

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Maja Pešić

Utjecaj premedikacije midazolamom za postupak aspiracije jajnih stanica na razinu stresa tijekom medicinski pomognute oplodnje

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

Utjecaj premedikacije midazolamom za postupak aspiracije jajnih stanica na razinu stresa tijekom medicinski pomognute oplodnje

Maja Pešić

Disertacija je izrađena u: Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice, Vinogradska cesta 29, 10 000 Zagreb i Institutu Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10 000 Zagreb

Mentor: dr.sc. Ana Čipak Gašparović, viši znanstveni suradnik

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Neploidnost je jedan od sve većih problema današnjeg doba. Postupak aspiracije jajnih stanica dio je procesa umjetne oplodnje (IVF, eng. *in vitro* fertilisation). Postupak je stresan te smo ovim istraživanjem pokušali, modifikacijom anesteziološkog postupka uvođenjem midazolama u premedikaciji, utjecati na smanjenje stresa u ispitanica koje prolaze postupak i time povećati uspješnost postupka. Rad nije potvrdio pozitivan učinak midazolama na promatrane biokemijske parametre stresa, niti na pozitivan ishod postupka pomognute oplodnje. Antioksidacijska zaštita značajno se aktivirala u kontrolnoj grupi, što nije dobiveno za midazolamsku grupu te smatramo da je mogla doprinijeti većem broju trudnoća u kontrolnoj grupi. Analiza broja trudnoća pokazala je da ima više trudnoća u kontrolnoj nego u midazolamskoj grupi, no ova razlika nije statistički značajna. Stoga se ne može zaključiti da midazolam negativno utječe na rezultate IVF-a, ali se može reći da primjena midazolama ne djeluje pozitivno na ishod postupka.

Broj stranica: 87

Broj slika: 16

Broj tablica: 11

Broj literaturnih navoda: 144

Jezik izvornika: hrvatski jezik

Ključne riječi: neplodnost, medicinski pomognuta oplodnja, midazolam, oksidacijski stres, TOC, TAC, glutation, katalaza, interleukin 1 β

Datum obrane: 05. lipnja 2020.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Jerko Barbić
2. Izv. Prof. dr. sc. Krunoslav Kuna
3. Dr.sc. Lidija Milković, znanstveni suradnik

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Fields: Biology and Basic Medical Sciences

Influence of premedication with midazolam for aspiration procedure on stress level during IVF procedure

Maja Pešić

Thesis performed at: University Hospital Centre „Sestre milosrdnice“, Vinogradska cesta 29, 10 000 Zagreb and Ruđer Bošković Institute, Bljencička 54, 10 000 Zagreb

Supervisor/s: dr.sc. Ana Čipak Gašparović, senior research associate

Short abstract:

Nowadays, infertility is becoming one of the growing problems. The process of oocyte aspiration is part of the process of in vitro fertilisation (IVF). The procedure is stressful and this research aimed at modification of the anaesthesiological procedure by introducing midazolam in premedication to reduce stress in the subjects who undergo the procedure, thereby increasing the possibility of successful outcome of the procedure. The work did not confirm the positive effect of midazolam on the observed biochemical stress parameters, nor on the positive outcome of IVF. Antioxidant protection was significantly activated in the control group, which was not obtained for the midazolam group. It is possible that this may have contributed to a higher number of pregnancies in the control group, but difference in number of pregnancies between control and midazolam groups was not statistically significant. We cannot conclude that midazolam negatively affects IVF results, but we can say that the use of midazolam does not positively affect the outcome of IVF.

Number of pages: 87

Number of figures: 16

Number of tables: 11

Number of references: 144

Original in: Croatian

Key words: infertility, medically assisted fertilization, midazolam, oxidative stress, TOC, TAC, glutathione, catalysis, interleukin 1 β

Date of the thesis defense: 05. June 2020.

Reviewers:

1. Professor Jerko Barbić, PhD
2. Associate Professor Krunoslav Kuna, PhD
3. Lidija Milković, PhD, research associate

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvaljujem se svim osobama koje su mi pomogle u izradi doktorata. Prije svega mojoj mentorici doc.dr.sc. Ani Čipak Gašparović, višoj znanstvenoj suradnici, koja me je svojim znanjem i iskustvom vodila i pomagala mi na svakom koraku, a njene dobronamjerne sugestije i savjeti pridonijeli su da ovaj doktorat zasja u punom sjaju. Mojoj kolegici prim. Katarini Kličan-Jaić, specijalistici anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja, jer bez njenog optimizma i vjere, te spremnosti na pomoć u bilo kojem trenutku cijeli posao uzimanja uzoraka i sistematizacije podataka tekao bi puno sporije. Hvala i medicinskoj sestri Ana Brezović što je stvaranjem opuštene atmosfere na radnom mjestu olakšala proces uzimanja uzoraka te mi uvijek bila pri ruci oko tehničke izvedbe. Isto tako, neizmjeno zahvaljujem Tei Vuković i Tei Horvat na pomoći u izvođenju laboratorijskih testova. Ujedno se zahvaljujem roditeljima i suprugu na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tokom cijelog puta.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. IVF (<i>in vitro</i> Fertilization)	3
1.1.1. Oplodnja	3
1.1.2. Neplodnost	4
1.1.3. Hormoni i citokini povezani s plodnošću i trudnoćom	5
1.1.4. Postupak IVF-a	8
1.2. Intravenska anestezija	11
1.2.1 Postupak intravenske anestezije	11
1.2.2. Intravenski anestetici	11
1.2.3. Propofol	13
1.3. Premedikacija	15
1.3.1. Postupak premedikacije	15
1.3.2. Benzodiazepini	17
1.3.3. Midazolam	19
1.4. Oksidacijski stres	21
1.4.1. Reaktivne kisikove vrste	21
1.4.2. Antioksidacijski enzimi	22
1.4.3. Štetne posljedice ROS-a	23
1.4.4. Oksidacijski stres i njegova uloga u razvoju patologije	24
2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	25
2.1. Hipoteza istraživanja	26
2.2. Ciljevi istraživanja	27
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1. Prikupljanje uzoraka	29
3.2. Laboratorijske analize	30
3.2.1. Određivanje ukupne aktivnosti peroksida - TOC	30
3.2.2. Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta - TAC	30
3.2.3. Određivanje ukupnog glutationa	31
3.2.4. Određivanje katalaze	31
3.2.5. Određivanje interleukina 1 β	32
3.3. Utvrđivanje broja trudnoća	33

3.4 . Statistička obrada podataka	33
4. REZULTATI	34
4.1. Analiza ulaznih parametara pacijentica na početku liječenja neplodnosti	35
4.2. Određivanje ukupne aktivnosti peroksida (TOC)	38
4.3. Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC)	42
4.4. Određivanje ukupnog glutationa	45
4.5. Određivanje katalaze	47
4.6. Određivanje interleukina 1β	49
4.7. Završni rezultat IVF postupka	50
5. RASPRAVA	52
5.1. Utjecaj hormonskog statusa na plodnost	54
5.2. Utjecaj BMI-a na plodnost	56
5.3. Utjecaj midazolama na oksidacijske i antioksidacijske parametre u plazmi ispitanica	57
5.4. Utjecaj midazolama na status folikularne tekućine	59
5.5. Utjecaj midazolama prilikom postupka aspiracije jajnih stanica na uspješnost postupka medicinski pomognute oplodnje	60
6. ZAKLJUČCI	63
7. LITERATURA	65
8. SAŽETAK	80
9. SUMMARY	84
10. ŽIVOTOPIS	86
11. POPIS RADOVA	

1.UVOD

1. UVOD

Neplodnost je, prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, izostanak trudnoće nakon 12 ili više mjeseci redovitih nezaštićenih odnosa, bez medicinskih intervencija. Također, ona je jedan od značajnih medicinskih problema današnjice, o čemu svjedoči podatak da obuhvaća 9% do 15% svjetske populacije fertile dobi [1] dok je prevalencija neplodnosti na području Europe 25 milijuna ljudi [2]. Većina neplodnih parova potražiti će medicinski savjet i pomoć za rješavanje toga problema i odlučiti se za postupak medicinski potpomognute oplodnje koja, između ostalog, uključuje *in vitro* fertilizaciju (IVF) [2].

Tijekom IVF postupka ovariji se stimuliraju kombinacijom različitih lijekova na proizvodnju jajnih stanica (oocita). Postupak se izvodi pod kontrolom transvaginalnog ultrazvuka, pri čemu se jedna ili više oocita aspiriraju se iz sazrelog folikula (eng. TUGOR- transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval). Oocite se postupkom *in vitro*, oplođuju spermijem nakon čega slijedi vraćanje embrija u maternicu [3]. Razni biološki i reproduktivni čimbenici te životni stil utječu na uspješnost IVF postupka. Najčešći su majčina dob, uzrok neplodnosti, ranije trudnoće, uspješnost ranijih IVF postupaka, debljina, pušenje itd. [4,5].

Zadnjih desetak godina ulažu se veliki naponi u istraživanja povezanosti stresa i ishoda potpomognute oplodnje. Brojna istraživanja pokazuju da se parovi, koji se odlučuju na IVF postupak, suočavaju s velikom količinom psihološkog i emocionalnog stresa o čemu svjedoči i podatak da njih 30% odustane od postupka potpomognute oplodnje prije njezinog završetka upravo zbog psihološkog tereta kojem su izloženi [6]. Većina istraživanja pokazuje da stres ima negativan utjecaj na ishod potpomognute oplodnje. Međutim zbog prirodne kompleksnosti, točan patofiziološki mehanizam djelovanja još uvijek nije poznat [7–11] te se pretpostavlja da djeluje preko neuroendokrinog, imunološkog te autonomnog živčanog sustava.

To se očituje u inhibiranju prijenosa signala putem hipotalamus-pituitarna žlijezda-gonade (HPG) osi te hipotalamus-pituitarna žlijezda-adrenalna žlijezda (HPA) osi, što uzrokuje promjene prijenosa signala simpatičkog živčanog sustava mijenjajući serumsku koncentraciju adrenalina, noradrenalina, kortizola i drugih signalnih molekula [7,9,11,12]. Upravo zbog te kompleksnosti djelovanja stresa na organizam, nisu pronađeni specifični markeri stresa koji utječu na ishod potpomognute oplodnje.

Početni stres je uzrokovan dijagnozom i problemom neplodnosti s kojim se parovi suočavaju, ali isto tako i značajano doprinosi anksioznost od samog medicinskog postupka i intervencije. Često je više ciklusa IVF-a potrebno da rezultira trudnoćom, a stres je nakon svakog

ponovljenog ciklusa veći [6]. Različiti stadiji IVF postupka ne pridonose jednako stresnom stanju pacijentice. Stres je veći što se stresni događaj više bliži. Dokazano je da se neposredno prije TUGOR-a žene suočavaju s većom razinom stresa nego u ostalim stadijima [6,7]. Istraživanjima, koja su bila usmjerena na promijene stresnih hormona i drugih signalnih molekula, dokazana je povezanost niske razine noradrenalina i kortizola u vrijeme TUGOR-a s uspješnim ishodom oplodnje [7,13]. Isto tako, zabilježen je značajan porast stresnih molekula na dan obavljanja takvog zahvata [7,13]. To se može pripisati neizvjesnosti uspjeha postupka aspiracije, povezanog i s brojem dobivenih oocita (veći broj oocita daje veću šansu za uspješnost oplodnje), ali i samoj naravi postupka, koji je bolan, neugodan te se izvodi uz anesteziju. S obzirom na kratkoću postupka (10-20 min) odabire se intravenska sedacija pacijentice propofolom i kratkodjelujućim opioidom [14].

Trenutno nije uobičajeno pacijentice premedicirati anksioliticima neposredno prije TUGOR-a, iako istraživanja govore u prilog tome da premedikacija anksioliticima smanjuje razinu stresa i bolnost tijekom postupka [12,15]. Također je dokazano da je zabrinutost oko IVF procedure negativno povezana s brojem dobivenih oocita za oplodnju [6,7]. Premedikacija midazolamom, koji je jedan od najčešće korištenih benzodiazepina, dobar je izbor za kratkotrajne postupke dnevne kirurgije jer smanjuje stres i napetost ne uzrokujući ozbiljnije i teške poremećaje svijesti ukoliko se pravilno dozira [12,15].

1.1. IVF (*in vitro* Fertilisation)

1.1.1. Oplodnja

Oplodnja je sjedinjenje muške spolne stanice - spermija i ženske spolne stanice - jajne stanice, a prirodno se odvija u jajovodu. Spolne stanice imaju haploidan broj kromosoma. Spermij prodire kroz membranu jajne stanice. Iz glave spermija koji je ušao u jajnu stanicu oslobađa se predjezgra s haploidnim brojem kromosoma. Predjezgra se udružuje u jajnoj stanici s haploidnom predjezgom jajne stanice te nastaje prava jezgra oplođene stanice - zigote s potpunim brojem kromosoma ($2n = 46$). Slijedi niz mitotičkih dioba, koji prelazi iz dvostaničnog oblika u četverostanični oblik, pa dalje u rani zametak s 8,16, 32, 64,128 itd. stanica. Nakon otprilike 72 sata nastaje zametni mjehurić sastavljen od većeg broja stanica. Mjehurić se sastoji od vanjskog sloja stanica i unutarnje mase stanica - embrioblasta, iz kojih se intenzivnom

diobom razvija zametak čovjeka. Obložnim stanicama mjehurića rani zametak će se za 7 do 8 dana ugnijezditi u dobro prokrvljenu sluznicu maternice [1,4,16].

1.1.2.Neplodnost

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji neplodnost je "bolest reproduktivnog sustava definirana kao izostanak kliničke trudnoće nakon 12 ili više mjeseci redovnih nezaštićenih odnosa [1]. Oko 7% do 26% populacije pogođen je ovim problemom pri čemu tek oko 50% neplodnih parova zatraži liječničku pomoć, a oko 22% se podvrgava liječenju [1]. Uzrok neplodnosti može biti podjednako i kod muškarca i kod žene ili kod oba partnera. Postoji i idiopatska neplodnost, kada uzrok ostaje nepoznat.

Najčešći uzroci neplodnosti u muškarca su: smanjeni broj spermija, njihova slabija pokretljivost ili smanjeni broj spermija normalnog oblika, iako se u velikom broju slučajeva razlog smanjene plodnosti ne zna točan uzrok. Danas se uočava globalno smanjenje plodnosti u muškaraca [1,17]. Uzroci smanjenog broja spermija mogu biti: varikokela, kriptorhizam, manjak testosterona, infekcije, genetske bolesti, autoimune bolesti, kemoterapija, alkohol, pušenje, stres, starost, štetne kemikalije i drugo [1,17].

Uzroci ženski neplodnosti mogu se podijeliti u tri skupine: smanjena ili nepredvidiva ovulacija (zbog hormonalnih poremećaja, policističnih jajnika ili dobi), nemogućnost dolaska jajnih stanica ili spermija do maternice (neprohodni jajovodi, antitijela na spermije) ili smanjena mogućnost implantacije zametka (deformacije maternice, endometrioza ili imunološki problemi) [1]. Također, neplodnost može imati i više uzroka istovremeno. Uzrok neprohodnih jajovoda mogu biti infekcije (primjerice klamidijom), izvanmaternične trudnoće, endometrioza i drugi. Prevelike količine testosterona u žene smeta ovulaciji te uzrokuje sindrom policističnih jajnika (PCOS). Kod PCOS se zbog navedenog hormonalnog poremećaja stvara puno folikula, ali su jajne stanice često nezrele. Kod endometrioze stanice zida maternice rastu i van maternice – u jajovodima, na jajnicima i drugim mjestima trbušne šupljine. Zbog toga mogu izazvati ožiljke i upale u maternici što otežava implantaciju zametka. Za parove koji pristupaju pomognutoj oplodnji postoje dijagnostički protokoli kojima se utvrđuje uzrok neplodnosti te se tek nakon toga pristupa postupcima IVF-a. Uzroci neplodnosti 2007. godine u Italiji [16] parova koji su pristupili IVF-u:

- muški čimbenik 34,3%
- problemi s jajovodima 13,2%
- problemi s ovulacijom 5,2% (PCOS i ciste na jajnicima)

- endometrioza 6,0%
- smanjena rezerva jajnika 5,2%
- višestruki spontani pobačaji 0,6%
- višestruki ženski faktor 6,6%
- i ženski i muški faktor 16,3%
- neobjašnjena neplodnost 12,2%

1.1.3. Hormoni i citokini povezani s plodnošću i trudnoćom

U prosječnog zdravog para plodnost je žene niska i iznosi svega 25% prilikom odnosa tijekom ovulacije [1]. U žena starijih od 40 godina taj postotak je još manji i pada na oko svega 5%. U svih žena biokemijskim testom dokazana trudnoća (povišenje beta HCG-a) u oko 50% slučajeva završi daljnjim nerazvijanjem ploda [1]. Ukoliko se trudnoća nastavi dalje razvijati, šansa za rani spontani pobačaj (prije 12. tjedna trudnoće) je 10-15%. Nakon 12. tjedna trudnoće pobačaji su rijetki i trudnoća obično završava rađanjem djeteta u terminu. Kada sve to uzmemo u obzir, vjerojatnost rađanja djeteta prilikom spolnih odnosa po jednom menstruacijskom ciklusu iznosi niskih 10%. Kako se žena približava menopauzi, njena se zaliha jajnih stanica iz jajnika ubrzano troši. U mlađoj dobi obično u jednom ciklusu sazrije jedna jajna stanica, a iza 37-me godine života nerijetko dvije.

U ženskog novorođenčeta ima 300.000 do 400.000 prvotnih (primordijalnih) jajnih stanica, od kojih oko 90 posto nestaje te ih u vrijeme puberteta ima oko 30.000 [1]. U reproduktivnoj dobi žene prvotna je jajna stanica, tzv. primordijalni folikul, pod utjecajem hormona hipofize, folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). FSH hormon potiče rast folikula. Za potpuni rast i razvoj folikula, u vrijeme ovulacije, potrebno je i djelovanje LH hormona hipofize [7]. Oko 14. dana pravilna ciklusa, uzajamnim djelovanjem FSH i LH hormona, folikul koji se sada naziva Graafov folikul, prsne te se jajna stanica izlije u trbušnu šupljinu, a resice jajovoda prijanjaju jajniku, obuhvate jajnu stanicu. Ukoliko dođe do oplodnje, oplodjena jajna stanica sljedećih šest dana putuje jajovodom te se šestog do sedmog dana ugnijezdi u sluznicu maternice [3]. Graafov folikul, dalje pod utjecajem FSH i LH hormona, pretvara se u tzv. žuto tijelo (korpus luteum). Funkcija žutog tijela posebice je važna prvih šest do osam tjedana trudnoće. Nedovoljna funkcija žutog tijela može biti uzrokom spontanih pobačaja. Žuto tijelo proizvodi svoje hormone: gestagene, androgene i estrogene. Nakon osmog tjedna trudnoće funkciju žutog tijela preuzima posteljica.

Hormonski status žene ima veliki utjecaj na plodnost žene [7]. Najznačajniji hormoni u tom smislu su: FSH, LH, estradiol (E), prolaktin (PRL), antiMuller hormon (AMH), tireotropin (TSH), testosteron (T) i progesteron.

Ovi hormoni se rutinski određuju prije pristupanja žene IVF-u. Krv se za pretragu većine hormona vadi drugog do petog dana ciklusa, radi standardizacije. Za neke hormone (TSH i AMH) nije važno doba ciklusa. Progesteron se određuje 7 dana iza uobičajenog vremena ovulacije, odnosno 21. dana ako su ciklusi redovni.

FSH je mjera rezerve jajnika te njegove povišene vrijednosti upućuju na iscrpljenje jajnika. Vrijednosti već preko 10 IU/L povezuju se s otežanom sposobnošću zanošenja [7]. LH je ženski spolni hormon koji svojim naglim skokom izaziva ovulaciju. Ukoliko je LH povišen, a FSH normalan, vjerojatno je riječ o poremećaju u sklopu sindroma policističnih jajnika. Ukoliko su oba povišena, riječ je o preranom iscrpljenju jajnika. Estradiol je glavni ženski spolni hormon. Njegove niske vrijednosti uz povišen FSH dodatno potvrđuju dijagnozu preranog iscrpljenja jajnika.

AMH je prisutan i kod muškaraca i kod žena. Kod muškaraca ovaj hormon se stvara cijelog života u testisima. Kod žena, hormon proizvode stanice folikula jajnika nakon puberteta, jer se tek tada jajnici aktiviraju [18]. Sa starošću žene smanjuje se broj folikula, te samim time i koncentracija AMH. AMH je pouzdan marker za reproduktivni potencijal jajnika budući njegova koncentracije u krvi direktno ukazuje na broj jajnih folikula žene [19]. Vrijednosti AMH su pouzdane i ne zavise od tjelesne težine, načina života, upotrebe alkohola, itd.

Prolaktin je hormon koji stimulira proizvodnju mlijeka. Prolaktin je i stresni hormon i jako varira i u danu i u ciklusu, tako da jedna njegova povišena vrijednost ne znači dijagnozu. Međutim, kada je stalno povišen postoji hiperprolaktinemija koja može spriječiti trudnoću, a koja se uspješno liječi. TSH je hormon štitnjače. U žena su česti poremećaji rada štitnjače, a smatra se da već blago povišenje TSH, iznad 2.5 μ IU/mL, smeta zanošenju te da je potrebno snižavanje.

Testosteron je muški spolni hormon i njegove vrijednosti iznad referentnih za žene mogu biti znak sindroma policističnih jajnika ili ozbiljnijih stanja te svakako smanjuju plodnost [20]. Progesteron je hormon koji se stvara nakon ovulacije. Njegovim određivanjem utvrđuje se ovulira li žena. Progesteron u razvijenom Graafovom folikulu, 11. do 12. dana ciklusa, doseže visoke vrijednosti, a oko 21. dana ciklusa, doseže 10-20 puta više vrijednosti od onih u prvoj polovici ciklusa.

Osim hormona i brojni citokini utječu na plodnost. Poremećaji u imunološkom sustavu mogu dovesti do oštećenja u folikulogenezi jajnika, dugog i složenog procesa u kojem endokrini i

imunološki sustavi igraju značajne uloge [21–23]. Do danas najviše istražen je utjecaj ovih citokina: IL-1 β , IL-6, IL-18, IFN γ , IFN α , TNF α , IL-12, sAPO1/Fas, MIP1 α i MIP1 β .

IL-2 ima negativni utjecaj na plodnost, što pokazuju eksperimentalni radovi na animalnim modelima gdje je tretman s IL-2 alogravidnih miševa u ranoj trudnoći doveo do gubitka 89% do 100% plodova putem indukcije pobačaja ili resorpcije placenti i plodova [21].

Uloga IL-3 u imunoj reakciji, upalnoj kaskadi i začecu je potvrđena, ali za sada još nedovoljno precizno definirana. Prisustvo IL-3 je dokazano u ranom i kasnom placentarnom tkivu [21,22].

Razina IL-4 u perifernoj krvi zdravih trudnica progresivno se smanjuje tokom cijele trudnoće, što nije uobičajena pojava za citokine Th2 grupe. Trofoblast i sinciotrofoblast ekspimiraju receptore za IL-4 [22]. IL-4, IL-6 i IL-7 snažno stimuliraju trofoblastnu produkciju HCG [23] i na taj način potiču sintezu progesterona iz žutog tijela, s druge strane progesteron svojim direktnim uticajem na Th2 limfocite stimulira produkciju IL-4, IL-5, IL-6 i na taj način zatvara ciklus međusobne stimulacije produkcije progesterona i citokina Th2 grupe. Na taj način snažno se stimulira implantacija i održavanje zametka.

IL-6 je jedan od najaktivnijih citokina u trudnoći, on na neki način stvara balans između Th1 i Th2 inflamatornog odgovora i smatra se protektorom rane trudnoće [24]. Veliki broj decidualnih imunokompetentnih stanica proizvodi IL-6, a najviše Th2 limfociti. Citokini IL-1 β i TNF α potiču i može se reći na neki način kontroliraju sekreciju IL-6. U slučajevima akceleracije imunološkog odgovora tipa Th1 i povećanja sekrecije IL-1 β i TNF α , dolazi do posljedične stimulacije sekrecije IL-6, koji sa svoje strane suprimira aktivnost Th1 i favorizira aktivnost Th2 limfocita, što je za dalji tok trudnoće povoljnija varijanta. Kao vrlo snažan stimulator produkcije protutijela, koja u trudnoći mogu biti usmjerena protiv posteljinih tkiva i ne sasvim bezopasna, povećana sekrecija IL-6 bi mogla kompromitirati daljnju trudnoću, međutim dokazano je da su ta protutijela nekompletna i funkcionalno skoro neaktivna [24,25].

