον βοηθά πολλά ζευγάρια να αποκτήσουν το πολυπόθητο όνειρό τους, δηλαδή την απόκτηση ενός παιδιού, αλλά πρόκειται για μια αρκετά ψυχοφθόρα διαδικασία. Τα στάδια αυτής της διαδικασίας και η συνειδητοποίηση της δυσκολίας να αποκτήσουν παιδί με φυσικό τρόπο εντείνουν τα επίπεδα άγχους, ενώ πολύ σημαντικός παράγοντας για την επιτυχή έκβαση κάθε προσπάθειας είναι η διατροφή η οποία ή θα αυξήσει το οξειδωτικό στρες ή θα το μειώσει, ανάλογα με τις διατροφικές επιλογές. Με κύριο γνώμονα αυτόν τον παράγοντα έγινε η συγκεκριμένη μελέτη.

Στην εν λόγω εργασία γίνεται αναφορά στη σημασία του οξειδωτικού στρες γενικά, αλλά και ειδικά στην ανθρώπινη αναπαραγωγή και στις παραμέτρους της IVF. Επίσης, γίνεται αναφορά στη σημασία της διατροφής και των αντιοξειδωτικών, τα οποία με τη σειρά τους φαίνεται να παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανθρώπινη αναπαραγωγή. Ακόμη, γίνεται αναφορά στα στάδια που ακολουθούνται κατά την IVF, καθώς επίσης και τους λόγους που τελικά οδηγούν ένα ζευγάρι στο να ξεκινήσει μια προσπάθεια υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Διάφορα ιστορικά και επιδημιολογικά στοιχεία παρουσιάζονται με στόχο την κατανόηση του μεγέθους του προβλήματος.

Κεφάλαιο 1. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες (OS) είναι αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) και της ικανότητας των φυσικών αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στο σώμα να αδρανοποιούν τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζουν τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου,

συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA, και επηρεάζουν τα μεταβολικά μονοπάτια (χημικοί μετασχηματισμοί στα κύτταρα) (Agarwal et al. 2012).

1.1. Ελεύθερες ρίζες, δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου

Όταν παρουσιαστεί οξειδωτική βλάβη παράγονται τοξίνες, ως συνέπεια της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων που χρησιμοποιούν οξυγόνο για να επιβιώσουν. Τα τοξικά τελικά προϊόντα ενδέχεται να περιλαμβάνουν μόρια που έχουν μη-συζευγμένα ηλεκτρόνια, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω επιβλαβείς αντιδράσεις με τα λιπίδια των μεμβρανών και τα αμινοξέα των πρωτεϊνών. Ένα μόριο αντιοξειδωτικό πιστεύεται ότι είναι σε θέση να επιβραδύνει ή να εμποδίσει την οξείδωση άλλων μορίων και ενδεχομένως να μειώσει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, η οποία προκαλεί την κυτταρική βλάβη. Δύο είναι τα σημαντικότερα είδη των ελευθέρων ριζών: τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και τα αντιδρώντα είδη αζώτου (RNS). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου, είναι προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και αποτελούνται από ελεύθερες ρίζες και υπεροξειδία. Η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου σε οξυγόνο σχηματίζει το υπεροξειδικό ανιόν ($\cdot\text{O}_2^-$), το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), υπεροξυλίου ή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Οι ελεύθερες ρίζες επιδιώκουν να συμμετέχουν σε χημικές αντιδράσεις που τους απαλλάσσουν από το μη συζευγμένο τους ηλεκτρόνιο, με αποτέλεσμα την οξείδωση (Ruder et al. 2008, Tremellen et al. 2008).

1.2. Μηχανισμοί της οξειδωτικής βλάβης που δημιουργείται στα κύτταρα

Οι ελεύθερες ρίζες στοχεύουν στα μακρομόρια των κυττάρων (π.χ. λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) και προκαλούν υπεροξειδωτικές βλάβες. Η έκταση της υπεροξειδωτικής βλάβης εξαρτάται από το πόσο ευαίσθητα είναι τα μακρομόρια στις ελεύθερες ρίζες (εκείνα με διπλούς δεσμούς μεταξύ ατόμων άνθρακα είναι εξαιρετικά ευαίσθητα) και τη διαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στο περιβάλλον. Η παρουσία των μεταλλικών ιόντων, όπως ο σίδηρος, μπορεί να ενισχύσει τη ζημιά από τις ελεύθερες ρίζες (Agarwal and Saleh, 2002).

1.3. Αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών

Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι αναγκαίο να εγκατασταθεί μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά όπλα που διαθέτει το κύτταρο είναι (Πίνακας 1):

- η **δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)**, που καταλύει την αντίδραση:
 $\cdot\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
- η **καταλάση**, που καταλύει την αντίδραση:
 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- η **υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)**, που καταλύει την αντίδραση:
 $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$

Αρκετά ακόμη ένζυμα είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η τρανσφεράση γλουταθειόνης-S και οι αφυδρογονάσες αλδεϋδών. Ως περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών χαρακτηρίζονται μόρια που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστούν ακίνδυνες. Μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες A, C, D και E, καθώς και διάφορα φυτοχημικά, όπως οι φαινόλες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή, είναι εν δυνάμει περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων (Gupta et al. 2007).

Πίνακας 1. Ελεύθερες ρίζες, ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα, ενδογενή μη-ενζυμικά και εξωγενή αντιοξειδωτικά της διατροφής

Ελεύθερες ρίζες	Ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα	Ενδογενή μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα	Εξωγενή αντιοξειδωτικά διατροφής
Ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-)	Υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs)	Ουρικό οξύ	Καροτενοειδή
Υπεροξείδιο του H_2O_2	Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs)	Χολερυθρίνη	Βιταμίνη E
Ρίζα υδροξυλίου ($\text{HO}^\cdot$)	Καταλάση	Μελατονίνη	Βιταμίνη C
Οξυγόνο απλής κατάστασης (O_2)	Σύστημα γλουταρεδοξίνης (GRXs)	Γλουταθειόνη	Πολυφαινολικές ενώσεις
Μονοξείδιο του αζώτου (NO)	Οξυγονάση αίμης (HO)	Λιποϊκό οξύ	
Υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO^-)	Σύστημα θειορεδοξίνης (TRXs)		
Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)			
Αλληλομετατροπές RNS			

Κεφάλαιο 2. Οξειδωτικό στρες και αναπαραγωγή

2.1. Οξειδωτικό στρες και γυναικεία αναπαραγωγή

Οι ελεύθερες ρίζες επηρεάζουν την αναπαραγωγική ικανότητα της γυναίκας καθ'όλη τη διάρκεια της αλλά ακόμη και μετά το τέλος αυτής (εμμηνόπαυση). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η μείωση της γονιμότητας συσχετίζεται με την ηλικία και ρυθμίζεται από το λειτουργικό σύστημα των ελευθέρων ριζών (De Bruin et al. 2002). Ακόμη, οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Myatt 2004), στο φυσιολογικό τοκετό (Fainaru et al. 2002, Mocatta et al. 2004), και στην έναρξη του πρόωρου τοκετού (Wall et al. 2002, Pressman et al. 2003). Αξιοσημείωτο είναι ότι οι ελεύθερες ρίζες επηρεάζουν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες (ωρίμανση ωοκυττάρων, ωοθηκική στεροειδογένεση, ωορρηξία, εμφύτευση, σχηματισμός βλαστοκύστης και ωχρινική συντήρηση) κατά την εγκυμοσύνη (Suzuki et al. 1999, Jozwik et al. 1999, Ishikawa et al. 1993, Vega et al. 1998, Sugino et al. 2000).

2.2. Οξειδωτικό στρες και γυναικεία υπογονιμότητα

Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται και στην υπογονιμότητα. Το οξειδωτικό στρες στην υπογονιμότητα συνεπάγεται κακή ποιότητα εμβρύου, κατακερματισμό του DNA και κακή έκβαση της εγκυμοσύνης στα προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η διατήρηση επαρκούς προ-οξειδωτικής-αντιοξειδωτικής ισορροπίας είναι επίσης σημαντική και σε γυναικολογικές παθήσεις, όπως η ενδομητρίωση, η προεκλαμψία, ο διαβήτης κύησης και οι εμβρυοπάθειες (Sharma et al. 2004). Το οξειδωτικό στάτους μπορεί να επηρεάσει από πολύ νωρίς την ανάπτυξη του εμβρύου τροποποιώντας τους βασικούς παράγοντες μεταγραφής και τροποποιώντας έτσι την έκφραση των γονιδίων (Dennerly et al. 2004).

2.3. Οξειδωτικό στρες και εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF)

Τα χαμηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών παίζουν ευεργετικό ρόλο στην εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF). Η λιπιδική υπεροξείδωση (LPO) καθώς και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) μέσα στο ωοθηλακικό υγρό φάνηκε να σχετίζεται θετικά με τα ποσοστά επίτευξης εγκυμοσύνης σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF (Pasqualotto et al. 2004). Οι Ogaonoge και συνεργάτες παρατήρησαν επίσης ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), στο ωοθυλάκιο των ωοκυττάρων που γονιμοποιήθηκαν στη συνέχεια, ήταν σημαντικά

υψηλότερη σε σχέση με τα ωοθυλάκια που δεν γονιμοποιήθηκαν (Ogawoye et al. 2003). Το περιβάλλον μέσα στο ωοθηλακικό υγρό και το στάτους του οξειδωτικού στρες προβλέπουν την ποιότητα των ωοκυττάρων, τα αποτελέσματα της γονιμοποίησης και την επιτυχία της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI) (Bedaiwy et al. 2005).

Τα επίπεδα του σεληνίου- το οποίο εξαρτάται από τη γλουταθειόνη της υπεροξειδάσης και από τις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης- ήταν σημαντικά μειωμένο σε ωοθυλάκια που απέδωσαν ωοκύτταρα που απέτυχαν να γονιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της IVF (Bedaiwy et al. 2005).

Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF με σκοπό να αξιολογήσει το ρόλο του οξειδωτικού στρες στη διαδικασία της γήρανσης των ωοθηκών έδειξε ότι τα επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) ήταν σημαντικά αυξημένο στα θυλάκια που περιείχαν ωοκύτταρα σε σύγκριση με τα κενά θυλάκια. Ακόμη, τα έμβρυα υψηλής ποιότητας προήλθαν από θύλακες με χαμηλότερα επίπεδα H_2O_2 σε σύγκριση με τα θυλάκια από τα οποία αναπτύχθηκαν έμβρυα κακής ποιότητας. Συμπερασματικά, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γήρανσης των ωοθηκών, μπορεί να υπάρξει σταδιακή αύξηση του επιπέδου του H_2O_2 στο θυλάκιο. Τέλος, όταν το θυλάκιο ωριμάζει και γίνεται άδειο από επίπεδα ωοκυττάρων, τα επίπεδα H_2O_2 πέφτουν σημαντικά. Ως εκ τούτου, τα επίπεδα H_2O_2 στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να χρησιμεύσουν ως πιθανός δείκτης για τον προσδιορισμό της γήρανσης των ωοθηκών και της ηλικίας του μεταβολισμού των ωοθυλακίων (Elizur et al. 2014).

Οι Bruna de Lima και συνεργάτες πραγματοποίησαν μελέτη παρατήρησης που στόχευε στην κατανόηση της σχέσης μεταξύ της λιπιδικής υπεροξειδάσης και της ενδομητρίωσης σε γυναίκες που υποβάλλονταν σε ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα υπεροξειδώσεως στην ομάδα της ενδομητρίωσης ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Επιπλέον, οι γυναίκες με ενδομητρίωση ηλικίας κάτω των 33 ετών είχαν 4.3 φορές περισσότερες πιθανότητες να επιτύχουν εγκυμοσύνη σε σχέση με τις γυναίκες πάνω από αυτή την ηλικία. Συμπερασματικά, η ενδομητρίωση συνδέεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες στο ωοθηλακικό υγρό σε γυναίκες που υποβάλλονται σε IVF. Επίσης, η αύξηση της ηλικίας συνδέεται με μειωμένη πιθανότητα εγκυμοσύνης (Bruna de Lima et al. 2016).

Ακόμη, οι Luddi και συνεργάτες σε μελέτη που πραγματοποίησαν, στόχευαν να δουν την επίδραση μιας πλήρους χορήγησης μικροθρεπτικών συστατικών στη διατροφή (διατροφικά συμπληρώματα) στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στο περιβάλλον του ωοθυλακίου, καθώς και την έκβαση της IVF. Αυτή η μελέτη διεξήχθη από τον Ιανουάριο του 2014 έως τον Ιούλιο του 2015 στην Κλινική Υπογονιμότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Σιένα. Ο ορός και το ωοθυλακικό υγρό συλλέχθηκαν από υπογόνιμες γυναίκες ηλικίας >39 ετών που υποβλήθηκαν σε δύο κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης. Στον πρώτο κύκλο χορηγούσαν GnRH-ανταγωνιστή ώστε να προκληθεί ωορρηξία, ενώ στον δεύτερο κύκλο οι γυναίκες ξεκινούσαν συμπληρώματα μικροθρεπτικών συστατικών τρεις μήνες πριν την έναρξη της θεραπείας. Μετρήθηκαν τα επίπεδα οξείδωσης των πρωτεϊνών και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) στον ορό και στο ωοθυλακικό υγρό και αξιολογήθηκαν στους κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης με ή χωρίς χορήγηση μικροθρεπτικών συστατικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συμπληρωματική χορήγηση μικροθρεπτικών συστατικών, ξεκινώντας τρεις μήνες πριν από τους κύκλους της εξωσωματικής γονιμοποίησης, προστάτευσε το περιβάλλον του ωοθυλακίου από το οξειδωτικό στρες, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των καλών ωοκυττάρων που ανακτήθηκαν κατά την ωοληψία (Luddi et al. 2016) .

Κεφάλαιο 3. Υπογονιμότητα και αντιοξειδωτικά

3.1. Ορισμός υπογονιμότητας

Ένα ζευγάρι που κάνει προσπάθειες για την απόκτηση παιδιού χωρίς επιτυχία έναν χρόνο ή και παραπάνω θεωρείται υπογόνιμο (Evers 2002) ή λιγότερο γόνιμο σε σχέση με άλλα ζευγάρια. Ο Παγκόσμιος οργανισμός υγείας (WHO) (Zegers-Hochschild et al. 2009) ορίζει ως υπογονιμότητα ως “την αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης μετά από 12 μήνες ή και παραπάνω ελεύθερων σεξουαλικών επαφών”. Τα επίπεδα της υπογονιμότητας το 2010 ήταν παρόμοια με εκείνα του 1990, εξαιρουμένου βέβαια κάποιων χωρών της Αφρικής και της Νότιας Ασίας (Mascarenhas et al. 2012). Το 40-50% των περιπτώσεων υπογονιμότητας αφορούν τον γυναικείο παράγοντα. Παράγοντες που επηρεάζουν είναι αποτυχία στην ωορρηξία, βλάβη στις σάλπιγγες, ενδομητρίωση, κακή ποιότητα ωαρίου και η ανεξήγητη υπογονιμότητα.

Για να ξεπεραστούν λοιπόν τα προβλήματα που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα και με κύριο στόχο την επίτευξη μιας εγκυμοσύνης, τα ζευγάρια καταφεύγουν σε υποβοηθούμενες τεχνικές γονιμοποίησης όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση (in vitro

fertilisation IVF), την ενδομήτρια σπερματέγχυση (IUI) και την ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI).

3.2. Αντιοξειδωτικά και γυναικεία αναπαραγωγή

Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα μεγάλο εύρος του αντιοξειδωτικού συστήματος για να περιορίσουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, να τις απενεργοποιούν και να διορθώνουν την καταστροφή των κυττάρων (Arnett et al. 2004, Szczepańska et al. 2003, Langendonck et al. 2002, Agarwal et al. 2004). Οι γυναίκες χρησιμοποιούν αντιοξειδωτικά συμπληρώματα όταν υποβάλλονται σε υποβοηθούμενες τεχνικές γονιμοποίησης, ενώ κάποιες χρησιμοποιούν αυτά τα συμπληρώματα και χωρίς να υποβάλλονται σε κάποια τεχνική υποβοηθούμενης γονιμοποίησης απλά και μόνο για να βελτιώσουν την γονιμότητά τους.

Τα αντιοξειδωτικά είναι βιολογικές και χημικές ενώσεις που μειώνουν την οξειδωτική βλάβη (ανισορροπία μεταξύ της δημιουργίας των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και την ικανότητα του σώματος να αποτοξινώνει). Είναι μια ομάδα από οργανικές θρεπτικές ουσίες που περιέχουν βιταμίνες, μέταλλα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Μερικά από τα κυρίαρχα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στη γυναικεία υπογονιμότητα είναι Ν-ακετυλο-κυστεΐνη, μελατονίνη, βιταμίνες Α, C και Ε, φυλλικό οξύ, μυο-ινοσιτόλη, ο ψευδάργυρος και το σελήνιο. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν ταξινομηθεί σε ωμέγα-3, ωμέγα-6 και ωμέγα-9. Τα ωμέγα-9 συντίθεται από τα ζώα, ενώ τα άλλα πρέπει να λαμβάνονται από τη διατροφή με άλλου είδους τρόφιμα, καθώς τα ζώα δεν μπορούν να συνθέσουν ωμέγα-3 και ωμέγα-6 λιπαρά οξέα. Οι κύριες πηγές των ωμέγα-6 είναι τα φυτικά έλαια. Πηγές των ωμέγα-3 είναι τα λαχανικά και τα ψάρια (Wathes et al. 2007). Δεδομένου ότι η ισορροπία διατηρείται από επαρκείς ποσότητες των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στον οργανισμό, η μέτρηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών μεμονωμένα ή ως σύνολο, έχει ήδη εξεταστεί (Jozwik et al. 1999, Ishikawa et al. 1993).

3.3. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών στις ενδομήτριες αλλαγές

Στο κεφάλαιο αυτό θα γίνει αναφορά σε μελέτες που έχουν υλοποιηθεί και έχουν εξετάσει τον ρόλο των αντιοξειδωτικών επιπέδων που υπάρχουν στο ενδομήτριο και την προστατευτική δράση που προσφέρουν.

Σε μελέτη που έγινε με σκοπό να εξετάσει τη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στο ενδομήτριο, παρατηρήθηκε αυξημένη δραστηριότητα της SOD στο ανθρώπινο ενδομήτριο στο μέσο προς τέλος της αιμορραγικής φάσης. Στην αρχή της εκκριτικής φάσης (είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την ωοθυλακιωρηξία μέχρι την εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως) μειώθηκε και αυξήθηκε πάλι στο μέσο αυτής της περιόδου. Η δραστηριότητα της SOD μετρήθηκε και κατά την αρχή της εγκυμοσύνης και φάνηκε ότι ήταν ίδια με το μέσο της εκκριτικής φάσης (Sugino et al. 1996).

Ακόμη μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη διεξήχθη και είχε ως στόχο να εξετάσει την επίδραση της διατροφικής πρόσληψης βιταμίνης A, C και E στο οξειδωτικό περιβάλλον των ωοθυλακίων σε γυναίκες που υποβάλλονταν σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλή διατροφική πρόσληψη βιταμίνης C ακολούθησε την αύξηση των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο ωοθηλακικό υγρό και τη βελτίωση της ποιότητας των ωαρίων (Kazemi et al. 2015).

