

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Οξειδωτικό stress Τεχνικές μελέτης και επίδραση στη γοναδική λειτουργία

Το άρθρο αυτό αφορά σε ανασκόπηση των μηχανισμών δημιουργίας του οξειδωτικού stress και των τρόπων επίδρασής του στον ανθρώπινο οργανισμό. Αναφέρονται οι ουσίες που συνιστούν το οξειδωτικό stress, το πώς επιδρούν στα κυριότερα βιομόρια και ποιοι είναι οι τρόποι με τους οποίους προκαλείται και συντηρείται το οξειδωτικό stress. Περιγράφεται διεξοδικά πώς επιτυγχάνεται η οξειδωτική καταστροφή στους ιστούς και πώς διορθώνεται ή περιορίζεται. Αξιολογούνται οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και τα πλεονεκτήματά τους. Επίσης, παρατίθενται οι διάφοροι τρόποι ανίχνευσης και μέτρησης του οξειδωτικού stress, καθώς και οι περιορισμοί των εν λόγω μεθόδων. Αναφέρονται ειδικότερα οι βλαπτικές επιδράσεις του οξειδωτικού stress στη γοναδική λειτουργία ανδρών και γυναικών. Επίσης, το άρθρο καταγράφει τους τρόπους της μέτρησης του οξειδωτικού stress ταυτόχρονα με την αξιολόγηση των κυριότερων μοριακών δεικτών, ιδίως στην ανδρική γοναδική λειτουργία. Τέλος, αναφέρονται οι κυριότεροι τρόποι μελέτης των ανδρικών γοναδικών μοριακών δεικτών και οι μεταβολές που υφίστανται από το οξειδωτικό stress.

1. ΓΕΝΙΚΗ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΠΕΡΙ ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS

Η έννοια των ανταλλαγών είναι κεντρικής σημασίας στην κατανόηση της εξέλιξης της ζωής. Οι μηχανισμοί όμως που τις χαρακτηρίζουν δεν έχουν μελετηθεί αρκετά.

Όλοι οι οργανισμοί χρειάζεται να κάψουν τις βιολογικές διαδικασίες, απ' όπου εξαρτώνται. Τα αερόβια είδη ανέπτυξαν την ικανότητα της χρήσης οξυγόνου για την αποτελεσματική έκλυση ενέργειας. Ωστόσο, χρειάζεται να παρεμποδίσουν την οξείδωση των συστημάτων του σώματός τους με αντιδραστικές ουσίες οι οποίες παράγονται σε αυτή τη διαδικασία, γεγονός που συμβαίνει στη διάρκεια του οξειδωτικού stress.

Η ανάγκη για αποτελεσματικότητα ενέργειας πρέπει να εξισορροπηθεί ενάντια στη δυνατότητα τοξικότητας από τα προϊόντα καύσης. Οι οργανισμοί εξελίχθηκαν, αναπτύσσοντας μηχανισμούς που παρεμποδίζουν την τοξικότητα χρησιμοποιώντας αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Παρ' όλα αυτά, οξειδωτική καταστροφή επισυμβαίνει και συσσωρεύεται με την ηλικία. Αυτή η συσσώρευση αποτελεί τη βάση της υπόθεσης των ελευθέρων ριζών της γήρανσης.¹⁻⁴

2. ΤΙ ΟΡΙΖΕΤΑΙ ΩΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

Η απειλή της μη ελεγχόμενης οξείδωσης των βιομορίων προέρχεται κατά μεγάλο μέρος από αυτό που διεθνώς καλείται reactive oxygen species (ROS). Παρ' ότι τα ROS από εξωγενείς πηγές, όπως υπεριώδη ακτινοβολία, όζον ή περιβαλλοντική μόλυνση, μπορεί να επιτεθούν σε βιομόρια, στις περισσότερες περιπτώσεις η μεγαλύτερη απειλή φαίνεται να προέρχεται από ενδογενή παραγωγή ROS.⁵

Ο όρος ROS χρησιμοποιείται για να καλύψει τα οξειδωτικά συμβάντα τόσο από ελεύθερες, όσο και από μη ελεύθερες ρίζες. Τα ROS των ελευθέρων ριζών είναι άτομα ή στοιχεία που περιέχουν ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στις εξωτερικές τους τροχιές. Ανάμεσα στα πλέον ισχυρά και σημαντικά περιλαμβάνεται το υπεροξείδιο και το οξείδιο του υδροξυλίου και του νιτρικού.⁴ Αυτά τα ελεύθερα οξειδωτικά προϊόντα, όντας αντιδραστικά και ασταθή, επικρατούν μόνο για μικρο- ή νανο-δευτερόλεπτα πριν από την πρόκληση αλυσιδωτών αντιδράσεων, στις οποίες η αντιδραστικότητα περνά σε περισσότερο καταστρεπτικά στοιχεία. Οι κύριες, μη ελεύθερες οξειδωτικές ουσίες είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το υποχλωρικό οξύ και το ελεύθερο οξυγόνο. Οι ουσίες αυτές μπορούν να

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2013, 30(2):177-185
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2013, 30(2):177-185

Μ.Σ. Βενετίκου

Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας (ΣΕΥΠ), Τμήμα Βασικών Ιατρικών Μαθημάτων, Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΑΤΕΙ), Αιγάλεω, Αθήνα

Oxidative stress: Study techniques and its effects on gonadal function

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί
Λιπίδια
DNA
Οξειδωτικό stress
Πρωτεΐνες
Σπέρμα
Ωοκύτταρα

Υποβλήθηκε 29.11.2012
Εγκρίθηκε 30.12.2012

διατηρηθούν περισσότερο, όπως λεπτά στην περίπτωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, προκαλώντας οξειδωτική καταστροφή σε βιομόρια.⁶

Υπάρχουν επίσης τα reactive nitrogen species (RNS), που προκαλούν ανάλογες νιτρικές επιδράσεις.⁶ Παρ' ότι δεν έχουν μελετηθεί πολύ, τα RNS δεν φαίνεται ότι είναι τόσο σημαντικά όσο τα ROS σε σχέση με την πρόκληση καταστροφής. Είναι σημαντικό να αντιληφθεί κάποιος ότι δεν έχει όλη η παραγωγή ROS αρνητικές συνέπειες.