TNF α ima ulogu u mehanizmima pobačaja, resorpcije posteljice i embria [26]. Nepovoljan utjecaj TNF α na trudnoću se dovodi u vezu sa činjenicom da je TNF α naročito aktivan u pogledu aktivacije apoptotičkih mehanizama na proliferativnim tkivima, između ostalog i trofoblastnom tkivu. Svaka povećana aktivnost TNF α u trudnoći vodi prema teškom kompromitiranju gravidne imunoregulacije i dovodi u pitanje daljnju sudbinu trudnoće.

IL-1 β , zajedno sa IL-6 i IL-18 je ključni posrednik upale i posreduje mnoge putove imunološkog odgovora [24]. Dokazano je da IL-1 β sudjeluje u indukciji ovulacije olakšavanjem ruptura folikula [25]. Činjenica da su pronašli niže vrijednosti IL-1 β u slučaju neplodnosti ukazuje na to da je oštećenje folikula možda doprinijelo neplodnosti tih žena [26].

1.1.4. Postupak IVF-a

Prema temeljnoj definiciji *in vitro* oplodnja (IVF) je proces oplodnje gdje se jajašce spaja sa spermijem izvan tijela, *in vitro* ("u staklu"). Proces uključuje praćenje i poticanje ženskog ovulacijskog procesa, uklanjanje jednog ili više jajašaca iz ženinih jajnika i ostavljanje spermiju da ih oplodi u tekućini u laboratoriju. Nakon početnog dijeljenja, zigota (traje dva do šest dana) se implantira u ženinu maternicu s namjerom uspostavljanja uspješne trudnoće [27,28].

U postupak IVF-a je uključeno više osoba medicinskog tima. Ginekolog pod kontrolom UZV-a prvo vadi jajne stanice iz jajnika da bi ih nakon oplodnje u drugom aktu vratio u maternicu na implantaciju. Embriolog uzima jajne stanice izvađene iz jajnika i započinje proces IVF-a ili ih pohranjuje (zamrzava) ako ima više stanica. Anesteziolog uspavljuje kratkotrajnom intravenskom anestezijom ženu za postupak vađenja jajnih stanica iz jajnika. Postupak vađenja jajašaca izvodi se koristeći transvaginalnu tehniku koja se zove transvaginalno oocitno dohvaćanje (TVOR- eng. transvaginal oocyte retrieval) iglom koja probija vaginalni zid kako bi se dosegli jajnici. TUGOR (eng. transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval) jest postupak transvaginalnog oocitnog dohvaćanja jajnih stanica izvođen pod kontrolom ultrazvuka, što povećava uspješnost i smanjuje mogućnost nuspojava. Kroz iglu se aspiriraju folikuli i folikularna tekućina u sterilne epruvete. Dobiveni sadržaj prenosi se embriologu i on identificira jajne stanice. Postupak dohvaćanja obično traje između 20 i 40 minuta, ovisno o broju zrelih folikula i obično se radi pod svjesnom sedacijom ili i.v. anestezijom.

U laboratoriju se jajašca odvajaju od okolnih stanica i pripremaju za oplodnju. Izbor oocita može se provesti prije oplodnje kako bi se odabrala jajašca s optimalnim izgledima za uspješnu trudnoću. U međuvremenu, sjeme se priprema za oplodnju uklanjanjem neaktivnih stanica i sjemenske tekućine u procesu pod nazivom pranje sperme. Sperma i jajašce inkubiraju se zajedno u omjeru od oko 75000:1 kako bi došlo do oplodnje [17]. U pregledu iz 2013. godine rezultati su pokazali da je trajanje ove suinkubacije od oko jedan do četiri sata rezultiralo značajno višim stopama trudnoće od onih s trajanjem 16 do 24 sata [17]. U većini slučajeva, jajašce će biti oplođeno tijekom suinkubacije. U određenim situacijama, kao što su nizak broj spermija ili slaba pokretljivost spermija, jedan spermij može se injicirati izravno u jajašce pomoću intracitoplazmičke injekcije spermija (ICSI).

Oplođeno jaje prenosi se na poseban medij za rast i ostavlja tamo oko 48 sati dok se ne podijeli na šest do osam stanica. Trajanje embrionalne kulture je do faze morule, dva dana do četiri nakon suinkubacije, ili do faze blastociste, pet ili šest dana nakon suinkubacije [27].

Embrionalna kultura do faze blastociste daje značajan porast broja živih nataliteta po prijenosu embrija, ali daje smanjen broj embrija dostupnih za prijenos i embrionalnu krioprezervaciju, tako da su kumulativne kliničke stope trudnoće povećane s prijenosom u fazi morule [29]. Transfer drugog dana umjesto trećeg dana nakon oplodnje ne čini razliku u uspješnosti [29]. Postoje znatno veći izgledi za preuranjeno rođenje (omjer koeficijenata 1,3) i prirođene anomalije (omjer koeficijenata 1,3) kod poroda u onih trudnoća koje su započele transferom u fazi blastociste u odnosu na fazu morule [27].

Laboratoriji su razvili metode ocjenjivanja za određivanje kvalitete embrija. Kako bi se optimizirala uspješnost trudnoće, postoje značajni dokazi da je morfološki sustav bodovanja najbolja strategija za odabir embrija [30]. Od 2009. godine kada je za kliničku primjenu ušao prvi mikroskopski sustav bodovanja za IVF, morfokinetički sustav bodovanja je i dalje onaj koji poboljšava uspješnost ishoda trudnoće [28].

Sljedeći korak je embriotransfer [31]. Broj embrija koji treba prenijeti ovisi o dostupnom broju embrija, dobi žene i drugim zdravstvenim i dijagnostičkim čimbenicima. U zemljama kao što su Kanada, Velika Britanija, Australija i Novi Zeland, prenose se najviše dva embrija. U Velikoj Britaniji i prema propisima Higher Education Financing Agency (HFEA), žena iznad 40 može imati prenesena do tri embrija [32], dok u SAD-u ne postoji zakonska granica za broj embrija koji se mogu prenijeti, iako su medicinska udruženja dostavila smjernice za praksu. Većina klinika i regulatornih tijela zemlje nastoje smanjiti rizik od višestruke trudnoće koji se pojavljuje kod embriotransfera više embrija. Embriji se prenose u ženinu maternicu kroz tanki, plastični kateter, vaginalnim putem.

Da bi se povećala uspješnost postupka često se vrši i hiperstimulacija jajnika. Hiperstimulacija jajnika je stimulacija jajnika koja se provodi s ciljem indukcije razvoja višestrukih folikula jajnika. Prije stimulacije takvog tipa trebalo bi napraviti analizu kandidatkinja prema parametrima koji mogu utjecati na ishod postupka npr. dob, broj antralnih folikula i razinu anti-Muller hormona [33]. Predviđanje npr. lošijeg ili hiper-odgovora na hiperstimulaciju jajnika određuje protokol doziranja hormona tijekom hiperstimulacije jajnika [33]. Uz hiperstimulaciju jajnika također se koristi i supresija spontane ovulacije, za koju su dostupne dvije glavne metode: upotreba (obično duljeg) protokola agonista gonadotropin oslobađajućeg hormon (GnRH) ili (obično kraći) protokol antagonista GnRH [33]. U standardnom dugom protokolu GnRH agonista dan kada se počne liječenje hiperstimulacijom i očekivani dan kasnijeg dohvaćanja oocita može biti odabran kako bi bio u skladu s osobnim izborom, dok u protokolu o antagonistima GnRH-a moramo se prilagoditi spontanom nastupu prethodne menstruacije. S druge strane, protokol s antagonistima GnRH-a ima manji rizik od sindroma hiperstimulacije jajnika (eng. ovarian hyperstimulation syndrome - OHSS).

IVF metoda gdje se ne koriste nikakvi lijekovi za hiperstimulaciju jajnika je metoda začeća Louise Brown. Ova metoda se može uspješno koristiti kada žene žele izbjeći nuspojave povezane s hiperstimulacijom. HFEA je procijenila da je stopa rođenja žive djece približno 1,3% po IVF ciklusu bez hiperstimulacije za žene u dobi između 40 do 42 [34].

Blaga IVF stimulacija je metoda u kojoj se koristi mala doza ženskih hormona za stimulaciju jajnika tijekom ženinog prirodnog ciklusa sa željom da se dobije dva do sedam jajašaca i implantiraju zdravi embriji [34]. Ova metoda čini se smanjuje komplikacije i nuspojave kod žena te je usmjerena na kvalitetu, a ne na količinu jajašaca i embrija. Ispitivanje u kojem se uspoređivalo blago liječenje (blaga stimulacija jajnika s antagonistima GnRH-a u kombinaciji s prijenosom jednog embrija) i standardno liječenje (stimulacija s dugim protokolom GnRH agonista i prijenos dvaju embrija) došlo je do rezultata da su proporcije kumulativne trudnoće koje su rezultirale rađanjem nakon prve godine bile 43,4% s blagim liječenjem i 44,7% sa standardnim liječenjem [34]. Blagi IVF može biti jeftiniji od konvencionalnog IVF-a i znatno manjeg rizik od višestruke gestacije i OHSS [35].

Kada folikuli jajnika dosegnu određeni stupanj razvoja, provodi se indukcija konačnog sazrijevanja oocita, injekcijom ljudskog korionskog gonadotropina (eng. human chorionic gonadotropin - hCG), što je poznato kao "pucanj okidača" [36]. HCG djeluje kao analog luteinizirajućeg hormona, a ovulacija se javlja između 38 i 40 sati nakon jednokratne injekcije hCG-a [36]. Izvlačenje jajašaca izvodi se u vrijeme između 34 i 36 sati nakon hCG injekcije, to jest, neposredno prije očekivanog pucanja folikula. hCG injekcija povezana je s rizikom sindroma hiperstimulacije jajnika. Koristeći GnRH agonist umjesto hCG eliminira se većina rizika od OHSS-a, ali sa smanjenom stopom isporuke prijenosa svježih embrija [36]. Iz tog razloga, mnogi centri zamrzavaju sve jajne stanice ili embrije nakon korištenja GnRH.

1.2. Intravenska anestezija

1.2.1. Postupak intravenske anestezije

Izbor anestezije ovisi o vrsti operativnog zahvata koji će biti izveden. Za dugotrajne kirurške zahvate danas se najčešće koristi balansirana anestezija gdje se za uvod u anesteziju koriste intravenski anestetici, a za održavanje anestezije kombinacija inhalacijskih anestetika, opioida i miorelaksansa. U novije vrijeme može se koristiti i totalna intravenska anestezija kod duljih kirurških zahvata uz primjenu pumpi koje pomoću računalnih programa kontinuirano infundiraju intravenski anestetik prema izračunu na temelju mjerenja koncentracije lijeka u krvi, a sa ciljem održavanja željene koncentracije u mozgu.

Za kratkotrajne operativne postupke nižeg bolnog podražaja primjerena je kratkotrajna intravenska anestezija. Postupak podrazumijeva uvod i održavanje anestezije davanjem intravenskih lijekova na postavljen intravenski put. Lijekovi koji se primjenjuju su kombinacija intravenskog anestetika i opijatnog analgetika. Postupak je u vremenskom trajanju do pola sata. Tijek postupka obično ne zahtijeva korištenje endotrahealnog tubusa, već se bolesnik ventilira preko maske, smjesom plinova 100% kisika i zraka u omjeru 50:50. Za postupak bolesnik mora biti natašte kako bi se izbjegla jedna od najčešćih komplikacija anestezije, a to je povraćanje. Budući bolesnik nije intubiran na to se mora posebno obratiti pažnja.

Postupak intravenske anestezije za aspiraciju jajnih stanica provodi se kroz dnevnu bolnicu, što podrazumijeva odlazak kući isti dan. Međutim, potrebno je sprovesti nadzor stručnog medicinskog osoblja najmanje dva sata poslije anestezije i pratiti razvoj mogućih komplikacija (najčešće mučnina i povraćanje).

1.2.2. Intravenski anestetici

Intravenski anestetici su skupina lijekova koja se koristi u anesteziji s ciljem uvoda i održavanja opće anestezije. Zajedničko djelovanje svih intravenskih anestetika je depresija središnjeg živčanog sustava različitog stupnja. Razinu anestezije potrebnu za operativni zahvat intravenski anestetici postižu tek kod velikih doza, pri čemu je depresija središnjeg živčanog sustava tolikog stupnja da opasno ugrožava kardiovaskularni sustav (hipotenzija) i respiratorni

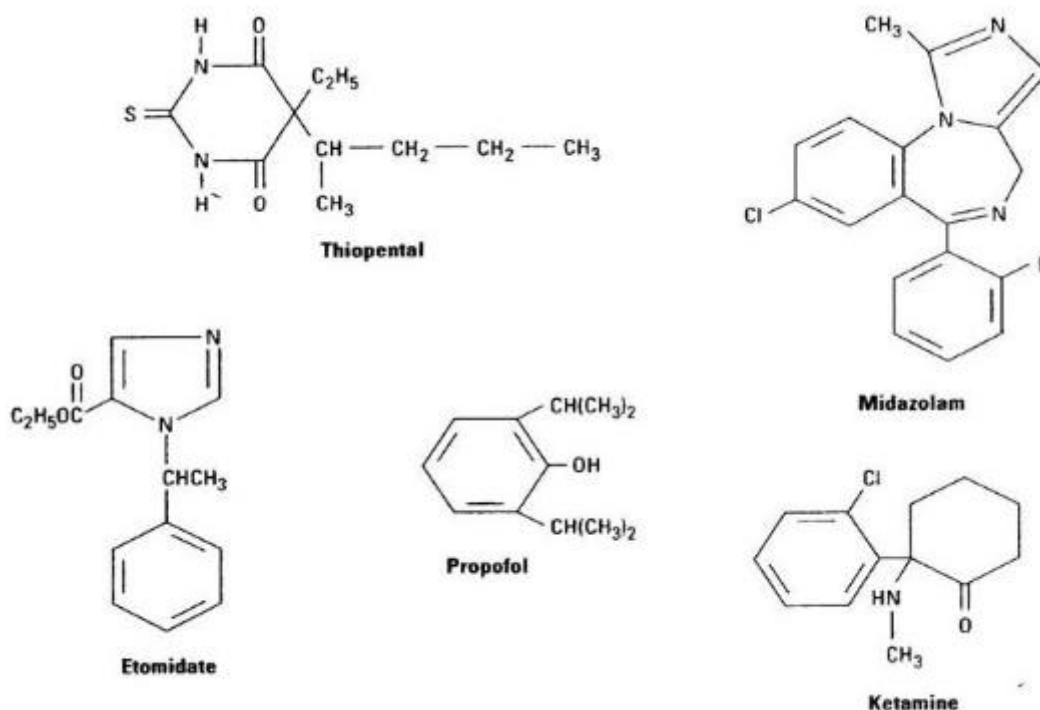
sustav (depresija disanja). Zato se intravenski anestetici u sklopu opće anestezije kombiniraju s drugim skupinama lijekova (opioidnim analgeticima, inhalacijskim anestheticima, miorelaksansima).

Kombinacija lijekova omogućuje davanje manje doze pojedinog lijeka za traženi učinak i time manje nuspojava svakog lijeka. Intravenske anestetike (slika 1.) možemo podijeliti prema kemijskoj strukturi: derivati barbituratne kiseline (tipenton), derivati imidazola (etomidat), derivati fenola (propofol), derivati fenilciklidina (ketamin), derivati benzodiazepina (midazolam), derivati steroida (altezin). Možemo ih podijeliti i prema brzini djelovanja: brzodjelujući i sporodjelujući. Brzodjelujući su: tiopental, etomidat, propofol, a sporodjelujući su: ketamin i midazolam.

Za brzinu i duljinu djelovanja intravenskih anestetika važna je njihova farmakokinetika. Farmakokinetika svakog lijeka sastoji se od nekoliko procesa: aplikacija, distribucija, razgradnja i eliminacija. Aplikacija intravenskih anestetika je, kao što i ime kazuje, intravenskim putem. Može biti jednokratna (bolus) aplikacija, višekratna aplikacija iste ili različite doze, kontinuirana aplikacija (infuzijom, TCI pumpe).

Distribucija intravenskih anestetika objašnjava se teorijom tri odjeljka: krv, tkiva koja su dobro prokrvljena i tkiva koja su slabije prokrvljena. Lijek, kao i svaka tvar, teži stanju dinamičke ravnoteže te teži postizanju jednake koncentracije u sva tri odjeljka. U startu, prilikom davanja bolus doze to nije odmah moguće. Koncentracija lijeka najveća je u krvi, zatim u tkivima koja su dobro prokrvljena pa tek onda u tkivima koja su slabo prokrvljena. Nakon toga dolazi do redistribucije lijeka prema stanju dinamičke ravnoteže gdje se smanjuje koncentracija lijeka u dobro prokrvljenim tkivima, a raste u slabije prokrvljenim. Budući mozak spada u dobro prokrvljena tkiva glavni razlog prestanka djelovanja intravenskog anestetika kod bolus doze je proces redistribucije. Koncentracija lijeka koja osigurava dovoljno duboku i sigurnu anesteziju naziva se ciljna koncentracija (engl. targeted concentration).

Intravenski anestetici razgrađuju se u jetri i na taj način eliminiraju iz krvotoka. Klirens je mjera brzine eliminacije anestetika. Klirens je volumen plazme iz kojeg se anestetik potpuno ukloni u jedinici vremena. Brzina eliminacije intravenskog anestetika je važan faktor prilikom korištenja perfuzora i kontinuirane aplikacije intravenskog anestetika kada smo već postigli stanje ravnoteže koncentracije lijeka u organizmu u sva tri odjeljka (eng. steady state). Tada je brzina infuzije direktno ovisna o klirensu. Danas postoje automatizirani sustavi infundiranja gdje se pomoću računalnog programa izračunava brzina infundiranja ovisno o izmjerenoj koncentraciji lijeka u krvi, a prema postavljenoj ciljnoj koncentraciji lijeka u mozgu (targeted concentration). Koriste se prilikom totalne intravenske anestezije.



Slika 1. Kemijska struktura intravenskih anestetika (Izvor: Ronald D. Miller, Millers Anesthesia, 4th Edition).

1.2.3. Propofol

Na receptorskoj razini propofol ima nekoliko mehanizama djelovanja [37]. Osnovni mehanizam djelovanja je potenciranje aktivnosti GABAA receptora (γ -aminomaslačna kiselina, GABA eng. γ -aminobutyric acid) i stoga djelujući kao "GABAA receptor" pozitivni modulator [38], čime se usporava vrijeme zatvaranja kanala. Pri visokim dozama, propofol može aktivirati GABAA receptor u odsutnosti GABA [39], te se ponaša kao agonist GABAA receptora [40]. Neka istraživanja su također predložila da endogeni kanabinoidni sustav može svojim jedinstvenim svojstvima znatno doprinijeti djelovanju propofola kao anestetika [41]. Istraživanje elektroencefalogramom (EEG) na pacijentima u općoj anesteziji propofolom pokazala su da propofol uzrokuje smanjenje kapaciteta za integraciju podataka u mozgu [42].

Propofol je velikim dijelom vezan za proteine plazme i metabolizira se konjugacijom u jetri [43]. Procjenjuje se da je poluvrijeme eliminacije propofola između 2 i 24 sata. Međutim, trajanje njegovog kliničkog učinka je mnogo kraće, jer se propofol brzo redistribuira u periferna tkiva

[43]. Sve navedeno čini ga lijekom brzog i kratkog djelovanja koji rezultira smanjenom razinom svijesti i nedostatkom pamćenja za događaje [37]. Koristi se za početak i održavanje opće anestezije, sedaciju mehanički ventiliranih bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja i kao proceduralna sedacija [37]. Njegova uporaba nije povezana s mučninom kao kod opioidnih lijekova. Zbog ovih karakteristika brzog nastupa i oporavka uz amnestijske učinke [44] došlo je do raširene uporabe lijeka za sedaciju i za anesteziju. Također se koristi za status epileptičkog napada ako drugi lijekovi nisu pomogli [45].

Maksimalni učinak traje oko dvije minute od primjene i obično traje pet do deset minuta [45]. Česte nuspojave uključuju nepravilan rad srca, nizak krvni tlak, osjećaj žarenja na mjestu injiciranja i zaustavljanje disanja [45]. Druge ozbiljne nuspojave mogu uključivati napadaje, infekcije u slučaju nepravilnog korištenja, ovisnost i propofol infuzija sindrom s dugoročnom uporabom [45].

Propofol nije lijek protiv bolova, stoga se uz njega za potrebu analgezije najčešće koriste opioidi. Propofol je za indukciju i održavanje opće anestezije uglavnom zamijenilo tiopental [46]. Kada se koristi za intravensku sedaciju, jednokratna doza propofola obično prestaje u roku od nekoliko minuta [47]. Može se primijeniti kao dio tehnike održavanja anestezije koja se naziva totalna intravenska anestezija pomoću ručno programiranih infuzijskih crpki ili računalnim infuzijskim crpkama u procesu koji se naziva ciljno kontrolirana infuzija ili TCI. Upotreba propofola za proceduralnu sedaciju rezultira bržim oporavkom u odnosu na midazolam [47]. Može se kombinirati s opioidima ili benzodiazepinima prilikom i.v. anestezije ili sedacije ukoliko je to zbog prirode medicinskog zahvata potrebno. Zbog brzog indukcije i oporavka, propofol je u širokoj primjeni za sedaciju dojenčadi i djece koja prolaze MRI [48]. Kod djece se često koristi u kombinaciji s ketaminom jer zajedno imaju manji rizik razvoja nuspojava [48].

Jedna od najučestalijih nuspojava propofola je bol prilikom aplikacije, posebno u manjim venama. Ova bol proizlazi iz aktivacije receptora boli, TRPA1 [45,49], koji se nalazi na osjetljivim živcima i može se ublažiti prije liječenja lidokainom. Kada se infuzijom ubrizgava sporije i koristi se deblja vena, bol je manje izražena. Dodatne nuspojave uključuju nizak krvni tlak koji je uzrokovan primarno vazodilatacijom. Propofol ima izraženije hemodinamičke učinke u odnosu na mnoge intravenske anestetike [49]. U izvješćima o padu krvnog tlaka od 30% ili više, smatra se da su barem djelomično uzrokovane inhibicijom živčanih aktivnosti [50]. Taj se učinak odnosi na dozu i brzinu primjene propofola, a može se potencirati opioidnim analgeticima [51]. Propofol također može uzrokovati smanjenu sistemska vaskularnu rezistenciju, smanjen protok krvi kroz miokard i smanjenu potrošnju kisika miokarda, putem izravne vazodilatacije [52].

Kao respiratorni depresiv, propofol često uzrokuje apneju. Pojavnost apneja može ovisiti o čimbenicima kao što su premedikacija, primijenjena doza, i brzina primjene i ponekad može trajati duže od 60 sekundi [53]. Propofol smanjuje respiratornu frekvenciju i samim time i minutni volumen disanja. Smanjenje moždanog protoka krvi, smanjenje cerebralne potrošnje kisika, i pad intrakranijalnog tlak su karakteristike utjecaja propofola na centralni živčani sustav (CNS, eng. central nervous system) [54].

Ozbiljnija, ali rijetka nuspojava je distonija [55]. Blagi mioklonički pokreti su česti, kao i kod drugih intravenskih anestetika. Primijećeno je da pogoršava kvalitetu spavanja u nekih bolesnika [56,57].

Propofol je otkriven 1977. godine i odobren za uporabu u Sjedinjenim Američkim Državama 1989. godine te je na popisu osnovnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije, najučinkovitijih i sigurnih lijekova potrebnih u zdravstvenom sustavu. Dostupan je kao generički lijek. Kao i kod bilo kojeg drugog intravenskog anestetika, propofol treba primijeniti samo ako su dostupni primjereno obučeno osoblje i aparati za praćenje vitalnih funkcija, kao i mogućnost pravilnog upravljanja dišnim putem, opskrba dodatnim kisikom i umjetna ventilacija [46].

1.3. Premedikacija

1.3.1. Postupak premedikacije

Prije primjene općeg anestetika, anesteziolog može primijeniti jedan ili više lijekova koji nadopunjuju ili poboljšavaju kvalitetu ili sigurnost anestezije i operativnog postupka u cjelini. Najčešće su to lijekovi kojima je svrha anksioliza i sedacija, međutim postoje i mnogi drugi razlozi za administraciju lijekova u premedikaciji (antiemetici, tromboprofilaksa, antihistaminici i potrebna kronična terapija).

Kao lijek za premedikaciju najčešće se koristi midazolam, benzodiazepin kojeg karakterizira brz početak djelovanja i kratko trajanje, učinkovit je u smanjenju preoperativne anksioznosti,

uključujući anksioznost odvajanja djece od roditelja [58]. U premedikaciji se može koristiti i klonidin, alfa-2 adrenergički agonist [59].

Premedikacija klonidinom smanjuje potrebu za indukcijskim lijekovima, lijekovima za održavanje opće anestezije i potrebu za postoperativnim analgeticima [59,60]. Također smanjuje postoperativno drhtanje, postoperativnu mučninu i povraćanje te mogućnost nastanka delirija. Međutim, kod oralne primjene klonidina može proći i do 45 minuta prije postizanja punog učinka, a ima i svoje nedostatke koji uključuju hipotenziju i bradikardiju [61].