3.4. Αντιοξειδωτικοί δείκτες στο ωοθηλακικό υγρό

Έχουν μελετηθεί αρκετοί αντιοξειδωτικοί δείκτες στο ωοθυλακικό υγρό όπως είναι υπεροξειδάση της δισμουτάσης (SOD), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), συζευγμένα διένια, υπεροξείδια λιπιδίων (LPO), δραστικές ουσίες θειοβαρβιτουρικού οξέος, προσθετικά οξειδωτικά DNA, νιτρικά οξείδια (NO), TAC (ολική αντιοξειδωτική ικανότητα) (Pasqualotto et al. 2004, Vega et al. 2000, Tsafiriri et al. 1999). Παρακάτω θα δούμε δύο από τους σημαντικότερους αντιοξειδωτικούς δείκτες οι οποίοι μελετήθηκαν στην εν λόγω εργασία.

3.4.1. Σελήνιο (Se)

Σε αυτό το κεφάλαιο θα γίνει αναφορά στο σελήνιο (Se), ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, και πιο συγκεκριμένα, θα αναφερθούμε στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), ένα ένζυμο το οποίο ανήκει στην οικογένεια των σεληνοπρωτεϊνών και στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), δείκτες οι οποίοι μετρήθηκαν στην εν λόγω μελέτη για την εύρεση των αντιοξειδωτικών επιπέδων στο ωοθυλακικό υγρό.

Το σελήνιο (Se) είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό ιχνοστοιχείο που είναι κρίσιμης σημασίας για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού (Rayman 2000). Φαίνεται ότι η ανεπάρκεια σε Se

είναι σπάνια σε ανθρώπους, υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι οι λιγοστές εμφανείς αλλαγές στο Se μπορεί να επηρεάσουν πτυχές της ανθρώπινης υγείας, όπως ανοσολογικές αποκρίσεις, νευροεκφυλισμό, καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνο (Rayman 2000). Τα οφέλη από τη συμπληρωματική πρόσληψη Se όσο αφορά τον καρκίνο έχουν ήδη εξεταστεί σε πρόσφατες κλινικές μελέτες. Μία από αυτές, η οποία υποστηρίχθηκε από το «Nutritional Prevention of Cancer (NPC)» αναφέρει ότι τα συμπληρώματα Se στη διατροφή μείωσαν σημαντικά τον κίνδυνο των καρκίνων του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του προστάτη (Clark et al. 1996). Οι τροφές από τις οποίες μπορούμε να προσλάβουμε σελήνιο είναι τα φιστίκια, το συκώτι, τα οστρακοειδή, το ψάρι, τα δημητριακά, ο ηλιόσπορος, το μπίκον, το χοιρινό, το χαβιάρι και τα θαλασσινά.

3.4.1.1. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον έξι ισοένζυμα GPx στα θηλαστικά. Το κυτοσολικό ένζυμο (GPx1) εκφράζεται από όλους τους τύπους κυττάρων σε θηλαστικά. Η εξωκυτταρική GPx (GPx3) είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη, η οποία είναι η δεύτερη πιο άφθονη σεληνοπρωτεΐνη στο πλάσμα, ενώ το υδροξυ-υπεροξείδιο του φωσφολιπιδίου GPx (GPx4) μπορεί να μειώσει συγκεκριμένα τα υδροϋπεροξείδια φωσφολιπιδίων (Imai & Nakagawa 2003) και μπορεί να εμπλέκεται στη μείωση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Nomura et al. 2001) και στην ωρίμανση του σπέρματος.

3.4.1.2. GPx3

Από την οικογένεια της GPx, το μόνο μέλος το οποίο εκκρίνεται και κυκλοφορεί στο πλάσμα σε αναλογία περίπου στο 20% είναι η GPx3 (Koyama et al. 1999). Βέβαια, αυτό το ποσοστό αλλάζει από άνθρωπο σε άνθρωπο και εξαρτάται από την ποσότητα του σεληνίου που προσλαμβάνεται με τη διατροφή (Burk et al. 2005). Η κύρια πηγή παραγωγής της GPx3 είναι οι νεφροί και η παραγωγή της γίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων και από τα τοιχωματικά κύτταρα της κάψας του Bowman, και στη συνέχεια απελευθερώνεται στο αίμα (Yoshimura et al. 1991). Ωστόσο, αρκετοί διαφορετικοί ιστοί φαίνεται να εκφράζουν το mRNA και την GPx3 πρωτεΐνη, η οποία πιθανότατα χρησιμεύει ως τοπική πηγή εξωκυτταρικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ένα παράδειγμα αυτού είναι στην καρδιά, όπου το mRNA της GPx3 είναι το τρίτο πιο άφθονο mRNA σεληνοπρωτεΐνης που ανιχνεύεται (Hoffmann et al. 2007).

Έχει ήδη αναγνωριστεί ένας σημαντικός ρόλος για τη GPx3 σε πρώιμα πειράματα που δείχνουν τη σημαντικότητά της στη ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου (NO) που παράγεται από τα αιμοπετάλια και τα αγγειακά κύτταρα (Freedman et al. 1995). Αυτό ακολουθήθηκε από μια μελέτη που έδειξε ότι η μειωμένη δραστηριότητα GPx3 οδήγησε στην υπεραντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων και σε αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης (Freedman et al. 1996). Η κλινική σημασία αυτού υποστηρίχθηκε με μια μελέτη που δείχνει ότι ο μειωμένος μεταβολισμός των ROS ως αποτέλεσμα της μειωμένης δραστηριότητας της GPx3 είχε ως συνέπεια ανεπαρκή επίπεδα NO που επηρέασαν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς αναστολής των αιμοπεταλίων και την προδιάθεση των δοκιμαζομένων της μελέτης σε αρτηριακή θρόμβωση (Kenet et al. 1999).

Το οξειδωτικό στρες συνοδεύει την παχυσαρκία και επηρεάζει τον λιπώδη ιστό, και σε αρκετά μοντέλα παχύσαρκων ζώων και φαίνεται πως η έκφραση της GPx3 μειώνεται επιλεκτικά σε αυτόν τον ιστό συνοδευόμενη από μείωση της GPx3 και στο πλάσμα (Lee et al. 2008). Μια κατηγορία ορμονών που σχετίζονται με την παχυσαρκία είναι τα οιστρογόνα, τα οποία εμπλέκονται στη διατήρηση και τη διανομή του σωματικού λίπους. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του γονιδίου της GPx3 είναι ένας άμεσος στόχος διεγέρσεως από τους υποδοχείς των οιστρογόνων στον λευκό λιπώδη ιστό (Lundholm et al. 2008). Η GPx3 έχει αποδειχθεί ότι είναι χαμηλότερη στους παχύσαρκους και υψηλότερη μετά την απώλεια βάρους, υποδηλώνοντας ότι η GPx3 είναι ένας μεσολαβητής των επιδράσεων των οιστρογόνων σε σχέση με τη μάζα λίπους στους ανθρώπους.

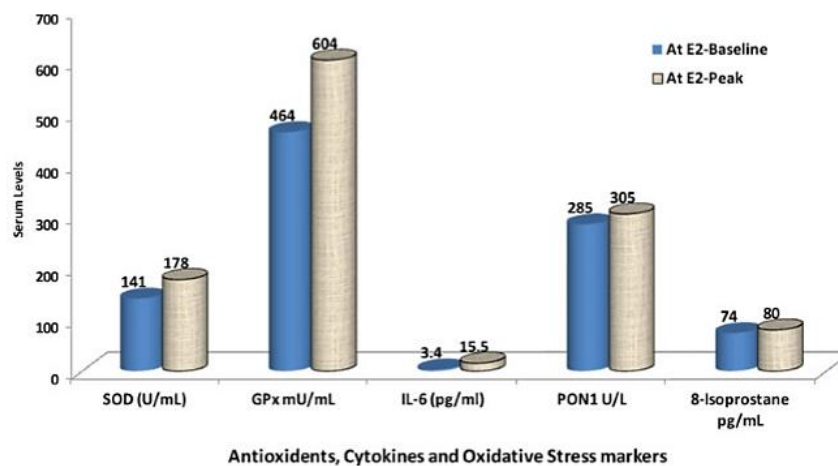
3.5. Ο ρόλος της GPx στην εξωσωματική γονιμοποίηση

Το 1995 οι Paszkowski και συνεργάτες πραγματοποίησαν μελέτη που σκοπό είχε να εκτιμήσει η δραστηριότητα της GPx στο ωοθηλακικό υγρό σε άτομα που είχαν υποβληθεί σε IVF σε σχέση με τα ατομικά χαρακτηριστικά τους και το αποτέλεσμα της θεραπείας. Όπως αναφέρουν και οι συγγραφείς του άρθρου, ήταν η πρώτη προσπάθεια μελέτης και ανάλυσης της GPx στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό. Στη μελέτη συμμετείχαν 112 γυναίκες και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστηριότητα της GPx στο ωοθυλακικό υγρό ήταν σημαντικά μειωμένη στα ωοθυλάκια που παρήγαγαν ωκύτταρα τα οποία απέτυχαν να γονιμοποιηθούν. Ακόμη, το κάπνισμα είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της δραστηριότητας της GPx των ωοθυλακίων. Αυτό παρέχει μια άλλη πιθανή εξήγηση για τη μειωμένη γονιμότητα των γυναικών που καπνίζουν. Έτσι, αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι υπάρχουν ανιχνεύσιμα

επίπεδα σεληνίου στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό και υπάρχουν ενδείξεις δραστηριότητας του εξαρτώμενου από το σελήνιο ενζύμου (GPx). Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η αντιοξειδωτική δράση της GPx στα ωοθυλάκια μπορεί να παίζει ρόλο στη διαδικασία της γονιμοποίησης (Paszowski et al. 1995).

Επιπλέον, οι Paszowski και συνεργάτες βρήκαν μειωμένα επίπεδα της SeGPx στο ωοθυλακικό υγρό σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα (Paszowski et al. 1995, Paszowski και Clarke 1996). Στην ίδια μελέτη, η SeGPx ήταν υψηλότερη στα ωοθυλάκια που παρήγαγαν ωάρια τα οποία γονιμοποιήθηκαν στη συνέχεια, σε σύγκριση με τη δραστηριότητα του ενζύμου σε ωοθυλάκια τα ωάρια των οποίων απέτυχαν να γονιμοποιηθούν.

Σε μια άλλη μελέτη, οι Younis και συνεργάτες διερεύνησαν τις δραστηριότητες αντιοξειδωτικών ενζύμων, κυτοκινών, ειδικών τελικών προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης και πέντε λιπαρών οξέων με σχετικές αναλύσεις σε σχέση με τα αποτελέσματα μιας θεραπείας διέγερσης των ωοθηκών σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF ή ενδομήτρια σπερματέγχυση. Δείγματα αίματος ελήφθησαν από 15 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε διέγερση των ωοθηκών με rFSH ή hMG και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα συλλέχθηκε το αρχικό αίμα την 2-3 ημέρα του κύκλου των γυναικών. Στην δεύτερη ομάδα συλλέγει το αίμα στο τέλος της χορήγησης FSH/hMG. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της παραοξονάσης (PON1), των υπεροξειδικών δισμουτάσεων (SOD), της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), της GPx, της 8-ισοπροστανής και των λιπαρών οξέων, αραχιδονικού, παλμιτικού, στεατικού, ελαϊκού και λινολεϊκού. Συμπερασματικά προέκυψε ότι η διέγερση των ωοθηκών προκαλεί σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των PON1, SOD, GPx και IL-6 στον ορό σε γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση ή ενδομήτρια σπερματέγχυση (Σχήμα 1). Τα υψηλά επίπεδα IL-6, SOD και PON1 και τα χαμηλότερα επίπεδα παλμιτικού και στεατικού οξέος στην ομάδα που επιτεύχθηκε εγκυμοσύνη υποδεικνύουν ότι αυτοί οι οξειδωτικοί δείκτες καθώς επίσης και οι διατροφικοί παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικός δείκτης στην ελεγχόμενη επιτυχία διέγερσης των ωοθηκών (Younis et al. 2012).



Σχήμα 1. Επίπεδα SOD, GPx, IL-6, PON 1, 8-Isoprostane στο αίμα πριν και μετά τη χορήγηση FSH/hMG.

3.6. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) έχει μελετηθεί κατά καιρούς στο ωθηλακικό υγρό και έχει συσχετιστεί με πολλούς παράγοντες όπως η ποιότητα των ωαρίων, το αν τα έμβρυα που εμφυτεύτηκαν μετά την εξωσωματική ήταν βιώσιμα και αν συνεχίστηκε η κύηση, σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες.

Οι Ογαωογε και συνεργάτες διερεύνησαν τη σχέση των ελευθέρων ριζών με την ωορρηξία, τη γονιμοποίηση και τη σύλληψη. Για τον λόγο αυτό μελέτησαν ωθηλακικά υγρά γυναικών που είχαν υποβληθεί σε διέγερση ωοθηκών με σκοπό την εξωσωματική γονιμοποίηση. Οι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν η δοκιμασία μειώσεως της αντιοξειδωτικής δύναμης σιδήρου (FRAP) και η TAC. Αναλύθηκαν συνολικά 303 ωοθυλάκια από 63 γυναίκες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 218 από τα ωοθυλάκια (71,9%) απέδωσαν ωκύτταρα, 169 (77,5%) από αυτά τα ωκύτταρα γονιμοποιήθηκαν και 134 (79,3%) από αυτά τα έμβρυα που παρήχθησαν επιβίωσαν μέχρι την ώρα της εμβρυομεταφοράς. Ακόμη, η αρχική TAC δεν ήταν διαφορετική στο ωθηλακικό υγρό αν το ωοθυλάκιο περιείχε ένα ωκύτταρο ή κανένα, αλλά ήταν σημαντικά υψηλότερη στο ωθηλακικό υγρό των οποίων το ωκύτταρο γονιμοποιήθηκε επιτυχώς και σημαντικά χαμηλότερη στο ωθηλακικό υγρό όπου το έμβρυο που προέκυψε έμεινε για να μεταφερθεί. Η μείωση της TAC ήταν χαμηλότερη όταν τα ωκύτταρα γονιμοποιήθηκαν και υψηλότερη σε συνδυασμό με τη βιωσιμότητα του εμβρύου, αλλά οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Συμπερασματικά, αυτά τα αποτελέσματα παρέχουν περαιτέρω στοιχεία ότι οι

ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γυναικεία αναπαραγωγική λειτουργία (Oyawoye et al. 2003).

Σε μια άλλη μελέτη, αξιολογήθηκε η επίδραση των συμπληρωμάτων διατροφής στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στο περιβάλλον του ωοθυλακίου, καθώς και στην έκβαση της IVF. Ο ορός του αίματος και το ωοθυλακικό υγρό συλλέχθηκαν από υπογόνιμες γυναίκες ηλικίας >39 ετών που υποβλήθηκαν σε IVF. Τα επίπεδα οξείδωσης των πρωτεϊνών και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στον ορό και στο ωοθυλακικό υγρό αξιολογήθηκαν με ή χωρίς συμπληρώματα διατροφής. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι γυναίκες που έλαβαν συμπληρώματα διατροφής πριν από την IVF, προστάτευσαν το ωοθυλακικό υγρό και τις πρωτεΐνες του ορού από την οξειδωτική βλάβη. Συγκρίσιμα αποτελέσματα ελήφθησαν όταν μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Επιπλέον, ο μέσος αριθμός ωοκυττάρων καλής ποιότητας που ανακτήθηκε όταν οι γυναίκες έλαβαν συμπληρώματα διατροφής αυξήθηκε σημαντικά. Η συγγραφέας κατέληξε λέγοντας ότι η χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής, ξεκινώντας τρεις μήνες πριν από την IVF, προστατεύει το περιβάλλον του ωοθυλακίου από το οξειδωτικό στρες, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των καλών ωοκυττάρων (Luddi et al. 2016).

Σε προοπτική μελέτη που διεξήχθη από τους Oyawoye και συνεργάτες, είχε ως στόχο και σκοπό να καθορίσει εάν η σχέση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ωοθυλακικού υγρού και των πρώιμων αναπαραγωγικών αποτελεσμάτων σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε IVF επηρεάζεται από την αιτία της στειρότητας, την μορφολογία των πολυκυστικών ωοθηκών, την ηλικία και το κάπνισμα. Μετρήθηκε η TAC με τη χρήση δοκιμασίας αναγωγικής αντιοξειδωτικής σιδήρου/αντιοξειδωτικού σε 303 δείγματα υγρών ωοθυλακίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η TAC ήταν αυξημένη σε γυναίκες με υπογονιμότητα της αιτιολογίας «ανεξήγητης» (UE) ή του σαλπιγγικού παράγοντα (TF), σε σχέση με εκείνες με στειρότητα του ανδρικού παράγοντα (MF), όταν τα αναπαραγωγικά αποτελέσματα ήταν θετικά αλλά όχι αρνητικά. Στις ομάδες TF και UE, η χαμηλή TAC συσχετίστηκε με την ανικανότητα γονιμοποίησης των ωαρίων, ενώ η TAC ήταν συγκρίσιμα ανεξάρτητη από τη βιωσιμότητα του εμβρύου. Η ανεξήγητη υπογονιμότητα συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένη ωοθυλακιορρηκτική TAC. Μεταξύ των γυναικών με πολυκυστικές ωοθήκες, η ανικανότητα γονιμοποίησης συσχετίστηκε με αυξημένη TAC. Συμπερασματικά καταλήγει λέγοντας ότι η ισορροπία του προ-οξειδωτικού-αντιοξειδωτικού των ωοθυλακίων που απαιτείται για τη σύλληψη σε γυναίκες που υποβάλλονται σε IVF σχετίζεται με την αιτιολογία της

υπογονιμότητας, την ηλικία, την παρουσία μορφολογίας πολυκυστικών ωοθηκών και το κάπνισμα (Oyawoye et al. 2009).

Τέλος, άλλη μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδάσης (LPO) και η συγκέντρωση της TAC στο ωοθηλακικό υγρό συσχετίστηκαν θετικά με τα ποσοστά εγκυμοσύνης (Pasqualotto et al. 2004).

Κεφάλαιο 4. Εξωσωματική γονιμοποίηση

Φαίνεται τα τελευταία χρόνια στην ελληνική επικράτεια ένα ποσοστό περίπου 17% των ζευγαριών να δυσκολεύονται να τεκνοποιήσουν. Αυτό το ποσοστό όμως με την μέθοδο της εξωσωματικής γονιμοποίησης φαίνεται να μειώνεται έχοντας το επιθυμητό αποτέλεσμα.