Περίπου το 10% των ROS που παράγεται στα ζωικά κύτταρα ευρίσκεται σε περιορισμένο περιβάλλον συνήθως από ειδικά ένζυμα, όπως οξειδάσες του NADPH και συνθετάσες του NO, και διοχετεύεται έτσι ώστε να χρησιμεύσει σε σημαντικές λειτουργίες, όπως κυτταρικές σημάσεις και κυτταρικές μετατροπές, ρύθμιση της χαλάρωσης των λείων μυϊκών ινών, ρύθμιση της αιματικής ροής και των ανοσολογικών αμυντικών μηχανισμών.⁷ Στην περίπτωση των αμυντικών ανοσολογικών μηχανισμών, η εγκύστωση των παθογόνων από μακροφάγα ακολουθείται από έντονη παραγωγή ROS στη μεμβράνη η οποία περιβάλλει το κυστίδιο, γεγονός που οδηγεί σε διέγερση παραγωγής πρωτεασών και με αυτόν τον τρόπο σε καταστροφή του εισβολέα.^{7,8} Το υπόλοιπο 90% των ROS προέρχεται ως ενδιάμεσο προϊόν φυσιολογικών μεταβολικών διαδικασιών.⁵

Στα κύτταρα των μεγαλύτερων οργανισμών η ενέργεια παράγεται υπό τη μορφή ATP, το οποίο προέρχεται από τα μιτοχόνδρια μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron transport chain, ETC). Ποσοστό >80% του συνολικού οξυγόνου που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα καταναλώνεται από το ETC.

Μελέτες *in vitro* δείχνουν ότι 1–2% των μορίων του οξυγόνου που χρησιμοποιείται μετατρέπονται σε ανιόντα υπεροξειδίου. Και παρ' ότι *in vivo* φαίνεται ότι το ποσοστό πρέπει να είναι μικρότερο, περίπου 0,2%,⁵ εν τούτοις τα ανιόντα αυτά συνιστούν ένα πολύ σημαντικό ποσοστό.

Το οξειδωτικό stress προκύπτει όταν τόσο τα ενζυμικά όσο και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά δεν μπορούν να ουδετεροποιήσουν τελείως τα παραγόμενα ROS, με αποτέλεσμα τα ROS να παραμένουν για αρκετό χρονικό διάστημα και να προκαλούν περαιτέρω αντιδράσεις. Έτσι, όταν ένα οξειδωτικό γεγονός επισυμβαίνει, βιομόρια οξειδώνονται από ROS, ενώ η έκταση της καταστροφής εξαρτάται από την επιρρέπεια αυτών των βιομορίων να ενωθούν με ROS. Υψηλά επίπεδα ROS δεν καταλήγουν απαραίτητα σε οξειδωτικό stress όταν αυτό μπορεί να εξισορροπηθεί μέσω αύξησης των αμυντικών μηχανισμών. Ούτε και προκύπτει ότι άτομα που βρίσκονται σε κάλυψη με αντιοξειδωτικά είναι αναγκαστικά σε καλύτερη κατάσταση από εκείνα

με χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών, καθώς αυτό θα εξαρτηθεί από τα επίπεδα των ROS και την κατάσταση της ανοσολογικής άμυνας. Στην πράξη, το οξειδωτικό stress εκτιμάται, μετρώντας είτε την καταστροφή είτε την παρουσία αυξημένων επιπέδων ROS.

3. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΡΟΦΗ

Μόρια-κλειδιά στη Βιολογία, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, επηρεάζονται αρνητικά από ROS. Επί πλέον, η αντίδραση των ROS με αυτά τα μόρια δημιουργεί περαιτέρω παραγωγή ROS, η οποία οδηγεί σε καταίγισμο καταστροφής, αν αφεθεί χωρίς έλεγχο.

Εκτιμάται ότι τα ROS είναι υπεύθυνα για περίπου 10.000 μετατροπές βάσεων DNA ανά κύτταρο ανά ημέρα.⁹ Η δε οξείδωση ή η μεθυλίωση των βάσεων θεωρείται ότι έχει τις σημαντικότερες φαινοτυπικές επιπτώσεις.¹⁰ Το μιτοχονδριακό DNA φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερα επιρρεπές, αφ' ενός λόγω της εγγύτητάς του στην παραγωγή ROS και αφ' ετέρου επειδή η επισκευή του είναι περιορισμένη.^{4,5,10} Τα τελομερή, δηλαδή οι κεφαλές (άκρα) των χρωματοσωμάτων, που άλλωστε είναι και τα πλέον σημαντικά για τη σταθερότητα του γονιδιακού υλικού, είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην επίθεση των ROS, ενώ η επιταχυνόμενη σμίκρυνση των τελομερών που προέρχεται από το οξειδωτικό stress μπορεί να επισπεύσει τη γήρανση.¹¹

Η οξείδωση των πρωτεϊνών προκαλεί αντιστρεπτές δισουλφιδικές γέφυρες, αλλάζει τη στροφή τους στο χώρο και, τελικά, επηρεάζει τη λειτουργία τους. Το μέγεθος της καταστροφής των πρωτεϊνών θα εξαρτηθεί από τη θέση της πρωτεΐνης σε σχέση με τον τόπο παραγωγής ROS, αλλά και από τη σύστασή τους και τη δομή τους.⁷ Μερικά αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη, η ιστιδίνη και η κυστεΐνη, είναι πολύ πιο επιρρεπή από άλλα. Γενικά, όμως, τα ROS μπορεί να αλλάξουν τόσο τη δευτεροταγή όσο και την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.^{6,7}

