

Δραστικές μορφές οξυγόνου και ανδρική υπογονιμότητα

Η υπογονιμότητα οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στον ανδρικό παράγοντα και σε 50% των περιπτώσεων χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής. Στο σπέρμα κακής ποιότητας ανιχνεύονται δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), που παράγονται από τα σπερματοζωάρια και τα λευκοκύτταρα. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τη βασική πηγή ROS και εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των προαποπτωτικών μορίων. Η παρουσία ROS στο σπέρμα έχει επιπτώσεις στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και στη γονιμοποίηση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Τα διαχεόμενα υπεροξειδία προκαλούν λιπιδική υπεροξειδωση, με αποτέλεσμα διαταραχή της δομής και της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης, των οργανιδίων των σπερματοζωαρίων και κερματισμό του DNA αυτών. Η οξειδωτική βλάβη του μιτοχονδριακού DNA οδηγεί σε ελαττωμένη παραγωγή ATP με αντίκτυπο στη γονιμοποιητική ικανότητα, ενώ η βλάβη του πυρηνικού DNA προσβάλλει τη δομή και τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Οι τεχνικές TUNEL και comet, που ανιχνεύουν την ακεραιότητα του DNA στο σπέρμα υπογόνιμων ανδρών, δείχνουν ότι η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης κερματισμένου DNA σχετίζεται με αλλαγές στην κινητικότητα, τη μορφολογία, τη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων στο σπέρμα και το ποσοστό γονιμοποίησης, μετά από ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίων (ICSI). Τα αποτελέσματα χορήγησης αντιοξειδωτικών, *in vivo*, δεν είναι ικανοποιητικά. *In vitro*, τα φυσιολογικά επίπεδα των ROS ευνοούν την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και τη γονιμοποίηση. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να επιβεβαιωθεί ότι τα αντιοξειδωτικά είναι αβλαβή και ωφέλιμα στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας και την επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) και της ενδομητρικής σπερματέγχυσης (IUI). Συνεπώς, επιβάλλεται η ανάλυση με νέες μεθόδους της δράσης των αντιοξειδωτικών για τη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος, *in vivo* και *in vitro*, καθώς και ο σχεδιασμός/ σύνθεση νέων ενώσεων με βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται ενώσεις, οι οποίες εμπεριέχουν δομικά χαρακτηριστικά υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δράση της τοκοφερόλης και του λιποϊκού ή του καφεϊκού οξέος.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αύξηση της υπογεννητικότητας, που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα, οφείλεται, εν μέρει, στην υπογονιμότητα θηλυκής ή και ανδρικής αιτιολογίας. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο συντελεστής αναπαραγωγής είναι 1,2, ενώ για την ανανέωση του πληθυσμού θα έπρεπε να είναι 2,1, και προβλέπεται ότι μέχρι το 2020 ο πληθυσμός της Ελλάδας θα έχει μειωθεί στα 8,5 εκατομμύρια.

Έχει διαπιστωθεί, παγκοσμίως, ότι η υπογονιμότητα πλήττει το 15% των ζευγαριών και, στις αναπτυγμένες χώρες, πολλές μελέτες σχετικές με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων και την ποιότητα του σπέρματος καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι σε μεγάλο ποσοστό ευθύνεται ο ανδρικός παράγοντας.^{1,2}

Στα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας περιλαμβάνονται γονιδιακές μεταλλάξεις, ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων, λοιμώξεις, απόφραξη των εκσπερματιστικών

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2005, 22(5):433-446
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2005, 22(5):433-446

Ρ. Αγγελιοπούλου,
Μ. Κυριαζόγλου

Εργαστήριο Ιστολογίας
και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Sperm oxidative damage
and the role of reactive oxygen
species in male infertility

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ανδρική υπογονιμότητα
Κερματισμός DNA
ROS
Σπερματοζωάρια

Υποβλήθηκε 2.9.2003

Εγκρίθηκε 21.4.2004

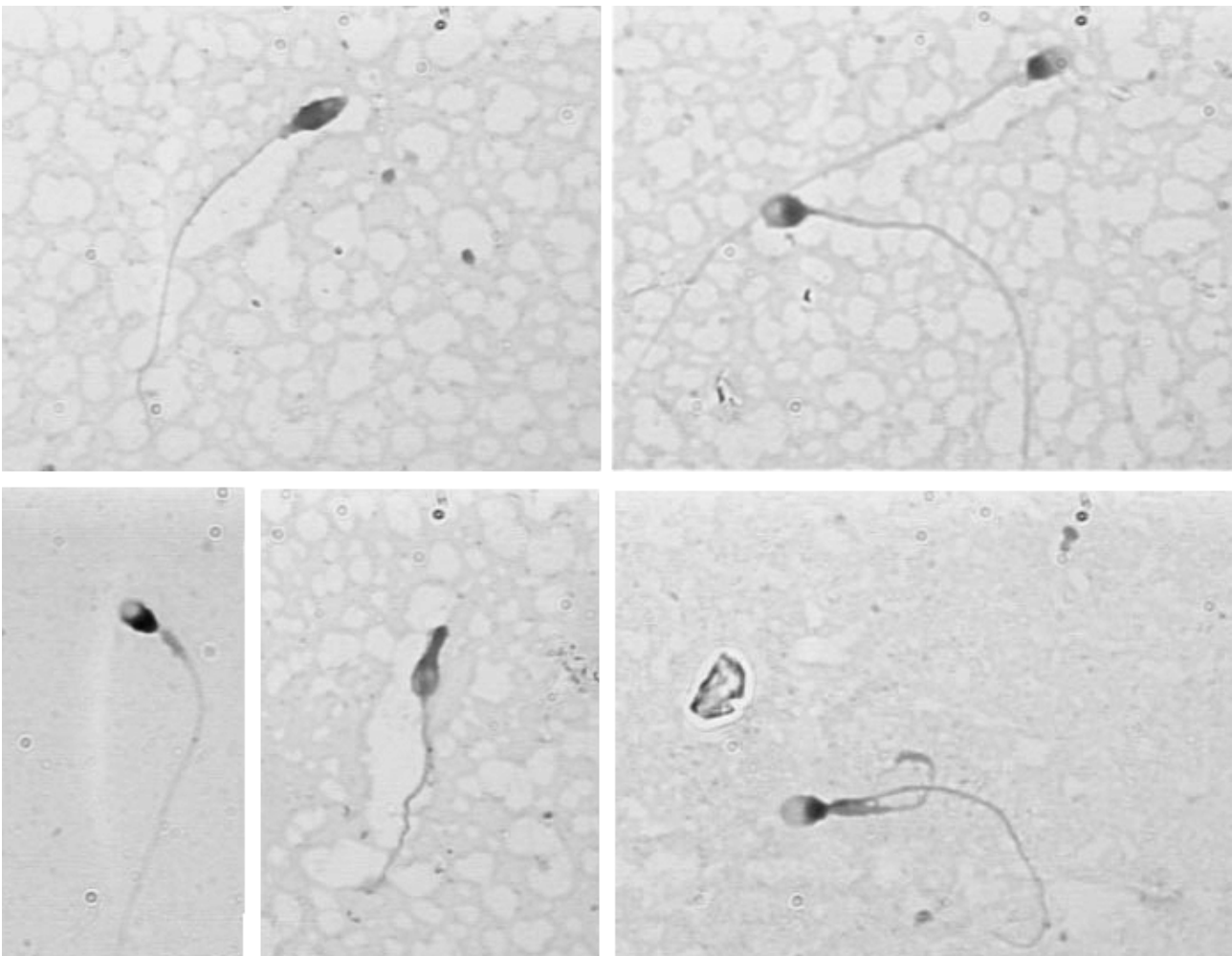
πόρων, κισσοκίλη, ακτινοβολία, χημειοθεραπεία και στυτική δυσλειτουργία.³⁻⁵ Περίπου στο 50% των περιπτώσεων η υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής και η ανάλυση του σπέρματος αποκαλύπτει μειωμένη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, ελαττωμένη κινητικότητα και μορφολογικές αλλοιώσεις (εικ. 1). Ορισμένες από αυτές τις διαταραχές συνδυάζονται με υψηλά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα του σπέρματος.⁶ Αυτό αποδεικνύεται από (α) την άμεση ανίχνευση των σχηματιζόμενων ROS από τα σπερματοζωάρια και τα λευκοκύτταρα του σπέρματος, (β) την εκτίμηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης (lipid peroxidation, LPO) και του ρόλου αυτής ως αιτιολογικού παράγοντα της ανδρικής υπογονιμότητας, (γ) τη μέτρηση της οξειδωτικής βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων και το συσχετισμό της με τη διαταραχή της λειτουργίας αυτών και (δ) τις μεταβολές στο σύστημα άμυνας των αντιοξειδωτικών και τη