4.1. Ορισμός εξωσωματικής γονιμοποίησης

Η εξωσωματική γονιμοποίηση (in vitro fertilization, IVF) είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος υποβοηθούμενη αναπαραγωγής και όπως το λέει και η λέξη επί της ουσίας μιλάμε για γονιμοποίηση η οποία πραγματοποιείται έξω από το σώμα αντί για τη γονιμοποίηση η οποία συμβαίνει στο φυσικό περιβάλλον, δηλαδή στη σάλπιγγα της γυναίκας. Είναι ουσιαστικά η παράκαμψη μιας συγκεκριμένης λειτουργίας του οργανισμού όταν για διάφορους λόγους δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί στο σώμα (Katsimigas & Kaba 2010)

4.2. Ιστορικά- επιδημιολογικά- στατιστικά στοιχεία

Από το 1973 που γεννήθηκε η Λουίζ Μπράουν, ένα κοριτσάκι στην Αγγλία, το οποίο ήταν το πρώτο που γεννήθηκε με τεχνητή γονιμοποίηση, μέχρι σήμερα, υπολογίζεται ότι το ποσοστό των γεννήσεων που προκύπτει από κάποια μέθοδο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής υπερβαίνει το 5% σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο αριθμός των βρεφών που έχουν γεννηθεί με την βοήθεια της IVF έχει εκτιναχθεί σε >5 εκατομμύρια.

Σήμερα στην Ελλάδα ένα στα είκοσι παιδιά κάθε χρόνο γεννιέται ύστερα από επιτυχημένη εφαρμογή κάποιας μεθόδου τεχνητής γονιμοποίησης. Σύμφωνα με μερικά ακόμα στατιστικά στοιχεία, ένα στα έξι ζευγάρια αναπαραγωγικής ηλικίας αντιμετωπίζει πρόβλημα υπογονιμότητας, ενώ στην Ελλάδα συγκεκριμένα ο αριθμός των ζευγαριών υπολογίζεται μεταξύ 250.000-300.000. Σε γενικές γραμμές, εκτιμάται ότι το 84% των ζευγαριών συλλαμβάνει μετά από 1 χρόνο ελεύθερων σεξουαλικών επαφών, και το 92% των ζευγαριών

θα συλλάβουν μετά από 2 χρόνια (Yu et al.2003). Αν και η συχνότητα και η προέλευση των διάφορων μορφών της υπογονιμότητας ποικίλλει, σε ποσοστό 40%-50% οφείλεται στο γυναικείο παράγοντα (Duckitt et al. 2003) ενώ ο ανδρικός παράγοντας καταλαμβάνει το 30% της υπογονιμότητας. Ο συνδυασμός ανδρικού και γυναικείου παράγοντα υπογονιμότητας ευθύνεται για το 20–30% των περιπτώσεων. Τέλος, η ανεξήγητη υπογονιμότητα επηρεάζει το 15% των ζευγαριών (DeCherney 2003).

4.3. Αίτια που οδηγούν στην εξωσωματική γονιμοποίηση

4.3.1. Διαταραχές της ωορρηξίας

Διαταραχές της ωορρηξίας έχουμε είτε όταν δεν πραγματοποιείται καθόλου ωορρηξία (ανωοθυλακιωρρηξία) είτε όταν η ωορρηξία που γίνεται είναι ασταθής και χωρίς περιοδικότητα (ολιγοωορρηξία). Αυτές οι διαταραχές προκαλούνται είτε από ελλείψεις στη ρύθμιση των αναπαραγωγικών ορμονών στον υποθάλαμο ή στην υπόφυση, είτε από προβλήματα στις ωοθήκες. Οι δυο ορμόνες που είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της ωορρηξίας κάθε μήνα είναι η ορμόνη FSH (ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη) και η ορμόνη LH (ωχρινότροπος ορμόνη) οι οποίες παράγονται κατά τη διάρκεια του εμμήνου κύκλου.

4.3.2. Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση είναι η ανάπτυξη ενδομητριακού ιστού εκτός της κοιλότητας και του σώματος της μήτρας. Κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρήσεως το αίμα παλινδρομεί μέσω των σαλπίνγων στην περιτοναϊκή κοιλότητα και κύτταρα από το εσωτερικό της μήτρας εμφυτεύονται στα κοιλιακά όργανα. Αυτή η περίπλοκη διαταραχή εκδηλώνεται με δυσμηνόρροια, υπογονιμότητα, δυσπαρεύνια (άλγος κατά τη σεξουαλική επαφή) ή ανευρίσκεται τυχαία σε υπερηχογραφικό έλεγχο ως κύστες στις ωοθήκες (Δελτσίδου & Νάνου 2011).

4.3.3. Πρόωρη ωοθηλική ανεπάρκεια

Η πρόωρη ωοθηλακική ανεπάρκεια είναι η απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των ωοθηκών πριν την ηλικία των 40 ετών. Η διαταραχή αυτή είναι μια αυτοάνοση αντίδραση, και ως αποτέλεσμα οι ωοθήκες δεν παράγουν φυσιολογικές ποσότητες οιστρογόνων και δεν απελευθερώνουν ωάρια τακτικά (Δελτίδου & Νάνου 2011).

4.3.4. Ανωμαλίες σπέρματος

Η IVF μπορεί να διενεργηθεί όταν ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι μικρός, τα σπερματοζωάρια δεν κινούνται καλά ή υπάρχει μεγάλος αριθμός ανώμαλων σπερματοζωαρίων.

4.3.5. Ανεξήγητη υπογονιμότητα

Η ανεξήγητη υπογονιμότητα σημαίνει ότι η αιτία της υπογονιμότητας δεν έχει βρεθεί (Δελτσίδου & Νάνου 2011).

4.3.6. Ινομώματα της μήτρας.

Πρόκειται για καλοήθεις όγκους που βρίσκονται στα τοιχώματα της μήτρας και κυρίως εμφανίζονται σε γυναίκες ηλικιών από 30 μέχρι 40 ετών. Τα ινομώματα της μήτρας μπορεί να προκαλέσουν απόφραξη στις σάλπιγγες, όπως επίσης και δυσλειτουργική συσπαστικότητα της μήτρας πράγμα που οδηγεί σε αδυναμία συγκράτησης του γονιμοποιημένου ωαρίου κατά την εμφύτευση στη μήτρα. Επίσης, τα ινομώματα μπορεί να συνδέονται με την αποτυχία της εμφύτευσης ή με τη διακοπή της εγκυμοσύνης λόγω ενδομήτριας φλεγμονής (Κατσίκης και συν 2006).

4.3.7. Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS).

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι η πιο κοινή ενδοκρινική διαταραχή που επηρεάζει τη γυναικεία γονιμότητα (Homburg et al.1996, Kousta et al.1999, Balen και Michelmores 2002), και αναφορές υπάρχουν ήδη από το 1935 (Stein και Leventhal 1935). Το φάσμα των συμπτωμάτων του συνδρόμου PCOS και ο λόγος που αυτό οδηγεί σε υπογονιμότητα έγκειται στο ότι οι γυναίκες μπορεί να παρουσιάσουν ανωορρηξία, αμηνόρροια, ολιγομηνόρροια, υψηλά επίπεδα ανδρογόνων, παχυσαρκία σε συνδυασμό με λίπος που εντοπίζεται στην περιοχή του άνω μέρους του σώματος, καθώς και αρκετές δερματολογικές παθήσεις, όπως σμηγματόρροια, αλωπεκία, ακμή ή υπερτρίχωση (Elsenbruch et al. 2003).

4.4. Στάδια της εξωσωματικής γονιμοποίησης

Η διαδικασία της IVF αποτελείται από τα εξής στάδια: τον προκαταρκτικό έλεγχο, τη διέγερση των ωοθηκών, την ωοληψία, τη γονιμοποίηση, την εμβρυομεταφορά και το τεστ κύησης.

4.4.1. Προκαταρκτικός έλεγχος

Αρχικά το ζευγάρι υπόκειται σε μια σειρά εξετάσεων προκειμένου να εντοπιστούν κάποιοι παράμετροι οι οποίοι θα διευκολύνουν τη διαδικασία μετέπειτα. Οι σημαντικότερες εξετάσεις που πραγματοποιούνται για τη γυναίκα είναι ο ορμονολογικός έλεγχος, προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα διαφόρων σημαντικών ορμονών στο αίμα, ακολουθεί κολπικός υπέρηχος ή κολποσκόπηση και έπειτα γίνεται έλεγχος για πιθανή εμφάνιση ηπατίτιδας, HIV και άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων, το τεστ-Παπ, τον μαστολογικό έλεγχο σε γυναίκες άνω των 35 ετών και τέλος καρδιολογική εξέταση. Για τον άνδρα πραγματοποιείται σπερμοδιάγραμμα ώστε να καθοριστεί ο αριθμός των σπερματοζωαρίων καθώς επίσης και η κινητικότητα που αυτά έχουν. Αφού εκτιμηθούν όλα αυτά ακολουθεί το επόμενο στάδιο (Λαϊνάς, 2006).

4.4.2. Διέγερση ωοθηκών

Η διέγερση των ωοθηκών γίνεται με φαρμακευτική αγωγή ώστε να συλλεγούν αρκετά ωάρια και να αυξηθούν οι πιθανότητες να είναι καλής ποιότητας. Διάρκει περίπου 2-4 εβδομάδες ανάλογα με το πιο φαρμακευτικό πρωτόκολλο έχει ακολουθηθεί. Η γυναίκα κατά το διάστημα αυτό παρακολουθείται ορμονολογικά (αιμοληψία) όσο και υπερηχογραφικά ώστε να εκτιμηθεί η ανταπόκριση στο φαρμακευτικό πρωτόκολλο (Χριστοφορίδης, 2007).

4.4.3. Ωοληψία

Πρόκειται για το τρίτο στάδιο κατά το οποίο γίνεται συλλογή από γυναικολόγο των ώριμων ωοκυττάρων από τις ωοθήκες διακολπικά, υπό συνεχή υπερηχογραφικό έλεγχο, ώστε να υπάρχει ακρίβεια στους χειρισμούς. Τα ωοθυλάκια παρακεντώνται διαδοχικά μέσω μιας βελόνης που διαπερνά το τοίχωμα του κόλπου. Με αυτόν τον τρόπο συλλέγονται τα ωάρια και τοποθετούνται σε κυτταρική καλλιέργεια στο εργαστήριο και μετά στην κοιλότητα της μήτρας. Τα ωοκύτταρα χρειάζονται 34-36 ώρες για να ωριμάσουν και προηγείται ένεση χοριακής γοναδοτροπίνης στη γυναίκα. Η γυναίκα κατά τη διάρκεια της ωοληψίας πρέπει να είναι νηστική και επίσης γίνεται μία ελαφριά νάρκωση. Στη συνέχεια, μέσω ενός σωλήνα αναρροφάται το υγρό των ωοθηλακίων και έπειτα το υγρό αυτό πάει στο εργαστήριο για επεξεργασία. Ο εμβρυολόγος με μια πιπέτα αναρροφά τα ωάρια και τα τοποθετεί σε ειδικά τρυβλία με καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό (Λαϊνάς, 2006).

4.4.4. Γονιμοποίηση

Στο στάδιο αυτό αρχικά γίνεται συλλογή σπέρματος από τον άνδρα. Το σπέρμα αυτό επεξεργάζεται και επιλέγονται τα πιο υγιή και πιο κινητά σπερματοζωάρια. Αυτά παραμένουν στο εργαστήριο υπό άσηπτες συνθήκες καλλιέργειας μέσα σε θρεπτικό υλικό έως ότου έρθουν σε επαφή με τα ωάρια (Αρκουλής και συν. 2005).

Μετά από 16-20 ώρες παραμονής σπερματοζωαρίων και ωαρίων μαζί σε συνθήκες καλλιέργειας, ο εμβρυολόγος ελέγχει πόσα ωάρια γονιμοποιήθηκαν ομαλά και πόσα όχι. Τα μη ομαλά απομακρύνονται διότι θεωρούνται υπεύθυνα για αποβολή (πχ. πολυσπερματικά). Τα φυσιολογικά πλέον έμβρυα παραμένουν μέσα στο υγρό για 2-3 ημέρες. Για την επίτευξη μιας πετυχημένης εγκυμοσύνης καλό θα ήταν να γονιμοποιηθούν πολλά ωάρια τα οποία θα μεταφερθούν στην μήτρα.

Δύο ημέρες μετά την ωοληψία τα έμβρυα θα έχουν διαιρεθεί σε 2-4 κύτταρα. Τα έμβρυα με τα 4 κύτταρα προτιμώνται διότι τα άλλα θεωρούνται «αργοπορούντα» έμβρυα. Την τρίτη ημέρα συνεχίζεται η διαίρεση με τα έμβρυα να έχουν 5-8 κύτταρα.

4.4.5. Εμβρυομεταφορά

Η εμβρυομεταφορά δεν είναι περίπλοκη διαδικασία και γι' αυτόν τον λόγο μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς αναισθησία. Τα γονιμοποιημένα έμβρυα τοποθετούνται σε έναν σωλήνα-καθετήρα και μεταφέρονται στη μήτρα 2-6 μέρες μετά την ωοληψία. Όταν η μεταφορά γίνεται την 5^η-6^η ημέρα τα έμβρυα έχουν φτάσει στο στάδιο των βλαστοκύστεων (12-150 κύτταρα) (Τσιριγώτης 1999).

4.4.6. Τεστ κυήσεως

Κατά το τέλος της διαδικασίας, 14 μέρες μετά την ωοληψία πραγματοποιείται το τεστ κυήσεως με αιμοληψία για την μέτρηση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (β-χοριακή). Εάν αυτό είναι θετικό μετά από δύο βδομάδες προγραμματίζεται υπερηχογραφικός έλεγχος για τον έλεγχο κλινικής εγκυμοσύνης.

4.4.7. Πιθανές επιπλοκές στα προγράμματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

Λόγω της αυξημένης χορήγησης φαρμάκων για την πρόκληση της ωορρηξίας είναι πιθανό να προκληθεί σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών. Το σύνδρομο αυτό εκδηλώνεται στο 5% του

συνόλου των γυναικών που εντάσσονται σε προγράμματα IVF. Διακρίνεται σε ελαφριάς, μέτριας και βαριάς μορφής, ανάλογα με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων. Η σοβαρή μορφή αφορά ~1% του συνόλου των γυναικών και εμφανίζεται κυρίως σε γυναίκες με PCOS. Από παθοφυσιολογικής πλευράς, το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και μετατόπιση του υγρού από τα αγγεία στον λεγόμενο τρίτο χώρο (κοιλότητες όπως περιτοναϊκή, οι υποδόριοι ιστοί κτλ.).

Άλλη πιθανή επιπλοκή είναι η ύπαρξη έκτοπου κύησης (εξωμήτριος κύηση). Στην περίπτωση αυτή η εγκατάσταση του εμβρύου γίνεται σε θέση εκτός της κοιλότητας της μήτρας (συνήθως στη σάλπιγγα). Μπορεί να συμβεί μετά από αυτόματη σύλληψη σε ποσοστό 1-1,5% (Lesny et al. 1999), ενώ στα προγράμματα IVF το ποσοστό αυτό μεγαλώνει.

Οι μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής χαρακτηρίζονται ακόμα από τα αυξημένα ποσοστά πολύδυμων κυήσεων. Η συχνότητα εμφάνισης τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί λόγω του ότι έχει αυξηθεί εντυπωσιακά και η χρήση αυτών των μεθόδων. Τέλος, στην IVF υπάρχει ένας απειροελάχιστος κίνδυνος τραυματισμού εσωτερικών οργάνων ή μεγάλων αγγείων κατά τη διάρκεια της ωοληψίας (Λαϊνάς, 2006).

Κεφάλαιο 5. Διατροφή και Γονιμότητα

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι συνήθειες του τρόπου ζωής του ζευγαριού, όπως οι διατροφικές συνήθειες, επηρεάζουν τη σύλληψη (Chavarro et al. 2009). Τα άτομα που επιθυμούν να ενισχύσουν τη γονιμότητά τους οφείλουν να τροποποιήσουν τον τρόπο ζωής τους δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στις διατροφικές τους συνήθειες. Μια σωστή και ισορροπημένη διατροφή δημιουργεί ένα περιβάλλον στο σώμα της γυναίκας που είναι ικανό να υποδεχτεί την εμφύτευση ενός εμβρύου στη μήτρα αλλά και το μέγιστο ενός υγιούς βρέφους. Βέβαια, και από τη μεριά του άντρα η ισορροπημένη διατροφή οδηγεί στη δημιουργία ποιοτικών σπερματοζωαρίων ικανών να φτάσουν τον στόχο τους και να γονιμοποιήσουν το ωάριο (Karagiannis et al. 2017).

Σε πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύθηκε από τους Karagiannis και συνεργάτες βρέθηκε ότι η υψηλή προσκόλληση στη Μεσογειακή διατροφή σχετίζεται με αυξημένες πιθανότητες κλινικής εγκυμοσύνης και ζώσας γέννησης μετά από θεραπεία με IVF / ICSI σε μη παχύσαρκες γυναίκες

<35 ετών (Karagiannis et al. 2018). Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι μια αύξηση 5 μονάδων στο MedDietScore (Panagiotakos et al. 2007) μπορούσε να οδηγήσει σε 2,5 φορές υψηλότερη πιθανότητα εγκυμοσύνης και ζώσας γέννησης σε γυναίκες ηλικίας <35 χρόνων.

5.1. Μακροθρεπτικά συστατικά

Στην κατηγορία των μακροθρεπτικών συστατικών ανήκουν οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια και είναι απαραίτητα σε μεγάλες ποσότητες στην καθημερινή διατροφή μας. Είναι τα βασικά καύσιμα για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού και την παροχή ενέργειας καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας. Ακόμη, τα μακροθρεπτικά συστατικά είναι απαραίτητα τόσο για την πρόληψη όσο και την αντιμετώπιση πολλών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένης και της ενίσχυσης της γυναικείας γονιμότητας.

5.1.1. Υδατάνθρακες

Η κυριότερη πηγή ενέργειας στη διατροφή του ανθρώπου είναι οι υδατάνθρακες, οι οποίοι παρέχουν σχεδόν το μισό της συνολικής θερμιδικής πρόσληψης. Οι υδατάνθρακες ανάλογα με το βαθμό του πολυμερισμού τους διαχωρίζονται σε μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Ακόμη, τη δεκαετία του 1970 στους υδατάνθρακες εντάχθηκαν και οι διαιτητικές ίνες (Gropner et al. 2007).

Σε μια πρόσφατη μελέτη αξιολογήθηκε αν η ποσότητα και η ποιότητα των υδατανθράκων στη διατροφή σχετίζεται με προβλήματα στην ωορρηξία. Συνολικά, στη μελέτη συμμετείχαν >18000 παντρεμένες γυναίκες, προεμμηνοπαυσιακές χωρίς ιστορικό στειρότητας καθώς προσπαθούσαν για εγκυμοσύνη ή έμειναν έγκυες κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 8 ετών. Η δίαιτα αξιολογήθηκε δύο φορές κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης χρησιμοποιώντας ένα σταθμισμένο ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων, ενώ προοπτικά συσχετίστηκε με τη συχνότητα εμφάνισης υπογονιμότητας λόγω ωορρηκτικής διαταραχής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης 438 γυναίκες ανέφεραν προβλήματα στην ωορρηξία. Η συνολική πρόσληψη υδατανθράκων και η διατροφική γλυκαιμική φόρτιση σχετίζονταν θετικά με την ωορρηκτική ανεπάρκεια. Συμπερασματικά, οι ερευνητές καταλήγουν ότι η ποσότητα και η ποιότητα των υδατανθράκων στη διατροφή μπορεί να είναι σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες της πρόκλησης ωορρηξίας και της γονιμότητας σε υγιείς γυναίκες (Chavarro et al. 2009).