Η καταστροφή των λιπιδίων είναι επίσης σημαντική, επειδή μπορεί να έχει συνέπειες στη λειτουργία και στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) είναι πολύ λιγότερο ανθεκτικά στην οξείδωση σε σχέση με τα μονοακόρεστα ή τα κεκορεσμένα λιπαρά οξέα, ώστε η ποικιλία σε PUFA στις μεμβράνες δυνατόν να επηρεάσει και την αναλογία της οξειδωτικής καταστροφής.¹² Παράλληλα, η οξείδωση των λιπών μπορεί να έχει και άλλες συνέπειες, καθώς η υπεροξειδάση των λιπών εμπλέκεται σε πολλές ενδιάμεσες μεταβολικές αντιδράσεις και αυτό έμμεσα ενδεχομένως να βλάψει τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες.¹³

4. ΤΟ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

- Η πρώτη γραμμή άμυνας είναι η ελάττωση της ανεξέλεγκτης παραγωγής ROS από το κύτταρο. Η σύσταση των μιτοχονδριακών μεμβρανών και η κατάστασή τους, που ποικίλλει από είδος σε είδος και από ιστό σε ιστό, ανάλογα με την ηλικία, μπορούν να επιδράσουν στην παραγωγή ROS.¹² Η αυξημένη αποσύνδεση της καταλάωσης οξυγόνου και της παραγωγής ATP, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή θερμότητας, ελαττώνει τη μιτοχονδριακή παραγωγή ROS.
- Τρεις κύριες ομάδες αντιοξειδωτικών ενζύμων βρίσκονται στο κύτταρο και αντιστρατεύονται τις δράσεις του ανιόντος του υπεροξειδίου και τα καταστρεπτικά του αποτελέσματα. Η δεσμουτάση του υπεροξειδίου δρα στο ανιόν του υπεροξειδίου για να παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου και μονοοξυγόνο. Και τα δύο αυτά προϊόντα είναι από μόνα τους δυνητικά καταστροφικά ROS. Εν τούτοις, πρωτεΐνες δεσμευτικές των μετάλλων παρεμποδίζουν τη μεταφορά μετάλλου, κυρίως σιδήρου και χαλκού, με το να διευκολύνουν την παραγωγή αντιδραστικής ρίζας υδροξυλίου από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ δύο ακόμη ένζυμα, η καταλάση και η οξειδάση της γλουταθειόνης, μετατρέπουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ύδωρ. Το μονοοξυγόνο αντιμετωπίζεται επίσης από τη βιταμίνη E. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκαν τα ένζυμα της υπεροξυρεδοξίνης, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση των ROS.⁵
- Το επόμενο επίπεδο άμυνας περιλαμβάνει τις αντιοξειδωτικές ουσίες, οι οποίες, διασπώντας αλυσίδες, ουδετεροποιούν τα ROS. Αυτές είναι ένα μείγμα από ενδογενώς παραγόμενες αντιοξειδωτικές ουσίες και ουσίες που προσλαμβάνονται από τη διαίτα. Οι ενδογενείς ουσίες περιλαμβάνουν τα εντός του κυττάρου συστήματα της θειορεδοξίνης, τις ουμπικινόνες και τη γλουταθειόνη. Η γλουταθειόνη είναι πιθανόν το πλέον δραστικό αντιοξειδωτικό στα βιολογικά συστήματα⁶ και ιδιαίτερα ικανό να ουδετεροποιεί τις καταστρεπτικές ελεύθερες ρίζες υδροξυλίων, όπου δεν υπάρχει ενζυμική ουδετεροποίηση. Άλλες ενδογενώς παραγόμενες αντιοξειδωτικές ουσίες περιλαμβάνουν την υδατοδιαλυτή βιταμίνη C και το ουρικό οξύ (παρ' ότι η παραγωγή του ουρικού μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω ελεύθερες ρίζες).⁷ Πολλά άλλα αντιοξειδωτικά προσλαμβάνονται από τη διαίτα, όπως η βιταμίνη E και τα καροτενοειδή. Ειδικά η βιταμίνη E αποτελεί το κύριο αντιοξειδωτικό

στις μεμβράνες, απομακρύνει το ελεύθερο οξυγόνο και διασπάζει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδάσης των λιπών.

- Άλλη γραμμή άμυνας ενάντια στην καταστροφή από ROS είναι η δομική, επειδή οι πιο σημαντικές δομές του οργανισμού είναι και οι πλέον ανθεκτικές στην επίθεση των ROS.¹²

Παρά τις αντιοξειδωτικές άμυνες του οργανισμού, εν τούτοις επισυμβαίνει κάποια οξειδωτική καταστροφή. Η τελική γραμμή άμυνας ενάντια στα καταστροφικά αποτελέσματα των οξειδωτικών είναι η απομάκρυνση ή η επιδιόρθωση των κατεστραμμένων μορίων. Η επιδιόρθωση του DNA είναι πολύ σημαντική στην κυτταρική λειτουργία και υπάρχουν διάφορα περίπλοκα μονοπάτια αναγνώρισης και επιδιόρθωσης της οξειδωτικής καταστροφής του.¹³

5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS

Τα τέσσερα στοιχεία του οξειδωτικού stress (παραγωγή ελευθέρων ριζών, αντιοξειδωτικές άμυνες, οξειδωτική καταστροφή και μηχανισμοί επιδιόρθωσης) είναι δυνατόν να καταμετρηθούν, αλλά όχι με την ίδια ευκολία. Η ποικιλία μεθόδων που υφίσταται για τη μέτρηση κάθε στοιχείου του οξειδωτικού stress είναι μεγάλη και υπάρχουν πολλές πηγές στη βιβλιογραφία που τις αναφέρουν.¹⁴⁻¹⁷

Καλύτερες είναι οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν πλάσμα ή βιολογικά υγρά.