Melatonin je utvrđeno učinkovit kao anestetik premedikacije u odraslih i djece zbog svojih hipnotičkih, anksiolitskih, sedativnih, antinociceptivnih, i antikonvulzivnih svojstava [62]. Za razliku od midazolama, melatonin ne narušava psihomoriku te na taj način ne ometa oporavak. Oporavak je brži nakon premedikacije s melatoninom nego midazolamom, a tu je i smanjena incidencija post-operativne agitacije i delirija [63]. Melatoninska premedikacija također smanjuje potrebnu indukcijsku dozu propofola ili tiopental [63].

Još jedan primjer premedikacije je preoperativna primjena beta adrenergičkih antagonista kako bi se smanjila incidencija postoperativne hipertenzije, srčane disaritmije ili infarkta miokarda. Anesteziolozi mogu primijeniti i antiemetik kao što su ondansetron, droperidol ili deksametazon u premedikaciji kako bi se spriječila postoperativna mučnina i povraćanje.

Također se primjenjuje i subkutani heparin u premedikaciji kako bi se smanjila incidencija duboke venske tromboze. Drugi premedikacijski lijekovi uključuju opioide kao što su fentanil ili sufentanil, gastrokinetički lijekovi kao što su metoklopramid i antagonisti histamina kao što je Sinopen.

Nefarmakološke premedikacijske intervencije uključuju slušanje opuštajuće glazbe i smanjenje razine ambijentalnog osvjetljenja i buke kako bi se održao ciklus sna i budnosti [64]. Te su tehnike posebno korisne za djecu i bolesnike s intelektualnim teškoćama, odnosno za one koji slabije razumiju što će im se zapravo raditi. Minimiziranje senzorske stimulacije ili distrakcija putem video igara može pomoći u smanjenju tjeskobe prije kretanja u operacijsku salu. Veće visoko kvalitete studije su potrebne za potvrdu najučinkovitijih nefarmakoloških pristupa za smanjenje tjeskobe [60].

1.3.2. Benzodiazepini

Benzodiazepini su razvijeni kao skupina lijekova čija je jezgra po kemijskoj strukturi fuzija benzenovog prstena i diazepin prstena. Benzodiazepini, smanjuju podražljivost neurona preko povećanja učinkovitosti moždanog neurotransmitera GABA-e [65]. Time dolazi do smanjenja komunikacije između neurona i stoga imaju smirujući učinak na mnoge funkcije mozga. GABA kontrolira podražljivost neurona vezivanjem na GABAA receptor [65].

GABAA receptor je proteinski kompleks koji se nalazi u sinapsi neurona. GABAA receptori su ionski kanali koji provode kloridne ione u neuron. GABAA receptor ima dva vezna mjesta za neurotransmiter GABA. Ovaj receptorski kompleks sadrži jedno vezno mjesto za benzodiazepine. Vežanje benzodiazepina na ovaj receptorski kompleks ne mijenja vežanje GABA-e [65].

Za razliku od drugih pozitivnih alosteričkih modulatora koji povećavaju vežanje liganda, benzodiazepinski djeluje kao pozitivan alosterički modulator povećanjem ukupne provodljivosti kloridnih iona u neuron kada je GABA već vezana za svoj receptor. Ovaj povećani priljev kloridnih iona hiperpolarizira membranski potencijal neurona. Kao rezultat toga, razlika između potencijala odmora i potencijala praga je povećana čime je okidanje impulsa u neuronu je manje vjerojatno. Različite podvrste GABAA receptora imaju različite distribucije unutar različitih područja mozga i stoga kontroliraju zasebne krugove neurona. Različita aktivacija podtipova GABAA receptora od strane benzodiazepina može rezultirati različitim farmakološkim djelovanjem [65,66].

Podtip GABAA receptora koji veže benzodiazepine naziva se benzodiazepinski receptor. GABAA receptor je heteromer sastavljen od pet podjedinica, najčešći su dva alfa, dva beta, i jedan gama ($\alpha_2\beta_2\gamma_1$). Za svaku podjedinicu postoje mnoge podvrste ($\alpha_1 - 6$, $\beta_1 - 3$ i $\gamma_1 - 3$). GABAA receptori koji se sastoje od različitih kombinacija podjedinica imaju različita svojstva, različite distribucije u mozgu i različite aktivnosti u odnosu na farmakološke i kliničke učinke [67].

Benzodiazepini vežu se na α podjedinicu na GABAA receptoru. Vežanje također zahtijeva da alfa podjedinice sadrže aminokiselinu histidin na veznom mjestu (to su: α_1 , α_2 , α_3 i α_5 podjedinice GABAA receptora). Benzodiazepini ne pokazuju afinitet za GABAA receptore α_4 i α_6 gdje je histidin zamijenjen argininom [67]. Nakon što se veže na benzodiazepinski receptor, benzodiazepinski ligand zadržava benzodiazepinski receptor u konformaciji u kojoj ima veći afinitet za neurotransmiter GABA. To povećava učestalost otvaranja kloridnog ionskog kanala i posljedično hiperpolarizira membranu neurona. Ligandi s visokom afinitetom za α_1

podjedinicu povezani su sa snažnijim hipnotičkim učincima, dok oni s višim afinitetom za $\alpha 2$ i/ili $\alpha 3$ podjedinicu imaju veću anksiolitičku aktivnost [67,68].

U smislu krajnjeg učinka benzodiazepina, sličnosti ove porodice lijekova su prevelike da bi ih odvojili u pojedinačne kategorije kao što su izolirano anksiolitici ili hipnotici. Na primjer, benzodiazepinski lijek koji se primarno koristi kao hipnotik primijenjen u niskim dozama djeluje anksiolitički, dok onaj koji se koristi kao anksiolitik pri višim dozama izaziva san [66].

Benzodiazepini djeluju i na periferne benzodiazepinske receptore. Periferni benzodiazepinski receptori su prisutni u tkivu perifernog živčanog sustava, na glija stanicama, u imunološkim stanicama u gastrointestinalnom traktu te u manjoj mjeri u središnjem živčanom sustavu [69]. Periferni receptori nisu strukturno povezani ili spojeni na GABAA receptor. Oni moduliraju imunološki sustav i uključeni su u odgovor tijela na ozljede [70]. Benzodiazepini funkcioniraju i kao slabi inhibitori ponovne pohrane adenozina što se smatra odgovornim za neke od njihovih antikonvulzivnih, anksiolitičkih i mišićno relaksirajućih učinaka [70].

Učinak benzodiazepina na GABAA receptor u kliničkom smislu rezultira sedacijom, hipnozom, anksiolizom, antikonvulzivnim učinkom, i mišićnom relaksacijom. Visoke doze mnogih kraće-djelujućih benzodiazepina također mogu uzrokovati anterogradnu amneziju i disocijaciju. Ta svojstva čine benzodiazepine korisnim u liječenju tjeskobe, nesanice, agitacije, napadaja panike, konvulzija, grčeva mišića, simptoma predoziranja alkoholom te kao lijek za premedikaciju za medicinske ili stomatološke zahvate [71]. Benzodiazepini, kao skupina lijekova u današnjoj kliničkoj praksi, smatraju se sigurnim i učinkovitim za kratkoročno korištenje, iako se kognitivno oštećenje i paradoksalni efekti kao što su agresija ili gubljenje inhibicija u ponašanju povremeno javljaju. Manjina ljudi može imati paradoksalne reakcije kao što su pogoršana agitacija ili panika [72].

Dugotrajna uporaba je kontroverzna zbog zabrinutosti o smanjenju učinkovitosti, razvoju fizičke ovisnosti, sindroma sustezanja i povećanog rizika od demencije [73–75]. Prema Nacionalnom Institutu za zdravlje i kliničku izvrsnost, Velika Britanija, benzodiazepini se mogu koristiti, ako je potrebno, u neposrednom upravljanju generaliziranim anksioznim poremećajem. Međutim, ne smiju se davati dulje od dva do četiri tjedna. Benzodiazepini su također povezani s povećanim rizikom od samoubojstva [76]. Potreban je oprez kada se benzodiazepini koriste u osoba s poremećajima osobnosti ili intelektualnim teškoćama zbog čestih paradoksalnih reakcija agitacije [77]. Pojedinci s anamnezom ovisnosti o alkoholu, opioidima i barbituratima ne smiju koristiti benzodiazepine, jer postoji rizik od situacija opasnih po život u slučaju interakcije sa sredstvom ovisnosti [77]. Zbog njihovog učinka na mišićnu relaksaciju, benzodiazepini mogu uzrokovati respiratornu depresiju kod osjetljivih pojedinaca.

Iz tog razloga, oni su kontraindicirani kod ljudi s miastenijom gravis, opstruktivnom apnjeom u snu, bronhitisom i kroničnom opstruktivnom plućnom bolešću [77,78].

Postoje kontroverze u vezi sa sigurnošću benzodiazepina u trudnoći. Iako nisu veliki teratogeni, ostaje nesigurnost u vezi s tim uzrokuju li oni rascjep nepca u malom broju beba [79]. Poznato je da uzrokuju simptome odvikavanja u novorođenčadi. Većina se primjenjuje oralno, međutim, oni se također mogu dati intravenski, intramuskularno ili rektalno [80]. U bolničkom okruženju, intravenski klonazepam, lorazepam i diazepam su prvi red izbora. U vanbolničkim uvjetima, intravenska primjena nije praktična i tada se koristi rektalni diazepam ili bukalni midazolam, a preferira se midazolam jer je njegova administracija jednostavnija [81].

Benzodiazepini su podijeljeni na one koji djeluju dugo, one koji djeluju srednje dugo i one s kratkim djelovanjem. Kratkodjelujući spojevi imaju poluvijek od 1 – 12 sati. Primjeri su brotizolam, midazolam i triazolam. Srednje dugo-djelujući spojevi imaju poluvijek od 12 – 40 sati. Primjeri su alprazolam, estazolam, flunitrazepam, klonazepam, lormetazepam, lorazepam, nitrazepam i temazepam. Dugodjelujući imaju poluvijek od 40 – 250 sati. Oni imaju rizik od nakupljanja u starijih osoba i osoba s teško oštećenom funkcijom jetre. Primjeri su diazepam, clorazepat.

Prvi benzodiazepin, klordiazepoxide (Librium), otkriven je slučajno. Otkrio ga je Leo Sternbach 1955. godine. Kao lijek stavljen je na raspolaganje 1960. godine od strane Hoffmann – La Roche. Sljedeći se počeo koristiti benzodiazepinski lijek diazepam (Valium) 1963. godine [82]. U 1977. godini benzodiazepini su bili globalno najviše propisivani lijekovi [82].

1.3.3. Midazolam

Midazolam je 8-klor-6(2-fluorofenil-1-metil)-imidazo-benzodiazepin [83]. Mjesto djelovanja je modulacija sinaptičkog prijenosa impulsa vezanjem na GABAA receptor. Uzrokuje anksiolizu, te ima hipnotički i antikonvulzivni učinak. Midazolam spada u prave agoniste.

Farmakokinetika midazolama razlikuje se ovisno o načinu primjene [84]. Nakon brze intravenske injekcije koncentracija u plazmi vraća se unutar 15 min na 15% do 20% od početne vrijednosti, dok nakon dva sata pada na 5%. Metabolizira se u jetri pri čemu nastaje aktivni metabolit hidroksi-midazolam [84]. Nakon intramuskularne injekcije midazolam se resorbira za deset minuta [85]. Nakon peroralne primjene učinak započinje nakon 20 minuta, a za 30 do 45 minuta doseže maksimalan sedacijski učinak [86].

Učinci midazolama prisutni su na svim glavnim organskim sustavima. U CNS-u smanjuje potrošnju kisika i smanjuje protok krvi kroz mozak. Uzrokuje amneziju, u višim dozama hipnozu, te podiže prag za razvoj epileptiformnih grčeva [87]. Mijenja elektroencefalogram (EEG) na način da se pojavljuje beta ritam. U respiratornom sustavu izaziva respiratornu depresiju u trajanju do 120 min nakon intravenske primjene (ovisno o dozi). Na kardiovaskularni sustav nema jači depresivni ni hipotenzivni učinak, ali može imati u kombinaciji sa drugim lijekovima.

Indikacije za primjenu midazolama u anesteziji: premedikacija, kombinirana intravenska anestezija, sedacija kod regionalne anestezije, liječenje grčeva kod predoziranja lokalnim anestetikom, sedacija djece za medicinske postupke koji zahtijevaju mirovanje [84]. Kontraindikacije za primjenu midazolama su: preosjetljivost na benzodiazepine, miastenija gravis.

Predožiranje midazolamom smatra se medicinskim hitnim slučajem i općenito zahtijeva neposrednu pozornost medicinskog osoblja. Predoziranje u zdravih pojedinaca je rijetko po život opasno s pravilnom medicinskom podrškom [71]. Međutim, toksičnost se povećava kada su u kombinaciji s drugim CNS depresorima kao što su alkohol, opiodi, ili triciklički antidepressivi. Toksičnost, predožiranja i rizik od smrti također je povećan u starijih osoba i onih s opstruktivnom plućnom bolesti i pri intravenskom korištenju. Antidot za predožiranje midazolamom je flumazenil [71]. Iako je učinkovit u antagoniziranju učinaka benzodiazepina ne koristi se rutinski jer može potaknuti napadaje u mješovitim predožiranjima [88,89]. U anesteziološkoj praksi flumazenil se koristi u situacijama kada se želi poništiti učinak midazolama zbog bržeg razbuđivanja bolesnika. Takva administracija povezana je s mogućim rizicima i nuspojavama, kao što su nagli porast tlaka i pulsa te nemir i agitacija.

Simptomi predožiranja midazolama mogu uključivati: ataksiju, disartiju, nistagmus, nerazumljiv govor, somnolenciju, mentalnu zbunjenost, hipotenziju, respiratorni zastoj, vazomotorni kolaps, oštećenje motorne funkcije i oslabljene reflekse, poremećenu koordinaciju, poremećaje ravnoteže, vrtoglavicu, komu i smrt [88,89].

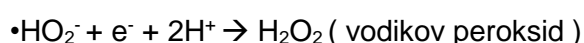
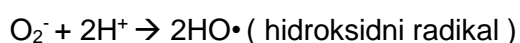
1.4. Oksidacijski stres

Stanica je u stanju oksidacijske homeostaze kada su oksidacijski i redukcijски procesi u ravnoteži. Prema tome, oksidacijski je stres pomak ravnoteže u oksidacijsko-redukcijskim procesima prema oksidaciji [90]. Ovo stanje može biti izazvano ili povećanim stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. Reactive Oxygen Species) ili smanjenom antioksidacijskom zaštitom [91]. I ROS i antioksidacijska zaštita bitni su za normalan metabolizam stanice, provođenje signala i regulaciju stanične funkcije [90,91]. Kako bi spriječile oštećenja proteina, lipida, DNA i RNA nastala djelovanjem oksidacijskog stresa, stanice aktiviraju sustave enzimskih i neenzimskih obrambenih mehanizama koji uklanjaju ROS i popravljaju ili degradiraju oštećene molekule.

1.4.1. Reaktivne kisikove vrste (ROS)

ROS karakterizira iznimno visoka reaktivnost, što je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu, spare nespareni elektron koji posjeduju i time postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju [92].

Lančana reakcija nastajanja ROS-a :



Možemo ih podijeliti na slobodne radikale kisika (superoksidni anion, peroksidni anion, hidroksilni anion) te reaktivne neradikalne derivate kisika (vodikov peroksid, ozon) [91].

Osim ROS postoje i reaktivne vrste dušika (RNS – engl. reactive nitrogen species) u koje ubrajamo molekule kao peroksinitrit (ONOO^-) ili nitrozilni kation $[\text{N}=\text{O}]^+$ [91].

Endogeni izvori ROS-a su: mitohondrij (oksidativna fosforilacija, transport elektrona), endoplazmatski retikulum, plazmatska membrana i peroksisom. Tijekom mitohondrijskog oksidativnog metabolizma, većina kisika se reducira do vode, no procijenjeno je da se 4% do 5% pretvori u ROS, primarno superoksidni anion ($\cdot\text{O}_2^-$).

Egzogeni izvori ROS-a su: ionizirajuće zračenje, infekcije patogenima (stimulirani makrofazi otpuštaju ROS kao mehanizam obrane protiv patogena), izlaganje herbicidima ili insekticidima.

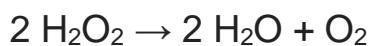
1.4.2. Antioksidacijski enzimi

Kako bi se stanice obranile od stresa došlo je do razvoja nekoliko enzimatskih sustava za neutralizaciju slobodnih radikala i ROS-a. Oni oblikuju endogeni obrambeni mehanizam zaštite stanice od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima i drugim elektrofilnim česticama [92]. Ovi enzimi su: superoksid dismutaza, katalaza, glutation enzimatski sustav [93]. Enzimi zahtijevaju i kofaktore za optimalnu enzimatsku aktivnost. To su: željezo, bakar, cink, selen i mangan. Smatra se da unos minerala u tragovima može poboljšati učinkovitost antioksidacijskih obrambenih mehanizama [94].

Katalaza

Katalaza je enzim koji katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu i kisik, koristeći kao kofaktor željezo ili mangan [95]. Nalazi se u peroksisomima u citoplazmi stanica [96]. Ima vrlo visoku aktivnost, to je enzim s najvećim obrtnim brojem, jako je brz i učinkovit [97]. Jedna molekula katalaze može pretvoriti milijune molekula vodikovog peroksida u vodu i kisik svake sekunde [98]. Ima nizak afinitet prema H₂O₂ i reakcija zahtijeva simultani ulazak dvije molekule H₂O₂ na aktivno mjesto [98]. Humana katalaza po kemijskoj strukturi je tetramer sastavljen od četiri podjedinice [95,96]. Kod osoba s kroničnom granulomatoznom bolešću postoji poremećaj u proizvodnji peroksida te su stoga bolesnici s tom bolešću skloniji infekcijama određenim mikroorganizmima [99].

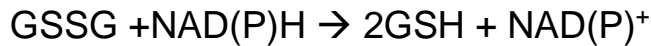
Pretvaranje vodikovog peroksida u vodu i kisik:



Glutation enzimatski sustav

Glutation enzimatski sustav uključuje glutation, glutation reduktazu, glutation peroksidazu i glutation-S-transferazu [100]. U procesu redukcije koristi svoju sulfhidrilnu skupinu cisteina, pomoću koje neutralizira ROS. Glutation peroksidaza je enzim koji sadrži četiri selena kao

kofaktore te katalizira razgradnju vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida. Glutation-S-transferaze pokazuju visoku aktivnost prema lipidnim peroksidima [101]. Ova porodica enzima je u posebno visokoj koncentraciji prisutna u jetri jer sudjeluje u inaktivaciji egzogenih toksina. Istraživanja pokazuju da glutacion i vitamin C rade interaktivno u neutralizaciji slobodnih radikala.



Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) je enzim koji katalizira pretvaranje superoksidnog aniona u kisik i vodikov peroksid. Prisutna je u gotovo svim aerobnim stanicama i u izvanstaničnoj tekućini [102]. SOD predstavlja prvu liniju obrane od toksičnog efekta povišenih razina ROS. To je jedan od najefikasnijih enzimatskih antioksidansa [93]. SOD kao kofaktore sadrži ione metala koji, ovisno o izoformi enzima, mogu biti bakar, cink, mangan ili željezo [102,103]. Na primjer, kod ljudi Cu/Zn SOD je prisutna u citoplazmi, dok je Mn SOD prisutna u mitohondrijima.

1.4.3. Štetne posljedice ROS-a

ROS zbog svoje velike reaktivnosti ulazi u kemijske reakcije s molekulama u svojoj neposrednoj blizini i na taj način oštećuju lipide, proteine i DNA (eng. deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleinska kiselina) stanice. S DNA ROS ulaze u reakcije s bazama pri čemu se mijenja njihova kemijska struktura i posljedično dolazi do krivog sparivanja baza i nastanka mutacija. Kod proteina ROS najčešće uzrokuju inaktivaciju i promjenu aktivnosti zbog oksidacijskog oštećenja [104].

Oksidacija proteina je kovalentna modifikacija proteina koju mogu uzrokovati ROS [105]. Najzastupljenija oksidacijska promjena je karbonilacija te se kao takva koristi kao marker oštećenja proteina [106]. Proces oštećenja lipida ROS-om je lipidna peroksidacija i uključuje tri koraka: inicijacija, propagacija i terminacija [107]. Inicijacija je početni korak u kojem ROS oduzima vodikov atom iz masnih kiselina nakon čega nastaju alkilni radikali. U daljnjem nizu kaskadnih reakcija dolazi do propagacije, pri čemu jedan ROS uzrokuje multiplikaciju oštećenja višestrukonezasićenih masnih kiselina (engl. polyunsaturated fatty acids – PUFA) [108]. Završni produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi (npr. akrolein, 4-

hidroksinonenal - HNE, malondialdehid) [107,108]. Ovi aldehidi su stabilne, ali vrlo reaktivne molekule zbog čega posjeduju sposobnost difundiranja i napadanja drugih, udaljenijih, makromolekula čime dolazi do povećanja opsega oštećenja [107,108].

1.4.4. Oksidacijski stres i njegova uloga u razvoju patologije

Postoje brojna istraživanja koja su dokazala utjecaj ROS-a na razvoj bolesti svih organskih sustava. Koža je organ koji je podložan različitim vanjskim utjecajima koji dovode do stvaranja ROS-a. ROS također mogu nastati i endogeno u koži [109]. Do sada je istražena uloga ROS-a u brojnim bolestima kože kao što su psorijaza, vitiligo, lihen planus i atopijski dermatitis [110–112].

Smatra se da je oksidacijski stres važan i u razvoju neurodegenerativnih bolesti [113] uključujući Parkinsonovu bolest, Alzheimerovu bolest, Huntingtonovu bolest, depresiju, autizam [114] i multiplu sklerozu [115]. Neizravni dokazi putem praćenja biomarkera ukazuju na to da oksidacijska šteta može biti uključena u patogenezu tih bolesti, dok se kumulativni oksidacijski stres s disrupcijom mitohondrija u neuronima povezuje s Alzheimerovom bolesti, Parkinsonovom bolesti i drugim neurodegenerativnim bolestima [116].

Oksidacijski stres povezuje se i s određenim kardiovaskularnim bolestima, budući da je oksidacija LDL u vaskularnom endotelu prethodnik formacija plaka. Oksidacijski stres također igra ulogu u ishemijskoj kaskadi kod reperfuzijske ozljede nakon hipoksije [117]. Također, on pridonosi ozljedi tkiva cijelog tijela kod dijabetesa [118].

Štete prouzrokovane oksidacijskom stresom tokom godina mogu dovesti do razvoja karcinoma. ROS može uzrokovati izravnu štetu na DNA, a također može potisnuti apoptozu i promovirati proliferaciju, invazivnost i metastazu [119,120]. Infekcija s *Helicobacter pylori* povećava proizvodnju ROS-a u ljudskom želucu čime povećava mogućnost razvoja karcinoma želuca [119]. Općenito, propagacija upalnih stanja s kretanjem u septični odgovor organizma također se povezuje sa štetnim učincima ROS-a na organizam [121,122].

Utjecaj ROS-a na humanu reprodukciju predmet je brojnih istraživanja i smatra se uzrokom lošije kvalitete oocita u žena [123] i smanjenog broja spermija u muškarca [124].

2.HIPOTEZA I CILJEVI

2.1. Hipoteza istraživanja

Midazolam djeluje anksiolitički i sedacijski te bi se stoga mogao koristiti u premedikaciji za aspiraciju jajnih stanica u postupku IVF-a za smanjenje sistemskog stresa ispitanica koje prolaze postupak. Smanjena količina sistemskog stresa ispitanice, koji utječe na oksidacijski status organizma, mogla bi rezultirati smanjenom razinom oksidacijskog stresa u plazmi i folikularnoj tekućini te time pozitivno djelovati na ishod IVF-a, odnosno biti će više uspješnih trudnoća.

2.2. Ciljevi istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja je utvrditi utječe li premedikacija midazolamom tijekom postupka aspiracije jajnih stanica na količinu stresa u ispitanica koje prolaze postupak IVF-a. Glavni cilj ostvariti će se preko manjih ciljeva kojim će se utvrditi korelira li razina stresa u plazmi ispitanica količini stresa u folikularnoj tekućini aspiriranih folikula te ispitanice. Konačni cilj je utvrditi utječe li premedikacija midazolamom u fazi aspiracije jajnih stanica na uspješnost medicinski pomognute oplodnje (IVF/ICSI u stimuliranom ciklusu), odnosno povećava li broj uspješnih trudnoća.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. Prikupljanje uzoraka

Istraživanje je provedeno na KBC "Sestre milosrdnice", na odjelu za humanu reprodukciju. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (EP-2258/18-3). Svakoj pacijentici je detaljno objašnjen postupak te ciljevi istraživanja, te im se odgovorilo na sva dodatna pitanja vezana uz istraživanje i postupak. Nakon informacija istraživanju, pacijentica je donijela odluku o sudjelovanju u ovom istraživanju te je svoj pristanak potvrdila potpisom na prethodno pripremljeni obrazac informiranog pristanka.