Στην ίδια μελέτη βρέθηκε, επίσης, ότι η κατανάλωση τροφίμων με υψηλό γλυκαιμικό δείκτη, όπως για παράδειγμα τα επεξεργασμένα δημητριακά, οι πατάτες και το λευκό ρύζι συσχετιζόνταν με μεγαλύτερο ποσοστό υπογονιμότητας, ενώ τρόφιμα με χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη, όπως ψωμί ολικής αλέσεως και καστανό ρύζι, συσχετίστηκαν με μειωμένο κίνδυνο αυτής της κατάστασης. Οι γυναίκες που κατανάλωναν τροφές με υψηλό γλυκαιμικό δείκτη είχαν 92% μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν προβλήματα ωορρηξίας σε σχέση με τις γυναίκες που κατανάλωναν τροφές με χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη (Chavarro et al. 2009).

5.1.2. Πρωτεΐνες

Το συγκεκριμένο μακροθρεπτικό συστατικό βρίσκεται σε όλο το σώμα με πάνω από 40% να εντοπίζεται στους σκελετικούς μύες, πάνω από 25% στα όργανα του σώματος, ενώ η υπόλοιπη βρίσκεται κυρίως στο δέρμα και στο αίμα (Groppe et al. 2007). Οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες στη διατροφή διότι περιέχουν αμινοξέα, με τα οποία το σώμα μας συνθέτει τις δικές του πρωτεΐνες που κάνουν εφικτή την ύπαρξη της ζωής. Τα αμινοξέα είναι είκοσι, τα εννέα από αυτά αναφέρονται ως απαραίτητα διότι δεν συντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό και πρέπει να προσληφθούν μέσω της διατροφής. Αυτά είναι η ιστιδίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη και η βαλίνη (Groppe et al. 2007). Τα άλλα έντεκα αναφέρονται ως μη απαραίτητα διότι ο οργανισμός τα βιοσυνθέτει μόνος του. Η έλλειψη αμινοξέων μπορεί να οδηγήσει σε αστία, εξασθένηση του ανοσοποιητικού, κούραση, ζάλη, ναυτία, στομαχικές διαταραχές, κατακράτηση υγρών ακόμη και υπογονιμότητα (Cibney et al. 2007).

Μελέτη που πραγματοποίησαν οι Chavarro και συνεργάτες είχε ως σκοπό να αξιολογηθεί αν η πρόσληψη ζωικής και φυτικής πρωτεΐνης σχετίζεται με προβλήματα στην ωορρηξία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντικατάσταση της ζωικής πρωτεΐνης με φυτική μειώνει τον κίνδυνο για ανάπτυξη προβλημάτων ωορρηξίας (Chavarro et al. 2008). Πιο συγκεκριμένα, η αντικατάσταση των υδατανθράκων με ζωική πρωτεΐνη (σε ποσοστό 5% επί της συνολικής προσλαμβανόμενης ενέργειας) συσχετίστηκε με 19% μεγαλύτερο κίνδυνο υπογονιμότητας λόγω ανωορρηξίας (Chavarro et al. 2008). Αντίθετα, οι γυναίκες που κατανάλωναν το 5% της συνολικής ενέργειας με τη μορφή φυτικής πρωτεΐνης και όχι υδατανθράκων, εμφάνισαν 43% χαμηλότερο κίνδυνο υπογονιμότητας. Εν κατακλείδι, η κατανάλωση φυτικής αντί ζωικής πρωτεΐνης συσχετίστηκε με >50% χαμηλότερο κίνδυνο ανωορρηκτικής υπογονιμότητας (Chavarro et al. 2008).

5.1.3. Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι και αυτά με τη σειρά τους ένα από τα βασικότερα στοιχεία της διατροφής διότι παρέχουν στον ανθρώπινο οργανισμό ενέργεια η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση αλλά και για τη λειτουργία των βασικών μηχανισμών. Επιπλέον το λίπος χρησιμοποιείται ως αποθήκευση ενέργειας στο σώμα (Groppe et al. 2007).

Σύμφωνα με τους επιστήμονες, το σωματικό λίπος επηρεάζει την αναπαραγωγή καθώς επιδρά άμεσα στα ορμονικά επίπεδα των γυναικών. Οι γυναίκες που έχουν πολύ χαμηλό σωματικό βάρος, καθώς επίσης και εκείνες που έχουν υπερβάλλον βάρος, φαίνεται να έχουν προβλήματα υπογονιμότητας. Οι γυναίκες με πολύ χαμηλό βάρος ενδέχεται να αντιμετωπίζουν προβλήματα με την ωορρηξία ή ακόμα και να απουσιάζει εντελώς η έμμηνος ρύση, ενώ γυναίκες με πολύ υψηλό σωματικό βάρος ενδέχεται να έχουν προβλήματα στη σύλληψη λόγω ανάπτυξης ινσουλινοαντίστασης, στην παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων ανδρικών αναπαραγωγικών ορμονών και στην παραγωγή μεγάλης ποσότητας λεπτίνης, η οποία διατηρεί το λίπος του σώματος σε φυσιολογικά επίπεδα (Dobbyn et al. 2009).

Η κατανάλωση απαραίτητων λιπαρών οξέων από τις φυτικές πηγές προάγει τη γονιμότητα και ρυθμίζει την ορμονική ισορροπία, ενώ τα λίπη που προέρχονται από ζωικές πηγές, καθώς και τα μαγειρεμένα λίπη επιδρούν αρνητικά στη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης, προκαλώντας αύξηση των οιστρογόνων (Dobbyn et al. 2009). Αντίθετα, σύμφωνα με άλλη μελέτη η πρόσληψη του συνολικού λίπους, η χοληστερόλη και τα περισσότερα είδη λιπαρών οξέων δεν σχετίστηκαν με μειωμένη γονιμότητα που οφειλόταν σε διαταραχές της ωορρηξίας (Chavarro et al. 2007).

Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η αυξημένη κατανάλωση trans λιπαρών οξέων αντί υδατανθράκων (κατά 2% της συνολικής ενεργειακής), συσχετίζεται με 73% μεγαλύτερο κίνδυνο ανωορρηκτικής γονιμότητας. Ακόμη, η πρόσληψη 2% της συνολικής ενέργειας από trans λιπαρά οξέα αντί για ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σχετίστηκε με ανάλογη αύξηση του κινδύνου υπογονιμότητας λόγω ανωορρηξίας, ενώ η πρόσληψη trans λιπαρών οξέων αντί μονοακόρεστων λιπαρών οξέων συνδέθηκε με διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης αυτού του τύπου υπογονιμότητας. Συνεπώς, τα trans λιπαρά οξέα μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο της

ανωορρηκτικής υπογονιμότητας όταν καταναλώνονται αντί των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Chavarro et al. 2007).

5.2.Μικροθρεπτικά συστατικά

Στα μικροθρεπτικά συστατικά ανήκουν οι βιταμίνες και τα ανόργανα στοιχεία, τα οποία αντίστοιχα διακρίνονται στα κύρια ανόργανα στοιχεία και στα ιχνοστοιχεία (Groppe et al. 2007). Τα στοιχεία αυτά δεν δίνουν ενέργεια στο οργανισμό αλλά είναι απαραίτητα σε μικρές ποσότητες για τη σωστή λειτουργία του.

Οι βιταμίνες ορίζονται ως οργανικές ουσίες, οι οποίες απαιτούνται σε πολύ μικρές ποσότητες και εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες του σώματος, όπως η ανάπτυξη, η διατήρηση της υγείας και ο μεταβολισμός (Groppe et al. 2007). Οι βιταμίνες διακρίνονται σε υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές. Στις υδατοδιαλυτές συμπεριλαμβάνονται το σύμπλεγμα των βιταμινών Β, το φυλλικό οξύ, η νιασίνη, η βιοτίνη, το παντοθενικό οξύ και η βιταμίνη C, ενώ οι βιταμίνες Α, D, Ε και Κ αποτελούν τις λιποδιαλυτές ενώ στις λιποδιαλυτές ανήκει η βιταμίνη Α (ρετινόλη), D (χοληκαλσιφερόλη), Ε (άλφα-Τοκοφερόλη), Κ (Φυλλοκινόνη, Μηνοκινόνη) (Williams et al. 2003).

Όπως προαναφέρθηκε, τα ανόργανα στοιχεία διακρίνονται σε κύρια και ιχνοστοιχεία, με βάση τις συγκεντρώσεις τους στο σώμα. Τα κύρια ανόργανα στοιχεία του ανθρώπινου σώματος περιλαμβάνουν το ασβέστιο, το φώσφορο, το μαγνήσιο, το νάτριο, το κάλιο και το χλώριο, ενώ τα ιχνοστοιχεία είναι ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το σελήνιο, το χρώμιο, το ιώδιο, το μαγνήσιο κ.α. (Groppe et al. 2007).

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες που αναδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των βιταμινών και των ανόργανων συστατικών στην ενίσχυση της γονιμότητας. Επίσης, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι κάποια μικροθρεπτικά στοιχεία είναι απαραίτητα σε μεγαλύτερες ποσότητες πριν την σύλληψη αλλά και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Κάποια από αυτά είναι το φυλλικό οξύ, ο σίδηρος, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος, το ασβέστιο, η βιταμίνες Α, C, Β12, Β6 και Ε. Παρακάτω θα αναφερθούν τα σημαντικότερα από τα παραπάνω μικροθρεπτικά στοιχεία.

5.2.1. Φυλλικό οξύ

Το φυλλικό οξύ είναι υδατοδιαλυτή βιταμίνη και αποτελεί μέρος του συμπλέγματος βιταμινών Β. Η Διαιτητική Πρόσληψη Αναφοράς (Δ.Π.Α.) για το φυλλικό οξύ είναι 400 μg για του ενήλικες άντρες και γυναίκες. Κατά τη διάρκεια της κύησης η ΔΠΑ αυξάνεται στα 600 μg, ενώ στα αρχικά στάδια του θηλασμού είναι της τάξης των 500 μg (Williams et al. 2003). Το φυλλικό οξύ πήρε το όνομά του από τη λέξη «φύλλωμα» διότι βρίσκεται σε πράσινα φυλλώδη λαχανικά, όπως το σπανάκι. Άλλες καλές πηγές είναι τα εντόσθια (σुकώτι, νεφρά), τα όσπρια, τα δημητριακά ολικής άλεσης καθώς και μερικά φρούτα, όπως τα πορτοκάλια και οι μπανάνες. Ακόμη, πολλά δημητριακά πρωινού είναι εμπλουτισμένα με φυλλικό οξύ και πολλοί ειδικοί συνιστούν ανάλογο εμπλουτισμό των περισσότερων προϊόντων δημητριακών (Williams et al. 2003).

Φυλλικό οξύ και γονιμότητα

Το φυλλικό οξύ είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του DNA, του t-RNA αλλά και των αμινοξέων κυστεΐνη και μεθειονίνη (Gibney et al. 2007). Και αυτός είναι ο κυριότερος λόγος που παίζει σημαντικότατο ρόλο στην ανθρώπινη αναπαραγωγή και γονιμότητα. Έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς πολλές μελέτες που εξετάζουν τη σχέση του φυλλικού οξέος με τη γονιμότητα. Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε είχε ως στόχο να αξιολογήσει τη συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης φυλλικού οξέος, των ορμονικών επιπέδων και την ανωορρηξία σε υγιείς γυναίκες με τακτική εμμηνόρροια. Στη μελέτη συμμετείχαν 259 υγιείς γυναίκες ηλικίας 18-44 ετών για 2 κύκλους εμμήνου ρύσεως. Το σύνολο του φυλλικού οξέος και συγκεκριμένων πηγών φυλλικού οξέος αξιολογήθηκαν έως και 4 φορές ανά κύκλο με ανάκληση 24 ωρών. Η οιστραδιόλη, η προγεστερόνη, η FSH και η LH μετρήθηκαν στον ορό έως και 8 φορές ανά κύκλο (Mumford et al. 2012).

Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά και πολύ σημαντικά. Αρχικά βρέθηκε ότι οι γυναίκες που βρίσκονταν στο υψηλότερο τριτημόριο πρόσληψης διαιτητικού φυλλικού οξέος είχαν υψηλότερη συνολική πρόσληψη θερμίδων, φυτικών ινών, βιταμινών Β, C και E, σεληνίου, μαγνησίου, καλίου, ασβεστίου και σιδήρου. Ο μέσος όρος πρόσληψης διαιτητικού φυλλικού οξέος ήταν 500,4 μg/ημέρα με το εύρος να κυμαίνεται από 77,3-2334,1 μg/ ημέρα. Κατά μέσο όρο το διαιτητικό φυλλικό οξύ που καταναλώθηκε από τις γυναίκες της μελέτης ήταν 50,8% συνθετικό (φυλλικό οξύ) και 49,2% φυσικό. Πιο συγκεκριμένα, το 29,1% του διαιτητικού

φυλλικού οξέος προερχόταν από εμπλουτισμένα δημητριακά, το 41,1% από εμπλουτισμένα προϊόντα σίτου, το 18,1% από λαχανικά και το 11,7% από όσπρια (Mumford et al. 2012).

5.2.2. Σίδηρος

Ο σίδηρος είναι ένα μεταλλικό στοιχείο που υπάρχει σε δύο μορφές, τη σιδηρούχο (Fe^{2+}) και τη σιδηρική (Fe^{3+}). Σε συνάρτηση με την ηλικία και το φύλο, ένα άτομο χρειάζεται να αναπληρώσει περίπου 1.0-1.5 mg σιδήρου που χάνεται από τον οργανισμό καθημερινά. Ωστόσο, επειδή η βιοδιαθεσιμότητα είναι πολύ χαμηλή (απορροφάται μόλις το 10% του σιδήρου που προσλαμβάνεται με τη διατροφή) η Διαιτητική Πρόσληψη Αναφοράς είναι 8 mg για τους άνδρες και 18 mg για τις γυναίκες. Οι έγκυες γυναίκες χρειάζονται 27 mg, ενώ οι μετεμμηνοπαυσιακές χρειάζονται μόλις 8 mg (Williams et al. 2003).

Σίδηρος και γονιμότητα

Η ικανοποιητική πρόσληψη σιδήρου δεν είναι μόνο αναγκαία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει και πριν την σύλληψη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι μετά τη σύλληψη το έμβρυο χρειάζεται αρκετή ποσότητα σιδήρου ώστε να αναπτυχθεί σωστά. Οπότε, είναι πολύ σημαντική η επαρκής πρόσληψη σιδήρου ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα αναιμίας.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες που έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ της πρόσληψης σιδήρου και της γονιμότητας. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε είχε ως σκοπό να αξιολογήσει αν η κατανάλωση συμπληρωμάτων σιδήρου και μη αιμικού σιδήρου από διάφορες πηγές, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης ωορρηκτικής υπογονιμότητας. Για αυτό το λόγο διεξήχθη μια προοπτική μελέτη κοόρτης που ως δείγμα είχε >18.000 παντρεμένες γυναίκες, προεμμηνοπαυσιακών χωρίς ιστορικό υπογονιμότητας οι οποίες προσπαθούσαν να μείνουν έγκυες ή έμειναν έγκυες μεταξύ των ετών 1991 και 1999. Η δίαιτα αξιολογήθηκε δύο φορές κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης και σχετίσθηκε προοπτικά με τη συχνότητα εμφάνισης υπογονιμότητας λόγω διαταραχών ωορρηξίας (Chavarro et al. 2006). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κατά τη διάρκεια των 8 ετών παρακολούθησης, 438 γυναίκες ανέφεραν υπογονιμότητα λόγω της διαταραχής της ωορρηξίας. Οι γυναίκες που κατανάλωναν συμπληρώματα σιδήρου είχαν σημαντικά χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης προβλημάτων ωορρηξίας συγκριτικά με τις γυναίκες που δεν χρησιμοποίησαν συμπληρώματα. Η συνολική πρόσληψη σιδήρου, εκτός του αιμικού που καταναλώθηκε, ήταν κυρίως υπό μορφή

πολυβιταμινών και συμπληρωμάτων σιδήρου, και ήταν αντιστρόφως ανάλογη με τον κίνδυνο υπογονιμότητας. Συμπερασματικά, η κατανάλωση συμπληρωμάτων σιδήρου και μη-αιμικού σιδήρου μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης υπογονιμότητας λόγω ανωορρηξίας (Chavarro et al. 2006).

Κεφάλαιο 6. Πειραματικό μέρος

6.1. Σκοπός μελέτης

Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, αρκετές μελέτες έχουν αξιολογήσει τη σχέση του οξειδωτικού στρες με τη γυναικεία αναπαραγωγή. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να εστιάζουν στη δραστικότητα της GPx3 στο ωοθυλακικό υγρό με παράγοντες διατροφικούς και με τις εκβάσεις της IVF. Σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογήσει τη σχέση ανάμεσα δραστικότητα της GPx3 και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία IVF με διατροφικούς παράγοντες και με τις εκβάσεις της IVF. Η εργασία αυτή αποτελεί μέρος μελέτης που διεξάγεται στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στο πλαίσιο διδακτορικής διατριβής, στην οποία μελετήθηκαν υπογόνιμα ζευγάρια από την Ελλάδα που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση με τελικό στόχο την εύρεση δεσμών μεταξύ της διατροφής και άλλων παραγόντων του τρόπου ζωής και της υπογονιμότητας.

6.2.Μεθοδολογία

6.2.1. Δείγμα και τοποθεσία

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 86 υπογόνιμες γυναίκες για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα ωοθυλακικού υγρού. Όλες οι γυναίκες προσήλθαν στην Ιατρική Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΙΣ στην Αθήνα, κατά το διάστημα Νοέμβρης 2013 - Σεπτέμβρης 2016.

6.2.2. Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη

Τα κριτήρια εισαγωγής των γυναικών στη μελέτη ήταν τα εξής:

- Να είναι ηλικίας ≤ 41 ετών
- Να μην είναι παχύσαρκες ($\Delta\text{ΜΣ} < 30\text{kg/m}^2$)
- Να μην έχουν υποβληθεί σε IVF στο παρελθόν
- Να μην έχουν ιστορικό προηγούμενης εγκυμοσύνης
- Να μην πάσχουν από ενδομητρίωση ή να έχουν ιστορικό χειρουργικών επεμβάσεων στις ωοθήκες

- Να μην έχουν ιστορικό σακχαρώδους διαβήτη, καρδιαγγειακής νόσου, υπέρτασης, νεοπλασιών, υποθυρεοειδισμού ή ψυχιατρικών διαταραχών.
- Να μην έχουν αλλάξει τις διατροφικές τους συνήθειες κατά το διάστημα τουλάχιστον των τελευταίων 6-μηνών πριν από τη θεραπεία IVF.