- *Ελεύθερες ρίζες:* Η μόνη τεχνική που επιτρέπει απ' ευθείας παρατήρηση των ελευθέρων ριζών είναι η electron spin resonance (ESR).¹⁸ Η ESR χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τεχνική του spin trapping, όπου ένα μόριο-παγίδα αφήνεται να αντιδράσει με μια ρίζα ώστε να παραχθεί ένα σταθερότερο και μετρήσιμο προϊόν. Οι μέθοδοι αυτές μπορεί να επηρεαστούν από "artifacts", αν και η χρήση τους έχει περιοριστεί στην οικολογία.
- *Αντιοξειδωτικές άμυνες:* Η μέτρηση ενζυμικών και μη ενζυμικών ουσιών μπορεί να γίνει σε ιστούς και υγρά.¹⁹ Υπάρχει μεγάλο εύρος μεθόδων για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (total antioxidant capacity, TAC) στο πλάσμα και στα βιολογικά υγρά.^{17,20} Οι συσχετίσεις όμως μεταξύ των *in vivo* και των *in vitro* αποτελεσμάτων δεν είναι γνωστές.¹⁷
- *Οξειδωτική καταστροφή:* Τα λιπίδια αποτελούν μείζονα στόχο του οξειδωτικού stress και η υπεροξειδάση των λιπών προσδίδει γένεση σε καταστροφικά προϊόντα, από τα οποία οι σημαντικότεροι δείκτες είναι η F2-isoprostanes και η malondialdehyde (MDA), που και τα δύο είναι

προϊόντα αποσύνθεσης των PUFA.¹⁸ Έχουν αναπτυχθεί πολλές φασματομετρικές και χρωματογραφικές μέθοδοι για τη μέτρηση των MDA και isoprostanes.¹⁵

- Οι πρωτεΐνες οξειδώνονται είτε με απ' ευθείας επίθεση ROS είτε με έμμεση δράση από την υπεροξειδάση των λιπών.¹⁸ Ως αποτέλεσμα, ρίζες καρβονυλίου εισέρχονται στις πρωτεΐνες με άμεση οξείδωση των αμινοξέων ή με έμμεση προσκόλληση μέρους καρβονυλίου. Με αυτόν τον τρόπο μεταβάλλεται η δομή στο χώρο των πρωτεϊνών και η λειτουργικότητά τους. Μερικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για ανίχνευση καρβονυλομάδων στις πρωτεΐνες είναι η φασματοφωτομετρία, η ELISA και η ηλεκτροφόρηση με Western blot.¹⁸
- Η οξειδωτική καταστροφή στο DNA προέρχεται από τροποποιήσεις σακχάρων και βάσεων, καταστροφή δεοξυριβόζης, ρωγμές και διασυνδέσεις πρωτεϊνών.¹⁸ Οι συχνότεροι δείκτες για την καταστροφή του DNA που υφίστανται μέσω τροποποιήσεων των βάσεων είναι οι συγκεντρώσεις των νουκλεοτιδίων (8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG) και 8-hydroxyguanine (8-OH-G). Τα προϊόντα αυτά είναι τα οξειδωμένα παράγωγα της γουανίνης, του νουκλεοτιδίου που είναι και το πλέον επιρρεπές στην οξείδωση. Και οι δύο δείκτες έχουν σημαντική εξειδίκευση.¹⁸ Η high performance liquid chromatography (HPLC) με ηλεκτροχημική ανίχνευση (electrochemical detection, ECD) (HPLC-ECD) είναι η κυριότερη μέθοδος ανίχνευσης επιπέδων 8-OHdG και 8-OH-G.
- Μέτρηση ενός μόνο προϊόντος οξείδωσης στο DNA δεν είναι παραδεκτά αντικειμενική στην εκτίμηση οξείδωσης του DNA, ενώ μια καλύτερη προσέγγιση συνιστά η μέτρηση πολλαπλών τροποποιημένων βάσεων κατά την ίδια χρονική στιγμή με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας (gas chromatography-mass spectrometry). Άλλες μέθοδοι για την εκτίμηση της οξείδωσης του DNA αποτελούν η HPLC με mass spectrometry, η antibody-based immunoassays, η ARP assay σε συνδυασμό με ELISA-like assay και η Comet assay (single gel electrophoresis).^{14,16} Οι συγκεκριμένες μετρήσεις δεν διευκρινίζουν πού γίνεται η βλάβη- δηλαδή, αν η οξείδωση επισυμβαίνει σε ενεργά γονίδια, σε τελομερή ή σε "junk" DNA. Για να το γνωρίζουμε αυτό θα πρέπει να είναι γνωστός και ο τύπος οξείδωσης του DNA.¹⁸
- *Μηχανισμοί επανόρθωσης:* Αρκετές μέθοδοι υπάρχουν για την εκτίμηση της επανορθωτικής ικανότητας ή της επανορθωτικής δραστηριότητας των ενζύμων (φασματοφωτομετρία, Comet assay).

6. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗ ΓΟΝΑΔΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Οι πρόσφατες μελέτες έχουν να επιδείξουν σημαντική συμμετοχή των οξειδωτικών παραγόντων τόσο στη γυναικεία όσο και στην ανδρική αναπαραγωγική λειτουργία, σε συνδυασμό ή μη με περιβαλλοντικούς βλαπτικούς παράγοντες. Το οξειδωτικό stress μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή του DNA και να πυροδοτήσει απόπτωση. Πράγματι, πολλά υποξικά θυλάκια δείχνουν στη συνέχεια αύξηση της ανευλοϊδίας στα έμβρυα.²¹

Επομένως, το οξειδωτικό stress στην ωρίμανση των ωοθυλακίων φαίνεται ότι είναι επικίνδυνα αρνητικό, παρ' ότι μερικές μελέτες βρήκαν θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ROS του ωοθυλακικού υγρού και των παραμέτρων ωρίμανσης *in vitro*.²²

Είναι πιθανό ότι απαιτείται μια ιδανική ισορροπία μεταξύ του οξυγόνου στο ωοκύτταρο και των αντιοξειδωτικών για την καλύτερη τοποθέτηση των χρωματοσωμάτων. Επίσης, τα κοκκιώδη κύτταρα περιέχουν eNo συνθετάση και συνθέτουν NO.²³ Έτσι, υψηλά επίπεδα NO φαίνεται ότι σχετίζονται με ωοθυλάκια χαμηλού δυναμικού γονιμοποίησης.²⁴ Αλλά και στο ανδρικό σπέρμα, πολλές μελέτες συνδέουν ενδογενείς και περιβαλλοντικούς παράγοντες οξείδωσης με παθολογικές μεταβολές ποικίλων τύπων.