χρησιμοποίησή τους για τη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος.⁷⁻⁹

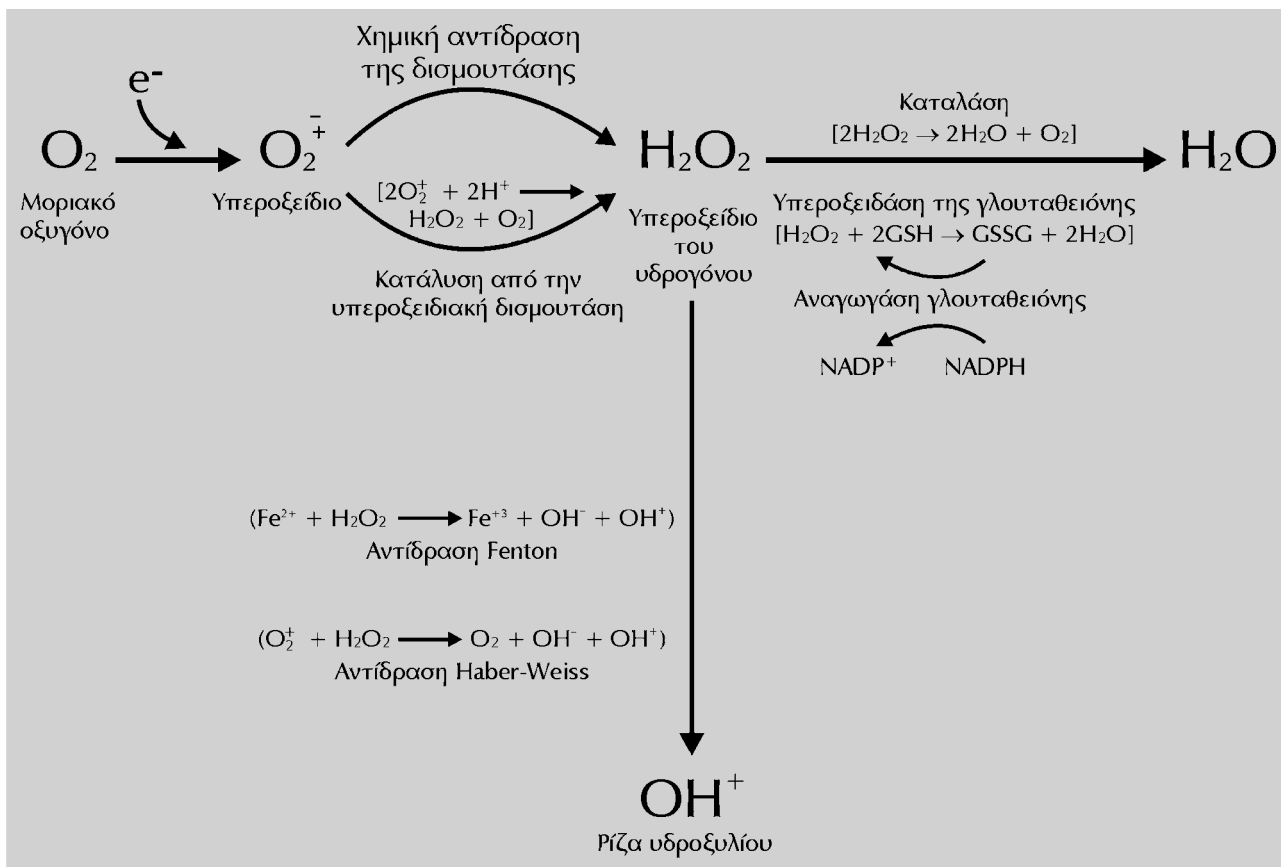
2. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Υπάρχουν πολλά δεδομένα που συνηγορούν υπέρ της συμμετοχής των ROS στην απόπτωση. Πρώτον, η προσθήκη ROS ή η στέρση των αντιοξειδωτικών προκαλεί απόπτωση. Δεύτερον, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αναστέλλεται από τα ενδογενή ή τα εξωγενή αντιοξειδωτικά. Τρίτον, η απόπτωση, σε μερικές περιπτώσεις, συνδυάζεται με αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων των ROS¹⁰ (εικ. 2).

Πράγματι, πολλά από τα χημικά και φυσικά ερεθίσματα που προκαλούν απόπτωση φαίνεται ότι οφείλονται στο οξειδωτικό stress, που αυξάνει τη συγκέντρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου στο κύτταρο. Αυτό γίνεται



Εικόνα 1. Παθολογικές μορφές σπερματοζωαρίων.



Εικόνα 2. Ενδοκυττάρια παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Διακρίνονται τα κύρια είδη ROS και ο μεταβολισμός τους.