Κατά την έναρξη της διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν ανθρωπομετρικές μετρήσεις (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης) για τον προσδιορισμό του δείκτη μάζας σώματος [$\Delta\text{ΜΣ} = \text{βάρος (kg)} / \text{ύψος (m)}^2$]. Από όλες τις συμμετέχουσες συμπληρώθηκαν ερωτηματολόγια σχετικά με δημογραφικά χαρακτηριστικά, το ιατρικό και αναπαραγωγικό ιστορικό της κάθε γυναίκας καθώς επίσης και τις συνήθειες του τρόπου ζωής (π.χ. κάπνισμα, φυσική δραστηριότητα, άγχος). Όλες οι διαδικασίες ήταν σύμφωνες με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και όλες οι γυναίκες υπέγραψαν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής, αφού προηγουμένως ενημερώθηκαν για τον σκοπό και τις διαδικασίες της μελέτης. Το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

6.2.3. Διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης και εκβάσεις

Πριν την έναρξη της IVF, οι γυναίκες υποβλήθηκαν σε έλεγχο ωθητικών αποθεμάτων προκειμένου να αποφασισθεί ποιο πρωτόκολλο ωθητικής διέγερσης θα ακολουθηθεί στην καθεμία, σύμφωνα με τις κλινικές υποδείξεις. Στις γυναίκες της παρούσας μελέτης ακολουθήθηκαν 2 διαφορετικά σχήματα ωθητικής διέγερσης: 1) με ανταγωνιστή GnRH (με εμπορικές ονομασίες φαρμάκων: Cetrotide, Orgalutran) και 2) βραχύ πρωτόκολλο με αγωνιστή GnRH στην ωθητική φάση (flareprotocol, Daronda, Arvekar). Και στα 2 σχήματα γινόταν υποδόρια χορήγηση ανασυνδυασμένης FSH (Gonal-F, Puregon, Altrmon) ή/και ανθρώπινης εμμηνοπαυσιακής γοναδοτροπίνης (hMG) (Menopur, Merional, Pergonal) με ανώτατη συνδυαστική δόση τα 450 IU/ημέρα. Καθ'όλη τη διάρκεια του πρωτοκόλλου ωθητικής διέγερσης παρακολουθούνταν τα επίπεδα οιστραδιόλης ορού καθώς και ο αριθμός και τα μεγέθη των ωθηλακίων. Η χορήγηση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) έγινε περίπου 36 ώρες πριν από την προγραμματισμένη ωοληψία, ώστε να προκληθεί ωορρηξία. Η συλλογή των ωαρίων πραγματοποιούνταν όταν το μέγεθος των ωθηλακίων ήταν μεταξύ 16 και 18 mm και τα επίπεδα οιστραδιόλης ορού ήταν τουλάχιστον 1800 pmol/L.

Η διαδικασία της ωοληψίας έγινε από γυναικολόγο διακολπικά, υπό επαρκή υπερηχογραφικό έλεγχο, ώστε να υπάρχει ακρίβεια στους χειρισμούς. Τα ωοθηλάκια παρακεντήθηκαν

διαδοχικά μέσω βελόνης που διαπερνούσε το τοίχωμα του κόλπου προκειμένου να απομονωθεί το σύνολο των ωαρίων που παρήγαγε η κάθε γυναίκα. Το περιεχόμενο του επικρατούς ωοθυλακίου κάθε γυναίκας αναρροφήθηκε ξεχωριστά σε ειδικά σωληνάρια για την απομόνωση του ωοθυλακικού υγρού. Το ωοθυλακικό υγρό που αναρροφήθηκε φυγοκεντρίθηκε στις 1800 rpm για 15 λεπτά για την απομάκρυνση κυττάρων και λοιπών έμμορφων συστατικών. Μετά την φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε και καταψύχθηκε στους -80 ° C μέχρι την ανάλυσή του.

Για όλα τα ζευγάρια στη συγκεκριμένη μελέτη η εξωσωματική γονιμοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ενδοκυτταροπλασματικής σπερματέγχυσης (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI). Τα ωάρια κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους από τον εμβρυολόγο σε ωάρια στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου, ωάρια στο στάδιο της Μετάφασης- I (M-I) ή ωάρια στο στάδιο της Μετάφασης- II (M-II). Η επιτυχής γονιμοποίηση του ωαρίου εκτιμήθηκε από την παρουσία δύο προπυρήνων 17-20 ώρες μετά τη σπερματέγχυση. Ως ρυθμός γονιμοποίησης ορίστηκε ο λόγος των γονιμοποιημένων ωαρίων προς τα ωάρια σταδίου M-II. Την τρίτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση εκτιμήθηκε η ποιότητα των παραγόμενων εμβρύων βάσει του αριθμού των κυττάρων και της μορφολογικής τους ποιότητας, με βαθμολογικό σκορ =1 να αντιστοιχεί στη βέλτιστη και σκορ=5 στη χειρότερη ποιότητα εμβρύων. Όσα έμβρυα είχαν 6-8 κύτταρα θεωρήθηκε ότι διαιρούνταν με φυσιολογικό ρυθμό, ενώ εκείνα που είχαν λιγότερα ή περισσότερα κύτταρα θεωρήθηκε ότι είχαν επιβραδυνόμενη ή επιταχυνόμενη διαίρεση, αντίστοιχα. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ως έμβρυα καλής ποιότητας θεωρήθηκαν όσα την τρίτη ημέρα είχαν τουλάχιστον 8 κύτταρα και ταυτόχρονα είχαν μορφολογικό σκορ 1-2. Κατά την εμβρυομεταφορά μεταφέρθηκαν από ένα έως το πολύ τέσσερα έμβρυα, σύμφωνα με την Εθνική Ελληνική Νομοθεσία για την εμβρυομεταφορά (Greek National Authority of Assisted Reproduction; Law 3305/01/2005; <http://eaiya.gov.gr/en/law-fek/>).

Ως επιτυχής εμφύτευση ορίστηκε η ανίχνευση τιμών b-hCG στον ορό >20 IU/L, 14-21 ημέρες μετά την ωοληψία, ενώ ως κλινική εγκυμοσύνη η ύπαρξη ενδομήτριας κύησης επιβεβαιωμένης με υπερηχογράφημα και παρουσία τουλάχιστον ενός σάκου κύησης καθώς επίσης και θετική καρδιακή λειτουργία κατά την 6^η εβδομάδα κύησης. Ως ζώσα γέννηση θεωρήθηκε η γέννηση ενός νεογνού μετά την 24^η εβδομάδα κύησης. Όλες οι κλινικές πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων της διάγνωσης της στειρότητας, των ορμονικών

επιπέδων και του πρωτοκόλλου ωοθηκικής διέγερσης, αντλήθηκαν από τα ηλεκτρονικά ιατρικά αρχεία των γυναικών. Ως κύρια καταληκτικά σημεία της μελέτης αξιολογήθηκαν η επιτυχής εμφύτευση, η κλινική εγκυμοσύνη και η ζώσα γέννηση, ενώ ως ενδιάμεσες εκβάσεις της IVF αξιολογήθηκαν αριθμός και η ποιότητα των παραγόμενων ωαρίων και εμβρύων, καθώς και ο ρυθμός γονιμοποίησης των ωαρίων.

6.2.4. Ερωτηματολόγια

Χρησιμοποιήθηκαν 3 ερωτηματολόγια, το πρώτο ήταν ένα γενικό ερωτηματολόγιο που παρείχε πληροφορίες σχετικά με δημογραφικά χαρακτηριστικά και τη φυσική δραστηριότητα, ένα ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQ), και ένα ερωτηματολόγιο για την εκτίμηση του στρες τόσο σε μακροχρόνιο επίπεδο όσο και βραχυπρόθεσμα. Όλα τα ερωτηματολόγια συμπληρώθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

6.2.4.1. Γενικό ερωτηματολόγιο

Όσον αφορά στο γενικό ερωτηματολόγιο καταγραφής ατομικών στοιχείων, αυτό περιείχε ερωτήσεις σχετικά με το μορφωτικό επίπεδο, ερωτήσεις οικονομικού περιεχομένου (π.χ. καταγραφή ετήσιου εισοδήματος), ερωτήσεις σχετικά με τις καπνιστικές συνήθειες και την έκθεση σε καπνό, καθώς και λεπτομερές ιατρικό ιστορικό. Τέλος, περιείχε ερωτήσεις σχετικά με τη φυσική δραστηριότητα των ατόμων η οποία εκτιμήθηκε βάσει του σταθμισμένου για τον Ελληνικό πληθυσμό σύντομου ερωτηματολογίου IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) (Papathanasiou et al. 2009)

6.2.4.2. Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQ)

Για την εκτίμηση της συνήθους πρόσληψης τροφίμων αλλά και αλκοόλ, οι γυναίκες της μελέτης κλήθηκαν να συμπληρώσουν ένα ημιποσοτικό ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων, σταθμισμένο για τον ελληνικό πληθυσμό (Bountziouka et al., 2012). Με τη χρήση του ερωτηματολογίου αυτού αποτυπώθηκε η διατροφική πρόσληψη των γυναικών κατά το διάστημα των τελευταίων 6-μηνών πριν την έναρξη της IVF και εκτιμήθηκε τόσο η ολική ενεργειακή πρόσληψη όσο και η πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών και ομάδων τροφίμων (σε μερίδες/ημέρα).

Οι ερωτήσεις που αφορούσαν την κατανάλωση τροφίμων και ποτών ήταν συνολικά 69. Σε κάθε μία αναφερόταν και η μερίδα αναφοράς. Σε κάθε ερώτηση οι γυναίκες καλούνταν να

απαντήσουν τη συχνότητα με την οποία κατανάλωναν ένα τρόφιμο. Η κλίμακα είχε 6 επιλογές: ποτέ/σπάνια, 1-3 φορές/μήνα, 1-2 φορές/εβδομάδα, 3-6 φορές/εβδομάδα, 1 φορά/ημέρα και ≥ 2 φορές/ημέρα. Ακόμα, στο FFQ περιλαμβάνονταν 7 ερωτήσεις σχετικά με τις διατροφικές συνήθειες των γυναικών (όπως η κατανάλωση ή όχι πρωινού και η χρήση ή όχι συμπληρωμάτων διατροφής). Οι ομάδες τροφίμων που προέκυψαν και χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις της παρούσας μελέτης ήταν: δημητριακά ολικής αλέσεως (που έλαβε υπόψη την κατανάλωση ψωμιού ή φρυγανιάς ολικής αλέσεως, καστανού ρυζιού, ζυμαρικών ολικής αλέσεως), επεξεργασμένα δημητριακά (που έλαβε υπόψη την κατανάλωση λευκού ψωμιού ή φρυγανιάς, ρυζιού, ζυμαρικών), πατάτες (που έλαβε υπόψη την κατανάλωση πατάτας ψητής, βραστής, πουρέ, τηγανητής), φρούτα (που δεν έλαβε υπόψη την κατανάλωση φυσικών χυμών από φρούτα), λαχανικά (που έλαβε υπόψη την κατανάλωση διάφορων λαχανικών, σπανακόπιτας, πίτας με χόρτα, καθώς και φαγητών που περιλαμβάνουν και λαχανικά, όπως το σπανακόρυζο κ.ά.), λαχανικά ως σαλάτα (που έλαβε υπόψη την κατανάλωση διάφορων λαχανικών, σπανακόπιτας και πίτας με χόρτα, χωρίς να λάβει υπόψη φαγητά με λαχανικά), όσπρια, ψάρια (που έλαβε υπόψη την κατανάλωση διάφορων ψαριών και θαλασσινών), κόκκινο κρέας (που έλαβε υπόψη την κατανάλωση κιμά, αρνιού, μοσχαριού κ.ά. κόκκινων κρεάτων καθώς και επεξεργασμένων προϊόντων τους όπως λουκάνικα και μπεϊκόν), πουλερικά, πλήρη γαλακτοκομικά (που έλαβε υπόψη την κατανάλωση γάλακτος, γιαουρτιού και τυριού που είναι πλήρη σε λιπαρά), τυρί χαμηλό σε λιπαρά, ελαιόλαδο, αλκοόλ (που έλαβε υπόψη την κατανάλωση κρασιού, μπύρας και άλλων αλκοολούχων ποτών), ξηροί καρποί. Η πρόσληψη των παραπάνω ομάδων τροφίμων υπολογίστηκε σε μερίδες/ημέρα που αντιστοιχούν ενδεικτικά σε 1 φέτα των 25 g ψωμί, 100 g πατάτας, ½ φλιτζάνι μαγειρεμένο ρύζι ή ζυμαρικά, 1 φλιτζάνι ωμά ή ½ φλιτζάνι μαγειρεμένα λαχανικά, 1 μήλο (~80 g), 1 μπανάνα (~60 g), 1 πορτοκάλι (~100 g), ~200 g καρπούζι ή πεπόνι, ~30 g σταφύλι, 1 φλιτζάνι γάλα ή γιαούρτι, 30 g τυρί, 1 αυγό, ~60 g μαγειρεμένο κρέας ή ψάρι και 1 φλιτζάνι μαγειρεμένα όσπρια. Το συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο έχει αξιολογηθεί για την αξιοπιστία, την επαναληψιμότητα και την καταλληλότητά του για τον ελληνικό, γενικό πληθυσμό (Bountziouka et al., 2012).

6.2.4.3. Ερωτηματολόγιο STAI-Gr. X-1 (State- Trait anxiety inventory)

Για την εκτίμηση της κατάστασης στρες των γυναικών του δείγματος χρησιμοποιήθηκε μία επικυρωμένη μορφή ερωτηματολογίου Άγχους Κατάστασης-Προδιάθεσης (State-Trait anxiety inventory, STAI) που δημιουργήθηκε από τους Spielberger et al. 1970 και η αναθεωρημένη του έκδοση έγινε το 1983 και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα (Onat et al. 2015). Αποτελούνταν από δύο ξεχωριστά τμήματα και περιείχε συνολικά 40 ερωτήσεις-φράσεις στις οποίες αντιστοιχούσε μία βαθμολογία από το 1 μέχρι το 4. Το 1 μεταφράζεται στο σχεδόν ποτέ ή καθόλου, το 2 στο μερικές φορές, το 3 στο συχνά ή μέτρια, και το 4 στο σχεδόν πάντοτε ή πάρα πολύ. Το πρώτο τμήμα μετρούσε το άγχος κατάστασης (state) και αναφερόταν στην παρούσα συναισθηματική κατάσταση των γυναικών, ενώ το δεύτερο τμήμα διερευνούσε το άγχος ως χαρακτηριστικό της προσωπικότητάς τους (trait), θέτοντας ερωτήσεις-φράσεις για το πώς αισθάνονται συνήθως οι γυναίκες του δείγματος. Το συνολικό σκορ του κάθε τμήματος κυμαινόταν από 20 έως 80, με ένα σκορ 20-39 να υποδηλώνει χαμηλά επίπεδα στρες, 40-59 μέτρια επίπεδα στρες και >59 υψηλό στρες (Karagiannis et al. 2016).

6.3. Προσδιορισμός δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

Αρχή μεθόδου

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) καταλύει την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων, συμπεριλαμβανομένων και των υπεροξειδίων του υδρογόνου, με τη βοήθεια της ανηγμένης γλουταθειόνης, λειτουργώντας έτσι ως προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στην οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων. Το ένζυμο χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη ως τον μοναδικό δότη ηλεκτρονίων προκειμένου να αναγεννηθεί η ανηγμένη μορφή της σεληνοκυστεΐνης. Στο συγκεκριμένο πείραμα, η δραστικότητα της GPx μετρήθηκε έμμεσα μέσω μιας συζευγμένης αντίδρασης με την αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR). Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), που παράγεται ύστερα από την αναγωγή των υδρουπεροξειδίων από την GPx, μετατρέπεται ξανά στην ανηγμένη της μορφή από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και το NADPH (ανηγμένη μορφή του β-νικοτιναμιδο αδενινο φωσφορικού δινουκλεοτιδίου), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Ο ρυθμός μείωσης της NADPH που καταγράφεται με μέτρηση απορρόφησης στα 340 nm είναι ανάλογος της δραστικότητας του ενζύμου.

Όργανα

- ELISA reader
- Αυτόματες πιπέτες
- Πολυκάναλη πιπέτα

Στέρεα αντιδραστήρια/ διαλύτες

- Sodium phosphate monobasic, $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid, Tetrasodium Salt) (Sigma, E6511)
- Sodium Azide (Sigma, S-2002)
- B-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced form (β - NADPH), Tetrasodium Salt (201-201), 1 vial
- Glutathione Reductase (Sigma, G-3664)
- GSH (Sigma, G-4251)
- Dithiothreitol (Sigma, D-0632)
- H_2O_2 30% (Sigma, H-1009)

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM με EDTA 0.4 mM, pH 7.0 (PBS/EDTA): 6,900 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (S5) και 0,1665g EDTA (E1) σε 1000mL απεσταγμένο νερό. Ρύθμιση pH με NaOH 1M
- Sodium Azide 1mM σε PBS 50 mM/ EDTA 0.4mM/ pH 7.0 (PBS/Sodium azide): 0,0032g NaN_3 σε 50mL PBS/EDTA
- Stock διάλυμα αναγωγής της γλουταθειόνης (προσδιορίζεται από τα στοιχεία της ταμπέλας του αντιδραστηρίου)
- Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 200mM (GSH): 0,0615g σε 1mL απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα H_2O_2 0.042% (H_2O_2): 1,4mL διαλύματος H_2O_2 και 999ml απεσταγμένο νερό. Παρασκευάζεται αμέσως πριν το assay.
- Διάλυμα H_2O_2 0,0105% (H_2O_2): 70 ml διαλύματος H_2O_2 30% σε 50 ml απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα NADPH: 1mg NADPH σε 100ml PBS/EDTA

Αναλυτική πορεία

- Παρασκευή μίγματος αντίδρασης και H_2O_2 λίγο πριν τις δοκιμασίες.
- Παρασκευή μίγματος αντίδρασης σε Falcon 50ml σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

PBS/ Sodium azide	9200ml
GR	37ml
H ₂ O	63
GSH	50ml
NADPH	100ml

- Προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων στα πηγαδάκια των plates και διεξαγωγή του assay σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:
- Παρασκευή μίγματος αντίδρασης και H₂O₂ λίγο πριν τις δοκιμασίες.
- Παρασκευή μίγματος αντίδρασης σε Falcon 50 mL σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Διάλυμα	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
PBS/Sodium azide	9200 μ L	48 mM
GR	x μ L (Τόσο ώστε η τελική συγκέντρωση GR να είναι 1U/mL στο μίγμα της αντίδρασης)	1 U/ml
H ₂ O	100-x	
GSH 200 mM	50 μ L	1 mM
NADPH	100 μ L (1 mg)	0,2 μ g/ μ L (0.12 mM)

- Πρώτα προστίθενται στα πηγαδάκια το μίγμα της αντίδρασης και ο διαλύτης αν χρειάζεται και στη συνέχεια με πολυκάναλη πιπέτα το H₂O₂ του υδρογόνου
- Το πλακίδιο μεταφέρεται άμεσα στο ELISA reader για μέτρηση
- Καταγράφεται η απορρόφηση σε 340 nm για 6 λεπτά ανά λεπτό

Υπολογισμοί

- Κατασκευάζεται σε excel η καμπύλη απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο ($y=ax+b$) για κάθε δείγμα και το blank και υπολογίζεται η κλίση της καμπύλης που αντιστοιχεί στα $\Delta A/\text{min}$
- Υπολογίζεται η δραστητικότητα του ενζύμου με την παρακάτω εξίσωση

$$\text{Units/ml παρασκευάσματος} = \frac{(\Delta A/\text{min, sample} - \Delta A/\text{min, blank}) \times 2 \times 0,250 \times df}{4,60 \times V_{\text{sample}}}$$

Όπου:

2: Τα 2 μ moles της GSH που παράγονται για κάθε μ mole NADPH που οξειδώνεται

0,250: Ο τελικός όγκος του assay σε ml

df: Ο συντελεστής αραιώσης αν το δείγμα της GPx αραιωθεί

4,60: ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του NADPH στα 340nm και για όγκο 0,250 ml (μήκος οπτικής διαδρομής : 0,9cm)

Vsample: Ο όγκος του διαλύματος της GPx που χρησιμοποιείται στο assay

6.4. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Αρχή της μεθόδου

Οι ελεύθερες ρίζες (ROS) παράγονται ως συνέπεια του αερόβιου μηχανισμού. Οι ασταθείς ελεύθερες ρίζες προσκολλώνται στο κύτταρο προκαλώντας καταστροφές στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στο DNA, προκαλώντας έτσι μία ποικιλία ασθενειών. Οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα περίπλοκο αντιοξειδωτικό σύστημα έτσι ώστε να μειώσουν αυτήν την καταστροφή. Αυτό το αντιοξειδωτικό σύστημα περιλαμβάνει ένζυμα (π.χ. υπεροξειδάση της δισμουτάσης, καταλάση, GPx), μακρομόρια (π.χ. αλβουμίνη, φερριτίνη, σερουλοπλασμίνη) και από μικρομόρια (π.χ. ασκορβικό οξύ, α-τοκοφερόλη, β-καροτένιο). Το σύνολο των ενδογενώς παραγόμενων και αυτών που λαμβάνονται από τη διατροφή αντιοξειδωτικών αποτελούν την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Η συνεργασία μεταξύ των αντιοξειδωτικών συστημάτων, παρέχει προστασία της κυτταρικής μεμβράνης από τις ελεύθερες ρίζες. Έτσι, η αντιοξειδωτική ικανότητα παρέχει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία συγκρινόμενη με τις πληροφορίες που θα μπορούσε να μας δώσει η μέτρηση μεμονωμένων συστατικών.