Η καταστροφή του DNA του σπέρματος μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις στο αναπαραγωγικό αποτέλεσμα. Οι υπογόνιμοι άνδρες έχουν σημαντικά περισσότερα σπερματοζωάρια με κατεστραμμένο DNA σε σύγκριση με τους γόνιμους δότες. Τόσο ενδο-ορχικά όσο και μετα-ορχικά γεγονότα έχουν ενοχοποιηθεί, ενώ έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την εξήγηση της παρουσίας κατεστραμμένου DNA στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια. Από αυτούς, τρεις τουλάχιστον έχουν μελετηθεί αρκετά, το ανώμαλο "packaging" της χρωματίνης, το οξειδωτικό stress και η απόπτωση.

Είναι γνωστό ότι η ωριμότητα της χρωματίνης και η ακεραιότητα του DNA είναι απαραίτητα για την τελείωση της γονιμοποίησης και τη μετέπειτα ανάπτυξη του εμβρύου.²⁵ Παρ' ότι σημαντικό επίπεδο καταστροφής σπερματικού πυρηνικού DNA ανιχνεύεται σε άνδρες με φυσιολογικές σπερματικές παραμέτρους, αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη σε νέους υπογόνιμους άνδρες και αρκετά εμφανής σε ηλικιωμένους άνδρες που είναι μόλις γόνιμοι.²⁶ Η καταστροφή του DNA μπορεί να οφείλεται σε ανώμαλο packing του DNA, οξειδωτικό stress ή μικρή ακεραιότητα του DNA.²⁷

Ο δείκτης τμηματοποίησης (fragmentation index) (DFI) του σπέρματος, που χρησιμοποιείται στην υποβοηθού-

μενη αναπαραγωγή (assisted reproductive technologies, ART), έδειξε ότι υπάρχουν οριακές τιμές καταστροφής του DNA, πέραν των οποίων τόσο η ανάπτυξη του εμβρύου όσο και η εγκυμοσύνη επηρεάζονται αρνητικά σε μεγάλο βαθμό.²⁸⁻³⁵ Στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας καθοδηγούμεστε ανάλογα με το επίπεδο ωρίμανσης της σπερματικής χρωματίνης και της σταθερότητας του DNA που παρατηρείται στην εκσπερμάτωση.³⁶

Καθώς η γονιμότητα δεν βασίζεται στον απόλυτο αριθμό των σπερματοζωαρίων, αλλά και στη λειτουργική τους ικανότητα, τα τελευταία 10 έτη έχουν εφαρμοστεί επιπρόσθετες μέθοδοι που ελέγχουν τη σταθερότητα και την ακεραιότητα του σπερματικού DNA προκειμένου να διερευνηθούν τη γονιμότητα και να αυξήσουν την αξία της ανάλυσης του σπέρματος, για τη γονιμοποίηση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Η κατάτμηση του DNA μπορεί να προέρχεται από υπερβολικό "packaging" στη διάρκεια της σπερματογένεσης,^{39,40} ελαττωματική απόπτωση πριν από την εκσπερμάτωση^{37,38} ή ελαττωματική παραγωγή ROS στην εκσπερμάτωση.⁴¹⁻⁴³ Στην πραγματικότητα, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός ανδρών (5-15%) με πλήρη έλλειψη πρωταμίνης.⁴⁴ Αυξημένα επίπεδα της 8-υδροξυ-2 δεοξυγουανωσίνης, ενός σημαντή της καταστροφής του DNA, έχουν επίσης ανιχνευτεί στο σπέρμα των υπογόνιμων ανδρών.⁴⁵ Ακόμα, έχει αναφερθεί θετική συσχέτιση μεταξύ κατακερματισμού του DNA και ύπαρξης ROS⁴⁶ και οι συγγραφείς συνδύασαν υψηλά επίπεδα ROS και καταστροφής του DNA.⁴⁶ Σε πρόσφατη ανακοίνωση, οι συγγραφείς ανέφεραν υψηλά επίπεδα ROS και καταστροφή του DNA των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων, κυρίως ως συνέπεια των κατακρατούμενων σταγονιδίων του ενδοπλασματικού δικτύου του μέσου τμήματος των σπερματοζωαρίων. Επιπρόσθετα, η κατακερματοποίηση του DNA των σπερματοζωαρίων μπορεί να ακολουθήσει το "cleavage" των σπερματοζωαρίων, μια δραστηριότητα που επηρεάζεται από το οξειδωτικό stress.²⁷

Πριν από 35 έτη, οι Kerr et al⁴⁷ ανέφεραν ότι η απόπτωση είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός ελεγχόμενης κυτταρικής καταστροφής, αντίθετη ακριβώς από τη μίτωση, αλλά αναγκαία για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού στην ενηλικίωση. Φαίνεται ότι στην απόπτωση οφείλεται η απώλεια τουλάχιστον του 75% του δυνητικού αριθμού των σπερματοζωαρίων.⁴⁸⁻⁵⁰

Έτσι, ο επιλεκτικός θάνατος πρέπει να διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη σπερματογένεση. Τόσο η χρώση του DNA (Hoechst) όσο και η μέτρηση TUNEL ή η κυτταρομετρική V-δέσμευση αννεξίνης έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της απόπτωσης στα σπερματογόνια, στα σπερματοκύτταρα και στις σπερματίδες των όρχων, τόσο στους άνδρες με φυσιολογική σπερματογένεση όσο και σε εκείνους με μη αποφρακτική αζωοσπερμία.⁵¹⁻⁵³