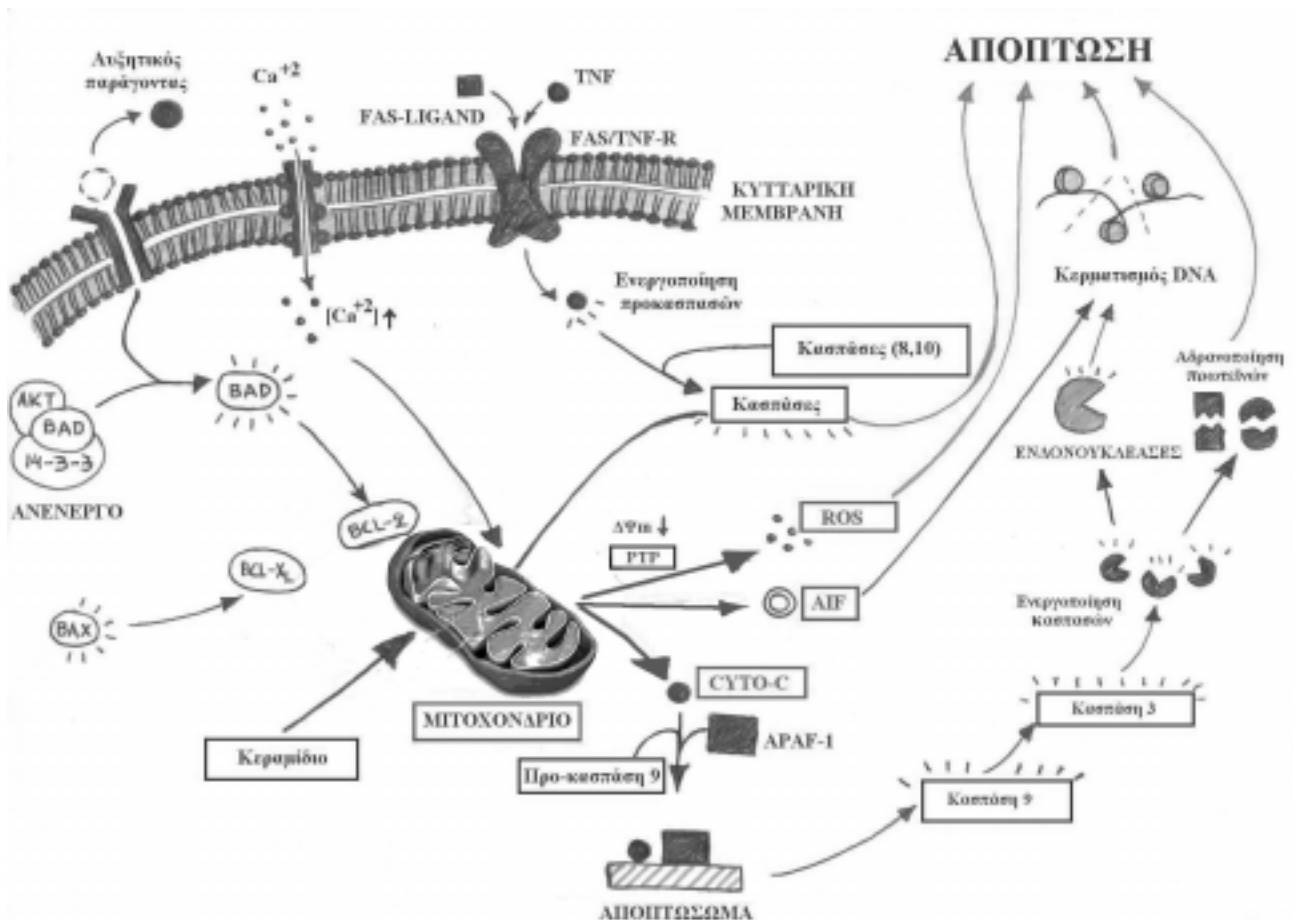
με (α) την κατανάλωση του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια, (β) την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στα υπεροξειδωμάτα, (γ) την «αναπνευστική έκρηξη», που παρατηρείται κατά την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων και (δ) την επαγωγή των ενζύμων του κυτοχρώματος P450.

Ορισμένοι προαποπτωτικοί παράγοντες, αν και δεν είναι ελεύθερες ρίζες, προκαλούν την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου ή και ελαττώνουν την ικανότητα του κυττάρου για αναγωγή. Η μείωση των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών, όπως της γλουταθειόνης (GSH), καθιστά το κύτταρο ευάλωτο στο οξειδωτικό stress και στην επαγόμενη από αυτό απόπτωση. Άλλωστε, τα αντιοξειδωτικά που εκκαθαρίζουν τα υπεροξειδία και τις υπόλοιπες ελεύθερες ρίζες, π.χ. τη Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), τη θειορεντοξίνη, την αναγωγή της ενδοκυττάριας θειόλης, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και τις ενδογενείς θειόλες, όπως το διυδρολιποϊκό οξύ κ.λπ., προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση.

Πηγή των ROS στο κύτταρο είναι τα μιτοχόνδρια, τα οποία παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτω-

σης, με βάση ένα μοντέλο που περιλαμβάνει τρία στάδια. Το πρώτο αφορά στην ενεργοποίηση των οδών μεταγωγής του σήματος και ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών BCL-2. Το δεύτερο αφορά στη διαταραχή της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων και τη διαφυγή στο κυτταρόπλασμα πρωτεϊνών, οι οποίες θα ενεργοποιήσουν τις κασπάσες, ενώ, συγχρόνως, μεταβάλλεται η μιτοχονδριακή μεταφορά των ηλεκτρονίων, η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η παραγωγή ATP. Το τρίτο στάδιο αφορά στην ενεργοποίηση των κασπασών και των νουκλεασών, που προκαλούν τον κερματισμό του DNA¹¹ (εικ. 3).

Οι αλλαγές που καταγράφονται στα μιτοχόνδρια αφορούν στη διόγκωση αυτών και την ελάττωση του δυναμικού της μεμβράνης σε συνδυασμό με τη δημιουργία πόρων. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 μεταβάλλουν το δυναμικό της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα τη διάνοιξη των πόρων (mitochondrial permeability transition pores), οι οποίοι λειτουργούν ως διάλυοι ιόντων.¹²⁻¹⁵ Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 εμποδίζουν τη διά-



Εικόνα 3. Τα στάδια της αποπτωτικής διεργασίας. Στο πρώτο στάδιο ενεργοποιούνται οι οδοί μεταγωγής του σήματος. Στο δεύτερο στάδιο διαταράσσεται η ομοιόσταση των μιτοχονδρίων και διαφεύγουν στο κυτταρόπλασμα προαποπτωτικές πρωτεΐνες. Το κυτόχρωμα c συνδυάζεται με τον Araf-1 και την προκασπάση 9 και σχηματίζεται ένα δραστικό σύμπλεγμα, το αποπτώσωμα. Στο τρίτο στάδιο, η δραστική κασπάση 9 ενεργοποιεί άλλες κασπάσες, όπως π.χ. την κασπάση 3, και δημιουργείται έτσι ένας αυτοενισχυόμενος κύκλος, που προκαλεί τον κερματισμό του DNA.

νοϊξη των πόρων, ενώ οι προαποπτωτικές πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας επάγουν το σχηματισμό αυτών, ίσως λόγω άμεσης επίδρασης σε άλλες πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, όπως ο μεταφορέας του νουκλεοτιδίου της αδενίνης. Εξάλλου, η διάνοϊξη των πόρων συντελεί στην επίταση του τρίτου σταδίου της εκτέλεσης του αποπτωτικού προγράμματος, επειδή επιτρέπει τη δίοδο στο κυτταρόπλασμα ROS και ιόντων ασβεστίου, ενώ, παράλληλα, αναστέλλει τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, γεγονός που οδηγεί στη μείωση των επιπέδων του ATP.¹⁶ Σημειώνεται ότι, λόγω της διάνοϊξης των πόρων, η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων γίνεται διαπερατή σε ουσίες μοριακού βάρους <1500 Da και διακόπτεται η σύνθεση του ATP. Η τάξη των ενεργοποιημένων κασπασών ενισχύει την αποπτωτική διεργασία, μέσω της πρωτεόλυσης ζωτικών συστατικών του κυττάρου και της ενεργοποίησης και άλλων καταβολικών ενζύμων, όπως

οι νουκλεάσες (DFF40/CAD), που προκαλούν τον κερματισμό του DNA.¹⁷⁻²⁰

Με τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης από τις αντι- και προαποπτωτικές πρωτεΐνες BCL-2, που σχηματίζουν τους πόρους, ελέγχεται η απελευθέρωση του κυτόχρωματος c (και άλλων μιτοχονδριακών προαποπτωτικών παραγόντων) από την επιφάνεια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα. Το κυτόχρωμα c συνδυάζεται με τον Araf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) και την προκασπάση 9 και σχηματίζεται ένα δραστικό σύμπλεγμα, το αποπτώσωμα (εικ. 3).¹⁹⁻²² Η δραστική κασπάση 9 ενεργοποιεί άλλες κασπάσες, όπως π.χ. την κασπάση 3, και δημιουργείται έτσι ένας αυτοενισχυόμενος κύκλος, που επιταχύνει την απόπτωση. Δηλαδή, η αύξηση της διαβατότητας της μεμβράνης των μιτοχονδρίων οδηγεί στην απελευθέρωση των ενεργοποιητών των κασπασών και αυτές, ως δραστικά μόρια, μπορούν να αυξήσουν τη διαπερατότητα



Εικόνα 4. Εκατοστιαία αναλογία των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων στο σπέρμα γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών.