Όργανα

- Antioxidant Assay Kit (Item No. 709001)
- Αυτόματες πιπέτες
- Πολυκάναλη πιπέτα

Αναλώσιμα

- Αντιοξειδωτικό ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης
- Αντιοξειδωτική ανάλυση χρωμογόνου
- Αντιοξειδωτική δοκιμασία μυοσφαιρίνης
- Αντιοξειδωτική δοκιμασία trolox
- Αντιοξειδωτική δοκιμασία υπεροξειδωσης του υδρογόνου
- 96 θέσεων στερεά πλακίδια
- 96 θέσεων καλυπτόμενα φύλλα

Αναλυτική πορεία

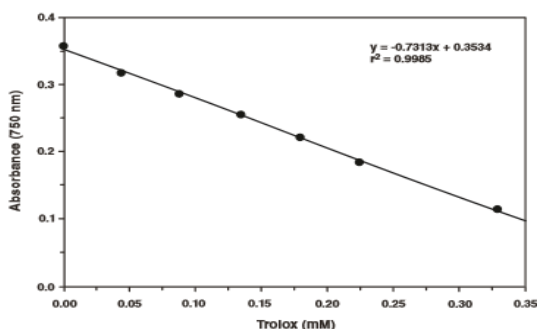
1. Προετοιμασία του Trolox. Χρειάστηκαν 7 δοκιμαστικοί σωλήνες οι οποίοι μαρκαρίστηκαν από το A-G. Έπειτα προστέθηκε η ποσότητα των ανασυσταθέντων αντιοξειδωτικών ρυθμιστικών διαλυμάτων ανάλυσης και του Trolox όπως περιγράφεται στον πίνακα.

Σωλήνας	Ανασύσταση Trolox	Ανασύσταση ρυθμιστικών διαλ/των	Τελική συγκέντρωση (mM Trolox)
A	0	1000	0
B	30	970	0.045
C	60	940	0.090
D	90	910	0.135
E	120	880	0.18
F	150	850	0.225
G	220	780	0.330

2. Trolox Standard Wells- προστέθηκαν 10μl από το Trolox standard (tubes A-G), 10 μl από τη μυοσφαιρίνη, και 150 μl από το χρωμογόνο ανά πηγάδι στα καθορισμένα πηγάδια στην πλάκα
3. Sample Wells- προστέθηκαν 10μl από το δείγμα, 10μl από τη μυοσφαιρίνη και 150 μl από το χρωμογόνο σε δύο πηγάδια. Για την επίτευξη επαναληπτικών αποτελεσμάτων, τα επίπεδα αντιοξειδωτικών του δείγματος πέφτουν εντός της πρότυπης καμπύλης. Όταν είναι απαραίτητο, το δείγμα αραιώνεται με Assay Buffer ώστε να φέρει τα αντιοξειδωτικά σε αυτό το επίπεδο.
4. Οι αντιδράσεις ξεκινάνε προσθέτοντας σε όλα τα πηγάδια που χρησιμοποιούνται 40μl υπεροξειδάση του υδρογόνου. Προσθέσαμε την υπεροξειδάση του υδρογόνου όσο πιο γρήγορα γίνεται.
5. Το πλακίδιο καλύφθηκε με το κάλυμμα και επώαστηκε σε ένα αναδευτήρα για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα αφαιρέθηκε το κάλυμμα και διαβάστηκε η απορρόφηση στα 750 nm ή στα 450 nm χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακών.

Υπολογισμοί

1. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος της απορρόφησης κάθε προτύπου και δείγματος.
2. Σχεδιάστηκε η μέση απορρόφηση των προτύπων σε μια συνάρτηση της τελικής συγκέντρωσης Trolox (mM) όπως στον προηγούμενο πίνακα. Μία τυπική καμπύλη φαίνεται παρακάτω.



3. Υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική συγκέντρωση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας την εξίσωση που λαμβάνεται από τη γραμμική παλινδρόμηση της πρότυπης καμπύλης αντικαθιστώντας την εξίσωση με τις μέσες τιμές απορρόφησης για κάθε δείγμα

$$\text{Antioxidant (mM)} = \left[\frac{(\text{Sample average absorbance}) - (\text{y-intercept})}{\text{Slope}} \right] \times \text{Dilution}$$

6.5. Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές που θα δούμε παρακάτω στους πίνακες αντιστοιχούν στη διάμεσο (25^ο, 75^ο εκατοστιαία θέση) ή στο ποσοστό του δείγματος (%). Οι τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Για τον έλεγχο στατιστικής σημαντικότητας στις διαφορές των μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney U test για τις συνεχείς μεταβλητές και ο έλεγχος t-test σε περίπτωση μεταβλητών υπό κανονική κατανομή, ενώ για τις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Χ².

Για τις συσχετίσεις μεταξύ της GPx3 και της TAC με τις ομάδες τροφίμων χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman rho. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS Statistics 23 Licence Authorization Wizard. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το 5% (p<0.05).

Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα

7.1. Χαρακτηριστικά δείγματος

Στον Πίνακα 2 φαίνονται τα κλινικά και δημογραφικά στοιχεία των γυναικών που υποβλήθηκαν σε IVF ανάλογα με το πρωτόκολλο ωοθηκικής διέγερσης. Φαίνεται ότι οι γυναίκες που ακολούθησαν πρωτόκολλο διέγερσης με GnRH-αγωνιστή είχαν διάμεση ηλικία τα 37 έτη ενώ εκείνες που ακολούθησαν πρωτόκολλο με GnRH-ανταγωνιστή είχαν συγκριτικά μικρότερη ηλικία (35 έτη, $p<0.01$). Ο Δ.Μ.Σ. των γυναικών κυμαινόταν σε φυσιολογικές τιμές τόσο για τις γυναίκες που ακολούθησαν πρωτόκολλο διέγερσης με GnRH-αγωνιστή (22.3 kg/m^2) όσο και για εκείνες που ακολούθησαν πρωτόκολλο με GnRH-ανταγωνιστή (22.1 kg/m^2), με την πλειονότητα των γυναικών να είναι νορμοβαρείς. Όσο αφορά στη φυσική δραστηριότητα, οι γυναίκες που ήταν μέτρια δραστήριες κατά τη διάρκεια της ημέρας άγγιζαν το ποσοστό του 21% και 37% για αυτές με πρωτόκολλο με GnRH-αγωνιστή και GnRH-ανταγωνιστή, αντίστοιχα, ενώ στην πλειονότητά τους ήταν μη-καπνίστριες.

Σχετικά με τα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των γυναικών βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο αίτιο της υπογονιμότητας, το οποίο για τις γυναίκες που ακολουθούσαν πρωτόκολλο με GnRH-ανταγωνιστή ήταν ο αντρικός παράγοντας και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ($p<0.01$). Ακόμη, σε σχέση με τις γυναίκες που ακολούθησαν πρωτόκολλο διέγερσης με GnRH-αγωνιστή, οι γυναίκες που ακολούθησαν πρωτόκολλο διέγερσης με GnRH-ανταγωνιστή παρήγαγαν συνολικά περισσότερα ωάρια [12 (9-18) έναντι 7 (5-9)] και ωάρια καλής ποιότητας [8 (5-13) έναντι 6 (4-8)], καθώς και μεγαλύτερο αριθμό εμβρύων [7 (4-11) έναντι 5 (3-8)], όλες οι τιμές $p<0.01$. Πολύ σημαντικό επίσης είναι ότι οι γυναίκες με πρωτόκολλο ανταγωνιστή είχαν καλύτερες τελικές εκβάσεις συγκριτικά με εκείνες με πρωτόκολλο διέγερσης με GnRH-αγωνιστή. Το 57.4% είχε επιτυχή εμφύτευση (έναντι 31.3%, $p=0.02$), το 48.1% είχε κλινική εγκυμοσύνη (έναντι 25.0%, $p=0.03$), ενώ το 46.3% είχε τελικώς ζώσα γέννηση (έναντι 21.9, $p=0.02$).

Τέλος, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη δραστικότητα της GPx3 και την TAC στο ωοθηλακικό υγρό μεταξύ των γυναικών που ακολούθησαν πρωτόκολλο με GnRH-αγωνιστή ή με GnRH-ανταγωνιστή.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των γυναικών που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) με βάση το πρωτόκολλο ωοθηκικής διέγερσης.

	GnRH-αγωνιστής (n=32)	GnRH-ανταγωνιστής (n=54)	P-value
Γενικά χαρακτηριστικά			
Ηλικία (έτη)	37 (36-40)	35 (32-38)	<0.01
Επίπεδο εκπαίδευσης, n (%)			
Α΄/Β΄-βάθμια	12 (37.5)	12 (22.2)	0.16
Πτυχιούχος / Bachelor	17 (53.1)	30 (55.6)	
MSc / PhD / PostDoc	3 (9.4)	12 (22.2)	
Ετήσιο εισόδημα, n (%)			
<10.000 ευρώ/έτος	7 (21.9)	6 (11.1)	0.25
10-30.000 ευρώ/έτος	21 (65.6)	44 (81.5)	
>30.000 ευρώ/έτος	4 (12.5)	4 (7.4)	
Δ.Μ.Σ.	22.3 (21.2-24.1)	22.1 (20.7-24.0)	0.99
Νορμοβαρής (<25 kg/m ²), n (%)	27 (84.4)	45 (84.6)	0.89
Υπέρβαρη (≥25 - <30 kg/m ²), n (%)	5 (15.6)	9 (15.4)	
Περίμετρος μέσης (cm)	79 (72-83)	78 (72.2-81)	0.86
Φυσική δραστηριότητα (MET-min /εβδομάδα)	828.7 (506.2-1121.2)	896.0 (412.5-1054.5)	0.94
Αδρανής, n (%)	11 (34.4)	17 (31.5)	0.78
Μέτρια δραστηριότητα, n (%)	21 (65.6)	37 (68.5)	
Κάπνισμα (%)			
Ναι	3 (9.4)	13 (24.1)	0.41
Όχι	29 (90.6)	41 (75.9)	
State στρες (εύρος σκορ 20-80)	46.0 (32.2- 53.7)	44.5 (35.7-52.2)	0.80
Trait στρες (εύρος σκορ 20-80)	38.0 (33.2-46.7)	41.5 (33.0-50.0)	0.73
Ολική ενέργεια (kcal/ημέρα)	1820 (1594-2041)	1798 (1546-2010)	0.60
Υδατάνθρακες (%)	34.3 (31.5-36.8)	34.1 (31.6-40.4)	0.58
Πρωτεΐνη (%)	16.1 (14.8-18.7)	15.9 (15.1-18.7)	0.65
Λίπος (%)	48.2 (43.5-52.1)	47.6 (43.1-51.2)	0.69
Λήψη συμπληρωμάτων, n (%)			
Ναι	13(40.6)	30 (57.7)	0.31
Όχι	19(59.4)	22(42.3)	

Είδος συμπληρωμάτων, n (%)			
Πολυβιταμίνες	3 (9.4)	6 (11.1)	0.14
Φυλλικό οξύ	4 (12.5)	9 (16.7)	
Βιταμίνη C	3 (9.4)	8 (14.8)	
Σίδηρος	0	7 (13.0)	
Άλλο†	3 (9.4)	1 (1.9)	
Αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά και εκβάσεις της IVF			
Ιστορικό υπογονιμότητας στην οικογένεια, n (%)	13 (40.6)	11 (20.4)	0.04
Αίτιο υπογονιμότητας, n (%)			
Ανδρικός παράγοντας	8 (25.0)	30 (55.6)	<0.01
Γυναικείος παράγοντας	0	4 (7.4)	
Ανεξήγητη υπογονιμότητα	24 (75.0)	20 (37.0)	
PCOS, n (%)	0	14 (25.9)	<0.01
Φυσιολογικός έμμηνος κύκλος			
Ναι	23 (71.9)	36 (66.7)	0.61
Όχι	9 (28.1)	18 (33.3)	
Ωάρια, n	7 (5-9)	12 (9-18)	<0.01
Ωάρια-MII, n*	6 (4-8)	8 (5-13)	<0.01
Ρυθμός γονιμοποίησης (%)‡	80.9 (66.6 -97.7)	86.5 (61.5 -96.2)	0.61
Έμβρυα, n	5 (3-8)	7 (4-11)	<0.01
Έμβρυα καλής ποιότητας, n**	2 (1-4)	2 (1-4)	0.87
Επιτυχής εμφύτευση, n (%)	10 (31.3)	31 (57.4)	0.02
Κλινική εγκυμοσύνη, n (%)	8 (25.0)	26 (48.1)	0.03
Ζώσα γέννηση, n (%)	7 (21.9)	25 (46.3)	0.02
Δείκτες οξειδωτικού στρες στο ΩΥ			
GRx3 (U/L) ††	7.4 ± 2.8	7.2 ± 3.7	0.29
TAC (mMolTrolox)	0.33 ± 0.12	0.35 ± 0.08	0.29

Οι τιμές αντιστοιχούν στη διάμεσο (25^ο, 75^ο εκατοστιαία θέση) ή στο ποσοστό του δείγματος (%). Οι τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Για τον έλεγχο στατιστικής σημαντικότητας στις διαφορές των μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney U test για τις συνεχείς μεταβλητές και ο έλεγχος t-test σε περίπτωση μεταβλητών υπό κανονική κατανομή, ενώ για τις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Χ².

Συντμήσεις: Δ.Μ.Σ = δείκτης μάζας σώματος, PCOS = Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ΩΥ = Ωοθυλακικό υγρό, GRx3 = υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, TAC = ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

* Ωάρια στο στάδιο της μετάφασης-II = ωάρια καλής ποιότητας.

** Έμβρυα καλής ποιότητας = Έμβρυα ≥8 κυττάρων την 3^η ημέρα με σκορ μορφολογικής ποιότητας 1-2.

‡ Ρυθμός γονιμοποίησης: λόγος γονιμοποιημένων ωαρίων προς τον αριθμό των ωαρίων-MII.

† ω-3 λιπαρά οξέα, ασβέστιο, βιταμίνη D, ψευδάργυρο, φυτικές στερόλες.

†† Τιμές διορθωμένες ως προς τη συνολική περιεκτικότητα του ΩΥ σε πρωτεΐνη.

Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των γυναικών με βάση την έκβαση της IVF, και συγκεκριμένα, ανάλογα με το αν επετεύχθη ή όχι κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση. Πιο συγκεκριμένα σε 34 γυναίκες (39.5%) επιτεύχθηκε κλινική εγκυμοσύνη ενώ 32 γυναίκες είχαν ζώσα γέννηση (37.2%). Ο Δ.Μ.Σ. των γυναικών κυμαινόταν σε φυσιολογικές τιμές τόσο για τις γυναίκες που είχαν κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση (22.1 kg/m^2) όσο και για εκείνες που δεν είχαν (22.1 kg/m^2), με την πλειονότητα των γυναικών να είναι νορμοβαρείς. Σχετικά με τη φυσική δραστηριότητα το 67.6% των γυναικών που είχαν κλινική εγκυμοσύνη και το 65.6% που είχαν ζώσα γέννηση ασκούσαν μέτρια κατά τη διάρκεια της ημέρας και στην πλειονότητά τους ήταν μη-καπνίστριες.

Αυτό που παρατηρήθηκε ως προς τα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά των γυναικών είναι ότι οι γυναίκες που δεν είχαν κλινική εγκυμοσύνη είχαν και μεγαλύτερο ποσοστό ιστορικού υπογονιμότητας στην οικογένεια (38.5%) σε σχέση με εκείνες που πέτυχαν κλινική εγκυμοσύνη (11.8%), με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.01$). Οι γυναίκες με κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση είχαν υψηλότερες τιμές AMH (δείκτη αποθεμάτων ωαρίων), κάτι που φαίνεται και από τις διαφορές στον αριθμό ωαρίων που θα δούμε παρακάτω. Υπήρξε διαφορά στον αριθμό των ωαρίων [κλινική εγκυμοσύνη $n=12$ (9-16), ζώσα γέννηση $n=12$ (9-16)] και στην ποιότητα τους [κλινική εγκυμοσύνη, ωάρια M-II $n=8$ (6-12), ζώσα γέννηση, ωάρια M-II $n=8$ (6-12)] στις γυναίκες που πέτυχαν κλινική εγκυμοσύνη όσο και ζώσα γέννηση, όλες οι τιμές με $p < 0.05$.

Αναφορικά με τους δείκτες οξειδωτικού στρες στο ωοθυλακικό υγρό, παρατηρήθηκε μια τάση, χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντική, για χαμηλότερα συγκέντρωση της TAC στις γυναίκες στις οποίες δεν επετεύχθη κλινική εγκυμοσύνη συγκριτικά με εκείνες στις οποίες επετεύχθη (0.33 ± 0.1 έναντι $0.37 \pm 0.1 \text{ mMol Trolox}$, $p = 0.09$), χωρίς ωστόσο, να διαφέρει η TAC μεταξύ των γυναικών με ή χωρίς ζώσα γέννηση. Επιπλέον, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις γυναίκες με κλινική εγκυμοσύνη ή όχι στη δραστηριότητα της GPx3 στο ωοθυλακικό υγρό (7.3 ± 3.4 έναντι $7.3 \pm 2.9 \text{ U/L}$, $p = 0.99$).