Η πρωτογενής πηγή ROS στο σπερματικό υγρό είναι αυτά καθ' αυτά τα σπερματοζωάρια, καθώς και τα πολυμορφοπύρηννα λευκοκύτταρα. Χαμηλά επίπεδα ROS χρειάζονται τόσο για την ενεργοποίηση όσο και για την ακροσωμιακή αντίδραση. Σε αντίθεση, ελλειμματικά σπερματοζωάρια και αυξημένος αριθμός από διηθούμενα λευκοκύτταρα, κυρίως από φλεγμονή στους όρχεις, στην επιδιδυμίδα και στον προστάτη, οδηγούν σε υψηλά επίπεδα ROS που υπερβαίνουν την προστατευτική ικανότητα του σπερματικού υγρού. Έτσι, το οξειδωτικό stress αυξάνει την πιθανότητα της καταστροφής του DNA, που οδηγεί σε πτωχή ποιότητα σπέρματος, απώλεια της ικανότητας για ακροσωμιακή αντίδραση, δυσκολία στην ένωση σπερματοζωαρίου και ωαρίου, καθώς και σε ελαττωμένη γονιμότητα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.^{27,54-56}

Η οξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες των σπερματοζωαρίων και η κατάτμηση του DNA ενοχοποιούνται για το μηχανισμό με τον οποίο τα ROS προκαλούν καταστροφή του DNA και διαταράσσουν τη σπερματική λειτουργία.^{56,57} Τα δε μιτοχόνδρια, καθώς είναι η βασική πηγή παραγωγής ROS και οξειδωτικού stress, εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των προαποπτωτικών μορίων, της κατάτμησης του DNA και της απόπτωσης. Μολονότι η οξειδωτική καταστροφή του μιτοχονδριακού DNA ελαττώνει την παραγωγή του ATP και κατά συνέπεια την αναπαραγωγική ικανότητα, η καταστροφή του πυρηνικού DNA είναι επιβλαβής στη μορφολογία και στη λειτουργία των σπερματοζωαρίων.⁵⁸ Προθεραπεία με αντιοξειδωτικούς παράγοντες μπορεί να μειώσει την καταστροφή του DNA του σπέρματος.

Οι λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος μπορεί να προκαλέσουν και καταστροφή του DNA, ενώ έχουν συσχετιστεί με υψηλά επίπεδα ROS.⁵⁹ Επίσης, η προχωρημένη πατρική ηλικία έχει συσχετιστεί με ποικιλία ανωμαλιών, όπως ελάττωση της ποιότητας του σπέρματος και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι οποίες μειώνουν την αναπαραγωγική ικανότητα και αυξάνουν τη συχνότητα των αυτόματων αποβολών.⁵⁶ Παράλληλα με την ηλικία φαίνεται ότι αυξάνει το ποσοστό καταστροφής του DNA των σπερματοζωαρίων,⁶⁰⁻⁶² που προέρχεται από τις τρεις δυνητικές πηγές βλάβης (οξειδωτικό stress, Fas απόπτωση και ανώμαλο packaging χρωματίνης).⁶³

Καθίσταται εμφανές ότι ο κατακερματισμός του DNA είναι συχνότερος σε ζευγάρια με ιστορικό συνεχών αποβολών και ότι ο συνδυασμός ανωμαλιών των διαφόρων σπερματικών παραμέτρων, αλλά και της αυξημένης καταστροφής του DNA, οδηγεί σε αρνητικό αποτέλεσμα της αναπαραγωγικής ικανότητας.⁶⁴⁻⁶⁷ Ένας ουδός >10% στην καταστροφή του DNA έχει σημαντική αρνητική επίπτωση στην αναλογία

γονιμοποίησης.⁶⁸ Γενικά δε, DNA fragmentation index (DFI) >15% μπορεί να πολλαπλασιάσει τον κίνδυνο αποβολής κατά 4 φορές (37,5% έναντι 8,8%).⁶⁹

Πολλές μετρήσεις, τόσο άμεσες όσο και έμμεσες, χρησιμοποιούνται για να ανιχνεύσουν τις ρωγμές του DNA. Οι άμεσες περιλαμβάνουν τη μέτρηση TUNEL,^{39,70,71} τη μέτρηση με μονοκυτταρική ηλεκτροφόρηση (μέτρηση Comet)⁷²⁻⁷⁴ και τη μέτρηση με την τεχνική ISNT (*in situ* nick translation) με ή χωρίς αποσυμπύκνωση του σπέρματος.⁷⁵ Οι έμμεσες μέθοδοι περιλαμβάνουν την τεχνική του πορτοκαλί της ακριδίνης (the acridine orange technique, AOT), που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Teyada,⁷⁶ και τη μέτρηση της δομής της χρωματίνης του σπέρματος (sperm chromatin structure assay, SCSA).⁷⁷

Οι εξετάσεις πυρηνικής ωρίμανσης του σπέρματος μετρούν την ποιότητα packaging της χρωματίνης και το ποσό της πρωταμίνης απ' ευθείας μέσω εξαγωγής πρωταμίνης και ηλεκτροφόρησης (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) ή και έμμεσα. Έχει χρησιμοποιηθεί το κυανό της τολουιδίνης (165), καθώς και μετρήσεις που χρησιμοποιούν κυανό ανιλίνης.⁷⁸ Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί ένας

αναστολέας της πολυμεράσης (CMA3) ως έμμεση μέθοδος για την αξιολόγηση της φυσιολογικής πρωταμίνωσης.⁷⁹

Οι μελέτες της καταστροφής του DNA θα πρέπει να συνδυάζονται με μελέτες του σπερμοδιαγράμματος. Με αυτόν τον τρόπο συνδυάζεται η εργαστηριακή εικόνα με τα κλινικά ευρήματα, έτσι ώστε η ανδρολογική παθολογία διαφαίνεται σφαιρικότερα.