της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω της μετατροπής των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών σε προαποπτωτικές και της ενεργοποίησης των προαποπτωτικών μορίων.²⁰

3. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

Σημαντική ώθηση στη μελέτη της ανδρικής υπογονιμότητας έδωσε κατά την τελευταία δεκαετία η διαπίστωση ότι η αύξηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου στο σπέρμα μπορεί να υπονομεύσει τη λειτουργική δραστηριότητα των σπερματοζωαρίων. Σε 25–40% των δειγμάτων, από σπέρμα υπογόνιμων ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα, ανιχνεύονται δραστικές μορφές οξυγόνου. Επιπλέον, με τις τεχνικές προετοιμασίας του σπέρματος, κατά τις οποίες γίνεται φυγοκέντρηση για τη λήψη του ιζήματος των σπερματοζωαρίων, που θα χρησιμοποιηθούν στην ενδομητρική σπερματέγχυση (IUI) ή την εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF), συχνά προκαλείται βλάβη των σπερματοζωαρίων και, κατά συνέπεια, ιατρογενής αποτυχία της κύησης.^{23,24} Αυτό οφείλεται, μεταξύ άλλων, και στην προκαλούμενη αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου κατά τη φυγοκέντρηση. Αναφέρεται ότι, σε 5 min, οι τιμές των ROS αυξάνουν στο διπλάσιο έως πενταπλάσιο της βασικής και η βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων που προκαλούν διπλασιάζεται σε 60 min, ενώ σε 2 ώρες τετραπλασιάζεται.²⁵

Εκτός από τη φυγοκέντρηση, τα διαλύματα κλίσης πυκνότητας (π.χ. Percoll), που χρησιμοποιούνται κατά την προετοιμασία του σπέρματος στις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, και οι εκπλύσεις προκαλούν βλάβη στα σπερματοζωάρια, είτε μειώνοντας την ικανότητα που έχει το σπερματικό υγρό να εξουδετερώνει τις ROS, είτε επιτείνοντας την παραγωγή ROS από τα σπερματοζωάρια.²⁶

Η παρουσία λευκοκυττάρων στο σπερματικό υγρό συνδυάζεται με σοβαρές καταστάσεις ανδρικής υπογο-

νιμότητας.^{27–29} Παρόλο που η *in vitro* γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων δεν μειώνεται, οι λανθασμένοι χειρισμοί, κατά την προετοιμασία του δείγματος, είναι δυνατό να το επιμολύνουν με λευκοκύτταρα, με αποτέλεσμα την ελαττωμένη λειτουργικότητα των σπερματοζωαρίων λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS.²⁷

Η παθολογική λευκοκυττάρωση, που ορίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (1987) ως $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, παρατηρείται μόνο στο 5% των ασθενών που παρουσιάζουν πρόβλημα υπογονιμότητας.³⁰ Η λευκοκυτταροσπερμία με αυξημένα επίπεδα ROS συνδυάζεται με αύξηση της κυτταροκίνης IL-8 και με μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου SOD (δισμουτάση του υπεροξειδίου) στο σπέρμα.³¹ Αυτό σημαίνει ότι το προκαλούμενο οξειδωτικό stress οφείλεται σε ελαττωματική εξουδετέρωση των ROS, που ενεργοποιείται από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες.³²

Ως προς την προέλευση των ROS, οι Iwasaki και Gagnon αναφέρουν ότι τα ελεύθερα λευκοκυττάρων δείγματα σπέρματος, που προέρχονται από υπογόνιμους άνδρες, περιέχουν μετά την επεξεργασία ανιχνεύσιμα επίπεδα ROS, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι παράγονται από τα ελαττωματικά σπερματοζωάρια.³³ Οι εστέρες της φορβόλης και ορισμένα πεπτίδια φορμυλίου ενεργοποιούν την παραγωγή ROS, με επιπτώσεις στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και τη γονιμοποίηση.³⁴

4. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

Παρόλο που η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου είναι μια ιδιότητα χαρακτηριστική των λευκοκυττάρων, θα πρέπει να αναφερθεί ότι το σπερματοζωάριο του ανθρώπου είναι ο πρώτος κυτταρικός τύπος στον οποίο περιγράφηκε.³⁵ Οι ROS αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές της φυσιολογικής λειτουργίας των σπερματοζωαρίων και της σύνδεσής τους με το ωοκύτταρο.⁹ Η παρουσία τους είναι απαραίτητη για την αντίδραση του ακροσώματος, μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης A_2 . Επίσης, συμμετέχουν στη διεύδυση του σπερματοζωαρίου στο ωοκύτταρο, μέσω της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης.²⁸

Όταν τα επίπεδα των ROS αυξάνουν, το DNA των σπερματοζωαρίων υφίσταται βλάβη, χωρίς ωστόσο να ελαττώνεται η ικανότητα σύντηξης ωοκυττάρου-σπερματοζωαρίου. Όμως, πέρα από ένα σημείο, οι ROS προκαλούν μη αντιστρεπτή βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης,

λόγω λιπιδικής υπεροξειδωσης, και κερματισμό του DNA, με αποτέλεσμα μειωμένη κινητικότητα και διαταραχή της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων.³⁶ Ωστόσο, ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται για μικρογονιμοποίηση σπερματοζωάρια με βλάβες τέτοιου τύπου, έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να σχηματιστεί αρσενικός προπυρήνας.^{37,38}

Τα υψηλά επίπεδα ROS, που ανιχνεύονται στο σπέρμα των υπογόνιμων ανδρών, συνδυάζονται με ανωμαλία του μέσου τμήματος της ουράς των σπερματοζωαρίων, ελαττωμένη κινητικότητα, απώλεια της ικανότητας εκτέλεσης της αντίδρασης του ακροσώματος, ελαττωμένη ικανότητα διείσδυσης του σπερματοζωαρίου στο ωοκύτταρο, καθώς και ελαττωμένη γονιμότητα *in vitro* και *in vivo*. Αντίθετα, στο σπέρμα που έχει χαμηλή συγκέντρωση ROS, ο αριθμός των κινητών σπερματοζωαρίων είναι μεγαλύτερος.³³

Δύο συστήματα θεωρούνται πηγές των ROS που παράγονται από τα σπερματοζωάρια. Το πρώτο εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και είναι παρόμοιο με το σύστημα της NADPH οξειδάσης. Το δεύτερο είναι το σύστημα της διαφοράσης (μιας οξειδοαναγωγής που εξαρτάται από το NADH), η οποία εντοπίζεται στο μέσο τμήμα της ουράς των σπερματοζωαρίων και συμμετέχει στο αναπνευστικό σύστημα των μιτοχονδρίων. Λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη λιπιδική υπεροξειδωση, αλλά θα πρέπει να σημειωθεί ότι και τα υπόλοιπα κυτταρικά διαμερίσματα δεν είναι λιγότερο ευάλωτα.^{39,40}

5. ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι η βλάβη των συστατικών του κυττάρου που επάγεται από τα διαχεόμενα υπεροξειδία. Σε οξείδωση υπόκεινται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, που περιέχουν πολλαπλούς διπλούς δεσμούς άνθρακα. Η λιπιδική υπεροξειδωση αρχίζει συνήθως με αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από τις ρίζες OH· και πιθανόν από άλλες ROS, όχι όμως και από το αδιάλυτο O₂. Προκύπτει ένα διένιο, που αντιδρά με το O₂ και σχηματίζει μια ρίζα υπεροξειδίου ROO·, η οποία αφαιρεί H⁺ από ένα λιπαρό οξύ και αναπτύσσεται μια αυτοκαταλυόμενη αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών. Σημειώνεται ότι ελεύθερη ρίζα καλείται κάθε μόριο ή άτομο που έχει ένα μονήρες ή ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στιβάδα, σε αντίθεση με τις μη ελεύθερες ρίζες, οι οποίες φέρουν ζεύγη ηλεκτρονίων στις εξωτερικές τους στιβάδες. Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών

και λιπιδικών υπεροξειδίων θεωρείται ουσιαστικό χαρακτηριστικό της κυτταρικής βλάβης και αν η αντίδραση δεν τερματιστεί, με κάποιο τρόπο, μπορεί να οδηγήσει στην ολική καταστροφή και το θάνατο του κυττάρου.