Ukupno 60 pacijentica randomizacijom su podjeljene u dvije grupe: midazolamsku i kontrolnu grupu. Midazolamska grupa primila je premedikaciju midazolamom oralnim putem tabletom od 7.5 mg 30 minuta prije početka postupka aspiracije. Budući da midazolam uzrokuje sedaciju, pacijentice su nakon primjene midazolama bile pod kontrolom zdravstvenog osoblja kako bi se izbjegle moguće komplikacije. Daljnji postupak bio je identičan kod obje ispitivane grupe te su pacijentice pristupile postupku aspiracije pod kontrolom transvaginalnog ultrazvuka jedne ili više oocita iz sazrelog folikula (eng. TUGOR- transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval). Neposredno prije postupka pacijentice su bile uspavane od strane anesteziologa kratkotrajnom intravenskom anestezijom pomoću kombinacije anestetika (propofol) i analgetika (sufentanil). Po završetku postupka pacijentice su se budile spontano. Ukoliko je postupak prošao bez komplikacija pacijentica se dva sata nakon postupka otpustila iz bolnice.

Postupak uzimanja uzoraka bio je isti u obje grupe. Uzorak krvi venepunkcijom bio je uzet u tri navrata: prije administracije midazolama, neposredno prije zahvata te 2 sata nakon zahvata. Uzorak krvi se kod svakog vađenja podijelio na uzorak pune krvi, te na uzorak plazme koji su pohranjeni u zamrzivaču na -80°C. Postupak venepunkcije bio je izveden od strane stručnog medicinskog osoblja u uvjetima asepse iz postavljenog venskog puta. Budući je venski put potreba za postupak anestezije, pacijentice ovime nisu bile izložene dodatnom postavljanju venskog puta za vađenje krvi. Također, tijekom TUGOR postupka, prilikom aspiracije jajnika uzet je i uzorak folikularne tekućine koji je također pohranjen u zamrzivaču na -80°C.

U sklopu standardnog protokola IVF-a pacijentice prolaze hormonsku obradu prije postupka IVF-a. Prikupljene podatke hormonskih analiza iskoristili smo za potrebe našeg istraživanja.

3.2. Laboratorijske analize

3.2.1. Određivanje ukupne aktivnosti peroksida - TOC

Za analizu ukupnih peroksida u plazmi reakcija se temelji na reakciji peroksidaze s peroksidima u plazmi pri čemu se reducira tetra-metil-benzidin (TMB) u plavo obojeni produkt. Nakon dodatka otopine za zaustavljanje reakcije, tzv. stop otopine (2M H₂SO₄), plava boja se proporcionalno mijenja u žutu. Intenzitet boje mjerio se spektrofotometrijski na čitaču pločica na valnoj duljini od 450 nm [125]. Kvantifikacija endogenih peroksida izražava se u odnosu na baždarnu krivulju dobivenu serijskim razrjeđenjima H₂O₂. Sam tijek izvođenja TOC testa je na način da su se pripremila razrjeđenja H₂O₂ koji služi kao standard. Zatim se u mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića najprije pipetiralo 10 µl standarda te 10 µl plazme kontrolne i midazolamske grupe ispitanica. Svaki uzorak nanosio se u triplikatu. Potom se na standarde i uzorke dodalo 200 µl reagensa po bunariću. Nakon inkubacije pri sobnoj temperaturi od 5 minuta izmjerila se apsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm. Slijedila je inkubacija od 20 minuta na temperaturi 4°C. Potom se pipetiralo 50 µl otopine za zaustavljanje tzv. stop otopine 2 M H₂SO₄ u svaki bunarić mikrotitarske pločice. Nakon tri minute pločica se lagano protresla kako bi se ujednačila boja te je očitana apsorbancija reakcijske otopine u bunarićima na čitaču mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 450 nm. Rezultat mjerenja je izračunat kao razlika između 2. i 1. mjerenja, te je izražen prema baždarnoj krivulji kao ekvivalent peroksida u uzorku.

3.2.2. Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta – TAC

Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta temelji se na reakciji antioksidansa s bezbojnim substratom te promjeni boje u kromogeni supstrat. Nakon dodatka otopine za zaustavljanje reakcije tzv. stop otopine (2M H₂SO₄) plava boja se proporcionalno mijenja u žutu. Intenzitet boje se mjeri spektrofotometrijski na čitaču pločica na valnoj duljini od 450 nm. Kvantifikacija ukupnih antioksidansa iz plazme napravljena je u odnosu na baždarnu krivulju koja podrazumijeva različita razrijeđenja mokraćne kiseline kao najučestalijeg antioksidansa u krvi. Alternativno se mogu koristiti razrijeđenja vitamina C kao standard. Reagensi su se pripremili na sljedeći način: pomiješalo se 10 mL pufera i 10 µl peroksida za reagens A te 5

mL pufera, 50 μ l supstrata i 5 μ l peroksidaze za reagens B. Navedene mješavine stabilna je 15 minuta. Reakcija je započela pipetiranjem 25 μ l standarda, kontrola i uzorka (plazme) u bunarić na mikrotitarskoj pločici. Zatim se dodalo 100 μ l reagensa A po svakom bunariću. Uzorci su se inkubirali 15 minuta na temperaturi 4°C prije nego što se dodalo 50 μ l stop otopine, 2 M H_2SO_4 , po bunariću mikrotitarske pločice. Potom se očitala apsorbancija otopine u bunarićima na čitaču mikrotitarskih pločica na valnoj duljini 450 nm. Rezultat mjerenja je izračunat kao razlika između 2. i 1. mjerenja te je zražen prema baždarnoj krivulji kao ekvivalent mokračne kiseline. Ukupni antioksidacijski kapacitet u uzorku je proporcionalan ukupnom antioksidacijskom kapacitetu mokračne kiseline.

3.2.3. Određivanje ukupnog glutationa

Za određivanje ukupnog glutationa potrebno je: fosfatni pufer (100 mM, NaH_2PO_4 , 6 mM EDTA, pH 7,5), Ellmanov reagens (4,5 mM DTNB dinitro-blue tetrazolium), GSH reduktaza (0,4 U/uzorak), NADPH (1,8 mM). Za test je bilo šotrebno uzroke razrijediti na koncentraciju 0,03 mg/mL proteina. Krv se prvo lizirala i kao takva je ulazila u reakciju. Lizati su se razjedili u 0,01M HCl na potrebnu koncentraciju proteina. Reakcija se odvijala na ledu. Nakon što su se uzorci nakapali, dodao se pufer za svaku komponentu. U pločicu, u svaki bunarić nakapano e 150 μ L standarda/uzorka. Neposredno prije kapanja pomiješao se Ellmanov reagens s GSH reduktazom i NADPH u omjeru 1:1:1. Po uzorku se dodao sljedeći omjer volumena svake komponente 25:25:25 μ L, ukupno 75 μ L. Za analizu se pripremilo na način da su se ovi volumeni pomnožili s brojem uzoraka (standardi + uzorci + višak). 75 μ L smjese se potom nakapalo na svaki uzorak. Rezultat se očitao neposredno po kapanju na 405 nm. Koncentracija glutationa u krvi određena je usporedbom s baždarnom krivuljom.

3.2.4. Određivanje katalaze

Za određivanje katalaze potrebne su sljedeće otopine: fosfatni pufer za katalazu pH 7,4 (60 mM KH_2PO_4), stop otopina (32,4 mM amonij molibdat). Reakcija se izvela s 20 μ L uzorka uz dodatak 100 μ L pufera i 100 μ L 65 mM H_2O_2 te se očitalo pozadinsko obojenje na 405 nm.

Reakcija se temelji na razgradnji H_2O_2 katalazom u punoj krvi. Princip metode temelji se na činjenici da je katalaza enzim s najvećim obrtajnim brojem [97] pa je pretpostavka da će H_2O_2 biti razgrađen upravo ovim enzimom. Nakon tri do pet minuta reakcije, preostali H_2O_2 kelirao se s amonij- molibdatom (stop otopina) te se ostavila jednu minutu kako bi se boja stabilizirala. Rezultat je zatim očitao mjereći apsorbanciju na 405 nm. Koncentracija preostalog H_2O_2 odredila se iz baždarne krivulje, te se količina razgrađenog H_2O_2 odredila oduzimanjem početne (65 mM) i konačne koncentracije H_2O_2 u jedinici vremena.

3.2.5. Određivanje Interleukina 1 β

Interleukin 1 β određen je testom ELISA (Human anti-IL-1 beta ELISA kit, ab100562) iz materijala folikularne tekućine pacijentica. Od 60 ispitanih, dva uzorka nismo mogli dobiti tako da je u test određivanja interleukina 1 β ušlo 58 uzoraka. Standardi su bili razrjeđeni po uputama proizvođača. Zatim se dodalo 100 μ l standarda ili uzorka u bunariće, a pločica se poklopila kako ne bi došlo do sušenja bunarića te je ovako ostavljeno preko noći na 4°C kako bi se IL 1 β vezao na protutijela kojima su prekriveni bunarići. Sljedeći dan se cijela pločica isprala četiri puta po 300 μ l s otopinom za ispiranje. Važno je dobro osušiti bunariće nakon ispiranja. Potom se dodalo 100 μ l biotiniziranog anti-IL1 β protutijela u svaki bunarić te se inkubiralo jedan sat na sobnoj temperaturi. Ponovno se isprala četiri puta s 300 μ l otopine za ispiranje. Zatim se dodalo 100 μ l HRP-streptavidina u svaki bunarić i inkubiralo 45 minuta na sobnoj temperaturi. Ponovno je slijedilo ispiranje četiri puta s 300 μ l otopine za ispiranje. Zatim se dodalo 100 μ l TMB reagensa u svaki uzorak i inkubiralo se 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Pri ovoj reakciji došlo je do promjene boje u plavu u uzorcima u kojima je prisutan IL1 β , pri čemu intenzitet boje ovisi o količini IL1 β . Na kraju se dodalo 50 μ l stop otopine i došlo je do promjene boje iz plave u žutu. Intenzitet boje očitavalo se na ELISA čitaču pločica na 450 nm. Količina IL1 β u uzorcima određena je pomoću baždarne krivulje.

3.3. Utvrđivanje broja trudnoća

Sve sudionice istraživanja praćene su nakon provedenog postupka IVF-a u smislu provjere uspješnosti postupka tj. trudnoće. Zabilježen je prvobitni porast beta HGC-a i ultrazvučna potvrda trudnoće nakon 8 tjedana. Svim sudionicama istraživanja zabilježen je ishod te je trudnicama dalje praćen tijekom trudnoće. Napravljena je usporedba broja trudnoća midazolamske i kontrolne grupe.

3.4. Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni u Prism GraphPad programu, verzija 8.0 (GraphPad Software, SAD). Korištene su sljedeći testovi: t-test i one-way ANOVA, te Fisherov egzaktni test za analizu frekvencija trudnoća u obje grupe.

4.REZULTATI

4.1. Analiza ulaznih parametara pacijentica na početku liječenja neplodnosti

Svi rezultati u skladu s istraživanjem podijeljeni su u dvije skupine, midazolamsku i kontrolnu skupinu. Svaka skupina sadrži 30 ispitanica. Kako bi mogli razlučiti utjecaj midazolama od ostalih čimbenika kod pozitivnog ishoda postupka umjetne oplodnje, analizirani su ulazni parametri pacijentica na početku liječenja neplodnosti. Budući su nalazi uzimani iz hormonske obrade ispitanica za zahvat, neki od nalaza nisu bili dostupni. Razine hormona estradiola kod ispitanica u istraživanju prikazane su u odnosu na referentne vrijednosti u Tablici 1. Za dvije ispitanice u kontrolnoj grupi i jednu u midazolamskoj grupi nije bio dostupan podatak o razini hormona estradiola. U midazolamskoj grupi 23 ispitanice imale su normalnu razinu estradiola, tri ih je imalo sniženu razinu, a tri su imale povišenu razinu hormona. U kontrolnoj grupi 23 ispitanica imale su normalne razine estradiola, jedna je imala sniženu razinu hormona i četiri su imale povišenu razinu hormona. Nema statistički značajne razlike u razini hormona između midazolamske i kontrolne grupe za hormon estradiol.

Tablica 1. Razine estradiola u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama u odnosu na referentne vrijednosti.

Estradiol (folikularna faza)	midazolamska grupa	kontrolna grupa
povišen	3	4
normalan (98.1-571)	23	23
snižen	3	1
Nije izvađen	1	2

Razina hormona progesterona nalazi se u tablici 2. i prikazane su u odnosu na referentne vrijednosti. 19 ispitanica, od čega 9 u midazolamskoj grupi i 10 u kontrolnoj nije imalo dostupnu razinu hormona. Deset od 21 dostupnih razina hormona u midazolamskoj grupi je imalo normalnu razinu hormona, devet je imalo sniženu razinu hormona i dvije su imale povišenu razinu hormona. U kontrolnoj grupi 10 od 20 dostupnih razina imalo je normalnu razinu hormona, deset je imalo sniženu razinu, niti jedna nije imala povišenu. Nije bilo statistički značajne razlike između midazolamske i kontrolne grupe u razini hormona progesterona.

Tablica 2. Razine progesterona u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama u odnosu na referentne vrijednosti.

progesteron	midazolamska grupa	kontrolna grupa
povišen	2	0
U granicama normale (5.3-86)	10	10
snižen	9	10
Nije izvađen nalaz	9	10

Razina hormona testosterona kod ispitanica u istraživanju prikazana je u tablici 3. Za ukupno 14 ispitanica, od čega šest u midazolamskoj grupi i osam u kontrolnoj grupi nije bio dostupan podatak o razini hormona estradiola. U midazolamskoj grupi 23 od 24 ispitanica dostupnih analizi imalo je normalnu razinu hormona, jedna je imala povišenu. U kontrolnoj grupi sve ispitanice (22 od 22 dostupnih) imale su normalnu razinu hormona testosterona. Nema statistički značajne razlike između midazolamske i kontrolne grupe u razini hormona testosterona.

Tablica 3. Razine testosterona u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama u odnosu na referentne vrijednosti.

testosteron	midazolamska grupa	kontrolna grupa
Povišen	1	0
normalan (0.22-2.9)	23	22
snižen	0	0
Nije izvađen nalaz	6	8

Nadalje, u tablici 4. nalaze se podaci o razini DHEA-S u odnosu na referentne vrijednosti. Ukupno 22 ispitanice nisu imale izmjerenu razinu hormona dostupnu za analizu, od toga 10 u midazolamskoj grupi i 12 u kontrolnoj grupi. U midazolamskoj grupi 19 od 20 dostupnih za analizu imale su normalnu razinu hormona, a jedna je imala povišenu. U kontrolnoj grupi 15 od 18 dostupnih analizi u kontrolnoj grupi su imale normalnu razinu hormona, tri su imale povišenu. Nema statistički značajne razlike između midazolamske i kontrolne grupe u razini DHEA-S.

Tablica 4. Razine DHEA-S u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama u odnosu na referentne vrijednosti.

DHEA-S	midazolamska grupa	kontrolna grupa
povišen	1	3
normalan (1.8-7.7)	19	15
snižen	0	0
Nije izvađen nalaz	10	12

Podaci o razinama hormona prolaktina u odnosu na referentne vrijednosti nalaze se u tablici 5. Za 15 ispitanica nisu bili dostupni podaci o razinu hormona prolaktina, od toga šest u midazolamskoj i devet u kontrolnoj grupi. U midazolamskoj grupi 17 od 24 poznatog hormonskog statusa imale su normalnu razinu prolaktina, kod pet je bio povišen i kod dva snižen. U kontrolnoj grupi 16 od 21 poznatog hormonskog statusa u kontrolnoj grupi imalo je normalnu razinu hormona, tri su imale povišenu razinu i dvije sniženu. Nema statistički značajne razlike između midazolamske i kontrolne grupe u razini hormona prolaktina

Tablica 5. Razine prolaktina u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama u odnosu na referentne vrijednosti.

prolaktin	midazolamska grupa	kontrolna grupa
povišen	5	3
normalan	17	16
snižen	2	2
Nije izvađen	6	9

Vrijednosti TSH hormona prikazane su u tablici 6. Za 14 ispitanica, od čega osam u midazolamskoj grupi i šest u kontrolnoj, nije bio dostupan podatak o razini hormona TSH. Od 46 dostupnih sve su imale razinu hormona unutar normalnih referentnih vrijednosti. Nema statistički značajne razlike između midazolamske i kontrolne grupe u razini TSH. Sve trudnoće poznate vrijednosti hormona su imale normalnu razinu TSH.

Tablica 6. Razine TSH u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama u odnosu na referentne vrijednosti.

TSH	midazolamska grupa	kontrolna grupa
povišen	0	0
Normalan (0.27-4.20)	22	24
snižen	0	0
Nije izvađen	8	6

Tablica 7. pokazuje vrijednost hormona AMH. Za 9 ispitanica, četiri iz midazolamske i pet iz kontrolne grupe nismo imali izvađenu razinu hormona dostupnu analizi. U midazolamskoj grupi sedam ispitanica ima normalnu razinu AMH, dok 19 im povišenu razinu. U kontrolnoj grupi pet ispitanica ima normalnu razinu hormona, dok 20 ima povišene vrijednosti. Nema statistički značajne razlike u hormonskom statusu AMH između midazolamske i kontrolne grupe.

Tablica 7. Razine AMH u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama u odnosu na referentne vrijednosti.

AMH	midazolamska grupa	kontrolna grupa
Povišen	19	20
Normalan (0.67-9.49)	7	5
snižen	0	0
Nije izvađen	4	5

U tablici 8. nalaze se podaci za vrijednosti hormona FSH. Za šest ispitanica, od čega tri iz midazolamske i tri iz kontrolne grupe, nije imalo dostupnu vrijednost. U midazolamskoj grupi 27 ispitanica ima normalnu razinu FSH. U kontrolnoj grupi 23 ispitanica ima normalnu razinu hormona, dok jedna ima povišene vrijednosti, a jedna snižene vrijednosti. Nema statistički značajne razlike između hormonskog statusa midazolamske i kontrolne grupe u hormonskom statusu FSH.

Tablica 8. Razine FSH u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama u odnosu na referentne vrijednosti.

FSH	midazolamska grupa	kontrolna grupa
povišen	0	1
Normalan (3.5-12.5)	27	23
snižen	0	1
Nije izvađen	3	5

U tablici 9. dostupne su vrijednosti hormona LH. Za osam ispitanica, tri iz midazolamske i pet iz kontrolne grupe, nije bila dostupna vrijednost hormona. U midazolamskoj grupi sve (27) ispitanice su unutar normalnih vrijednosti razile LH. U kontrolnoj grupi 21 ispitanica ima vrijednosti unutar normalnih vrijednosti, dok četiri imaju povišene razine LH. Nema statički značajne razlike između hormonskog statusa ispitanica midazolamske i kontrolne grupe.

Tablica 9. Razine LH u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama u odnosu na referentne vrijednosti.

LH	midazolamska grupa	kontrolna grupa
povišen	0	4
Normalan (2.4-13)	27	21
snižen	0	0
Nije izvađen	3	5

U tablici 10 nalaze se BMI svih ispitanica u istraživanju. Najveći broj ispitanica nalazi se unutar idealnog BMI-a, i u midazolamskoj i u kontrolnoj grupi. Nema statistički značajne razlike u BMI između midazolamske i kontrolne grupe.

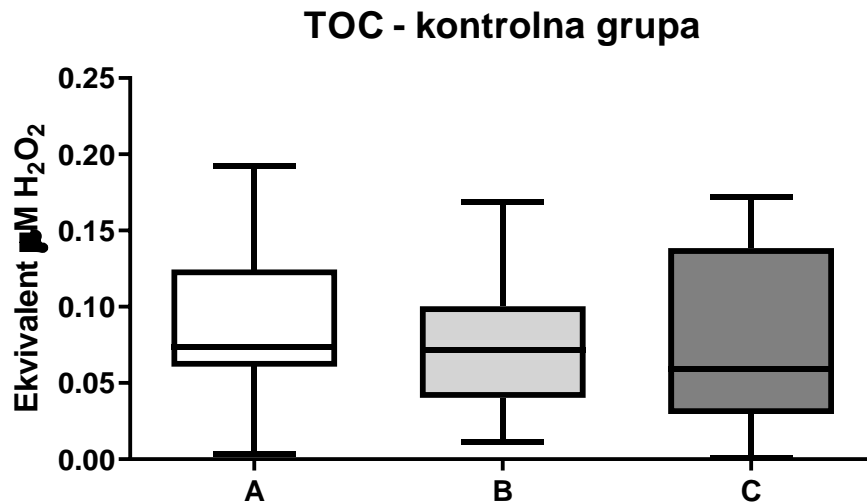
Tablica 10. BMI u ispitanica na početku liječenja neplodnosti po grupama.

BMI	midazolamska grupa	kontrolna grupa
prenizak (<19.1)	1	2
IDEALAN (19.1-25.8)	20	24
lagano visok (25.9-27.3)	3	3
visok (27.4-32.3)	3	1
previsok (32.4-45)	3	0
izrazito visok (>45)	0	0

4.2. Određivanje ukupne aktivnosti peroksida (TOC)

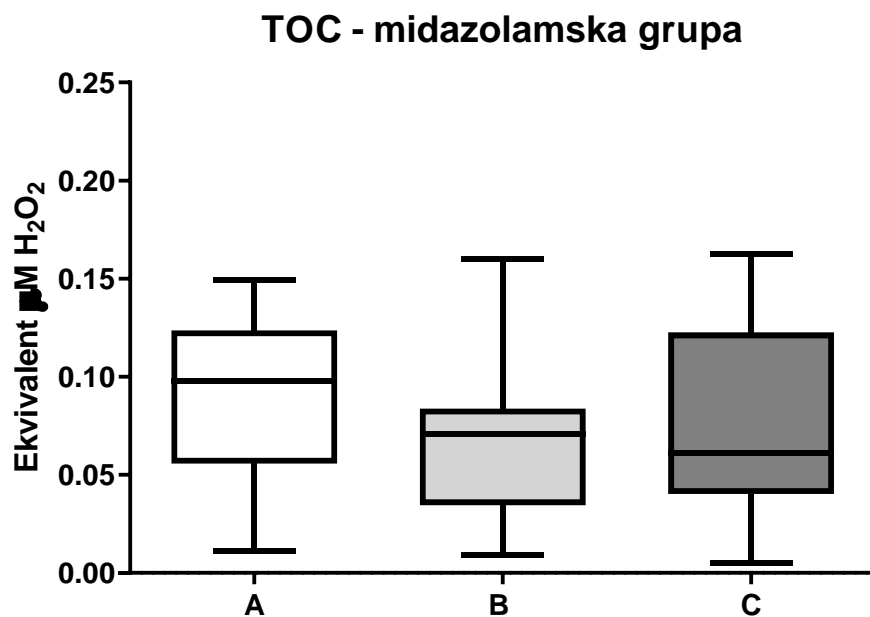
Ukupni oksidacijski kapacitet mjeren je u uzorcima plazme kontrolne i midazolamske grupe uzorkovane u tri vremenske točke te u uzorcima folikularne tekućine u obje grupe. Rezultati su

analizirani odvojeno po grupama u odnosu na tri vremenske točke, te u odnosu jedna na drugu. Razina TOC, ukupnih peroksida u plazmi u kontrolnoj grupi ne mijenja se u različitim vremenskim točkama u kojima su uzeti uzorci (Slika 2).



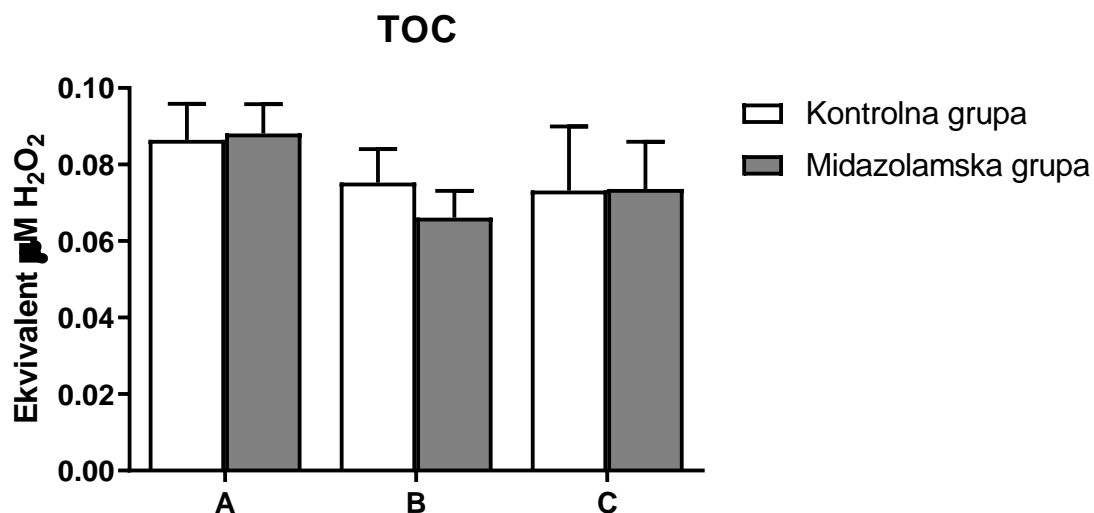
Slika 2. TOC u kontrolnoj grupi u tri vremenske točke: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, otprilike 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući

Razina TOC, ukupnih peroksida u plazmi u midazolamskoj grupi ne mijenja se u različitim vremenskim točkama u kojima su uzeti uzorci (Slika 3).