Παρά τα σαφή προοδευτικά βήματα στη μοριακή κατεύθυνση με την καλύτερη αντίληψη της συμμετοχής του πυρήνα, πολλές παράμετροι παραμένουν αδιευκρίνιστες και σίγουρα θα βοηθηθούν στο μέλλον με την καλύτερη γνώση των γονιδίων του σπερματικού DNA.

Η καλύτερη γνώση θα οδηγήσει αφ' ενός στη βέλτιστη αντίληψη των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα στην ακροσωμιακή αντίδραση και αφ' ετέρου στην παραγωγή παραγόντων και τεχνικών βελτίωσης του σπέρματος. Τέλος, η δύσκολη περιοχή έρευνας και υπολογισμού του οξειδωτικού stress, ενώ έχει δώσει ήδη πολλές απαντήσεις, διατηρεί ακόμα πολλές πτυχές αδιευκρίνιστες και χρήζουσες περαιτέρω μελέτης.

ABSTRACT

Oxidative stress: Study techniques and its effects on gonadal function

M.S. VENETIKOU

School of Health and Caring Professions, Department of Basic Sciences, Highest Technological Education of Athens (ATEI), Aigaleo, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2013, 30(2):177-185

This is a review of the mechanisms that contribute to the development of oxidative stress and its effects. The substances involved in oxidative stress and their effects on major biomolecules are described, and the ways in which oxidative stress is produced and maintained are outlined. The process of oxidative destruction in the tissues, and the means by which this is corrected or reduced are covered, with evaluation of antioxidative mechanisms and their advantages. The various different ways of estimating oxidative stress and their drawbacks are also explored. In particular, the destructive effects of oxidative stress on male and female gonadal function are reviewed. The means of estimation of oxidative stress are presented here, along with evaluation of the main molecular indices, especially those related to male gonadal function. These ways of studying male molecular gonadal indices are discussed in relation to the effects of oxidative stress.

Key words: Antioxidative mechanisms, DNA, Lipids, Oocytes, Oxidative stress, Proteins, Sperm

Βιβλιογραφία

1. GERSCHMAN R, GILBERT DL, NYE SW, DWYER P, FENN WO. Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science* 1954, 119:623-626
2. HARMAN D. Aging: A history based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956, 11:298-300
3. BECKMAN KB, AMES BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998, 78:547-581
4. FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 2000, 408:239-247
5. BALABAN RS, NEMOTO S, FINKEL T. Mitochondria, oxidants, and

- aging. *Cell* 2005, 120:483–495
6. SURAI OF. *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 2002:233–304
 7. DRÖGEW. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002, 82:47–95
 8. FINKEL T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003, 15:247–254
 9. AMES BN, SHINGENAGA MK, PARK EM. DNA damage by endogenous oxidants as a cause of ageing and cancer. In: Davies KJA (ed) *Oxidative damage and repair: Chemical, medical, and biological aspects*. Pergamon Press, New York, 1991:181–187
 10. FALNES PØ, KLUNGLAND A, ALSETH I. Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience* 2007, 145:1222–1232
 11. RICHER T, VON ZGLINICKI T. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol* 2007, 42:1039–1042
 12. HULBERT AJ, PAMPLONA R, BUFFENSTEIN R, BUTTEMER WA. Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* 2007, 87:1175–1213
 13. KASTAN MB, BARTEK J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004, 432:316–323
 14. GUETENS G, DE BOECK G, HIGHLEY M, VAN OOSTEROM AT, DE BRYIJN EA. Oxidative DNA damage: Biological significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002, 39:331–457
 15. DEL RIO D, STEWART AJ, PELLEGRINI N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005, 15:316–328
 16. MARCOS R, BRAVO L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci* 2007, 30:175–191
 17. SOMOGYI A, ROSTA K, PUSZTAI P, TULASSAY Z, NAGY G. Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 2007, 28:R41–R55
 18. HALLIWELL B, GUTTERIDGE J. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK, 2007
 19. SELMAN C, McLAREN JS, COLLINS AR, DUTHIE GG, SPEAKMAN JR. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: The effects of short term voluntary wheel running. *Arch Biochem Biophys* 2002, 401:255–261
 20. COHEN A, KLASING K, RICKLEFS R. Measuring circulating antioxidants in wild birds. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007, 147:110–121
 21. VAN BLERKOM J, ANTCZAK M, SCHRADER R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: Association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997, 12:1047–1055
 22. BLONDIN P, COENEN K, SIRARD MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 1997, 18:454–460
 23. LEE KS, JOO BS, NA YJ, YOON MS, CHOI OH, KIM WW. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 2000, 17:222–228
 24. LEE TH, WU MY, CHEN MJ, CHAO KH, HO HN, YANG YS. Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in *in vitro* fertilization cycles. *Fertil Steril* 2004, 82:126–131
 25. AHMADI A, NG SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999, 14:2279–2285
 26. SALEH RA, AGARWAL A, NELSON DR, NADA EA, EL-TONSY MH, ALVAREZ JG ET AL. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: A prospective study. *Fertil Steril* 2002, 78:313–318
 27. AITKEN RJ, DE IULIIS GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007, 14:727–733
 28. AHMADI A, NG SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999, 284:696–704
 29. CHO C, JUNG-HA H, WILLIS WD, GOULDING EH, STEIN P, XU Z ET AL. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 2003, 69:211–217
 30. EVENSON DP, JOST LK, MARSHALL D, ZINAMAN MJ, CLEGG E, PURVIS K ET AL. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999, 14:1039–1049
 31. AGARWAI A, SAID TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003, 9:331–345
 32. GANDINI L, LOMBARDO F, PAOLI D, CARUSO F, ELEUTERI P, LETER G ET AL. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004, 19:1409–1417
 33. SERGERIE M, LAFOREST G, BUJAN L, BISSONNETTE F, BLEAU G. Sperm DNA fragmentation: Threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005, 20:3446–3451
 34. ERENPREISS J, SPANO M, ERENPREISA J, BUNGUM M, GIWERCMAN A. Sperm chromatin structure and male fertility: Biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006, 8:11–29
 35. ZINI A, LIBMAN J. Sperm DNA damage: Importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol* 2006, 16:428–434
 36. EVENSON DP, WIXON R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 2006, 65:979–991
 37. SAKKAS D, MARIETHOZ E, MANICARDI G, BIZZARO D, BIANCHI PG, BIANCHI U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999, 4:31–37
 38. SAKKAS D, MOFFATT O, MANICARDI GC, MARIETHOZ E, TAROZZI N, BIZZARO D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002, 66:1061–1067
 39. GORCZYCA W, TRAGANOS F, JESIONOWSKA H, DARZYNKIEWICZ Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: Analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993, 207:202–205
 40. MANICARDI GC, BIANCHI PG, PANTANO S, AZZONI P, BIZZARO D, BIANCHI U ET AL. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995, 52:864–867