Τα σπερματοζωάρια, σε αντίθεση με άλλα κύτταρα, λόγω της ιδιαίτερης δομής και λειτουργίας τους είναι επιρρεπή στη λιπιδική υπεροξειδωση.⁴⁰ Η πλέον σημαντική επίπτωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι η διαταραχή της δομής και της λειτουργίας της μεμβράνης του κυττάρου και των οργανιδίων (διακυτταρική και ενδοκυτταρική μεταφορά, ομοίωση ιόντων και μεταβολικών κ.λπ.). Εκτός από την προσβολή των κυτταρικών μεμβρανών, η λιπιδική υπεροξειδωση προκαλεί βλάβη του πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA και των πρωτεϊνών, είτε μέσω οξείδωσης των βάσεων του DNA (κυρίως της γουανίνης) είτε μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης της μαλονδιαλδεϋδης (MDA), με αποτέλεσμα να προκαλείται διασταυρούμενη αντίδραση και κερματισμός του DNA.⁴¹ Οι ROS μπορούν επίσης να προκαλέσουν οξείδωση των θειικών ομάδων (-SH) στις πρωτεΐνες και στο DNA, με αποτέλεσμα την αλλοίωση της δομής και της λειτουργίας των σπερματοζωαρίων.⁴² Η οξειδωτική βλάβη του μιτοχονδριακού DNA παρατηρείται σε όλα τα αερόβια κύτταρα που είναι πλούσια σε μιτοχόνδρια, περιλαμβανομένων και των σπερματοζωαρίων. Επιπρόσθετα, επηρεάζεται η φωσφορυλίωση και η παραγωγή ATP, με άμεσο αντίκτυπο στη γονιμοποιητική ικανότητα.⁴²

6. ΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Η χρωματίνη του σπερματοζωαρίου είναι μια συμπαγής, σταθερή, εξαιρετικά συμπυκνωμένη δομή και το DNA είναι στη φυσική και χημική κατάσταση που απαιτείται, όχι μόνο για να μεταφερθεί η γενετική πληροφορία στο ωοκύτταρο, αλλά και για να έχει πρόσβαση σε αυτή το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Ο Ward έχει προτείνει για το ώριμο σπερματοζωάριο ένα μοντέλο συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων, τα οποία από μακρές ταινίες DNA συσπειρώνονται σε τέσσερα επίπεδα οργάνωσης: (α) του πυρηνικού δακτυλίου-DNA, (β) της περιοχής της αγκύλης, (γ) της αποσυμπύκνωσης της πρωταμίνης και (δ) της χρωμοσωμικής οργάνωσης. Από τη μελέτη αυτού του μοντέλου συνάγεται ότι οι ανωμαλίες στο DNA αντανακλούν ανωμαλίες της συνολικής οργάνωσης του πυρήνα.⁴³

Για τη μελέτη της ακεραιότητας του DNA στα ώριμα σπερματοζωάρια εφαρμόστηκε από την ομάδα του Sakkas η μέθοδος της *in situ* σήμανσης με μετατόπιση εγκο-

πής.⁴⁴ Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση του ποσοστού των σπερματοζωαρίων που περιέχουν ενδογενείς εγχοπές του DNA σχετίζεται με μειωμένη γονιμότητα.⁴⁵⁻⁴⁷ Οι νορμοζωοσπερμικοί άνδρες έχουν χαμηλότερο ποσοστό σπερματοζωαρίων με βλάβη του DNA σε σύγκριση με τους ολιγοζωοσπερμικούς και τους τετατοζωοσπερμικούς.⁴⁸

Χρησιμοποιήθηκε επίσης και η μέθοδος TUNEL, για να δειχθεί το ποσοστό κερματισμένου DNA στα σπερματοζωάρια και εξετάστηκε η σχέση μεταξύ ελλιπούς πρωταμίνωσης και παρουσίας εγχοπών στο DNA.^{49,50} Οι Sun et al χρησιμοποίησαν τη μέθοδο TUNEL σε δείγματα από 298 ασθενείς και με την κυτταρομετρία ροής έδειξαν ότι υπάρχει αρνητική σχέση μεταξύ του ποσοστού κερματισμένου DNA και της κινητικότητας, της μορφολογίας και της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα.⁵¹ Σε 143 δείγματα γονιμοποίησης *in vitro* (IVF), διαπιστώθηκε αρνητική σχέση μεταξύ του ποσοστού σπερματοζωαρίων με κερματισμένο DNA και του ποσοστού γονιμοποίησης μετά από ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίων (ICSI).

Παρόλο που οι τεχνικές της *in situ* σήμανσης με μετατόπιση εγχοπής και TUNEL μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την παρατήρηση μεμονωμένων σπερματοζωαρίων, δεν είναι απολύτως ευαίσθητες και πιθανόν να μην ανιχνεύουν όλα τα σπερματοζωάρια που περιέχουν κερματισμένο DNA. Νεότερες τεχνικές, όπως π.χ. η μέθοδος comet (single cell gel electrophoresis, SCGE), έχουν επίσης προταθεί και σε πολλές κυτταρικές σειρές έχουν αποδειχθεί πλέον ειδικές και ευαίσθητες.⁵²⁻⁵⁴ Ενδιαφέρει, επίσης, αν η βλάβη αφορά σε μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA. Οι βλάβες στο μονόκλωνο DNA επιδιορθώνονται συνήθως κατά τη γονιμοποίηση, αλλά όταν πρόκειται για εκτεταμένη βλάβη, ο μηχανισμός αποκατάστασης είναι ελλιπής, με αποτέλεσμα διαταραχές της γονιμοποίησης ή και των αμέσως επόμενων σταδίων της ανάπτυξης του εμβρύου.

Όπως συμπεραίνεται από την εφαρμογή των τεχνικών TUNEL και comet, τα σπερματοζωάρια που συλλέγονται μετά την επεξεργασία παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ακέραιου DNA, σε σύγκριση με αυτά που λαμβάνονται απευθείας από το σπέρμα. Συνεπώς, κατά την επεξεργασία του σπέρματος και μετά τη φυγοκέντρηση, εκτός από το ότι λαμβάνονται σπερματοζωάρια καλής κινητικότητας και μορφολογίας, απομονώνονται και αυτά που διαθέτουν ακέραιο DNA. Υπάρχει όμως και αντίθετη άποψη, κατά την οποία η ακεραιότητα του DNA επηρεάζεται σημαντικά μετά την επεξεργασία, γεγονός που εκτιμάται με ανάλυση στον κυτταρομετρική ροή και με τη δοκιμασία ακριδίνης (acridine

orange test, AO). Προς επιβεβαίωση αναφέρονται και άλλες εργασίες, όπου γίνεται λόγος για την πρόκληση οξειδωτικού stress κατά τη φυγοκέντρηση.^{23,48}

7. ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΟ DNA ΤΩΝ ΩΡΙΜΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Ο πληθυσμός των σπερματοζωαρίων στο ανθρώπινο σπέρμα παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και αυτό είναι εμφανέστερο σε άνδρες των οποίων οι παράμετροι του σπέρματος είναι χαμηλότερες από τις φυσιολογικές που έχουν θεοπιστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.⁵⁵ Η θετική σχέση που παρατηρείται μεταξύ των παραμέτρων του σπέρματος κακής ποιότητας και της βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων υποδηλώνει, αρχικά, προβλήματα κατά τη σπερματογένεση.^{56,57}

Ως προς τη δημιουργία των εγχοπών στο DNA των σπερματοζωαρίων, προτείνονται δύο θεωρίες.