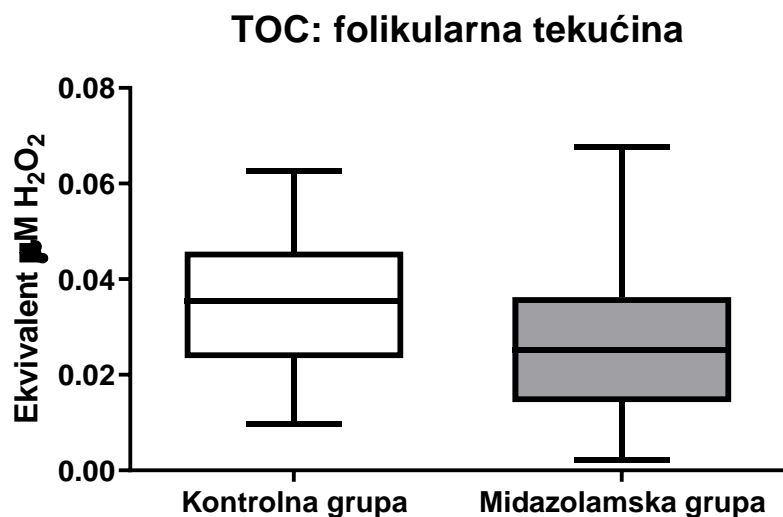
Slika 3. TOC u midazolamskoj grupi u tri vremenske točke: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući

Usporedbom pojedinih vremenskih točaka između kontrolne i midazolamske grupe nije se pokazala statistički značajna razlika (Slika 4).



Slika 4. Usporedba TOC-a u kontrolnoj i midazolamskoj grupi: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući

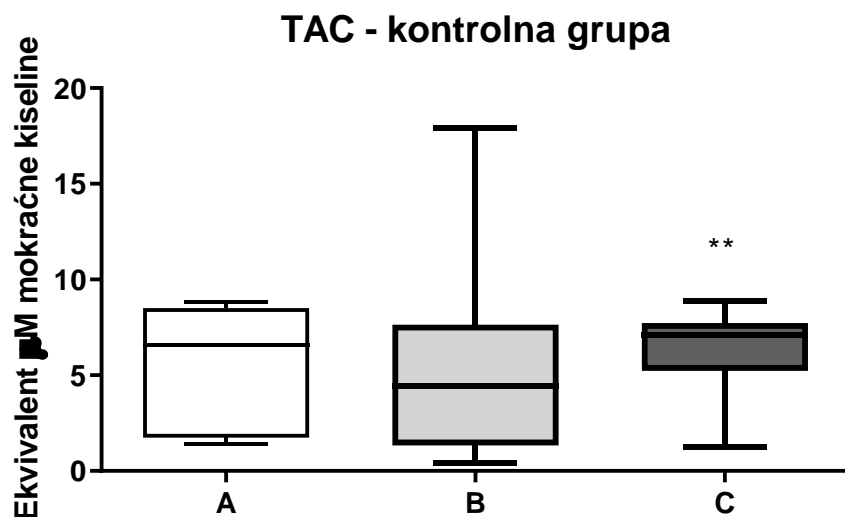
Usporedbom razine TOC-a u folikularnoj tekućini midazolamske i kontrolne grupe nije dobiven rezultat statistički značajne razlike (Slika 5.).



Slika 5. Usporedba TOC-a u folikularnoj tekućini kontrolne i midazolamske grupe

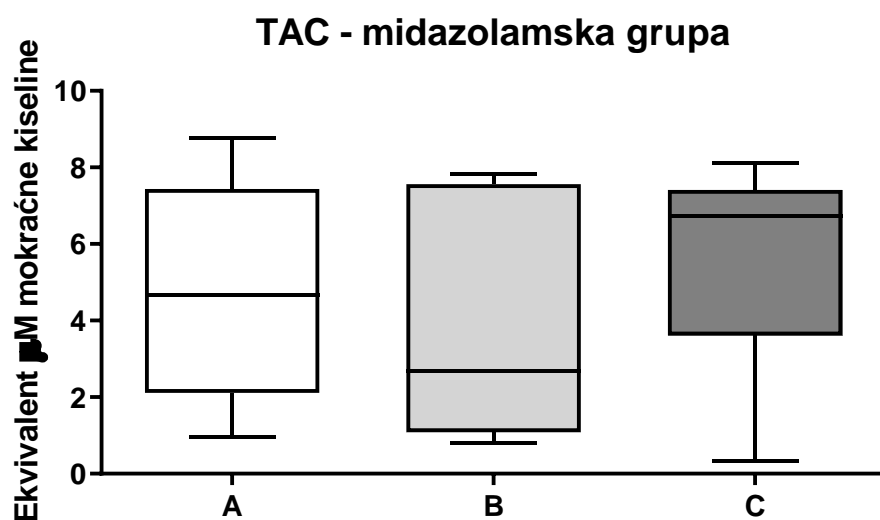
4.3. Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC)

Ukupni antioksidacijski kapacitet mjereno je u uzorcima plazme kontrolne i midazolamske grupe uzorkovane u tri vremenske točke te u uzorcima folikularne tekućine u obje grupe. Rezultati su analizirani odvojeno po grupama u odnosu na tri vremenske točke, te u odnosu jedna na drugu. Rezultati su prikazani grafički. Analiza ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u kontrolnoj grupi pokazala je porast u trećoj mjernoj točki (C) u odnosu na prvu (A) ($p=0,0072$) (Slika 6.).



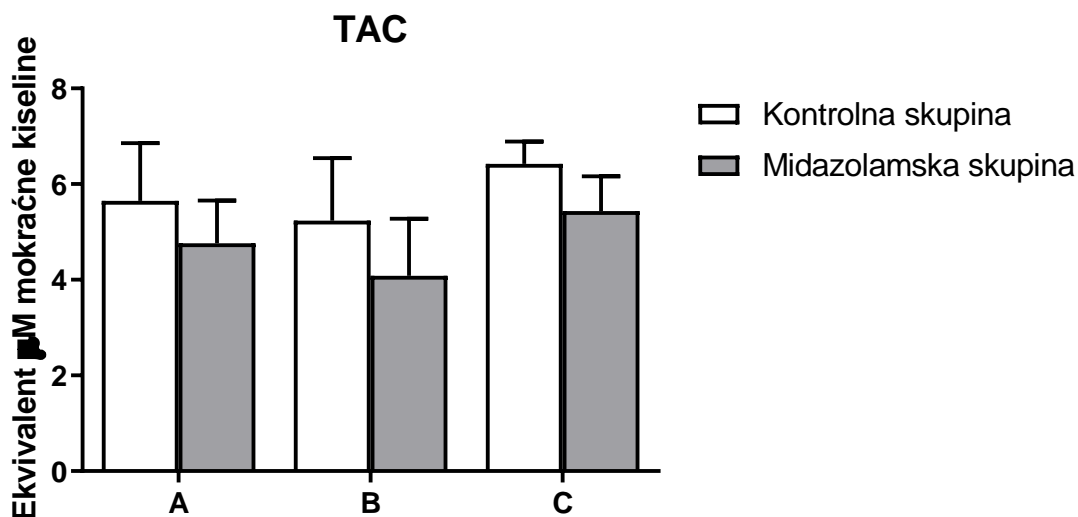
Slika 6. TAC u kontrolnoj grupi u tri vremenske točke: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući, ** statistički značajno A vs C, $p < 0,01$

U midazolamskoj grupi nije bilo razlike između pojedinih vremenskih točaka uzimanja uzoraka (Slika 7.).



Slika 7. TAC u midazolamskoj grupi u tri vremenske točke: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući

Usporedbom pojedinih vremenskih točaka između kontrolne i midazolamske grupe nije se pokazala statistički značajna razlika (Slika 8).

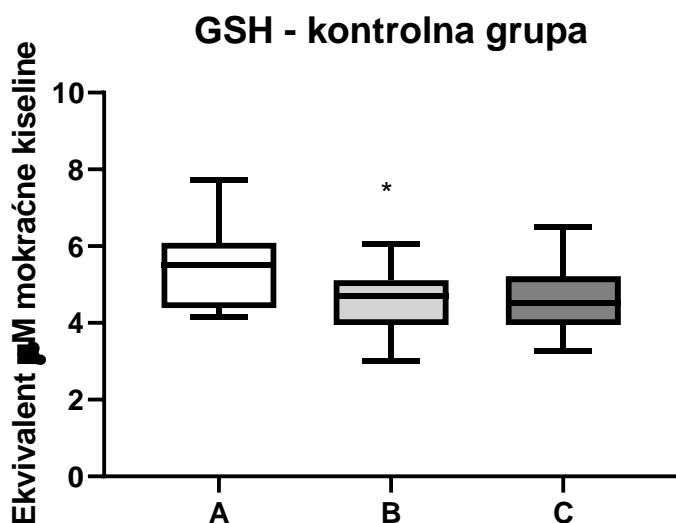


Slika 8. Usporedba TAC-a u kontrolnoj i midazolamskoj grupi: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući

Mjerenje TAC u folikularnoj tekućini nije bilo moguće zbog izrazito visokog anitoksidacijskog kapaciteta, čime su unatoč prilagođavanju metode, vrijednosti bile neusporedivo više nego u baždarnoj krivulji.

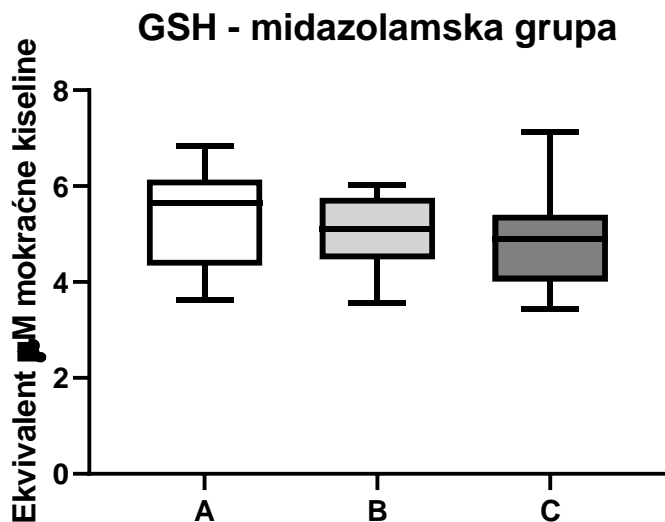
4.4. Određivanje ukupnog glutationa

Ukupni glutation je mjereno u uzorcima krvi kontrolne i midazolamske grupe uzorkovane u tri vremenske točke (Slika 9. i 10.). Rezultati su analizirani odvojeno po grupama u odnosu na tri vremenske točke, te u odnosu jedna na drugu (Slika 11.). Analiza kontrolne grupe po vremenskim točkama pokazala je da u drugoj mjernoj točki (B) dolazi do statistički značajnog pada razine glutationa ($p=0,0156$). Iako trend niže razine glutationa ostaje i u trećoj mjernoj točki, ovaj pad nije statistički značajan u odnosu na prvo ni u odnosu na drugo mjerno vrijeme.



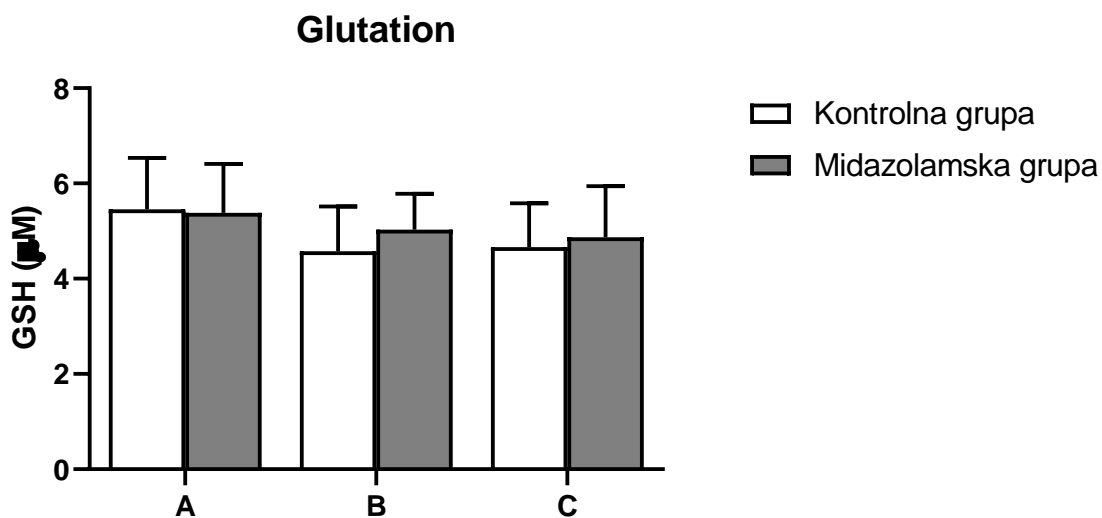
Slika 9. Razina GSH u kontrolnoj grupi u tri vremenske točke: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući, * statistički značajno A vs B, $p<0,05$

Analiza po vremenskim točkama u midazolamskoj grupi pokazala je da unatoč istom trendu kao i u kontrolnoj grupi, gdje dolazi do pada razine glutationa, ovaj pad nije statistički značajan.



Slika 10. Razina GSH u midazolamskoj grupi u tri vremenske točke: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući

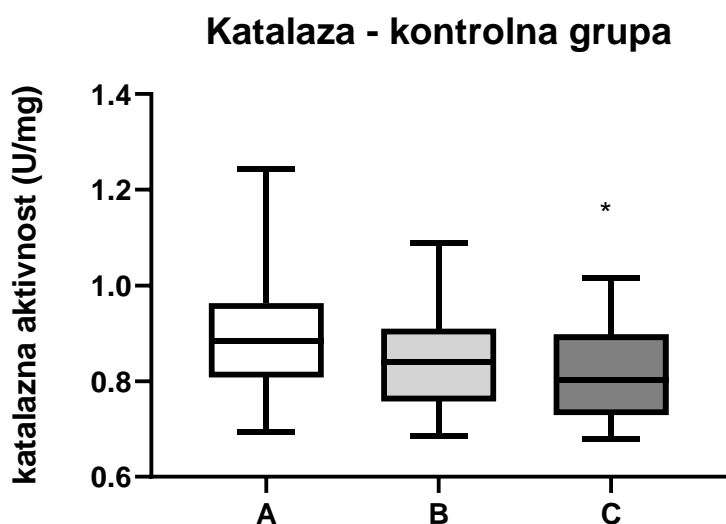
Iako se uočava zajednički trend pada glutationa, koji je u drugoj mjernoj točki značajan za kontrolnu grupu, među grupama nema statistički značajne razlike.



Slika 11. Razina ukupnog glutationa u punoj krvi: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući

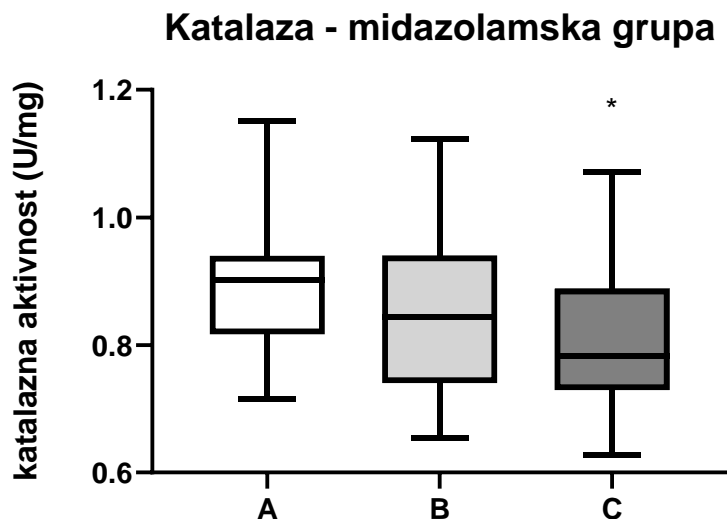
4.5. Određivanje katalaze

Katalaza je mjerena u uzorcima plazme kontrolne i midazolamske grupe uzorkovane u tri vremenske točke. Rezultati su analizirani odvojeno po grupama u odnosu na tri vremenske točke, te u odnosu jedna na drugu, a prikazani su na slikama 12. i 13. U kontrolnoj grupi aktivnost katalaze je statistički značajno snižena u trećoj mjernoj točki (C) ($p=0.0119$).



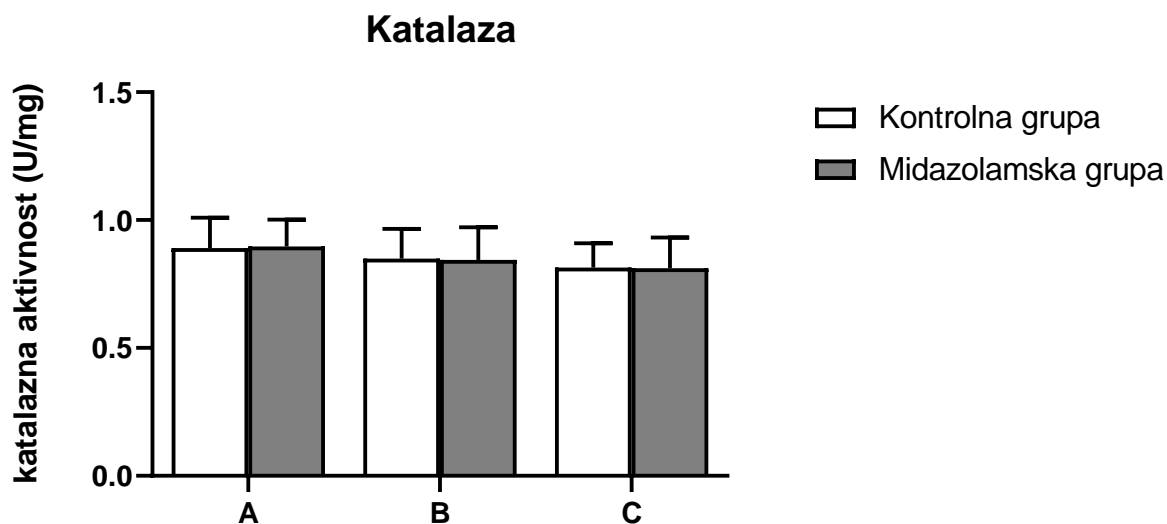
Slika 12. Razina katalaze u kontrolnoj grupi u tri vremenske točke: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući, * statistički značajno A vs C, $p<0,05$

Isti trend kao i u kontrolnoj grupi uočljiv je i u midazolamskoj grupi, gdje je aktivnost katalaze statistički značajno snižena u trećoj mjernoj točki (C) ($p=0,0102$).



Slika 13. Aktivnost katalaze u midazolamskoj grupi u tri vremenske točke: A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući, * statistički značajno A vs C, $p<0,05$

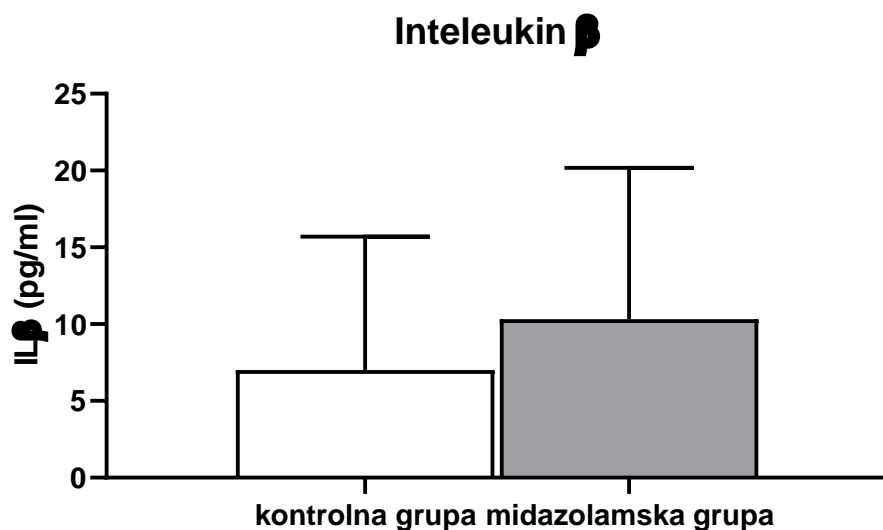
Između dvije grupe ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti katalaze ni u trendu ni u pojedinoj mjernoj točki.



Slika 14. Razina aktivnosti katalaze u punoj krvi. : A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući

4.6. Određivanje interleukina 1 β

Interleukin 1 β je određivan u folikularnoj tekućini midazolamske i kontrolne grupe. Rezultati su analizirani u odnosu jedan na drugi i prikazani grafički. Nije pronađena statistički značajna razlika između grupa (Slika 15.).



Slika 15. Razina interleukina β u folikularnoj tekućini u kontrolnoj i midazolamskoj grupi

4.7. Završni rezultat IVF postupka

Od ukupno 60 ispitanica, 11 je IVF postupka završilo trudnoćom, od čega osam u kontrolnoj skupini, a tri u midazolamskoj skupini. Iako je razlika u broju trudnoća velika, ona nije statistički značajna (Fisherov egzaktni test raspodjele frekvencija među grupama, $p = 0.1806$). Niti jedna trudnica nema u potpunosti uredan hormonalni status, što je očekivano zbog same činjenice da su pristupile postupku IVF-a, distribucija je raspoređena bez uočljivih razlika između midazolamske i kontrolne skupine.

Tablica 11. Razine ispitivanih hormona u ispitanica kod kojih je postupak IVF-a bio uspješan

	N	E	T	DHEA-S(s)	P	Prolaktin	TSH	AMH	FSH	LH
kontrola	9	5144 H			1.10 L					
	26									
	27	154	1.20	8.50 H		250	0.75	15.7 H	6.70	4.30
	28	157	1.73	6.98					6.62	15.6 H
	32	492	1.06	6.14	56.90	754 H	1.47	15.9 H	5.23	8.47
	41						1.87	9.3	6.10	4.00
	60	189					1.95	11.1 H	6.00	3.40
midazolam	47	169	1.20	5.77	1.10 L	172	1.48	56.2 H	5.90	8.70
	49	279	>0.4	5.23	46.30	309	2.34		7.30	6.10
	54	133			44.20	317	1.53	6.8	10.4	6.80

N - redni broj ispitanice; E – estradiol; T – testosteron; P – progesteron; H – povišena razina mjerenog parametra; L – snižena razina mjerenog parametra

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Neplodnost je jedan od sve većih problema današnjeg doba te obuhvaća 9% do 15% svjetske populacije fertile dobi [1]. Posljedično, medicina radi na razvoju metoda i postupaka kojim se ovaj problem rješava. Jedan od postupaka koji parovi suočeni s neplodnošću prolaze je umjetna oplodnja IVF (engl. *in vitro* fertilization) [2]. Postupak IVF sastoji se od nekoliko koraka, a jedan od njih je i aspiracija jajnih stanica. Samom postupku prethodi stimulacija ovarija kombinacijom različitih lijekova na proizvodnju jajnih stanica (oocita), a postupak se provodi pod kontrolom transvaginalnog ultrazvuka, pri čemu se jedna ili više oocita aspiriraju se iz sazrelog folikula. Kako je ovaj korak izuzetno važan korak u IVF postupku, i stres žena koje ga prolaze je izuzetno velik. Stoga je cilj ovog istraživanja bio proučiti utjecaj lijeka midazolama na razinu stresa prilikom postupka aspiracije jajnih stanica u sklopu medicinski pomognute oplodnje. Kako bi dokazali da su razlike koje smo dobili rezultat administracije midazolama, prvo smo dokazali da je administracija te tvari jedini faktor razlike između proučavanih grupa te da slučajnim odabirom nije došlo do statistički značajnih razlika između dvije grupe u faktorima koji su pokazani da utječu na ishod postupka. U skladu s time, bilježeni su svi dostupni hormonski statusi ispitanica za koje je poznato da mogu utjecati na plodnost. Isto tako, u obzir je uzet BMI ispitanica obaju ispitivanih grupa budući je od prije poznato da pretilost ima negativne efekte na plodnost. Kako bi pokazali da i po imunološkom statusu ispitanice midazolamske i kontrolne grupe nemaju statistički značajnih razlika izabran je interleukin 1 β kao bitan parametar. Hipoteza ovog istraživanja je bila da midazolam djeluje anksiolitički i sedacijski te bi se stoga mogao koristiti u premedikaciji za aspiraciju jajnih stanica u postupku IVF-a za smanjenje sistemskog stresa žena koje prolaze postupak. Smanjena količina sistemskog stresa žene rezultirala bi smanjenom razinom stresa u folikularnoj tekućini i time pozitivno djelovala na ishod IVF-a, odnosno bilo bi više uspješnih trudnoća. Kako bi se provjerila hipoteza, ispitala se statistička povezanost uzoraka uzorkovanih u tri vremenske točke, te među grupama u svakoj vremenskoj točki. Također, budući da su ispitanice raspoređivane po grupama nasumično, potrebno je bilo pokazati kako pri ovakvom raspoređivanju grupa nije došlo do značajne razlike između grupa u faktorima koji uzrokuju neplodnost te bi samim time moglo doći do lažnog pozitivnog ili negativnog rezultata s obzirom na ishod IVF postupka.