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των γυναικών που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) με βάση την έκβαση της IVF.

	Κλινική εγκυμοσύνη			Ζώσα γέννηση		
	Ναι (n=34)	Όχι (n=52)	<i>P-value</i>	Ναι (n=32)	Όχι (n=54)	<i>P-value</i>
Γενικά χαρακτηριστικά						
Ηλικία (έτη)	35 (33-37)	37(33-39)	0.11	35 (33-37)	37 (33-39)	0.17
Επίπεδο εκπαίδευσης, n (%)						
Α΄/Β΄-βάθμια	12 (35.3)	12 (23.1)	0.45	11 (34.4)	13 (24.1)	0.47
Πτυχιούχος/ Bachelor	17 (50)	30 (57.7)		17 (53.1)	30 (55.6)	
MSc/ PhD / PostDoc	5 (14.7)	10 (19.2)		4 (12.5)	11 (20.4)	
Ετήσιο εισόδημα, n (%)						
<10.000 ευρώ/έτος	3 (8.8)	10 (19.2)	0.23	3 (9.4)	10 (18.5)	0.34
10-30.000 ευρώ/έτος	29 (85.3)	36 (69.2)		27 (84.4)	38 (70.4)	
>30.000 ευρώ/έτος	2 (5.9)	6 (11.5)		2 (6.3)	6 (11.1)	
Δ.Μ.Σ.	22.1 (20.3 – 24.8)	22.1 (21.3-23.7)	0.54	22.1 (20.5-24.6)	22.1 (21.3-23.9)	0.57
Νορμοβαρής (<25 kg/m ²), n (%)	27 (79.4)	45 (86.5)	0.38	26 (81.3)	46 (85.2)	0.63
Υπέρβαρη (≥25 - <30 kg/m ²), n (%)	7 (20.6)	7 (13.5)		6 (18.8)	8 (14.8)	
Περιφέρεια μέσης, cm	78.0 (72.0-84.0)	79 (73.7 -81.2)	0.69	78 (72-84)	79 (73-81)	0.81
Φυσική δραστηριότητα (MET-min /εβδομάδα)	893.0 (431.6-1078.7)	828.7 (454.8-1063.5)	0.89	858.0 (418.2-1014.7)	870.7(469.2-1136.1)	0.85
Αδρανής, n (%)	11 (32.4)	17 (32.7)	0.97	11 (34.4)	17 (31.5)	0.78
Μέτρια δραστηριότητα , n (%)	23 (67.6)	35 (67.3)		21 (65.6)	37 (68.5)	
Κάπνισμα (%)						
Ναι	6 (17.6)	10 (19.2)	0.72	6 (18.7)	10 (18.50)	0.92
Όχι	28 (82.4)	42 (80.8)		26 (81.3)	44 (81.5)	
State στρες (εύρος σκορ 20-80)	39.0 (33.2-51.3)	47.0 (36.0-54.0)	0.16	41.0 (34.0- 51.0)	47.0 (35.7-54.0)	0.34
Trait στρες (εύρος σκορ 20-80)	40.0 (33.2-46.7)	39.0 (33.2-50.3)	0.43	40.5 (33.2-46.7)	38.5 (33.0 -50.2)	0.65

Ολική ενέργεια (kcal/ημέρα)	1715 (1546-2016)	1815 (1623-2008)	0.44	1715 (1531-2002)	1815 (1618 -2014)	0.44
Υδατάνθρακες (%)	35.2 (31.9-40.4)	33.9 (31.4-36.8)	0.26	35.2 (32-40)	33.9 (31-36)	0.20
Πρωτεΐνη (%)	16.1 (14.7-18.5)	15.9 (15.1-18.2)	0.99	15.9 (14-18)	16 (15-18)	0.65
Λίπος (%)	47.2 (42.7-51.0)	48.0 (45.3-51.9)	0.25	47 (42-51)	48 (45-51)	0.26
Λήψη συμπληρωμάτων, n (%)						
Ναι	20 (58.8)	24(46.2)	0.25	20(62.5)	24(44.4)	0.10
Όχι	14(41.2)	28(53.8)		12(37.5)	30(55.6)	
Χρήση συμπληρωμάτων, n (%)						
Πολυβιταμίνες	5 (14.7)	4 (7.7)	0.76	5 (15.6)	4 (7.4)	0.58
Φυλλικό οξύ	4 (11.8)	9 (17.3)		4 (12.5)	9 (16.7)	
Βιταμίνη C	5 (14.7)	6 (11.5)		5 (15.6)	6 (11.1)	
Σίδηρος	4 (11.8)	3 (5.8)		4 (12.5)	3 (5.6)	
Άλλο†	2 (5.8)	2 (3.8)		2 (6.2)	2 (3.8)	
Αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά και ενδιάμεσες εκβάσεις της IVF						
Ιστορικό υπογονιμότητας στην οικογένεια, n (%)	4 (11.8)	30 (38.5)	<0.01	4 (12.5)	20 (37.0)	0.14
Φυσιολογικός έμμηνος κύκλος, n (%)	23 (67.6)	36 (69.2)	0.87	21 (65.6)	38 (70.4)	0.64
Αίτια υπογονιμότητας, n (%)			0.25			
Ανδρικός παράγοντας	16 (47.1)	22 (42.3)		15 (46.9)	23 (42.6)	0.28
Γυναικείος παράγοντας	0	4 (7.7)		0	4 (7.4)	
Ανεξήγητη υπογονιμότητα	18 (52.9)	26 (50.0)		17 (53.1)	27 (50.0)	
PCOS (%)	4 (11.8)	10 (19.2)	0.35	4 (12.5)	10 (18.5)	0.46
FSH-3 ^{ης} ημέρας (IU/l)	7.0 (5.1-8.2)	7.0 (5.2-8.2)	0.59	7.0 (5.1-8.2)	7.0 (5.0-8.4)	0.17
LH-3 ^{ης} ημέρας (IU/l)	5.9 (4.7-7.2)	5.0 (4.0-6.7)	0.09	5.8 (4.7-7.2)	5.0 (4.0-6.8)	0.51
Οιστραδιόλη-3 ^{ης} ημέρας (pmol/l)	133.0 (99.0-178.7)	118.3 (90.6-160.7)	0.38	134.5 (99.0-178.7)	118.3 (87.4-157.0)	0.11
AMH (ng/ml)	2.7 (1.4-5.3)	1.7 (1.1-3.2)	0.03	2.7 (1.4-5.3)	1.8 (1.1-3.3)	0.07

Ωάρια, n	12 (9-16)	9 (6-14)	0.01	12 (9 16)	9 (6-14)	0.02
Ωάρια-MII, n	8 (6-12)	6 (4-10)	0.01	8 (6-12)	6 (4-11)	0.02
Ρυθμός γονιμοποίησης (%) [‡]	86.5 (64.4-94.2)	81.6 (60.0-98.7)	0.28	86.5 (67.2-98.1)	81.6 (59.2-96.2)	0.23
Έμβρυα, n	7 (6-9)	5 (3-9)	0.02	7 (6-9)	5 (3-9)	0.02
Έμβρυα καλής ποιότητας, n**	3 (2-5)	1.5 (0-4)	0.04	3 (2-5)	1.5 (0-4)	0.02
Δείκτες οξειδωτικού στρες στο ΩΥ						
GPx3 (U/L) ^{††}	7.3 ± 2.9	7.3 ± 3.4	0.99	7.3 ± 2.7	7.4 ± 3.4	0.83
TAC (mMolTrolox)	0.37 ± 0.1	0.33 ± 0.1	0.09	0.36 ± 0.08	0.34 ± 0.11	0.36

Οι τιμές αντιστοιχούν στη διάμεσο (25°, 75° εκατοστιαία θέση) ή στο ποσοστό του δείγματος (%). Οι τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Για τον έλεγχο στατιστικής σημαντικότητας στις διαφορές των μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney U test για τις συνεχείς μεταβλητές και ο έλεγχος t-test σε περίπτωση μεταβλητών υπό κανονική κατανομή, ενώ για τις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Χ².

Συντμήσεις: Δ.Μ.Σ = δείκτης μάζας σώματος, PCOS = Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, FSH = ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη, LH = ωχρινοτρόπος ορμόνη, AMH = αντιμυλλέριος ορμόνη, ΩΥ = Ωοθυλακικό υγρό, GPx3 = υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, TAC = ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

* Ωάρια στο στάδιο της μετάφασης-II = ωάρια καλής ποιότητας.

** Έμβρυα καλής ποιότητας = Έμβρυα ≥8 κυττάρων την 3η ημέρα με σκορ μορφολογικής ποιότητας 1-2.

‡ Ρυθμός γονιμοποίησης: λόγος γονιμοποιημένων ωαρίων προς τον αριθμό των ωαρίων-MII.

† ω-3 λιπαρά οξέα, ασβέστιο, βιταμίνη D, ψευδάργυρο, φυτικές στερόλες.

†† Τιμές διορθωμένες ως προς τη συνολική περιεκτικότητα του ΩΥ σε πρωτεΐνη.

7.2. Συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης ομάδων τροφίμων με τη δραστικότητα της GPx3 και την TAC στο ωοθυλακικό υγρό.

Στον **Πίνακα 4** παρουσιάζονται οι συσχετίσεις διαφόρων ομάδων τροφίμων που καταναλώνονται καθημερινά με τη δραστικότητα της GPx3 και την TAC στο ωοθυλακικό υγρό, οι οποίες εκφράστηκαν με τον συντελεστή συσχέτισης Spearman rho. Όπως ήταν αναμενόμενο η GPx3 σχετίζεται θετικά και σημαντικά με την TAC ($\rho=0.68$, $p<0.01$). Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας της GPx3 και της κατανάλωσης γάλακτος και γιαουρτιού με πλήρη λιπαρά ($\rho= -0.24$, $p=0.03$), χωρίς ωστόσο να βρεθεί αντίστοιχη συσχέτιση με την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων με πλήρη λιπαρά. Ανάλογη τάση για αρνητική συσχέτιση με την κατανάλωση γάλακτος και γιαουρτιού με πλήρη λιπαρά παρατηρήθηκε και σε σχέση με την TAC, χωρίς ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό να είναι στατιστικώς σημαντικό ($\rho= -0.19$, $p=0.08$).

Πίνακας 4. Τιμές συντελεστή συσχέτισης Spearman (ρ) για τις συσχετίσεις ανάμεσα στην κατανάλωση ομάδων τροφίμων και τη δραστικότητα της GPx3 και την TAC στο ωοθυλακικό υγρό.

	GPx3 (U/L)* (n=85)		TAC (mMolTrolox) (n=79)	
Ομάδα Τροφίμων (μερίδες/ημέρα)	ρ	P-value	ρ	P-value
Δημητριακά, επεξεργασμένα	-0.04	0.70	-0.04	0.75
Δημητριακά, μη-επεξεργασμένα	0.12	0.27	0.13	0.26
Φρούτα	0.08	0.49	0.11	0.31
Λαχανικά	-0.04	0.68	0.02	0.87
Πατάτες	0.00	0.95	0.11	0.32
Γαλακτοκομικά, πλήρη σε λιπαρά	-0.03	0.78	-0.11	0.33
Γάλα/γιαούρτι, πλήρες	-0.24	0.03	-0.19	0.08
Γάλα/γιαούρτι, χαμηλό σε λιπαρά	0.04	0.57	0.03	0.75
Κρέας	0.07	0.50	0.00	0.96
Πουλερικά	0.10	0.36	0.01	0.92
Ψάρι	-0.04	0.66	-0.05	0.63
Ελαιόλαδο	-0.22	0.04	-0.17	0.13
Ξηροί Καρποί	0.13	0.24	0.03	0.79
Αλκοόλ	0.00	0.94	-0.03	0.79

GPx3 = υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, TAC = ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

* Τιμές διορθωμένες ως προς τη συνολική περιεκτικότητα του ωοθυλακικού υγρού σε πρωτεΐνη.

Επιπλέον, αντίθετα από ότι ίσως αναμενόταν, η κατανάλωση ελαιόλαδου βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά με τη δραστικότητα της GPx3 ($\rho = -0.22$, $p = 0.04$), ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με την TAC στατιστικώς σημαντική. Καμία συσχέτιση μεταξύ της GPx3 ή της TAC και της κατανάλωσης άλλων ομάδων τροφίμων δεν παρατηρήθηκε.

Κεφάλαιο 8. Συζήτηση- συμπεράσματα

Όπως είναι πλέον γνωστό, ο αυξανόμενος αριθμός υπογόνιμων ζευγαριών οδηγεί στην εφαρμογή τεχνητών τρόπων αναπαραγωγής με σκοπό τη μείωση της υπογονιμότητας. Ακόμη πολύ σημαντική είναι η γνώση και αντιμετώπιση των λόγων που οδηγούν στη δυσκολία απόκτησης ενός παιδιού, έτσι ώστε το πρόβλημα να αντιμετωπίζεται από τη ρίζα του πριν καν αναπτυχθεί. Αν κάποιος από τους παράγοντες που οδηγούν σε υπογονιμότητα μπορεί να τροποποιηθούν και να αντιμετωπιστούν, τότε ίσως τα ζευγάρια να μην χρειαστεί να καταφύγουν σε τεχνικές μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, οι οποίες είναι αρκετά ακριβές αλλά και ψυχοφθόρες.

Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η σχέση ανάμεσα σε αντιοξειδωτικούς δείκτες (GPx3 και TAC) σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού γυναικών που ακολουθούν θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης με διατροφικούς παράγοντες και με την έκβαση της IVF.

Μετά την στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, φάνηκε ότι οι γυναίκες που είχαν κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση παρήγαγαν περισσότερα και πιο ποιοτικά ωάρια καθώς επίσης και τα έμβρυα που προέκυψαν μετά την γονιμοποίηση ήταν περισσότερα σε αριθμό και καλύτερα σε ποιότητα σε σχέση με τις γυναίκες που δεν είχαν κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση. Βέβαια, πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση στις τελικές εκβάσεις της εξωσωματικής (κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση) με τα αντιοξειδωτικά επίπεδα (GPx3 και TAC). Όπως είδαμε και από μελέτη που έχει γίνει, το κάπνισμα είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες που μειώνουν την GPx (Paszkowski et al. 1995). Στο δείγμα όμως της μελέτης μας υπήρχε ένα πολύ μικρό ποσοστό γυναικών που κάπνιζε και ίσως αυτός ήταν ένας από τους λόγους που η GPx3 δεν διέφερε ως προς τις τελικές εκβάσεις. Αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματα σχετικά με την TAC. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε και εξέταζε τη συγκέντρωση της TAC ωοθυλακικό υγρό γυναικών που υποβάλλονταν σε IVF έδειξε αυξημένη την TAC στις γυναίκες που τελικά κατάφεραν να μείνουν έγκυες (Pasqualotto et al. 2004). Βέβαια, το ωοθυλακικό υγρό που αναλύθηκε ήταν

από όλα τα ωοθυλάκια που αναρροφήθηκαν εξαιρουμένων εκείνων που δεν περιείχαν καθόλου ωάριο, ενώ στη δική μας εργασία ήταν από το επικρατούν ωοθυλάκιο.

Ένας από τους πιο τροποποιήσιμους παράγοντες είναι η διατροφή. Η διατροφή μπορεί να διαμορφώσει ένα καλό ή κακό αντίστοιχα περιβάλλον για την ανάπτυξη ή όχι ελευθέρων ριζών. Μέσα από την βιβλιογραφία είδαμε ότι υπάρχουν πολλές μελέτες που αναφέρονται στην επίδραση των μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών στις εκβάσεις της εξωσωματικής. Όποτε, είναι δεδομένο ότι η διατροφή είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας στην ανθρώπινη αναπαραγωγή. Ακόμη, η μεσογειακή διατροφή, μια διατροφή πλούσια σε λαχανικά, φρούτα, ολικής αλέσεως τρόφιμα, οσπρίων, ξηρών καρπών και ελαιολάδου και χαμηλής περιεκτικότητας σε κόκκινα κρέατα φαίνεται να είναι η πιο ελπιδοφόρα και ευρέως αποδεκτή για τις θετικές συνέπειές της στην υγεία του ανθρώπου (García-Fernández et al. 2014). Συνάμα, η υψηλή προσκόλληση στη Μεσογειακή διατροφή σχετίζεται με αυξημένες πιθανότητες κλινικής εγκυμοσύνης και ζώσας γέννησης μετά από θεραπεία με IVF / ICSI σε μη παχύσαρκες γυναίκες <35 ετών (Karagiannis et al. 2018).

Στην παρούσα εργασία αυτό που μελετήθηκε ήταν η συσχέτιση αντιοξειδωτικών δεικτών (GPx3 και TAC) με διάφορα τρόφιμα. Μετά από τη στατιστική ανάλυση είδαμε πως κάποιες από τις πιο σημαντικές πηγές ενέργειας επηρεάζουν τη GPx3 και την TAC. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της διατροφικής λήψης γάλακτος και γιαουρτιού με πλήρη λιπαρά με τη δραστηριότητα της GPx3 η οποία συσχέτιση συνέχισε να είναι αρνητική όταν η κατηγορία γενικοποιήθηκε σε κατανάλωση γαλακτοκομικών πλήρους σε λιπαρά, χάνοντας βέβαια την στατιστική σημαντικότητά της. Την ίδια τάση είχε και η TAC χωρίς όμως στατιστικά σημαντική σχέση. Αυτό συνεπάγεται στο γεγονός ότι όσο πιο πολύ κατανάλωναν γιαούρτι και γάλα που ήταν πλήρη σε λιπαρά τόσο μειωνόταν η GPx3. Αυτό επαληθεύεται και στο βιβλίο της Dobbryn και των συνεργατών, η οποία λέει ότι η κατανάλωση απαραίτητων λιπαρών οξέων από τις φυτικές πηγές προάγει τη γονιμότητα και ρυθμίζει την ορμονική ισορροπία, ενώ τα λίπη που προέρχονται από ζωικές πηγές, καθώς και τα μαγειρεμένα λίπη επιδρούν αρνητικά στη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης, προκαλώντας υπερβολική αύξηση των οιστρογόνων (Dobbryn 2009).

Μη αναμενόμενη ήταν η αρνητική συσχέτιση που βρέθηκε στην κατανάλωση ελαιόλαδου με τη δραστηριότητα της GPx3. Μελέτες σχετικά με την επίδραση των ελαίων στα επίπεδα του

οξειδωτικού στρες δεν υπάρχουν πολλές, όπως επίσης δεν υπάρχουν μελέτες που να συσχετίζουν την κατανάλωση ελαιόλαδου με αντιοξειδωτικούς δείκτες μέσα στο ωοθυλακικό υγρό. Οπότε χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για την ασφαλή διεξαγωγή συμπερασμάτων.