Η πρώτη προκύπτει από μελέτες σε πειραματόζωα και σχετίζεται με τον τρόπο συμπύκνωσης της χρωματίνης. Ενδογενείς εγχοπές στο DNA παρατηρούνται, φυσιολογικά, σε ορισμένα στάδια της σπερμιόγένεσης, στον αρουραίο και στο ποντίκι, και πιστεύεται ότι έχουν λειτουργική σημασία.⁵⁸⁻⁶⁰ Γίνονται στον όρχι, περί το τέλος της σπερμιόγένεσης και μάλιστα στα στάδια σπερματίδας 12-13, ενώ απαλείφονται όταν ολοκληρωθεί η συμπύκνωση της χρωματίνης. Συνεπώς, οι εγχοπές δημιουργούνται κατά τη μετατροπή των στρογγύλων σε επιμήκεις σπερματίδες πριν από την ολοκλήρωση της πρωταμίνωσης. Έτσι, διευκολύνεται η συσπείρωση και επαναδιάταξη της χρωματίνης κατά τη σπερμιόγένεση. Όμως, όταν οι εντομές διατηρούνται και στα σπερματοζωάρια, αυτό υποδηλώνει ατελή ωρίμανση ή υποπρωταμίνωση, η οποία διαπιστώνεται με τη χρώση της χρωμομυκίνης A₃.

Η δεύτερη θεωρία προτείνει ότι η παρουσία κερματισμένου DNA στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια οφείλεται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, παρόμοιο με αυτόν που παρατηρείται κατά την απόπτωση των σωματικών κυττάρων.⁶¹⁻⁶³ Αυτό επιβεβαιώθηκε από παρατηρήσεις *in situ*, με τη μέθοδο TUNEL^{50,61,62} και συγκριτικές μελέτες ανίχνευσης και διάκρισης των νεκρωτικών από τους αποπτωτικούς πυρήνες.⁶³ Τα σπερματοζωάρια των υπογόνιμων ανδρών διακρίνονται, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, από τη χαρακτηριστική αποπτωτική μορφολογία. Τέτοιου τύπου γαμέτες θεωρούνται «νεκροί» ως προς τη γονιμοποιητική τους ικανότητα.

Η εκατοστιαία αναλογία των αποπτωτικών σπερματοζωαρίων σε γόνιμους άνδρες κυμαίνεται, ανάλογα με

τη μέτρηση, από 0,1–5,2%.^{63,64} Είναι της τάξης του 1,9% στα σπερματοζωάρια που συλλέγονται σε διάλυμα κλίσης πυκνότητας, ενώ στις περιπτώσεις φλεγμονής, κίρσοκλής και AIDS ανέρχεται στο 10%. Σε ασθενείς με κρυψορχία, η συχνότητα αποπτωτικών σπερματοζωαρίων στο σπέρμα κυμαίνεται μεταξύ 15–20%. Οι πάσχοντες από τη νόσο του Hodgkin έχουν αποπτωτικά σπερματοζωάρια σε ποσοστό 16,5% και στην περίπτωση του σεμινώματος η αναλογία μπορεί να φθάσει μέχρι και 50% (εικ. 2).⁶⁴

Μια αρνητική σχέση παρατηρείται μεταξύ της εκατοστιαίας αναλογίας του κερματισμένου DNA και της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (58,3% στους γόνιμους άνδρες και 18,2% στους υπογόνιμους), της μορφολογίας (42,2% άτυπες μορφές στους γόνιμους άνδρες, 76% στους υπογόνιμους) και της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων ($100,9 \times 10^6/\text{mL}$ στους γόνιμους, $15,5 \times 10^6/\text{mL}$ στους υπογόνιμους).^{51,52,63,64}

8. ΠΟΙΕΣ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΟ DNA ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Κατά τη χρήση των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και ιδιαίτερα της ICSI (ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίων-μικρογονιμοποίηση) είναι δυνατό να προκύψουν δυσάρεστα αποτελέσματα, όταν τα χρησιμοποιούμενα σπερματοζωάρια παρουσιάζουν ανωμαλίες του DNA. Σε 143 δείγματα IVF διαπιστώθηκε αρνητική σχέση μεταξύ του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με κερματισμένο DNA και του ποσοστού γονιμοποίησης και αυλάκωσης του ζυγώτη, που παρατηρήθηκε μετά από ICSI.^{51,62}

Επίσης, έχει αναφερθεί θάνατος του εμβρύου στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης και από πειραματικές μελέτες διαπιστώνεται αυξημένη συχνότητα αποβολών και συγγενείς ανωμαλίες μεταβιβάσιμες στις επόμενες γενεές. Στον άνθρωπο, τα γονιμοποιημένα ωοκύτταρα που δεν αναπτύσσονται περαιτέρω, έχουν υποβληθεί σε ICSI με σπερματοζωάρια που φέρουν βλάβες στο DNA.⁶² Τα σπερματοζωάρια αυτά δεν αποσυμπυκνώνονται. Στους άνδρες με >25% βλάβη στο DNA παρατηρείται ποσοστό επιτυχούς γονιμοποίησης <20% μετά την ICSI. Επιπλέον, μικρότερη αναλογία των εμβρύων αυτών σχηματίζει βλαστοκύστες, σε σύγκριση με εκείνα που προέρχονται από IVF.^{65,66}

9. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Τα αντιοξειδωτικά αναστέλλουν ή καθυστερούν την απόπτωση, σε ορισμένα συστήματα. Πολλά αντιοξειδω-

τικά είναι εκκαθαριστές των δραστικών μορφών οξυγόνου και έχει βρεθεί, για παράδειγμα, ότι καταργούν την κυτταροτοξικότητα του TNF-α στα καρκινικά κύτταρα, την ενεργοποίηση της απόπτωσης που επάγεται από τα κορτικοειδή, την ετοποσίδη και την ακτινοβολία, την απόπτωση των θυμοκυττάρων, αλλά και τη λόγω έλλειψης γλυταθειόνης προκαλούμενη απόπτωση των νευρικών κυττάρων, όχι όμως και την απόπτωση που επάγεται από το Fas ή τη σταυροσπορίνη.