5.1. Utjecaj hormonskog statusa na plodnost

Hormoni koji se određuju prilikom dijagnosticiranja neplodnosti u žena su: estradiol, progesteron, testosteron, DHEA-s, prolaktin, TSH, anti-Mullerov hormon, LH i FSH. Svaki od navedenih hormona ima utjecaj na plodnost žene tako da je za istraživanje bilo važno pokazati da nema statistički značajne razlike između midazolamske i kontrolne grupe u razini hormona. Statističke analize pokazale su da se midazolamska i kontrolna grupa u ovom istraživanju značajno ne razlikuju po hormonskom statusu, te da su za svaki ispitivani hormon najvećim postotkom ispitanice bile normalnog hormonskog statusa i u midazolamskoj i u kontrolnoj grupi.

Estradiol je glavni ženski spolni hormon i njegov utjecaj na plodnost žene je neupitan. Tijekom menstrualnog ciklusa, razina estradiola raste te preko pozitivne povratne sprege dovodi do skokovitog porasta LH čime se izaziva ovulacija. U luteinskoj fazi, estradiol, zajedno sa progesteronom, priprema endometrij za implantaciju. Normalne vrijednosti ovog hormona kao i ciklički porast u određenoj fazi ciklusa neophodan je da bi došlo do začeća, što je potvrđeno brojnim istraživanjima [126]. Hormon estradiol u našem istraživanju ispitanicama je vađen u folikularnoj fazi ciklusa. Za hormon estradiol 46 ispitanica od 56 koje su imale izvađen nalaz imalo je normalnu vrijednost hormona estradiola. U kontrolnoj grupi 23 od 27 imale su normalnu razinu hormona i u midazolamskoj grupi 23 od 29 imale su normalnu razinu hormona, što pokazuje da se grupe statistički ne razlikuju u razini hormona estradiola.

Progesteron je hormon druge faze menstrualnog ciklusa, dan prije ovulacije poraste i od tada je njegovo lučenje povećano čime se priprema maternicu za implantaciju oplođene jajne stanice, zbog čega se progesteron ponekad naziva hormon trudnoće [127]. U našem istraživanju hormon progesteron je kod polovine ispitanica s poznatom vrijednošću hormona bio snižen (omjer snižen/normalan 18/20), što je očekivan rezultat s obzirom da je to hormon ovulacije, a u ispitivanje su bile uključene žene s problemima vezanim za plodnost. Ipak, najvažnije je da je i u midazolamskoj i u kontrolnoj grupi bio približno jednak broj ispitanica s normalnim i sniženim vrijednostima hormona progesterona (midazolam 8/10, kontrola 10/10) što pokazuje da nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa koja bi mogla utjecati na rezultat i broj trudnoća.

Hormon testosteron je muški spolni hormon i njegova povišena vrijednost u žena ukazuje na smanjenu plodnost. Sindrom policističnih jajnika je skup simptoma zbog povišenih androgena u žena [128]. U našem istraživanju hormon testosteron je u većine ispitanica koje su imale

izvađen nalaz bio normalne vrijednosti (45/46). Nije bilo statistički značajne razlike između grupa koja bi utjecala na rezultat.

DHEA-S je steroidni hormon koji nastaje u nadbubrežnoj žlijezdi iz kolesterola. Iako mu je androgena aktivnost slaba, treba znati da se DHEA-S može metabolizirati u androstendion i testosteron koji direktno uzrokuju hirzutizam i neplodnost u žena [129]. DHEA-s je u 34 ispitanice imao normalnu vrijednost od 38 poznatih razina hormona. Dakle, u većine je bio normalnih vrijednosti, od čega je 19 u midazolam grupi i 15 u kontrolnoj grupi imalo normalnu razinu hormona stoga nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa.

Hiperprolaktinemija je najčešći uzrok hipogonadotropne anovulacije i jedan je od vodećih uzroka neplodnosti u žena u dobi od 25-34 godine. Hiperprolaktinemija blokiraju ovulaciju inhibicijom otpuštanja GnRH-a [130]. U našem istraživanju hormona prolaktina 33/45 poznatih nalaza imalo je normalnu razinu hormona, 8/45 je imalo povišenu vrijednost hormona i 4/45 je imalo sniženu vrijednost hormona. Nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa u hormonskom statusu za hormon prolaktin.

TSH je hormon koji kod povišenja ukazuje na slabiju funkciju štitne žlijezde. Oslabljena funkcija štitne žlijezde uvelike otežava začecje tako da već kod malih povišenja TSH naglo se smanjuju šanse za trudnoću. Hipotireoza može utjecati na plodnost zbog utjecaja na druge hormonske sustave pa dolazi do: anovulacijskih ciklusa, oštećenja lutealne faze, inducirane hiperprolaktinemije i neravnoteže u stvaranju spolnih hormona [131]. Hormon TSH je u svih ispitanica koje su imale izvađen nalaz bio normalne vrijednosti (46/46). Nema statistički značajne razlike između grupa koja bi utjecala na rezultat.

AMH je važan jer ukazuje na rezervu jajnika i normalna vrijednost pokazuje da jajnik sadrži još uvijek dovoljan broj jajnih stanica potrebnih za oplodnju. AMH je dobar prediktor za odgovor jajnika u procesu IVF-a. Mjerenje AMH ipak treba biti samo dio obrade prije IVF-a jer samostalno nije dovoljan prediktor IVF uspjeha [132]. AMH je u našem istraživanju kod 39 ispitanica hormona bio povišenih vrijednosti (19 u midazolamskoj i 20 u kontrolnoj grupi), dok je kod 12 ispitanica bio normalnih vrijednosti (7 u midazolamskoj i 5 u kontrolnoj grupi). Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih grupa.

Važnost FSH u plodnosti je velika jer sudjeluje i u početnom stvaranju folikula i u stvaranju žutog tijela koje hormonski podržava započetu ranu trudnoću. Sa sniženim vrijednostima FSH smanjena je mogućnost stvaranja zrelih jajnih folikula i normalna ovulacija, a neadekvatna aktivnost žutog tijela dovodi da ranih abortusa [133]. Hormon FSH je u našem istraživanju u većine ispitanica koje su imale izvađen nalaz bio normalne vrijednosti (50/52). Nema statistički značajne razlike između grupa koja bi utjecala na rezultat. Sve trudnoće su bile unutar normalne razine hormona FSH.

Za potpuni rast i razvoj folikula, u vrijeme ovulacije, uz hormon FSH potrebno je i djelovanje LH hormona hipofize. Naime, upravo porastom LH provocira se ovulacija u ženskom menstrualnom ciklusu [134]. Isto tako, za funkcioniranje žutog tijela potreban je zajednički utjecaj FSH i LH. U većine ispitanica koje su imale određen LH nalaz je bio normalne vrijednosti (48/52). Nema statistički značajne razlike između grupa koja bi utjecala na rezultat. Također, sve trudnoće bile su unutar normalne razine hormona LH.

5.2. Utjecaj BMI-a na plodnost

Neplodnost izazvana debljinom često je povezana s promjenama u sintezi i aktivnosti hormona [135]. Estrogen, hormon koji igra glavnu ulogu u plodnosti žena nastaje na dva mjesta u organizmu – u jajnicima i skladišnom masnom tkivu [136]. Visoke ili niske razine masnog tkiva te sklonost gomilanju masnog tkiva oko struka utječu na sintezu estrogena [136]. Te promjene u stvaranju estrogena mogu biti uzrokom trajne ili privremene neplodnosti, budući da uzrokuju poremećaj menstrualnog ciklusa ili izostanak ovulacije. Količina i smještaj tjelesnih zaliha masti također može utjecati na stvaranje drugih reproduktivnih hormona te tako povećati rizik od neplodnosti i spontanog pobačaja [135,136]. Brojne su znanstvene studije dokazale da normalizacija udjela tjelesne masti utječe na uravnoteženje razina reproduktivnih hormona i bolju plodnost [135,136]. Žene normalne tjelesne mase lakše ostvaruju trudnoću. Analizom prikupljenih podataka u istraživanju dokazali smo da nema statistički značajne razlike između midazolamske i kontrolne grupe u BMI vrijednosti. U našem istraživanju većina ispitanica je bila unutar normalnog BMI-a. 20/30 u midazolamskoj grupi i 24/30 u kontrolnoj grupi. Potvrdili smo i od prije poznat podatak da žena s normalnim BMI lakše ostaje trudna (7/11 trudnoća je imalo normalan BMI). Od ukupno 11 trudnoća u našem istraživanju samo jedna ima BMI veći od 32.4 što je prema definiciji pretilost.

5.3. Utjecaj midazolama na oksidacijske i antioksidacijske parametre u plazmi ispitanica

Oksidacijski stres je pomak ravnoteže u oksidacijsko - redukcijskim procesima prema oksidaciji [90]. Kako bi spriječile oštećenja proteina, lipida i DNA nastala djelovanjem oksidacijskog stresa, stanice aktiviraju sustave enzimskih i neenzimskih obrambenih mehanizama. Utvrđeno je da oksidacijski stres može oštetiti jajne stanice i može narušiti njihov kapacitet plodnosti [137]. Također, prekomjerna proizvodnja ROS-a ima značajan utjecaj na uspješnost IVF-a [137]. Novija istraživanja koje se odnose na patološke karakteristike endometrioze otkrile su da oksidacijski stres olakšava implantaciju ektopičnog endometrija, a ektopični endometrij producira ROS čime se stvara začarani krug širenja endometrioze i jačanja neplodnosti u žene [138]. Budući da je kod zdravih ljudi proizvodnja ROS-a u ravnoteži s antioksidacijskim sustavom stanica, pri čemu stanice mogu bez posljedica detoksificirati određenu mjeru prekomjerno stvorenih ROS, cilj je bio ispitati ukupni oksidacijski i antioksidacijski kapacitet (TOC i TAC) u ispitanica koje prolaze postupak aspiracije jajnih stanica.

U ovom istraživanju koristili smo TOC i TAC u plazmi ispitanica kao markere stresnog odgovora. TOC mjeri ukupne perokside u plazmi, dok TAC mjeri ukupni antioksidacijski kapacitet plazme. Kako bi vidjeli dolazi li do iscrpljivanja pojedinih komponenti antioksidacijskog sustava, u istraživanje smo uključili i glutation i katalazu kao dijelove antioksidacijske zaštite koji mogu ukazati na aktiviranu obranu organizma od oksidacijskog stresa. Glutation je tripeptid koji sam po sebi djeluje kao antioksidans, ali je i dio glutationskog enzimatskog sustava koji znatno ubrzava antioksidacijsko djelovanje glutaciona. S druge strane, katalaza u potpunosti neutralizira vodikov peroksid do vode i molekule kisika. Njena važnost leži u činjenici da je katalaza enzim s jednim od najvećih obrtnih brojeva [97], što ju čini izuzetno efikasnom u detoksifikaciji vodikovog peroksida. Potrebno je naglasiti kako su glutation i katalaza mjereni iz pune krvi, čime se prvenstveno mjeri njihova razina i aktivnost u eritrocitima.

Jedan od lijekova izbora za smanjenje anksioznosti, i time psihičkog stresa je midazolam. Midazolam kao lijek iz grupe benzodiazepina, smanjuje podražljivost neurona preko povećanja učinkovitosti moždanog neurotransmitera GABA-e te na taj način uzrokuje anksiolizu i sedaciju [84]. Naša pretpostavka je bila da će administracija lijeka koji od prije poznato uzrokuje sedaciju i anksiolizu dovesti do smanjenja stresa kod ispitanica što će se očitovati sniženjem TOC-a i povišenjem TAC-a u plazmi ispitanica koje su ga dobile u odnosu na ispitanice koje nisu dobile lijek.

Kako bi odredili utjecaj midazolama na stres u ispitanica koje prolaze postupak aspiracije jajnih stanica koristili smo plazmu uzorkovanu u tri vremenske točke: 45 minuta prije zahvata, neposredno nakon zahvata i 2 sata nakon zahvata. Ove vremenske točke odabrane su kako bismo pratili stanje u glavnim točkama krivulje farmakokinetike administriranog lijeka te tako mogli dobiti uvid u stanje stresnog odgovora plazme ispitanica prije administracije lijeka, kod maksimalnog učinka midazolama (45 minuta nakon uzimanja lijeka), te nakon prestanka učinka midazolama (2 sata nakon uzimanja lijeka). Farmakokinetika midazolama uklopljena je u medicinski protokol postupka aspiracije jajnih stanica. Prva vremenska točka, prije nego su ispitanice dobile lijek služi kao kontrolna. Usporedbom grupa u prvoj vremenskoj točki kontrolirali smo uniformnost stresnog odgovora midazolamske i kontrolne grupe prije administracije midazolama. Druga vremenska točka pokazala nam je koliko midazolam kod svog maksimalnog učinka utječe na stresni odgovor u plazmi ispitanica. Treća vremenska točka pokazala nam je postoji li ostatni učinak na stresni odgovor u plazmi ispitanica nakon što midazolam prestane djelovati.

Prvi cilj bio je ispitati dolazi li do povećanja parametara stresa tijekom postupka i utječe li administracija midazolamom na njegovo smanjenje. U tu smo svrhu analizirali ukupne perokside plazme (TOC), te smo usporedili razine TOC-a u svakoj grupi u tri vremenske točke, a zatim i grupe međusobno. Iako se uočava trend pada ukupnih peroksida u plazmi u obje grupe, ovaj pad nije statistički značajan. Također, nema značajne razlike među grupama u niti jednoj mjerenoj točki, a početne razine ukupnih peroksida među grupama su jednake. Iz ovoga možemo zaključiti kako se grupe početno ne razlikuju, a tretman midazolamom ne djeluje na ukupne perokside u krvi.

Ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) je analiziran na isti način, u tri vremenske točke i usporedbom grupa. U prvoj vremenskoj točki nismo dobili značajnu razliku između grupa, čime se potvrđuje da se grupe međusobno ne razlikuju. Kontrolna grupa je pokazala statistički značajan porast TAC-a u trećoj vremenskoj točki. Ovaj trend prati i midazolamska grupa iako nije statistički značajan. Usporedbom dviju grupa dobili smo da nema razlike u mjernim točkama.

Nadalje, glutation je praćen u plazmi ispitanica kao jedan od najvažnijih komponenti antioksidacijskog sustava stanice. Kao i TOC i TAC i glutation je analiziran u tri vremenske točke, za obje grupe i midazolamsku i kontrolnu, te je zatim uspoređena njegova razina između grupa. Prije administracije lijeka obje su grupe bile uniformne prema razini glutaciona u plazmi. U kontrolnoj grupi vidi se statistički značajan pad razine glutaciona u plazmi u drugoj vremenskoj točki. Nasuprot tome u midazolamskoj grupi nema statistički značajnog pada razine glutaciona u plazmi. Usporedbom dvaju grupa pokazalo se da je kontrolna grupa imala

značajniji pad razine glutationa u plazmi u odnosu na midazolamsku grupu, ali razlika nije statistički značajna. Rezultati analize glutationa ukazuju na to da je kontrolna grupa imala povećanu potrošnju glutationa, odnosno veću potrebu za kompenzacijom stresa.

Posljednje je analizirana aktivnost katalaze, antioksidacijskog enzima koji detoksificira i neutralizira vodikov peroksid. Katalaza je analizirana iz pune krvi, što znači da je analizirana prvenstveno katalaza iz eritrocita. Kao i kod ostalih parametara, katalaza je analizirana u obje grupe, u tri vremenske točke te su uspoređeni trendovi unutar i između grupa. Aktivnost katalaze statistički se značajno smanjila u trećoj vremenskoj točki u obje grupe. Međutim, usporedbom grupa nije pronađena statistički značajna razlika između njih. Statistička analiza katalaze pokazala je da nema razlika među grupama prije administracije lijeka i da midazolam nije utjecao na razliku u odgovoru katalaze na postupak aspiracije jajnih stanica. Katalaza je antioksidacijski enzim i stoga ne čudi njezin pad tokom postupka zbog povećane potrošnje u kompenzaciji stresa.

5.4. Utjecaj midazolama na status folikularne tekućine

Dosadašnji radovi pokazali su da je ukupna razina glutationa u folikularnoj tekućini bila niža u bolesnica koji su imale nisku stopu plodnosti [139]. Radovi su pokazali i da su razine lipidne peroksidaze i TAC-a u folikularnoj tekućini bile u pozitivnoj korelaciji sa stopom trudnoće [140].

Naša pretpostavka je bila da će administracija lijeka midazolama koji od prije poznato uzrokuje sedaciju i anksiolizu dovesti do povišenja TAC-a i sniženja TOC-a u folikularnoj tekućini u midazolamskoj grupi u odnosu na kontrolnu.

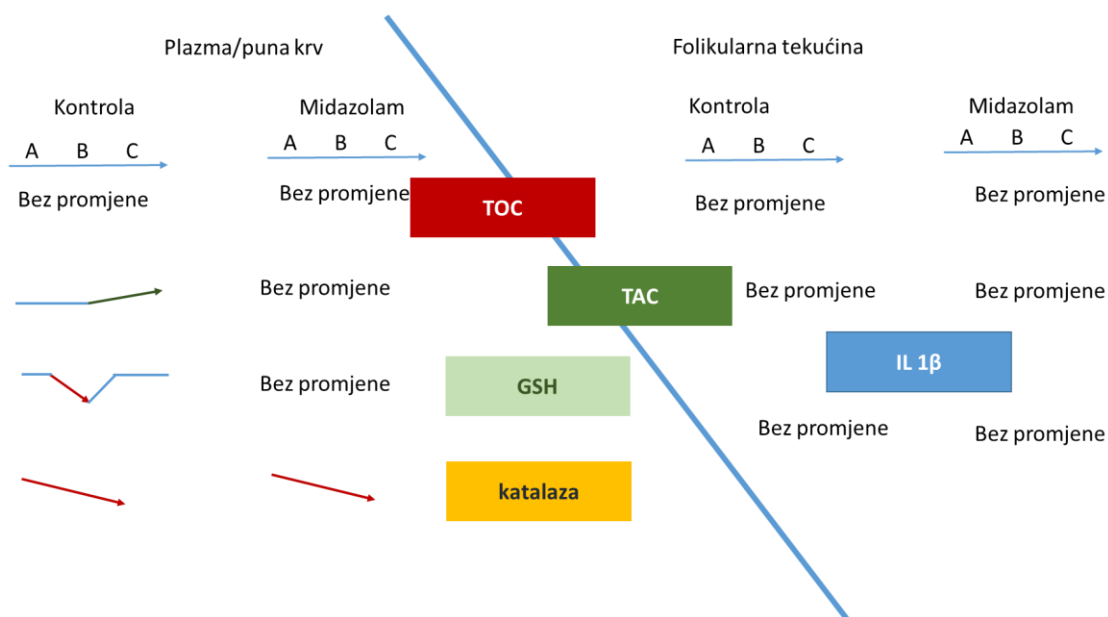
Analizom rezultata TOC-a folikularne tekućine vidi se da je midazolamska grupa imala niži TOC u odnosu na kontrolnu grupu iako ne statistički značajno. Mjerenje TAC u folikularnoj tekućini nije bilo moguće zbog izrazito visokog antioksidacijskog kapaciteta folikularne tekućine, čime su unatoč prilagođavnaju metode, vrijednosti bile neusporedivo više nego u baždarnoj krivulji.

Literaturni podaci upućuju na činjenicu da imunološki status uvelike pridonosi plodnosti i da kod procesa medicinski pomognute oplodnje određeni imunološki status folikularne tekućine može značajno pridonijeti uspjehu postupka. Zbog te činjenice izabran je interleukin 1 β kao promatrani parametar koji će nam ukazati postoji li statistički značajna razlika između midazolamske i kontrolne grupe u imunološkom statusu folikularne tekućine ispitanica.

Interleukin 1 β je citokin poznat još i pod nazivom endogeni pirogen ili leukocitni pirogen. Stvaraju ga aktivirani makrofazi i važan je medijator upalnog odgovora [141]. Prvenstveno potiče proliferaciju i diferencijaciju upalnih stanica [142], a smatra se da utječe i na hipersenzitivnost kod upale preko djelovanja na neurone. Dokazana je i njegova uloga u razvoju autoimunih bolesti u suradnji s drugim interleukinima [143]. Proučava se njegova uloga u dijabetesu, pretilosti, aterosklerozi i Alzheimerovoj bolesti [144]. Za naše istraživanje najvažnija je uloga interleukina 1 β na plodnost u žena. Postoji imunološka teorija da je ovulacija zapravo imunološka reakcija te je dokazano da interleukin 1 β sudjeluje u indukciji ovulacije olakšavanjem ruptura folikula [25]. Novija istraživanja pokazala su da se citokini sintetiziraju u velikom broju neimunih stanica, uključujući normalne stanice jajnika [25]. Pronađene su niže vrijednosti interleukina 1 β u slučaju neplodnosti što bi moglo biti povezano s oštećenjem folikula [26]. Analizom dobivenih rezultata vrijednosti interleukin 1 β iz folikularne tekućine ispitanica u istraživanju pokazalo se da midazolamska grupa ima viši interleukin 1 β u odnosu na kontrolnu grupu iako ne statistički značajno.

5.5. Utjecaj midazolama prilikom postupka aspiracije jajnih stanica na uspješnost postupka medicinski pomognute oplodnje

Kako bi se dobio bolji uvid u rezultate te ih se povezano s ishodom IVF postupka, shematski prikaz rezultata prikazan je na slici 16. Praćenje ishoda postupka IVF tijekom kojeg je bila izvedena aspiracija jajnih stanica rezultirala je većim brojem trudnoća u kontrolnoj nego u midazolamskoj grupi (osam u kontrolnoj i tri u midazolamskoj) iako ova razlika nije statistički značajna. Ovim rezultatom nije potvrđena hipoteza o pozitivnom učinku midazolama. Hipoteza također nije potvrđena niti na biokemijskoj razini. Pozitivan učinak midazolama očitovao se u smanjenju psihičkog stresa tijekom postupka ispitanica koji se očitovao u smanjenoj anksioznosti tijekom postupka. Na biokemijskoj razini, rezultati ukazuju na lagani pad TOC-a koji je, iako nije statistički značajan, mogao biti rezultat aktivacije pojedinih dijelova antioksidacijske zaštite (zabilježeno je smanjenje glutaciona i katalaze uz porast TAC-a) tijekom postupka aspiracije jajnih stanica.



Slika 16. Sažeti prikaz rezultata u kontrolnoj i midazolamskoj grupi. A - uzorak uzet kod dolaska u bolnicu, 45 minuta prije zahvata, (kada midazolamskoj grupi još nije administriran lijek), B – posredno nakon zahvata (45 min nakon administracije midazolama) i C - 2 sata nakon zahvata, neposredno prije otpuštanja ispitanica kući; TOC – ukupni oksidacijski kapacitet plazme; TAC – ukupni anitoksidacijski kapacitet plazme; GSH – glutation; IL 1β – interleukin 1β; zelena strelica – pozitivni trend, crvene strelice – negativni trendovi

Interesantno, antioksidacijska zaštita značajno se aktivirala u kontrolnoj grupi, što nije dobiveno za midazolamsku grupu te smatramo da je mogla doprinijeti većem broju trudnoća u kontrolnoj grupi. Naime, analiza broja trudnoća pokazala je da imamo suprotan rezultat od očekivanog, ima više trudnoća u kontrolnoj nego u midazolamskoj grupi, no ova razlika nije statistički značajna. Stoga se ne može zaključiti da midazolam negativno utječe na rezultate IVF-a jer smatramo da je premalen broj pozitivnog ishoda trudnoća u midazolamskoj grupi. Ipak, možemo zaključiti da primjena midazolama ne djeluje pozitivno na ishod IVF-a. Iako midazolam smanjuje stresni emocionalni doživljaj postupka kod ispitanica na biokemijskoj razini ne utječe na stresni odgovor organizma. Ovaj kontroverzni završni rezultat dokaz je da su procesi ljudske oplodnje, a time i medicinski pomognute oplodnje još uvijek nedovoljno istraženi i da su potrebna daljnja istraživanja na tom području. Do danas u literaturi nije zabilježeno istraživanje utjecaja sedacijskog lijeka na uspješnost medicinski pomognute

oplodnje pa nismo mogli usporediti dobivene rezultate u našem istraživanju s drugim dobivenim rezultatima.