Η συγκεκριμένη μελέτη έχει τόσο πλεονεκτήματα όσο και αδυναμίες. Ένα από τα πλεονεκτήματα είναι ο επαρκής αριθμός του δείγματος καθώς αναλύθηκαν 79 ωοθυλακικά υγρά για την TAC και 85 για την δραστικότητα της GPx3. Ακόμη, όλες οι γυναίκες προέρχονταν από την ίδια κλινική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΙΣ) και έτσι σε όλο το δείγμα εφαρμόστηκαν οι ίδιες διαδικασίες από το ίδιο προσωπικό. Οπότε με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η πιθανότητα σφάλματος από πιθανών ιατρικά λάθη και λανθασμένων χειρισμών.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για τη συγκέντρωση πληροφοριών σχετικά με τη διατροφή του δείγματος χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο FFQ, το οποίο είναι σταθμισμένο για τον ελληνικό πληθυσμό. Σημαντικό ακόμη είναι να αναφερθεί ότι όλες οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις πάρθηκαν από το προσωπικό και δεν ήταν καταγεγραμμένες από τις ίδιες τις γυναίκες, γεγονός που συνδέει τις μετρήσεις με την εγκυρότητα και την αξιοπιστία.

Από την άλλη μεριά όπως είπαμε η μελέτη είχε και μειονεκτήματα. Η μελέτη είναι συγχρονική και δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την αιτιολογική σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση ομάδων τροφίμων και τις εκβάσεις της εξωσωματικής, λόγω απουσίας χρονικής ακολουθίας κατά την οποία το αποτέλεσμα της εξωσωματικής έπεται της έκθεσης στον αιτιολογικό παράγοντα. Ακόμη, η συλλογή του ωοθυλακικού υγρού έγινε από το επικρατούν ωοθυλάκιο και όχι από όλα τα ωοθυλάκια που συλλέχτηκαν. Αυτό συνεπάγεται ότι ίσως οι αντιοξειδωτικοί δείκτες που μετρήθηκαν να μην αντικατοπτρίζουν την πραγματική αντιοξειδωτική ικανότητα στο σύνολο.

Εν κατακλείδι, η αντιοξειδωτική ικανότητα σε δείγματα ωοθυλακικού υγρού δεν σχετίζεται με το αν υπήρχε κλινική εγκυμοσύνη και ζώσα γέννηση ή όχι. Τέλος, φάνηκε ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνεται όσο αυξάνεται η κατανάλωση γάλακτος και γιαουρτιού με πλήρη λιπαρά, κάτι που χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, A., & Allamaneni, S. S. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive biomedicine online* 2004; **9**:338-347.
- Arnett, M. G., & Pierce, J. D. Why should you care about free radicals?. (2004)
- Balen, A., & Michelmores, K. What is polycystic ovary syndrome? Are national views important?. *Human reproduction* 2002; **17**: 2219-2227.
- Bedaiwy, M. A., Agarwal, A., Falcone, T., Goldberg, J. M., Arrigain, S., & Mascha, E. Relationship of the follicular fluid oxidative stress parameters and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 2005; **84**: S250-S251.
- Bountziouka, V., et al. "Development, repeatability and validity regarding energy and macronutrient intake of a semi-quantitative food frequency questionnaire: methodological considerations." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2012;**22**: 659-667.
- Burk, R. F., & Hill, K. E. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu. Rev. Nutr* 2005; **25**:215-235.
- Chavarro, J. E., Rich-Edwards, J. W., Rosner, B. A., & Willett, W. C. A prospective study of dietary carbohydrate quantity and quality in relation to risk of ovulatory infertility. *European journal of clinical nutrition* 2009; **63**: 78-86.
- Chavarro, J. E., Rich-Edwards, J. W., Rosner, B. A., & Willett, W. C. Protein intake and ovulatory infertility. *American journal of obstetrics and gynecology* 2008; **198**: 210-e1.
- Chavarro, J. E., Rich-Edwards, J. W., Rosner, B. A., & Willett, W. C. Dietary fatty acid intakes and the risk of ovulatory infertility. *The American journal of clinical nutrition* 2007; **85**: 231-237.
- Chavarro, J. E., Rich-Edwards, J. W., Rosner, B. A., & Willett, W. C. Iron intake and risk of ovulatory infertility. *Obstetrics & Gynecology* 2006; **108**: 1145-1152.
- Clark, L. C., Combs, G. F., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Krongrad, A. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. *Jama* 1996; **276**: 1957-1963.
- De Bruin, J. P., Dorland, M., Spek, E. R., Posthuma, G., Van Haaften, M., Looman, C. W. N., & Te Velde, E. R. Ultrastructure of the resting ovarian follicle pool in healthy young women. *Biology of reproduction* 200;**66**: 1151-1160.

- DeCherney A, Nathan L, Eskandari M, Cadieux M: Current Obstetric & Gynecologic Diagnosis & Treatment. McGraw Hill, New York 2003, **6**: 979-990
- Dennerly, P. A. Role of redox in fetal development and neonatal diseases. Antioxidants and Redox Signaling 2004; **6**: 147-153.
- De Lima, C. B., Cordeiro, F. B., Camargo, M., Zylbersztejn, D. S., Cedenho, A. P., Bertolla, R. P., & Lo Turco, E. G. Follicular fluid lipid peroxidation levels in women with endometriosis during controlled ovarian hyperstimulation. Human Fertility 2017; **20**: 48-54.
- Dobbryn S., Διατροφή και Γονιμότητα. Κάντε το χρόνο σύμμαχό σας., ed. M.E. Μαντζώρου. Πρώτη ελληνική έκδοση: Απρίλιος 2009, Αθήνα: Εκδόσεις Διόπτρα.
- Duckitt, K. Infertility and subfertility. Clinical evidence 2003; **9**: 2044-2073.
- Elsenbruch, S., Hahn, S., Kowalsky, D., Öffner, A. H., Schedlowski, M., Mann, K., & Janssen, O. E. Quality of life, psychosocial well-being, and sexual satisfaction in women with polycystic ovary syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2003; **88**: 5801-5807.
- Elizur, S. E., Lebovitz, O., Orvieto, R., Dor, J., & Zan-Bar, T. Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. Gynecological Endocrinology 2014; **30**: 705-707.
- Evers, J. L. Female subfertility. The Lancet 2002; **360**:151-159.
- Fainaru, O., Almog, B., Pinchuk, I., Kupferminc, M. J., Lichtenberg, D., & Many, A. Active labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology 2002; **109**: 938-941.
- Freedman, J. E., Frei, B., Welch, G. N., & Loscalzo, J. Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. Journal of Clinical Investigation 1995; **96**: 394.
- Freedman, J. E., Loscalzo, J., Benoit, S. E., Valeri, C. R., Barnard, M. R., & Michelson, A. D. Decreased platelet inhibition by nitric oxide in two brothers with a history of arterial thrombosis. Journal of Clinical Investigation 1996; **97**: 979.
- García-Fernández E, Rico-Cabanas L, Rosgaard N, Estruch R, Bach-Faig A. Mediterranean diet and cardiometabolic disease: a review. Nutrients 2014;6: 3474–3500.
- Gropper S., Jack I., Groff, J.L., Διατροφή και Μεταβολισμός. 2007: Επιστημονική Επιμέλεια: Συντώσης Λ., Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.

- Gupta, S., Agarwal, A., Banerjee, J., & Alvarez, J. G. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstetrical & gynecological survey* 2007; **62**: 335-347.
- Homburg, R. Polycystic ovary syndrome—from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy. *Human Reproduction* 1996; **11**: 29-39.
- Hoffmann, P. R., Höge, S. C., Li, P. A., Hoffmann, F. W., Hashimoto, A. C., & Berry, M. J. The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic acids research* 2007; **35**: 3963-3973.
- Imai, H., & Nakagawa, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2003; **34**: 145-169.
- Ishikawa, M. Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1993; **45**: 842-848.
- Jozwik, M., Wolczynski, S., Jozwik, M., & Szamatowicz, M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Molecular human reproduction* 1999; **5**: 409-413.
- Karayiannis, D., Kontogianni, M. D., Mendorou, C., Douka, L., Mastrominas, M., & Yiannakouris, N. Association between adherence to the Mediterranean diet and semen quality parameters in male partners of couples attempting fertility. *Human Reproduction* 2016; **32**: 215-222.
- Karayiannis, D., Kontogianni, M. D., Mendorou, C., Douka, L., Mastrominas, M., & Yiannakouris, N. Association between adherence to the Mediterranean diet and semen quality parameters in male partners of couples attempting fertility. *Human Reproduction* 20; **32**: 215-222.
- Karayiannis, D., Kontogianni, M. D., Mendorou, C., Mastrominas, M., & Yiannakouris, N. Adherence to the Mediterranean diet and IVF success rate among non-obese women attempting fertility. *Human Reproduction* 2018.
- Katsimigas, G, and Kaba, E. "The Ethical-Theological and Legal Aspects of in vitro Fertilization." *Nosileftiki* (2010).
- Kazemi, A., Ramezanzadeh, F., & Nasr-Esfahani, M. H. The relations between dietary antioxidant vitamins intake and oxidative stress in follicular fluid and ART outcomes. *Iranian journal of reproductive medicine* 2015; **13**: 533.

- Kenet, G., Freedman, J., Shenkman, B., Regina, E., Brok-Simoni, F., Holzman, F., Loscalzo, J. Plasma glutathione peroxidase deficiency and platelet insensitivity to nitric oxide in children with familial stroke. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1999; **19**: 2017-2023
- Kousta, E., White, D. M., Cela, E., McCarthy, M. I., & Franks, S. The prevalence of polycystic ovaries in women with infertility. *Human Reproduction* 1999; **14**: 2720-2723.
- Koyama, H., Omura, K., Ejima, A., Kasanuma, Y., Watanabe, C., & Satoh, H. Separation of selenium-containing proteins in human and mouse plasma using tandem high-performance liquid chromatography columns coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 1999; **267**: 84-91.
- Lee, Y. S., Kim, A. Y., Choi, J. W., Kim, M., Yasue, S., Son, H. J., ... & Kim, J. B. Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Molecular Endocrinology* 2008; **22**: 2176-2189.
- Lesny, P., Killick, S. R., Robinson, J., & Maguiness, S. D. Transcervical embryo transfer as a risk factor for ectopic pregnancy. *Fertility and sterility* 1999; **72**: 305-309.
- Lundholm, L., Putnik, M., Otsuki, M., Andersson, S., Ohlsson, C., Gustafsson, J. Å., & Dahlman-Wright, K. Effects of estrogen on gene expression profiles in mouse hypothalamus and white adipose tissue: target genes include glutathione peroxidase 3 and cell death-inducing DNA fragmentation factor, α -subunit-like effector A. *Journal of Endocrinology* 2008; **196**: 547-557.
- Luddi, A., Capaldo, A., Focarelli, R., Gori, M., Morgante, G., Piomboni, P., & De Leo, V. Antioxidants reduce oxidative stress in follicular fluid of aged women undergoing IVF. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2016; **14**: 57.
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine* 2012; **9**: e1001356.
- Myatt, L., & Cui, X. Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and cell biology* 2004; **122**: 369-382.
- Mocatta, T. J., Winterbourn, C. C., Inder, T. E., & Darlow, B. A. The effect of gestational age and labour on markers of lipid and protein oxidation in cord plasma. *Free radical research* 2004; **38**: 185-191.

- Michael J Gibney, Hester H Voster, Frans J Kok, Εισαγωγή στη διατροφή του ανθρώπου. 2007: Επιμέλεια: Αντωνία-Λήδα Ματάλα, Μαρία Γιαννακούλια, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού.
- Mumford, S. L., Zhang, C., Pollack, A. Z., Wactawski-Wende, J., Perkins, N. J., Schisterman, E. F., Chavarro, J. E. (2012). The Impact of Dietary Folate Intake on Reproductive Function in Premenopausal Women: A Prospective Cohort Study
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., & Nakagawa, Y. Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor. *Neurosignals* 2001; **10**: 81-92.
- Oyawoye, O., Abdel Gadir, A., Garner, A., Constantinovici, N., Perrett, C., & Hardiman, P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Human reproduction* 2003; **18**: 2270-2274.
- Oyawoye, O. A., Abdel-Gadir, A., Garner, A., Leonard, A. J., Perrett, C., & Hardiman, P. The interaction between follicular fluid total antioxidant capacity, infertility and early reproductive outcomes during in vitro fertilization. *Redox Report* 2009; **14**: 205-213.
- Onat, G., & Aba, Y. A. The Effects of a Healthy Lifestyle and of Anxiety Levels on IVF Outcomes. *African Journal of Reproductive Health* 2016; **19**: 92-101.
- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvaniti F, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev Med* 2007;44:335-340.
- Pasqualotto, E. B., Agarwal, A., Sharma, R. K., Izzo, V. M., Pinotti, J. A., Joshi, N. J., & Rose, B. I. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and sterility* 2004; **81**: 973-976.
- Pasqualotto, E. B., Agarwal, A., Sharma, R. K., Izzo, V. M., Pinotti, J. A., Joshi, N. J., & Rose, B. I. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and sterility* 2004; **81**: 973-976.
- Paszkowski, T., Traub, A. I., Robinson, S. Y., & McMaster, D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clinica Chimica Acta* 1995; **236**: 173-180.
- Paszkowski, T., & Clarke, R. N. Fertilization and early embryology: Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Human Reproduction* 1996; **11**: 2493-2495.

- Papathanasiou, G., Georgoudis, G. Papandreou, M., Spyropoulos, P. Georgakopoulos, D. Kalfakakou, V. , Evangelou, A. Reliability measures of the short International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) in Greek young adults. *Hellenic J Cardiol* 2009; **50**: 283-294.
- Pressman, E. K., Cavanaugh, J. L., Mingione, M., Norkus, E. P., & Woods, J. R. Effects of maternal antioxidant supplementation on maternal and fetal antioxidant levels: a randomized, double-blind study. *American journal of obstetrics and gynecology* 2003; **189**: 1720-1725.
- Prakash, A., Tuckerman, E., Laird, S., Ola, B., Li, T. C., & Ledger, W. L. A preliminary study comparing the endometrial expression of inhibin, activin and follistatin in women with a history of implantation failure after IVF treatment and a control group. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2008; **115**: 532-537.
- Rayman, M. P. The importance of selenium to human health. *The lancet* 2000; **356**: 233-241.
- Ruder, E. H., Hartman, T. J., Reindollar, R. H., & Goldman, M. B. Female dietary antioxidant intake and time to pregnancy among couples treated for unexplained infertility. *Fertility and sterility* 2014; **101**: 759-766.
- Szczepańska, M., Koźlik, J., Skrzypczak, J., & Mikołajczyk, M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertility and sterility* 2003; **79**: 1288-1293.
- Stein, I. F., & Leventhal, M. L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1935; **29**: 181-191.
- Suzuki, T., Sugino, N., Fukaya, T., Sugiyama, S., Uda, T., Takaya, R., Sasano, H. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertility and sterility* 1999; **72**: 720-726.
- Sugino, N., Takiguchi, S., Kashida, S., Karube, A., Nakamura, Y., & Kato, H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Molecular human reproduction* 2000; **6**: 19-25.
- Sharma, R. K., & Agarwal, A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. *Reproductive medicine and Biology* 2004, **3**: 177-199.
- Stein, I. F., & Leventhal, M. L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1935; **29**: 181-191.

- Sugino, N., Shimamura, K., Takiguchi, S., Tamura, H., Ono, M., Nakata, M., Kato, H. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Human Reproduction* 1996; **11**: 1073-1078.
- Sugino, N., Karube-Harada, A., Kashida, S., Takiguchi, S., & Kato, H. Reactive oxygen species stimulate prostaglandin F2 α production in human endometrial stromal cells in vitro. *Human reproduction* 2001; **16**: 1797-1801.
- SUGINO, N., KARUBE-HARADA, A., TAKETANI, T., SAKATA, A., & NAKAMURA, Y. Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F2 α production through nuclear factor- κ B activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. *Journal of Reproduction and Development* 2004; **50**: 215-225.
- Tsafiri, A., & Reich, R. Molecular aspects of mammalian ovulation. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 1999; **107**: 1-11.
- Tremellen, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human reproduction update* 2008; **14**: 243-258.
- Van Langendonckt, A., Casanas-Roux, F., & Donnez, J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertility and sterility* 2000, **77**: 861-870.
- Vega, M., Johnson, M. C., Díaz, H. A., Urrutia, L. R., Troncoso, J. L., & Devoto, L. Regulation of human luteal steroidogenesis in vitro by nitric oxide. *Endocrine* 1998; **8**: 185-191.
- Vega, M., Urrutia, L., Iniguez, G., Gabler, F., Devoto, L., & Johnson, M. C. Nitric oxide induces apoptosis in the human corpus luteum in vitro. *Molecular human reproduction* 2000; **6**: 681-687.
- Wall, P. D., Pressman, E. K., & Woods, J. R. Preterm premature rupture of the membranes and antioxidants: the free radical connection. *Journal of perinatal medicine* 2002; **30**: 447-457.
- Wathes, D. Claire, D. Robert E. Abayasekara, and R. John Aitken. "Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction." *Biology of reproduction* 2007;**77**: 190-201.
- Williams, M. H. (2003). Διατροφή: Υγεία. Ευρωστία και Αθλητική Απόδοση (2003) Ιατρικές Εκδόσεις: Πασχαλίδης.
- Yu, S. L., & Yap, C. Investigating the infertile couple. *Ann Acad Med Singapore* 2003; **32**: 611-14
- Yoshimura, S., Watanabe, K., Suemizu, H., Onozawa, T., Mizoguchi, J., Tsuda, K., Moriuchi, T. Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *The Journal of Biochemistry* 1991; **109**: 918-923.

- Younis, A., Clower, C., Nelsen, D., Butler, W., Carvalho, A., Hok, E., & Garelnabi, M. The relationship between pregnancy and oxidative stress markers on patients undergoing ovarian stimulations. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2012; **29**: 1083-1089.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., & Van der Poel, S. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Human reproduction* 2009; **24**: 2683-2687.
- Αρκουλή, 2005, Έρευνα για τη γονιμότητα, Εφημερίδα Ιατρικής Πληροφόρησης του Κέντρου Εξωσωματικής Γονιμοποίησης Πειραιά «ΜΙΤΩΣΗ, τεύχος 42, σελ. 1
- Δελτσίδου, Α . & Νάνου , Χ . (2011). Εγχειρίδιο Γυναικολογικής Νοσηλευτικής Φροντίδας. Αθήνα: Εκδόσεις Πασχαλίδη.
- Κατσίκης, Η., Ρούσσο, Δ., Πιούκα, Α., Αστεριάδης, Χ., Μούσλεχ, Τ., & Πανίδης, Δ. (2006). Ο ρόλος των ινομυωμάτων στη γονιμότητα.
- Λαϊνός, Τ. (2006). Ανθρώπινη Αναπαραγωγή και Εξωσωματική γονιμοποίηση. Α, Β τόμος, Οικογενειακή Ιατρική Εγκυκλοπαίδεια, εκδόσεις Μανιατέα, Αθήνα.
- Τσιριγώτης, Μ. (1999). Εμβρυομεταφορά στο στάδιο της βλαστοκύστης: πλεονεκτήματα, μειονεκτήματα και μελλοντικές προοπτικές