Αρκετά αντιοξειδωτικά έχουν και άλλες ιδιότητες με ειδική επίδραση επί των μορίων που εμπλέκονται στην απόπτωση. Για παράδειγμα, πολλά αντιοξειδωτικά είναι αναγωγικοί παράγοντες και μεταβάλλουν τις σουλφυδρυλικές ομάδες των πρωτεϊνών, αλλάζοντας τη δράση τους. Αναφέρεται, για παράδειγμα, η ρύθμιση με ένα μηχανισμό οξειδοαναγωγής της δραστηριότητας δέσμευσης στο DNA των Fos-Jun (AP-1) και η αλλαγή της δραστηριότητας υποδοχέα του N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) μέσω θειολομάδων επί της πρωτεΐνης.¹⁰

Ορισμένα ένζυμα και άλλες ουσίες στο σπερματικό υγρό παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Μεταξύ αυτών αναφέρονται η υπεροξειδάση/αναγωγάση της γλυταθειόνης, η δισμουτάση του υπεροξειδίου, το πυροσταφυλικό, η ταυρίνη, η υποταυρίνη, το ουρικό και οι βιταμίνες C και E.^{67,68} Τα ιόντα των μετάλλων, π.χ. του χαλκού και του σιδήρου, μπορούν να τροποποιήσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του σπερματικού υγρού, μεταβάλλοντας το ρυθμό οξείδωσης του ασκορβικού οξέος.

Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα χορήγησης αντιοξειδωτικών, *in vivo*, δεν είναι ικανοποιητικά και σε κάθε περίπτωση όχι καλύτερα από τα αμφισβητούμενα αποτελέσματα θεραπειών που εφαρμόζονται σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας λόγω προστατίτιδας ή κίρσοκλής.⁶⁹ Η αποτελεσματικότητα της *per os* θεραπείας με βιταμίνη E, στη συνήθη δοσολογία, αμφισβητείται. Αντίθετα, ακόμη και μικρές δόσεις βιταμίνης C (200 mg) αυξάνουν τα επίπεδα του ασκορβικού οξέος στους καπνιστές, από 5,6 σε 13,1 mg/dL και αυτό αντιστοιχεί στα 16,1 mg/dL που επιτυγχάνονται μετά από χορήγηση 1000 mg βιταμίνης C.⁷⁰ Είναι γνωστό ότι το κάπνισμα ελαττώνει το ασκορβικό οξύ στο σπέρμα και ότι η βιταμίνη C προστατεύει έναντι της οξειδωτικής βλάβης του DNA των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων.⁷¹

Σε ένα τυχαίο δείγμα 152 ανδρών και 86 υπογόνιμων με ολιγοασθενοτεροσπερμία (OAT), η χορήγηση 200 mg βιταμίνης C, ως placebo, δεν επηρέασε τις παραμέτρους του σπέρματος και είχε τα ίδια αποτελέσματα ως προς την επιτυχία της κύησης με αυτά που παρατηρούνται μετά από τη χορήγηση μεστρερολόνης και κλο-

μφαιίνης.⁷² Λογικά, τα αντιοξειδωτικά θα έπρεπε να είναι αποτελεσματικά μόνο στην ΟΑΤ, λόγω αυξημένων επιπέδων ROS. Όμως, οι υπογόνιμοι άνδρες με υψηλό βαθμό οξειδωτικής βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων, ακόμη και μετά από τη χορήγηση συνδυασμού βιταμινών C, E και γλουταθειόνης, παρουσιάζουν ελάχιστη αύξηση της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων.⁷³

Τα αντιοξειδωτικά θα είχαν ενδιαφέρον, αν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αντί της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στις περιπτώσεις σοβαρής ανδρικής υπογονιμότητας ή αν μπορούσαν να βελτιώσουν το ποσοστό γονιμοποίησης, όταν είναι απαραίτητη η IVF. *In vitro*, τα φυσιολογικά επίπεδα των ROS ευνοούν την ενεργοποίηση και τη γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων, καθώς και τη σύντηξη του ωοκυττάρου με το σπερματοζωάριο. Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι χρήσιμα στις περιπτώσεις όπου γίνεται επιλογή σπερματοζωαρίων για εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) ή για ενδομητρική σπερματέγχυση (IUI) και τα επίπεδα των ROS είναι πολύ υψηλά. Η προσθήκη αντιοξειδωτικών (π.χ. δισμουτάσης του υπεροξειδίου) κατά τη φυγοκέντρηση εμποδίζει την ελάττωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και βελτιώνει την ενεργοποίηση αλλά και την αντίδραση του ακροσώματος.⁷⁴ Παρομοίως, η προσθήκη της αναγωγικής ουσίας Ν-ακετυλο-L-κυστεΐνης σε σπέρμα από υπογόνιμους άνδρες με αυξημένες τιμές ROS βελτιώνει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και ελαττώνει τα επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου.⁷⁵ Η επώαση κατά τη ρευστοποίηση και τη φυγοκέντρηση με διάλυμα που περιέχει γλυκόζη και γλουταθειόνη (sperm-fit) αυξάνει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.⁷⁶ Ωστόσο, είναι απαραίτητο να γίνουν περισσότερες μελέτες, για να επιβεβαιωθεί ότι τα αντιοξειδωτικά είναι αβλαβή και ωφέλιμα για την επιτυχία της γονιμοποίησης κατά την IVF και την IUI.

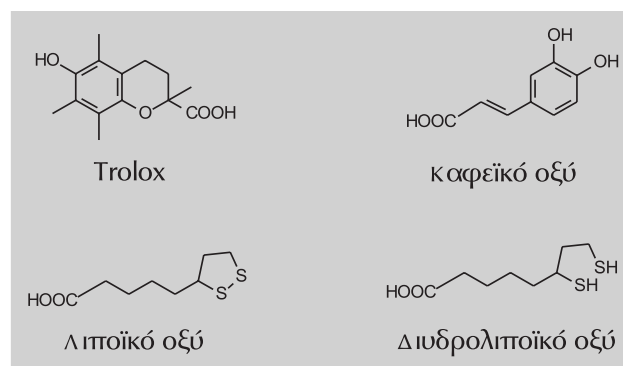
Η άποψη ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS προκαλούν διαταραχές στην ακεραιότητα και τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων φαίνεται να κερδίζει συνεχώς έδαφος, αλλά δεν είναι ακόμη εντελώς τεκμηριωμένο ότι τα αντιοξειδωτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας.

Συνεπώς, επιβάλλεται η ανάλυση με νέες μεθόδους της δράσης των αντιοξειδωτικών για τη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος, *in vivo* και *in vitro*, καθώς και ο σχεδιασμός/σύνθεση νέων ενώσεων με βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται ενώσεις που εμπεριέχουν δομικά χαρακτηριστικά υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δράση της τοκοφερόλης και του λιποϊκού οξέος ή του καφεϊκού οξέος (εικ. 5).

Η τοκοφερόλη (vitamin E) είναι γνωστό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό.^{77,78} *In vitro* πειράματα έδειξαν ότι η τοκοφερόλη προστατεύει τα σπερματοζωάρια από την οξειδωτική βλάβη προλαμβάνοντας την απώλεια της κινητικότητάς τους.⁷⁹ Το συνθετικό υδατοδιαλυτό της ανάλογο *trolox* εμφανίζει ισχυρή ενδοκυτταρική δράση και αναστολή του κερματισμού του DNA σε HepG2 κύτταρα.⁸⁰ Επίσης, εμποδίζει την απόπτωση που προκαλείται από το οξειδωτικό stress σε θυμοκύτταρα ποντικού.⁸¹