Naš rezultat temelji se na 60 ispitanica. Od sveukupno 60 ispitanica trudnoća je započela u njih 11 što je uspješnost postupka od 20%. Analiza frekvencija trudnoća po pojedinoj skupini ne odstupa od prosjeka te nije statistički značajna. Ovaj rezultat je uobičajen i unutar europskih i svjetskih vrijednosti jer od ukupnoga broja IVF/ICSI postupaka uspješnost u Europi iznosi 15%-25% [1].

Od 11 trudnoća deset je završilo rađanjem djeteta dok je jedna prekinuta u ranoj fazi trudnoće jer je bila vanmaternična. Konačno, naši rezultati ne potvrđuju pozitivan učinak administracije midazolama tijekom postupka aspiracije jajnih stanica, iako smanjuje psihički stres kod ispitanica. Međutim, iako je manji broj trudnoća u midazolamskoj skupini ne može se sa sigurnošću potvrditi negativni učinak administracije midazolama tijekom aspiracije jajnih stanica te bi veličina grupe od 60 ispitanica trebala biti proširena kako bi se naš dobiveni rezultat potvrdio.

6.ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

1. Kontrolna i midazolamska grupa uniformne su s obzirom na razinu hormona te s obzirom na BMI ispitanica.
2. Grupe se statistički značajno ne razlikuju u prvoj vremenskoj točki niti po razini TOC-a, niti TAC-a, niti glutaciona, niti katalaze, što je potvrda uniformnosti grupa prema ulaznim parametrima stresa.
3. TOC nije pokazao statistički značajnu promjenu kroz tri vremenske točke niti u midazolamskoj niti u kontrolnoj grupi te se grupe statistički ne razlikuju u razini TOC-a u niti jednoj vremenskoj točki.
4. TAC je pokazao statistički značajan porast u trećoj vremenskoj točki u kontrolnoj grupi, koji nije opažen u midazolamskoj grupi.
5. Glutacion je pokazao statistički značajan pad u drugoj vremenskoj točki u kontrolnoj grupi, dok u midazolamskoj grupi nema statistički značajne promjene kroz tri vremenske točke iako graf pokazuje tendenciju pada.
6. Katalaza je pokazala statistički značajan pad i u kontrolnoj i u midazolamskoj grupi u trećoj vremenskoj točki.
7. TOC folikularne tekućine je pokazao je da je midazolamska grupa imala niži TOC od kontrolne, iako ne statistički značajno.
8. Mjerenje TAC u folikularnoj tekućini nije bilo moguće zbog izrazito visokog antioksidacijskog kapaciteta.
9. Midazolamska grupa ima trend povišenja IL 1 β u folikularnoj tekućini u odnosu na kontrolnu grupu iako nije statistički značajno.
10. Od ukupnog broja trudnoća (11), njih 8 (73%) je u kontrolnoj grupi i 3 (27%) u midazolamskoj grupi, što nije statistički značajno.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- [1] J. Boivin, L. Bunting, J.A. Collins, K.G. Nygren, International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care., *Hum. Reprod.* 22 (2007) 1506–12. doi:10.1093/humrep/dem046.
- [2] P. Amato, J. Daar, L. Francis, S. Klipstein, D. Ball, P. Rinaudo, A. Rajovic, M. Palmore, S. Tipton, C. Coutifaris, R. Reindollar, S. Gitlin, L. Collins, J. Davis, O. Davis, E. Gates, E. Ginsburg, L. McCullough, R. Paulson, G. Ryan, M. Sauer, L. Westphal, J. Zweifel, Ethics in embryo research: a position statement by the ASRM Ethics in Embryo Research Task Force and the ASRM Ethics Committee, *Fertil. Steril.* 113 (2020) 270–294. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.10.012.
- [3] R.J. Paulson, M. V. Sauer, R.A. Lobo, Reprint of: In vitro fertilization in unstimulated cycles: a new application, *Fertil. Steril.* 112 (2019) e207–e208. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.08.093.
- [4] E. Leushuis, J.W. van der Steeg, P. Steures, P.M.M. Bossuyt, M.J.C. Eijkemans, F. van der Veen, B.W.J. Mol, P.G.A. Hompes, Prediction models in reproductive medicine: a critical appraisal†, *Hum. Reprod. Update.* 15 (2009) 537–552. doi:10.1093/humupd/dmp013.
- [5] R.S. Mandelbaum, M.A. Ciccone, D.J. Nusbaum, M. Khoshchereh, H. Purswani, E.B. Morocco, M.B. Smith, S. Matsuzaki, C.E. Dancz, B. Ozel, L.D. Roman, R.J. Paulson, K. Matsuo, Progesterin therapy for obese women with complex atypical hyperplasia: levonorgestrel-releasing intrauterine device vs systemic therapy, *Am. J. Obstet. Gynecol.* (2020). doi:10.1016/j.ajog.2019.12.273.
- [6] J. Boivin, E. Griffiths, C.A. Venetis, Emotional distress in infertile women and failure of assisted reproductive technologies: meta-analysis of prospective psychosocial studies, *BMJ.* 342 (2011) d223–d223. doi:10.1136/bmj.d223.
- [7] J.M.J. Smeenk, C.M. Verhaak, A.J.J.M. Vingerhoets, C.G.J. Sweep, J.M.W.M. Merkus, S.J. Willemsen, A. van Minnen, H. Straatman, D.D.M. Braat, Stress and outcome success in IVF: the role of self-reports and endocrine variables, *Hum. Reprod.* 20 (2005) 991–996. doi:10.1093/humrep/deh739.
- [8] H. Klonoff-Cohen, E. Chu, L. Natarajan, W. Sieber, A prospective study of stress among women undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer, *Fertil.*

- Steril. 76 (2001) 675–687. doi:10.1016/s0015-0282(01)02008-8.
- [9] K. Demyttenaere, P. Nijs, G. Evers-Kiebooms, P.R. Koninckx, Coping, ineffectiveness of coping and the psychoendocrinological stress responses during in-vitro fertilization, *J. Psychosom. Res.* 35 (1991) 231–243. doi:10.1016/0022-3999(91)90077-2.
- [10] J. Boivin, J.E. Takefman, Stress level across stages of in vitro fertilization in subsequently pregnant and nonpregnant women*†, *Fertil. Steril.* 64 (1995) 802–810. doi:10.1016/s0015-0282(16)57858-3.
- [11] G. Csemiczky, B.-M. Landgten, A. Collins, The influence of stress and state anxiety on the outcome of IVF-treatment: Psychological and endocrinological assessment of Swedish women entering IVF-treatment, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 79 (2000) 113–118. doi:10.1034/j.1600-0412.2000.079002113.x.
- [12] E.H.Y. Ng, Anxiolytic premedication reduces preoperative anxiety and pain during oocyte retrieval. A randomized double-blinded placebo-controlled trial, *Hum. Reprod.* 17 (2002) 1233–1238. doi:10.1093/humrep/17.5.1233.
- [13] Y. An, Z. Sun, L. Li, Y. Zhang, H. Ji, Relationship between psychological stress and reproductive outcome in women undergoing in vitro fertilization treatment: Psychological and neurohormonal assessment, *J. Assist. Reprod. Genet.* 30 (2012) 35–41. doi:10.1007/s10815-012-9904-x.
- [14] N. Hadimioglu, T. Aydogdu Titiz, L. Dosemeci, M. Erman, Comparison of various sedation regimens for transvaginal oocyte retrieval, *Fertil. Steril.* 78 (2002) 648–649. doi:10.1016/s0015-0282(02)03274-0.
- [15] E.N. Tola, The effect of anesthetic agents for oocyte pick-up on in vitro fertilization outcome: A retrospective study in a tertiary center., *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 58 (2019) 673–679. doi:10.1016/j.tjog.2019.07.016.
- [16] C. Casini, A tre anni dalla Legge 40/2004 sulla “procreazione medicalmente assistita” Un esame critico della relazione del Ministro della Salute, *Med. e Morale.* 56 (2007). doi:10.4081/mem.2007.311.
- [17] X.D. Zhang, J.X. Liu, W.W. Liu, Y. Gao, W. Han, S. Xiong, L.H. Wu, G.N. Huang, Time of insemination culture and outcomes of in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis, *Hum. Reprod. Update.* 19 (2013) 685–695. doi:10.1093/humupd/dmt036.
- [18] R.L. Cate, R.J. Mattaliano, C. Hession, R. Tizard, N.M. Farber, A. Cheung, E.G. Ninfa, A.Z. Frey, D.J. Gash, E.P. Chow, R.A. Fisher, J.M. Bertonis, G. Torres, B.P. Wallner,

- K.L. Ramachandran, R.C. Ragin, T.F. Manganaro, D.T. MacLaughlin, P.K. Donahoe, Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells, *Cell*. 45 (1986) 685–698. doi:10.1016/0092-8674(86)90783-x.
- [19] B. Tata, N.E.H. Mimouni, A.-L. Barbotin, S.A. Malone, A. Loyens, P. Pigny, D. Dewailly, S. Catteau-Jonard, I. Sundström-Poromaa, T.T. Piltonen, F. Dal Bello, C. Medana, V. Prevot, J. Clasadonte, P. Giacobini, Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood, *Nat. Med.* 24 (2018) 834–846. doi:10.1038/s41591-018-0035-5.
- [20] A.D. MOORADIAN, J.E. MORLEY, S.G. KORENMAN, Biological Actions of Androgens, *Endocr. Rev.* 8 (1987) 1–28. doi:10.1210/edrv-8-1-1.
- [21] K. Haller, C. Mathieu, K. Rull, K. Matt, M.C. Bene, R. Uibo, IgG, IgA and IgM Antibodies against FSH: Serological Markers of Pathogenic Autoimmunity or of Normal Immunoregulation?, *Am. J. Reprod. Immunol.* 54 (2005) 262–269. doi:10.1111/j.1600-0897.2005.00306.x.
- [22] K. Haller, A. Salumets, M. Grigorova, I. Talja, L. Salur, M.C. Béné, M. Laan, R. Uibo, Putative Predictors of Antibodies Against Follicle-Stimulating Hormone in Female Infertility: A Study Based on In Vitro Fertilization Patients, *Am. J. Reprod. Immunol.* 57 (2007) 193–200. doi:10.1111/j.1600-0897.2006.00462.x.
- [23] K. Reimand, I. Talja, K. Metsküla, Ü. Kadastik, K. Matt, R. Uibo, Autoantibody studies of female patients with reproductive failure, *J. Reprod. Immunol.* 51 (2001) 167–176. doi:10.1016/s0165-0378(01)00075-4.
- [24] M. Bedaiwy, A.Y. Shahin, A.M. AbulHassan, J.M. Goldberg, R.K. Sharma, A. Agarwal, T. Falcone, Differential expression of follicular fluid cytokines: relationship to subsequent pregnancy in IVF cycles, *Reprod. Biomed. Online.* 15 (2007) 321–325. doi:10.1016/s1472-6483(10)60346-x.
- [25] U. Buscher, Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction?, *Hum. Reprod.* 14 (1999) 162–166. doi:10.1093/humrep/14.1.162.
- [26] S. Vassiliadis, K. Relakis, A. Papageorgiou, I. Athanassakis, Endometriosis and Infertility: A Multi-cytokine Imbalance Versus Ovulation, Fertilization and Early Embryo Development, *Clin. Dev. Immunol.* 12 (2005) 125–129. doi:10.1080/17402520500125484.

- [27] S. Dar, T. Lazer, P.S. Shah, C.L. Librach, Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a systematic review and meta-analysis, *Hum. Reprod. Update.* 20 (2014) 439–448. doi:10.1093/humupd/dmu001.
- [28] M. Meseguer, I. Rubio, M. Cruz, N. Basile, J. Marcos, A. Requena, Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study, *Fertil. Steril.* 98 (2012) 1481–1489.e10. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.08.016.
- [29] C. Farquhar, J.R. Rishworth, J. Brown, W.L.D.M. Nelen, J. Marjoribanks, Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews, *Cochrane Database Syst. Rev.* (2015). doi:10.1002/14651858.cd010537.pub4.
- [30] V. Rebmann, M. Switala, I. Eue, H. Grosse-Wilde, Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study, *Hum. Reprod.* 25 (2010) 1691–1698. doi:10.1093/humrep/deq120.
- [31] R.Z. Gergely, C.M. DeUgarte, H. Danzer, M. Surrey, D. Hill, A.H. DeCherney, Three dimensional/four dimensional ultrasound-guided embryo transfer using the maximal implantation potential point, *Fertil. Steril.* 84 (2005) 500–503. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.01.141.
- [32] N. O'Flynn, Assessment and treatment for people with fertility problems: NICE guideline, *Br. J. Gen. Pract.* 64 (2013) 50–51. doi:10.3399/bjgp14x676609.
- [33] A. La Marca, S.K. Sunkara, Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice, *Hum. Reprod. Update.* 20 (2013) 124–140. doi:10.1093/humupd/dmt037.
- [34] E.M.E.W. Heijnen, M.J.C. Eijkemans, C. De Klerk, S. Polinder, N.G.M. Beckers, E.R. Klinkert, F.J. Broekmans, J. Passchier, E.R. Te Velde, N.S. Macklon, B.C.J.M. Fauser, A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial, *Lancet.* 369 (2007) 743–749. doi:10.1016/s0140-6736(07)60360-2.
- [35] B.C.J.M. Fauser, G. Nargund, A.N. Andersen, R. Norman, B. Tarlatzis, J. Boivin, W. Ledger, Mild ovarian stimulation for IVF: 10 years later, *Hum. Reprod.* 25 (2010) 2678–2684. doi:10.1093/humrep/deq247.
- [36] P. Humaidan, S. Kol, E. Papanikolaou, GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: time for a change of practice?, *Hum. Reprod. Update.* 17 (2011) 510–524. doi:10.1093/humupd/dmr008.
- [37] G. Trapani, C. Altomare, E. Sanna, G. Biggio, G. Liso, Propofol in Anesthesia.

- Mechanism of Action, Structure-Activity Relationships, and Drug Delivery, *Curr. Med. Chem.* 7 (2000) 249–271. doi:10.2174/0929867003375335.
- [38] Y. Kotani, M. Shimazawa, S. Yoshimura, T. Iwama, H. Hara, The Experimental and Clinical Pharmacology of Propofol, an Anesthetic Agent with Neuroprotective Properties, *CNS Neurosci. Ther.* 14 (2008) 95–106. doi:10.1111/j.1527-3458.2008.00043.x.
- [39] C. Vanlersberghe, F. Camu, Propofol, *Handb. Exp. Pharmacol.* (n.d.) 227–252. doi:10.1007/978-3-540-74806-9_11.
- [40] G. Trapani, A. Latrofa, M. Franco, C. Altomare, E. Sanna, M. Usala, G. Biggio, G. Liso, Propofol Analogues. Synthesis, Relationships between Structure and Affinity at GABAAReceptor in Rat Brain, and Differential Electrophysiological Profile at Recombinant Human GABAAReceptors, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 1846–1854. doi:10.1021/jm970681h.
- [41] C.J. Fowler, Possible involvement of the endocannabinoid system in the actions of three clinically used drugs, *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (2004) 59–61. doi:10.1016/j.tips.2003.12.001.
- [42] U. Lee, G.A. Mashour, S. Kim, G.-J. Noh, B.-M. Choi, Propofol induction reduces the capacity for neural information integration: Implications for the mechanism of consciousness and general anesthesia, *Conscious. Cogn.* 18 (2009) 56–64. doi:10.1016/j.concog.2008.10.005.
- [43] P. Favetta, C.-S. Degoute, J.-P. Perdrix, C. Dufresne, R. Boulieu, J. Guitton, Propofol metabolites in man following propofol induction and maintenance, *Br. J. Anaesth.* 88 (2002) 653–658. doi:10.1093/bja/88.5.653.
- [44] R.A. Veselis, R.A. Reinsel, V.A. Feshchenko, M. Wronski, The Comparative Amnestic Effects of Midazolam, Propofol, Thiopental, and Fentanyl at Equisedative Concentrations, *Anesthesiology.* 87 (1997) 749–764. doi:10.1097/00000542-199710000-00007.
- [45] Comprehensive drug reference resource from the American Society of Health-System Pharmacists, *Pharm. J.* (2017). doi:10.1211/pj.2017.20202569.
- [46] J.R. Miner, J.H. Burton, Clinical Practice Advisory: Emergency Department Procedural Sedation With Propofol, *Ann. Emerg. Med.* 50 (2007) 182-187.e1. doi:10.1016/j.annemergmed.2006.12.017.
- [47] K.R. McQuaid, L. Laine, A systematic review and meta-analysis of randomized,

- controlled trials of moderate sedation for routine endoscopic procedures, *Gastrointest. Endosc.* 67 (2008) 910–923. doi:10.1016/j.gie.2007.12.046.
- [48] A.-M. Machata, H. Willschke, B. Kabon, S.C. Kettner, P. Marhofer, Propofol-based sedation regimen for infants and children undergoing ambulatory magnetic resonance imaging, *Br. J. Anaesth.* 101 (2008) 239–243. doi:10.1093/bja/aen153.
- [49] P.S. Sebel, J.D. Lowdon, Propofol, *Anesthesiology.* 71 (1989) 260–277. doi:10.1097/00000542-198908000-00015.
- [50] B.J. Robinson, T.J. Ebert, T.J. O'Brien, M.D. Colino, M. Muzi, Mechanisms whereby Propofol Mediates Peripheral Vasodilation in Humans, *Anesthesiology.* 86 (1997) 64–72. doi:10.1097/00000542-199701000-00010.
- [51] New Awakening in Anaesthesia— at a Price, *Lancet.* 329 (1987) 1469–1470. doi:10.1016/s0140-6736(87)92214-8.
- [52] G.E. Larijani, I. Gratz, M. Afshar, A.G. Jacobi, Clinical Pharmacology of Propofol: An Intravenous Anesthetic Agent, *DICP.* 23 (1989) 743–749. doi:10.1177/106002808902301001.
- [53] M.S. Langley, R.C. Heel, Propofol, *Drugs.* 35 (1988) 334–372. doi:10.2165/00003495-198835040-00002.
- [54] C.S. Reilly, W.S. Nimmo, New Intravenous Anaesthetics and Neuromuscular Blocking Drugs, *Drugs.* 34 (1987) 98–135. doi:10.2165/00003495-198734010-00004.
- [55] B.M. Schramm, B.A. Orser, Dystonic Reaction to Propofol Attenuated by Benztropine (Cogentin), *Anesth. Analg.* 94 (2002) 1237–1240. doi:10.1097/00000539-200205000-00034.
- [56] E. Kondili, C. Alexopoulou, N. Xirouchaki, D. Georgopoulos, Effects of propofol on sleep quality in mechanically ventilated critically ill patients: a physiological study, *Intensive Care Med.* 38 (2012) 1640–1646. doi:10.1007/s00134-012-2623-z.
- [57] B. Vasile, F. Rasulo, A. Candiani, N. Latronico, The pathophysiology of propofol infusion syndrome: a simple name for a complex syndrome, *Intensive Care Med.* 29 (2003) 1417–1425. doi:10.1007/s00134-003-1905-x.
- [58] R.G. Cox, U. Nemish, A. Ewen, M.-J. Crowe, Evidence-based clinical update: Does premedication with oral midazolam lead to improved behavioural outcomes in children?, *Can. J. Anesth. Can. d'anesthésie.* 53 (2006) 1213–1219. doi:10.1007/bf03021583.

- [59] S. DAHMANI, C. BRASHER, I. STANY, J. GOLMARD, A. SKHIRI, B. BRUNEAU, Y. NIVOCHÉ, I. CONSTANT, I. MURAT, Premedication with clonidine is superior to benzodiazepines. A meta analysis of published studies, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 54 (2010) 397–402. doi:10.1111/j.1399-6576.2009.02207.x.
- [60] S.M. Bartolomé, J.L.-H. Cid, N. Freddi, Analgesia and sedation in children: practical approach for the most frequent situations, *J. Pediatr. (Rio. J.)*. 83 (2007) 71–82. doi:10.2223/jped.1625.
- [61] H. Bergendahl, P.-A. Lonnqvist, S. Eksborg, Clonidine in paediatric anaesthesia: review of the literature and comparison with benzodiazepines for premedication, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 50 (2006) 135–143. doi:10.1111/j.1399-6576.2006.00940.x.
- [62] P. Bozkurt, Premedication of the pediatric patient – anesthesia for the uncooperative child, *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 20 (2007) 211–215. doi:10.1097/aco.0b013e328105e0dd.
- [63] M. Naguib, V. Gottumukkala, P.A. Goldstein, Melatonin and anesthesia: a clinical perspective, *J. Pineal Res.* 42 (2007) 12–21. doi:10.1111/j.1600-079x.2006.00384.x.
- [64] A. Manyande, A.M. Cyna, P. Yip, C. Chooi, P. Middleton, Non-pharmacological interventions for assisting the induction of anaesthesia in children, *Cochrane Database Syst. Rev.* (2015). doi:10.1002/14651858.cd006447.pub3.
- [65] U. RUDOLPH, H. MOHLER, GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions, *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 (2006) 18–23. doi:10.1016/j.coph.2005.10.003.
- [66] W. Hevers, H. Lüddens, The diversity of GABAA receptors, *Mol. Neurobiol.* 18 (1998) 35–86. doi:10.1007/bf02741459.
- [67] K.A. Wafford, A.J. Macaulay, R. Fradley, G.F. O’Meara, D.S. Reynolds, T.W. Rosahl, Differentiating the role of γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor subtypes, *Biochem. Soc. Trans.* 32 (2004) 553–556. doi:10.1042/bst0320553.
- [68] G.A.R. Johnston, GABAA receptor pharmacology, *Pharmacol. Ther.* 69 (1996) 173–198. doi:10.1016/0163-7258(95)02043-8.
- [69] E. Arvat, R. Giordano, S. Grottoli, E. Ghigo, Benzodiazepines and anterior pituitary function, *J. Endocrinol. Invest.* 25 (2002) 735–747. doi:10.1007/bf03345110.
- [70] F. Zavala, Benzodiazepines, anxiety and immunity, *Pharmacol. Ther.* 75 (1997) 199–216. doi:10.1016/s0163-7258(97)00055-7.