41. LOPES S, JURISICOVA A, SUN JG, CASPER RF. Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998, 13:896–900
42. KODAMA H, YAMAGUCHI R, FUKUDA J, KASAI H, TANAKA T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997, 68:519–524
43. MOUSTAFA MH, SHARMA RK, THORNTON J, MASCHA E, ABDEL-HAFEZ MA, THOMAS AJ Jr ET AL. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004, 19:129–138
44. OLIVA R, DIXON GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1991, 40:25–94
45. IRVINE DS, TWIGG JP, GORDON EL, FULTON N, MILNE PA, AITKEN RJ. DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. *J Androl* 2000, 21:33–44
46. BARROSO G, MORSHEDI M, OEHNINGER S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000, 15:1338–1344
47. KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26:239–257
48. HUCKINS C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: An analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 1978, 190:905–926
49. REGAUD CP. Dégénérescence des cellules séminales chez les mammifères en absence de tout état pathologique. *C R S Soc Biol Fil* 1900, 52:268–270
50. STORH PI. *Efubuch der Histologie und microscopishen Anatomie des Menschen*. Gustav Fisher, Jena, 1886
51. GANDINI L, LOMBARDO F, PAOLI D, CAPONECCHIA L, FAMILIARI G, VERLENGIA C ET AL. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000, 15:830–839
52. ANGELOPOULOU R, DADOUNE JP. Apoptose dans la spermatogénèse normale et pathologique. *Contracept Fertil Sex* 1999, 27:99–106
53. JURISICOVA A, LOPES S, MERIANO J, OPPEDISANO L, CASPER RF, VARMUZA S. DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1c gamma gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999, 5:323–330
54. AITKEN RJ, BUCKINGHAM D, WEST K, WU FC, ZIKOPOULOS K, RICHARDSON DW. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil* 1992, 94:451–462
55. ERENPREISS J, HLEVICKA S, ZALKALNS J, ERENPREISA J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: A negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 2002, 23:717–723
56. KÜHNERT B, NIESCHLAG E. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update* 2004, 10:327–339
57. SINGH NP, MULLER CH, BERGER RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003, 80:1420–1430
58. ANGELOPOULOU R, KYRIAZOGLU M. Sperm oxidative damage and the role of reactive oxygen species in male infertility. *Arch Helv Med* 2005, 22:433–446
59. DE IULIIS GN, WINGATE JK, KOPPERS AJ, McLAUGHLIN EA, AITKEN RJ. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91:1968–1975
60. MORRIS ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002, 25:255–261
61. SPANÒ M, KOLSTAD AH, LARSEN SB, CORDELLI E, LETER G, GIWERCMAN A ET AL. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepios. Hum Reprod* 1998, 13:2495–2505
62. WYROBEK AJ, ESKENAZI B, YOUNG S, ARNHEIM N, TIEMANN-BOEGE I, JABS EW ET AL. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:9601–9606
63. AITKEN RJ, KRAUSZ C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001, 122:497–506
64. VIRRO MR, LARSON-COOK KL, EVENSON DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004, 81:1289–1295
65. HENKEL R, HAJIMOHAMMAD M, STALFT, HOOGENDIJK C, MEHNERT C, MENKVELD R ET AL. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004, 81:965–972
66. MORRIS ID, ILOTT S, DIXON L, BRISON DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002, 17:990–998
67. LI Z, WANG L, CAI J, HUANG H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2006, 23:367–376
68. BENCHAIIB M, BRAUN V, LORNAGE J, HADJ S, SALLE B, LEJEUNE H ET AL. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003, 18:1023–1028
69. BENCHAIIB M, LORNAGE J, MAZOYER C, LEJEUNE H, SALLE B, FRANÇOIS GUERIN J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007, 87:93–100
70. SUN JG, JURISICOVA A, CASPER RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: Correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1997, 56:602–607
71. SAILER BL, JOST LK, EVENSON DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to *in situ* denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 1995, 16:80–87
72. ANDERSON D, DOBRZYŃSKA MM, BASARAN N. Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the Comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 1997, 17:29–43
73. ARAVINDAN GR, BJORDAHL J, JOST LK, EVENSON DP. Susceptibility of human sperm to *in situ* DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res* 1997, 236:231–237

74. HUGHES CM, LEWIS SE, McKELVEY-MARTIN VJ, THOMPSON W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996, 2:613–619
75. TWIGG J, FULTON N, GOMEZ E, IRVINE DS, AITKEN RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: Lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998, 13:1429–1436
76. TEYADA RI, MITCHELL JC, NORMAN A, MARIK JJ, FRIEDMAN S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984, 42:87–91
77. EVENSON DP, LARSON KL, JOST LK. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002, 23:25–43
78. TERQUEM A, DADOUNE JP. Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin. In: Andre J (ed) *Evaluation of nuclear maturation in the sperm cell*. Martinus Nijhoff, The Hague, 1983:249–252
79. HAYASAKA T, INOUE Y. Chromomycin A3 studies in aqueous solutions. Spectrophotometric evidence for aggregation and interaction with herring sperm deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1969, 8:2342–2347

Corresponding author:

M.S. Venetikou, 88 Agias Varvaras street, GR-152 31 Halandri, Greece
e-mail: mvenet@teiath.gr