- [71] K.T. Olkkola, J. Ahonen, Midazolam and Other Benzodiazepines, *Handb. Exp. Pharmacol.* (n.d.) 335–360. doi:10.1007/978-3-540-74806-9_16.
- [72] T. Saias, T. Gallarda, Réactions d'agressivité sous benzodiazépines : une revue de la littérature, *Encephale*. 34 (2008) 330–336. doi:10.1016/j.encep.2007.05.005.
- [73] M. Lader, Effectiveness of benzodiazepines: do they work or not?, *Expert Rev. Neurother.* 8 (2008) 1189–1191. doi:10.1586/14737175.8.8.1189.
- [74] M. Lader, A. Tylee, J. Donoghue, Withdrawing Benzodiazepines in Primary Care, *CNS Drugs*. 23 (2009) 19–34. doi:10.2165/0023210-200923010-00002.
- [75] R. Penninkilampi, G.D. Eslick, A Systematic Review and Meta-Analysis of the Risk of Dementia Associated with Benzodiazepine Use, After Controlling for Protopathic Bias, *CNS Drugs*. 32 (2018) 485–497. doi:10.1007/s40263-018-0535-3.
- [76] T.J. Dodds, Prescribed Benzodiazepines and Suicide Risk, *Prim. Care Companion CNS Disord.* 19 (2017). doi:10.4088/pcc.16r02037.
- [77] Benzocaine, Meyler's Side Eff. *Drugs Int. Encycl. Advers. Drug React. Interact.* (2006) 427–429. doi:10.1016/b0-44-451005-2/00212-6.
- [78] American Geriatrics Society 2015 Updated Beers Criteria for Potentially Inappropriate Medication Use in Older Adults, *J. Am. Geriatr. Soc.* 63 (2015) 2227–2246. doi:10.1111/jgs.13702.
- [79] J. Michel, M. Hofbeck, A.K. Peper, M. Kumpf, F. Neunhoeffler, Evaluation of an updated sedation protocol to reduce benzodiazepines in a pediatric intensive care unit, *Curr. Med. Res. Opin.* 36 (2020) 1–6. doi:10.1080/03007995.2019.1663689.
- [80] S.D. Shorvon, Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The second 50 years, 1959-2009, *Epilepsia*. 50 (2009) 93–130. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02042.x.
- [81] F. Brigo, R. Nardone, F. Tezzon, E. Trinka, Nonintravenous midazolam versus intravenous or rectal diazepam for the treatment of early status epilepticus: A systematic review with meta-analysis, *Epilepsy Behav.* 49 (2015) 325–336. doi:10.1016/j.yebeh.2015.02.030.
- [82] B.F. Hoffman, G. Shugar, Benzodiazepines: uses and abuses., *Can. Fam. Physician*. 28 (1982) 1630–9.
- [83] J.G. Reves, G. Corssen, C. Holcomb, Comparison of two benzodiazepines for anaesthesia induction: midazolam and diazepam, *Can. Anaesth. Soc. J.* 25 (1978)

- 211–214. doi:10.1007/BF03004881.
- [84] P. Heizmann, M. Eckert, W.H. Ziegler, Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 16 (1983) 43S-49S. doi:10.1111/j.1365-2125.1983.tb02270.x.
- [85] J.G. Reves, R.J. Fragen, H.R. Vinik, D.J. Greenblatt, Midazolam, *Anesthesiology.* 62 (1985) 310–324. doi:10.1097/00000542-198503000-00017.
- [86] C.M. Schwartz, K. Honsinger, B.A. Fischer, C.A. Elmaraghy, Evaluation of the effect of pre-operative oral midazolam on post-operative oral fluid intake after tonsillectomy., *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 113 (2018) 248–251. doi:10.1016/j.ijporl.2018.08.011.
- [87] D.F. Kawano, J. Ueta, A.K. Sankarankutty, L.R.L. Pereira, O. de Freitas, Midazolam-Related Drug Interactions, *J. Patient Saf.* 5 (2009) 69–74. doi:10.1097/pts.0b013e3181a5dafa.
- [88] D. Rastegar, M. Fingerhood, *The American Society of Addiction Medicine Handbook of Addiction Medicine*, Oxford University Press, 2015. doi:10.1093/med/9780190214647.001.0001.
- [89] D. Warriner, *Davidson's Principles and Practices of Medicine (21st edn)* Davidson's Principles and Practices of Medicine (21st edn) Edited by Nicki R Colledge, Brian R Walker, Stuart H Ralston Churchill Livingstone Elsevier 2010 Price £46.99. Pp 1376 ISBN 978 0 7020 30, *Br. J. Hosp. Med.* 72 (2011) 117. doi:10.12968/hmed.2011.72.2.117.
- [90] H. Sies, *Biochemistry of Oxidative Stress*, *Angew. Chemie Int. Ed. English.* 25 (1986) 1058–1071. doi:10.1002/anie.198610581.
- [91] F. Guéraud, M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P.M.M. Eckl, L. Huc, I. Jouanin, W. Siems, K. Uchida, F. Gueraud, M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P.M.M. Eckl, L. Huc, F. Guéraud, I. Jouanin, W. Siems, K. Uchida, F.G.U.É. Raud, M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P.M.M. Eckl, L. Huc, I. Jouanin, W. Siems, K. Uchida, F. Gueraud, M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P.M.M. Eckl, L. Huc, F. Guéraud, I. Jouanin, W. Siems, K. Uchida, *Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products.*, *Free Radic. Res.* 44 (2010) 1098–124. doi:10.3109/10715762.2010.498477.
- [92] A. Augustyniak, G. Bartosz, A. Čipak, G. Duburs, L. Horáková, W. Łuczaj, M. Majekova, A.D. Odysseos, L. Rackova, E. Skrzydlewska, M. Stefek, M. Štrosová, G. Tirzitis, P.R.P.R. Venskutonis, J. Viskupicova, P.S.P.S. Vranka, N. Žarković, A. Cipak, G. Duburs, L. Horáková, W. Luczaj, M. Majekova, A.D. Odysseos, L. Rackova, E.

- Skrzydłewska, M. Stefek, M. Strosová, G. Tirzitis, P.R.P.R. Venskutonis, J. Viskupicova, P.S.P.S. Vranka, N. Zarković, Natural and synthetic antioxidants: an updated overview., *Free Radic. Res.* 44 (2010) 1216–62. doi:10.3109/10715762.2010.508495.
- [93] F. Johnson, C. Giulivi, Superoxide dismutases and their impact upon human health, *Mol. Aspects Med.* 26 (2005) 340–352. doi:10.1016/j.mam.2005.07.006.
- [94] L. Jiang, K. Yang, J. Tian, Q. Guan, N. Yao, N. Cao, D. Mi, J. Wu, B. Ma, S. Yang, Efficacy of Antioxidant Vitamins and Selenium Supplement in Prostate Cancer Prevention: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, *Nutr. Cancer.* 62 (2010) 719–727. doi:10.1080/01635581.2010.494335.
- [95] M. Zámocký, F. Koller, Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72 (1999) 19–66. doi:10.1016/s0079-6107(98)00058-3.
- [96] L.A. del Río, L.M. Sandalio, J. Palma, P. Bueno, F.J. Corpas, Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications, *Free Radic. Biol. Med.* 13 (1992) 557–580. doi:10.1016/0891-5849(92)90150-f.
- [97] M.K. Campbell, S.O. Farrell, *Biochemistry*, Brooks/Cole, Cengage Learning, 2012.
- [98] D.S. Goodsell, Catalase, RCSB Protein Data Bank. (2004). doi:10.2210/rcsb_pdb/mom_2004_9.
- [99] C.C. Winterbourn, A.J. Kettle, M.B. Hampton, Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function, *Annu. Rev. Biochem.* 85 (2016) 765–792. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014442.
- [100] R. Brigelius-Flohé, Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 951–965. doi:10.1016/s0891-5849(99)00173-2.
- [101] J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey, GLUTATHIONE TRANSFERASES, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 51–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
- [102] J. V Bannister, W.H. Bannister, G. Rotilio, Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase, *Crit. Rev. Biochem.* 22 (1987) 111–180. doi:10.3109/10409238709083738.
- [103] I.N. Zelko, T.J. Mariani, R.J. Folz, Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene

- structures, evolution, and expression, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 337–349. doi:10.1016/s0891-5849(02)00905-x.
- [104] J.H. Miller, Mutators in *Escherichia coli*, *Mutat. Res. Repair.* 409 (1998) 99–106. doi:10.1016/s0921-8777(98)00049-4.
- [105] S.S. Stahl, *Organotransition Metal Chemistry: From Bonding to Catalysis*
Organotransition Metal Chemistry: From Bonding to Catalysis . By John Hartwig (University of Illinois, Urbana-Champaign). University Science Books: Sausalito, CA. 2010. xxxii + 1128 pp. \$134.50. , *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 8524–8525. doi:10.1021/ja103695e.
- [106] P.A. Grimsrud, H. Xie, T.J. Griffin, D.A. Bernlohr, Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 21837–21841. doi:10.1074/jbc.r700019200.
- [107] L.J. Marnett, Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 424 (1999) 83–95. doi:10.1016/s0027-5107(99)00010-x.
- [108] D. Weber, L. Milkovic, S.J. Bennett, H.R. Griffiths, N. Zarkovic, T. Grune, Measurement of HNE-protein adducts in human plasma and serum by ELISA- Comparison of two primary antibodies., *Redox Biol.* 1 (2013) 226–33. doi:10.1016/j.redox.2013.01.012.
- [109] G. He, V. Kumar Kutala, P. Kuppusamy, J.L. Zweier, In vivo measurement and mapping of skin redox stress induced by ultraviolet light exposure, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 665–672. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.024.
- [110] S. Kaur, K. Zilmer, V. Leping, M. Zilmer, Serum methylglyoxal level and its association with oxidative stress and disease severity in patients with psoriasis, *Arch. Dermatol. Res.* 305 (2013) 489–494. doi:10.1007/s00403-013-1362-5.
- [111] A.A. Shah, A.A. Sinha, Oxidative stress and autoimmune skin disease, *Eur. J. Dermatology.* 23 (2013) 5–13. doi:10.1684/ejd.2012.1884.
- [112] D.G. Peroni, A. Bodini, M. Corradi, A. Coghi, A.L. Boner, G.L. Piacentini, Markers of oxidative stress are increased in exhaled breath condensates of children with atopic dermatitis, *Br. J. Dermatol.* 166 (2012) 839–843. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10771.x.
- [113] L.-E. Cassagnes, M. Chhour, P. Pério, J. Sudor, R. Gayon, G. Ferry, J.A. Boutin, F. Nepveu, K. Reybier, Oxidative stress and neurodegeneration: The possible contribution of quinone reductase 2., *Free Radic. Biol. Med.* 120 (2018) 56–61.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.002.

- [114] F. Hollis, A.K. Kanellopoulos, C. Bagni, Mitochondrial dysfunction in Autism Spectrum Disorder: clinical features and perspectives, *Curr. Opin. Neurobiol.* 45 (2017) 178–187. doi:10.1016/j.conb.2017.05.018.
- [115] L. Haider, M.T. Fischer, J.M. Frischer, J. Bauer, R. Hoftberger, G. Botond, H. Esterbauer, C.J. Binder, J.L. Witztum, H. Lassmann, Oxidative damage in multiple sclerosis lesions, *Brain*. 134 (2011) 1914–1924. doi:10.1093/brain/awr128.
- [116] M. Ramalingam, S.-J. Kim, Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases, *J. Neural Transm.* 119 (2012) 891–910. doi:10.1007/s00702-011-0758-7.
- [117] A. Uysal, E. Sahna, I.M. Ozguler, O. Burma, N. Ilhan, Effects of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, on levels of ADMA, MPO, iNOS and TLR4 induced by myocardial ischemia reperfusion, *Perfusion*. 30 (2014) 472–477. doi:10.1177/0267659114559260.
- [118] G. Özdemirler, G. Mehmetçik, S. Öztezcan, G. Toker, A. Sivas, M. Uysal, Peroxidation Potential and Antioxidant Activity of Serum in Patients with Diabetes Mellitus and Myocard Infarction, *Horm. Metab. Res.* 27 (1995) 194–196. doi:10.1055/s-2007-979938.
- [119] O. Handa, Y. Naito, T. Yoshikawa, Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of *Helicobacter pylori*, *Redox Rep.* 16 (2011) 1–7. doi:10.1179/174329211x12968219310756.
- [120] B. Halliwell, Oxidative stress and cancer: have we moved forward?, *Biochem. J.* 401 (2006) 1–11. doi:10.1042/bj20061131.
- [121] K. Mantzarlis, V. Tsolaki, E. Zakynthinos, Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017 (2017) 1–10. doi:10.1155/2017/5985209.
- [122] C.A. Prauchner, Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy, *Burns*. 43 (2017) 471–485. doi:10.1016/j.burns.2016.09.023.
- [123] A. Agarwal, S. Gupta, R.K. Sharma, No Title, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3 (2005) 28. doi:10.1186/1477-7827-3-28.
- [124] S. Dutta, A. Majzoub, A. Agarwal, Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management, *Arab J. Urol.* 17 (2019) 87–97. doi:10.1080/2090598x.2019.1599624.

- [125] M. Antoncic-Svetina, D. Sentija, A. Cipak, D. Milicic, A. Meinitzer, F. Tatzber, L. Andrisic, S. Zelzer, N. Zarkovic, Ergometry induces systemic oxidative stress in healthy human subjects., *Tohoku J. Exp. Med.* 221 (2010) 43–8. doi:10.1620/tjem.221.43.
- [126] L.M.A. Pinheiro, P. da S. Cândido, T.C. Moreto, W.G. Di Almeida, E.C. de Castro, Estradiol use in the luteal phase and its effects on pregnancy rates in IVF cycles with GnRH antagonist: a systematic review., *JBRA Assist. Reprod.* 21 (2017) 247–250. doi:10.5935/1518-0557.20170046.
- [127] S. Taraborrelli, Physiology, production and action of progesterone, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 94 (2015) 8–16. doi:10.1111/aogs.12771.
- [128] V. De Leo, M.C. Musacchio, V. Cappelli, M.G. Massaro, G. Morgante, F. Petraglia, Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: an update, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 14 (2016). doi:10.1186/s12958-016-0173-x.
- [129] Q. Mo, S. Lu, N.G. Simon, Dehydroepiandrosterone and its metabolites: Differential effects on androgen receptor trafficking and transcriptional activity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99 (2006) 50–58. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.11.011.
- [130] C. Sonigo, J. Bouilly, N. Carré, V. Tolle, A. Caraty, J. Tello, F.-J. Simony-Conesa, R. Millar, J. Young, N. Binart, Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 3791–3795. doi:10.1172/jci63937.
- [131] I. Verma, S. Juneja, R. Sood, S. Kaur, Prevalence of hypothyroidism in infertile women and evaluation of response of treatment for hypothyroidism on infertility, *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* 2 (2012) 17. doi:10.4103/2229-516x.96795.
- [132] C. Gnoth, A.N. Schuring, K. Friol, J. Tigges, P. Mallmann, E. Godehardt, Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program, *Hum. Reprod.* 23 (2008) 1359–1365. doi:10.1093/humrep/den108.
- [133] A. Ulloa-Aguirre, E. Reiter, P. Crépieux, FSH Receptor Signaling: Complexity of Interactions and Signal Diversity, *Endocrinology.* 159 (2018) 3020–3035. doi:10.1210/en.2018-00452.
- [134] D. Ezcurra, P. Humaidan, A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12 (2014) 95. doi:10.1186/1477-7827-12-95.
- [135] M. Al-Azemi, F.E. Omu, A.E. Omu, The effect of obesity on the outcome of infertility

- management in women with polycystic ovary syndrome, *Arch. Gynecol. Obstet.* 270 (2003) 205–210. doi:10.1007/s00404-003-0537-2.
- [136] R. Pasquali, Obesity, fat distribution and infertility, *Maturitas.* 54 (2006) 363–371. doi:10.1016/j.maturitas.2006.04.018.
- [137] J. Wojsiat, J. Korczyński, M. Borowiecka, H.M. Żbikowska, The role of oxidative stress in female infertility and in vitro fertilization, *Postepy Hig. Med. Dosw.* 71 (2017) 0. doi:10.5604/01.3001.0010.3820.
- [138] A. Harlev, S. Gupta, A. Agarwal, Targeting oxidative stress to treat endometriosis, *Expert Opin. Ther. Targets.* 19 (2015) 1447–1464. doi:10.1517/14728222.2015.1077226.
- [139] T. Nishihara, K. Matsumoto, Y. Hosoi, Y. Morimoto, Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in follicular fluid for human in vitro fertilization outcome, *Reprod. Med. Biol.* 17 (2018) 481–486. doi:10.1002/rmb2.12229.
- [140] E.B. Pasqualotto, A. Agarwal, R.K. Sharma, V.M. Izzo, J.A. Pinotti, N.J. Joshi, B.I. Rose, Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures, *Fertil. Steril.* 81 (2004) 973–976. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.11.021.
- [141] I. Gery, R.E. Handschumacher, Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens, *Cell. Immunol.* 11 (1974) 162–169. doi:10.1016/0008-8749(74)90016-1.
- [142] I. Gery, B.H. Waksman, POTENTIATION OF THE T-LYMPHOCYTE RESPONSE TO MITOGENS, *J. Exp. Med.* 136 (1972) 143–155. doi:10.1084/jem.136.1.143.
- [143] S.L. Masters, A. Simon, I. Aksentijevich, D.L. Kastner, Horror Autoinflammaticus: The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 621–668. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141627.
- [144] M.T. Heneka, Inflammasome activation and innate immunity in Alzheimer's disease, *Brain Pathol.* 27 (2017) 220–222. doi:10.1111/bpa.12483.

8. SAŽETAK

8. SAŽETAK

Neplodnost je jedan od značajnih medicinskih problema današnjice o čemu svjedoči podatak da obuhvaća 9% do 15% svjetske populacije fertile dobi. Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije neplodnost je izostanak trudnoće nakon 12 ili više mjeseci redovitih nezaštićenih odnosa, bez medicinskih intervencija. Jedan od medicinskih postupaka kojim se pristupa ovom problemu je umjetna oplodnja (IVF, od engl. *in vitro* fertilisation). Jedan od koraka u IVF postupku je aspiracija jajnih stanica iz jajnika žene. Tijekom postupka ženu se kratkotrajno uspava, za što se koristi kratkotrajna intravenska anestezija. Premedikacija je postupak koji se koristi u suvremenoj anesteziološkoj praksi i podrazumijeva primjenu lijekova pola sata prije početka anestezije u svrhu sedacije i anksiolize. Danas je najčešće u primjeni lijek midazolam. Do sada se prije postupka kratkotrajne anestezije za aspiraciju jajnih stanica nije koristila premedikacija. Budući su žene koje prolaze ovaj postupak pod izrazitim stresom, hipoteza ovog rada je da bi anksioliza u premedikaciji mogla utjecati na uspješnost samog postupka smanjenjem biokemijskih parametara stresa. Stoga su žene koje polaze IVF, odnosno specifično aspiraciju jajnih stanica, podjeljene u dvije grupe: grupu koja je dobila midazolam u premedikaciji tijekom postupka aspiracije jajnih stanica i kontrolnu grupu ispitanica kod kojih je učinjen postupak aspiracije jajnih stanica bez prethodne premedikacije. U istraživanju se ispitala razina oksidacijskog stresa kod ispitanica u plazmi, krvi i u folikularnoj tekućini njihovih jajnih stanica i u konačnici uspješnost postupka tj. broj trudnoća u ispitivanoj i kontrolnoj grupi. Rad nije potvrdio pozitivan učinak midazolama na biokemijske parametre, niti na pozitivan ishod postupka IVF. Na biokemijskoj razini rezultati ukazuju na lagani pad TOC-a koji bi, iako nije statistički značajan, mogao biti rezultat aktivacije pojedinih dijelova antioksidacijske zaštite (zabilježen je porast TAC-a, ali i smanjenje glutationa i katalaze, što bi ukazivalo na iscrpljivanje ovih elemenata sustava) tijekom postupka aspiracije jajnih stanica. Interesantno, antioksidacijska zaštita značajno se aktivirala u kontrolnoj grupi, što nije dobiveno za midazolamsku grupu te smatramo da je mogla doprinijeti većem broju trudnoća u kontrolnoj grupi. Naime, analiza broja trudnoća pokazala je da imamo suprotan rezultat od očekivanog, ima više trudnoća u kontrolnoj nego u midazolamskoj grupi, no ova razlika nije statistički značajna. Stoga se ne može zaključiti da midazolam negativno utječe na rezultate IVF-a. Ipak, možemo zaključiti da primjena midazolama ne djeluje pozitivno na ishod IVF-a. Iako midazolam smanjuje stresni emocionalni doživljaj postupka kod ispitanica na biokemijskoj razini ne utječe na stresni odgovor organizma. Ovaj kontroverzni završni rezultat dokaz je da su procesi ljudske oplodnje, a time i medicinski pomognute oplodnje još uvijek nedovoljno istraženi i da su potrebna daljnja istraživanja na tom području. Do danas nema u literaturi zabilježeno istraživanje utjecaja sedacijskog lijeka na uspješnost medicinski pomognute oplodnje pa nismo mogli usporediti dobivene rezultate u ovom istraživanju s drugim dobivenim rezultatima.

9. SUMMARY

9. SUMMARY

Infertility is one of the significant medical problems of modern society, as evidenced by the fact that it includes 9% to 15% of the world's population of fertile age. According to the World Health Organization definition, infertility is the absence of pregnancy after 12 or more months of regular and unprotected intercourse without medical interventions. One of the medical solutions for this problem is in vitro fertilisation (IVF). One of the steps in the IVF procedure is the aspiration of the oocytes from a woman's ovaries. During this procedure, woman is briefly put to sleep, for which short-term intravenous anaesthesia is used. Premedication is a procedure used in modern anaesthesiological practice and involves the use of drugs half an hour before the onset of anaesthesia for the purpose of sedation and anxiolysis. Today, midazolam is the most widely used for these purposes. Until now, premedication was not used before the short-term anaesthesia procedure for aspiration of the oocytes. As women who undergo this procedure are under extreme stress, the hypothesis of this research is that anxiolysis in premedication could affect the success of the procedure itself by reducing the biochemical parameters of stress. Therefore, women who undertake IVF, specifically aspiration of the oocytes, were divided into a group who received midazolam premedication during the egg aspiration process and the control group of women who had the aspiration procedure of the egg without prior premedication. The study examined the level of oxidative stress in subjects in plasma, whole blood and follicular fluid of their oocytes and ultimately the success of the procedure (number of pregnancies in the study and control group). The work did not confirm the positive effect of midazolam neither in biochemical parameters, nor in the positive outcome of IVF. At the biochemical level, the results indicate a slight decrease in TOC which, although not statistically significant, could have been the result of activation of certain parts of antioxidant protection (there was an increase in TAC, but also a decrease in glutathione and catalase) during aspiration procedure. Interestingly, the antioxidant protection was significantly activated in the control group, which was not obtained for the midazolam group and we speculate that it could have contributed to a higher number of pregnancies in the control group. In fact, analysis of the number of pregnancies showed that we have the opposite result than expected. There are more pregnancies in the control group than in the midazolam group, but this difference is not statistically significant. Therefore, it cannot be concluded that midazolam negatively affects IVF results. However, results indicate that the use of midazolam does not positively affect the outcome of IVF. Although midazolam reduces the stressful emotional experience of the procedure in the subjects, at the biochemical level does not affect the stress response of the organism. This controversial end result is evidence that human fertilisation processes and medically assisted fertilization are still underresearched and that further research in this area is needed. There has been no study of the effect of the sedation drug on the success of medically assisted fertilization in the literature, so we could not compare the results obtained in our study with other results.

10.ŽIVOTOPIS

10. ŽIVOTOPIS

Maja Pešić, dr. med., spec. anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja, rođena je 24. rujna 1980. godine u Zagrebu. Završila je osnovnu školu u Zagrebu, te Opću IX. gimnaziju u Zagrebu. Upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci 1999. godine, a diplomirala na istom 2006. godine. Obavezni liječnički pripravnički staž u trajanju od jedne godine završila je u Kliničkom bolničkom centru „Sestre Milosrdnice“ u Zagrebu. Godine 2007. započinje specijalizaciju iz Anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja na Zavodu za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje u KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu, a nakon položenog specijalističkog ispita u svibnju 2014. godine radi kao anesteziolog na Zavodu za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje u KBC Sestre milosrdnice. 2010. godine upisuje Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij „Molekularne bioznanosti“ na Sveučilištu Josip Juraj Strossmayer u Osijeku u suradnji sa Institutom Ruđer Bošković u Zagrebu i Sveučilištem u Dubrovniku. Autor je i koautor više postera i stručnih publikacija te je sudjelovala na raznim znanstvenim i stručnim skupovima. Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora te Hrvatskog društva za liječenje boli. Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom uz odlično znanje programskog paketa Microsoft Office. Posjeduje vozačku dozvolu B kategorije. Majka je dvoje djece.

11. POPIS RADOVA

11. POPIS RADOVA

1. Klican-Jaic, K ; Roso, I ; **Pesic, M** ; Djakovic, I ; Bilic, N. Conducting an epidural analgesia in University Hospital Center „Sisters of Mercy“: Croatian experience. *Gazzetta Medica Italiana Archivio per le Scienze Mediche*. 2018; 177(12):689-695.
2. **Pesic M**, Ivanovski I, Klican-Jaic K, Kovac J, Vucic M. Comparison of General and Regional Anesthesia in Morbidly Obese Patient: Case report. *International Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 2018. (ISSN 2475-5451)
3. **Pešić, M.**, Kličan-Jaić, K., Djaković, I., Muratović, A., Košec, A., Turković, T.M. Impact of prepartal acupuncture on labor and delivery. *Acta Medica Croatica*. 2019;73:5-9.
4. Katarina Kličan-Jaić, Ivka Djaković, Nika Orešković, Tihana Magdić Turković, **Maja Pešić**, Vesna Košec. Dilemmas about the selection of anesthesia for elective c- section in pregnant women with myotonic dystrophy type 2 and suspected von Willebrand disease- Case report. *Acta Clinica Croatica*, vol.58/2019.
5. Katarina Kličan-Jaić, **Maja Pešić**, Marinko Vučić, Vesna Košec. Anesthesiologist in delivery ward- an important person of great benefit. *Acta Clinica Croatica*, vol.58/2019.
6. Katarina Kličan Jaić, MD¹, Tihana Magdić Turković, MD, PhD¹, **Maja Pešić**, MD¹, Ivka Djaković, MD², Vesna Košec, MD, PhD², Andro Košec, MD, PhD, FEBORL-HNS³. Auricular Acupuncture as Effective Pain Relief After Episiotomy: A Randomized Controlled Pilot Study. "Archives of Gynecology and Obstetrics (ARCH)" ARCH-D-18-01542R2
7. Katarina Kličan-Jaić, **Maja Pešić**, Ivan Ivanovski, Marinko Vučić, Krunoslav Kuna; Trend i razvoj epiduralne analgezije i epiduralne anestezije u rodilišti KBC Sestre milosrdnice tijekom prošlih 10 godina; *Liječnički vjesnik* (in press)