Το λιποϊκό οξύ βρίσκεται σε όλα τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα, συμμετέχει σε πολυενzymικά συστήματα και είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες.⁸² Οι θεραπευτικές του όμως εφαρμογές έχουν σχέση με τη χορήγηση ελεύθερου λιποϊκού.⁸³ Το λιποϊκό οξύ ανάγεται *in vivo* σε διυδρολιποϊκό οξύ (DHLA).⁸⁴ Τα τελευταία 10 χρόνια σημειώνεται έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για το λιποϊκό οξύ.⁸⁵ Θεραπευτικά, χορηγείται ως ρακεμικό μίγμα και έχει αξιόλογη δράση σε παθολογικές καταστάσεις όπου εμπλέκεται το οξειδωτικό stress, όπως ο διαβήτης,⁸⁶ οι προκαλούμενες βλάβες κατά την ισχαιμία-επαναιμάτωση,⁸⁷ η φλεγμονή,⁸⁸ τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα⁸⁹ και άλλες. Σημαντικό πλεονέκτημα του λιποϊκού οξέος είναι η χαμηλή τοξικότητά του. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το αμινοαμιδικό ανάλογο του λιποϊκού παρουσιάζει βελτιωμένη δράση. Συγκεκριμένα, συγκρατείται στο εσωτερικό των κυττάρων και είναι αναστολέας της ενεργοποίησης του NF-κΒ.⁹⁰

Οι εστέρες του καφεϊκού οξέος αποτελούν συστατικά πολλών τροφίμων. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει αξιόλογη δράση του καφεϊκού οξέος και των παραγώγων του, όπως παρεμπόδιση της οξειδωτικής μετατροπής της LDL⁹¹ και προστασία από τη βλάβη κατά την επαναιμάτωση μετά από ισχαιμία του εντέρου.⁹² Τα αμίδια του καφεϊκού οξέος είναι ισχυροί αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης.⁹³ Επίσης, το καφεϊκό οξύ δεσμεύει την



Εικόνα 5. Δομικά χαρακτηριστικά ουσιών με αντιοξειδωτική δράση.

ιδιαίτερα τοξική ρίζα υδροξυλίου, ενώ φαίνεται ότι έχει αντιοξειδωτική δράση μέσα στο κύτταρο. Η ο-διυδροξυομάδα φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη δράση του κατά του κερματισμού του DNA, που προκαλείται από το H₂O₂.⁹⁴ Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, το καφεϊκό οξύ μπορεί να εμπλέκεται στην αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κΒ και της απόπτωσης σε U937 κύτταρα.⁹⁵

Οι διαφορετικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των τριών παραπάνω ενώσεων αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης ερευνητικής δραστηριότητας, η οποία αποβλέπει στο σχεδιασμό νέων μορίων που θα συνδυάζουν τα δομικά χαρακτηριστικά αυτών, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της δράσης τους.

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μια νέα εξέλιξη στο χώρο της μελέτης της ανδρικής υπογονιμότητας είναι η ανακάλυψη ότι η αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), στο σπέρμα, επηρεάζει τη λειτουργική ικανότητα των σπερματοζωαρίων. ROS ανιχνεύονται σε ποσοστό 25–40% των δειγμάτων σπέρματος στους υπογόνιμους άνδρες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα και παράγονται από τα σπερματοζωάρια και τα λευκοκύτταρα. Συνυπάρχουν με ανωμαλία του μέσου τμήματος της ουράς του σπερματοζωαρίου, με ελαττωμένη κινητικότητα και απώλεια της ικανότητας των σπερματοζωαρίων για την αντίδραση του ακροσώματος, καθώς και με ελαττωμένη ικανότητα σύντηξης σπερματοζωαρίου-ωοκυττάρου και μειωμένη γονιμότητα *in vitro* και *in vivo*.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τη βασική πηγή ROS και εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των προαποπτωτικών

μορίων, τον κερματισμό του DNA και την απόπτωση. Τα διαχεόμενα υπεροξειδία προκαλούν λιπιδική υπεροξείδωση, με αποτέλεσμα διαταραχή της δομής και της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης, των οργανιδίων των σπερματοζωαρίων και κερματισμό του DNA αυτών. Η οξειδωτική βλάβη του μιτοχονδριακού DNA οδηγεί σε ελαττωμένη παραγωγή ATP με αντίκτυπο στη γονιμοποιητική ικανότητα, ενώ η βλάβη του πυρηνικού DNA προσβάλλει τη δομή και τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Οι τεχνικές TUNEL και comet, που ανιχνεύουν την ακεραιότητα του DNA στο σπέρμα υπογόνιμων ανδρών, δείχνουν ότι η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης κερματισμένου DNA σχετίζεται με αλλαγές στην κινητικότητα, τη μορφολογία, τη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων στο σπέρμα και το ποσοστό γονιμοποίησης, μετά από ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίων (ICSI).

Τα αποτελέσματα χορήγησης αντιοξειδωτικών, *in vivo*, δεν είναι ικανοποιητικά. *In vitro*, τα φυσιολογικά επίπεδα των ROS ευνοούν την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και τη γονιμοποίηση. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να επιβεβαιωθεί ότι τα αντιοξειδωτικά είναι αβλαβή και ωφέλιμα στη θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας και την επιτυχία της εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) και της ενδομητρικής σπερματέγχυσης (IUI).

Συνεπώς, επιβάλλεται η ανάλυση με νέες μεθόδους της δράσης των αντιοξειδωτικών για τη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος, *in vivo* και *in vitro*, καθώς και ο σχεδιασμός/σύνθεση νέων ενώσεων με βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται ενώσεις που εμπεριέχουν δομικά χαρακτηριστικά υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δράση της τοκοφερόλης και του λιποϊκού ή του καφεϊκού οξέος

ABSTRACT

Sperm oxidative damage and the role of reactive oxygen species in male infertility

R. ANGELOPOULOU, M. KYRIAZOGLU

Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2005, 22(5):433–446

Infertility may be due, to a very large extent, to the male factor. Reactive oxygen species (ROS) found in sperm of poor quality are produced by either the spermatozoa or the leucocytes. Mitochondria are the basic source of ROS and are involved in the activation of proapoptotic molecules, DNA fragmentation and apoptosis. Excessive generation of ROS in the ejaculate affects the functional competence of human spermatozoa and has been associated with decreased motility, loss of the capacity to undergo the acrosome reaction, decreased sperm-oocyte fusion capability and diminished fertility *in vitro* and *in vivo*. The mechanism by which ROS disrupt sperm function involves the peroxidation of unsaturated fatty acids in the sperm membranes and DNA frag-

mentation. Oxidative damage of the mitochondrial DNA leads to reduced production of ATP, affecting reproductive capacity, while nuclear DNA damage is detrimental to the structure and function of the sperm. Techniques such as TUNEL and comet, which are efficient in detecting DNA breakage in ejaculated spermatozoa from subfertile men, showed that a high incidence of fragmented DNA correlated with adverse effects on sperm motility, morphology, sperm count and the percentage of fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The results reported to date of *in vivo* antioxidant treatment are modest. Antioxidants could be useful in the case of excessive levels of ROS found during sperm selection for *in vitro* fertilization (IVF) or intrauterine injection (IUI), but further studies are needed to ascertain their role in the treatment of male infertility. Analysis, using new techniques, of the action of antioxidants and subsequent design/synthesis of new compounds with optimal antioxidant action are necessary for the improvement of sperm quality and the treatment of male infertility.

Key words: DNA fragmentation, Male infertility, ROS, Spermatozoa

Βιβλιογραφία

- CARLSEN E, GIWERCMAN A, KEIDING N, SKAKKEBAEK NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 1992, 305:609–613
- HULL MG, GLAZENER CM, KELLY NJ, CONWAY DI, FOSTER PA, HINTON RA ET AL. Population study of causes, treatment and outcome of infertility. *Br Med J* 1995, 291:1693–1697
- MAK V, ZIELENSKI J, TSUI LC, DURIE P, ZINI A, MARTIN S ET AL. Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. *JAMA* 1999, 281:2217–2224
- HENDIN BN, KOLETTIS PN, SHARMA RK, THOMAS AJ, AGARWAL A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 1999, 161:1831–1844
- WANG A, FANNING L, ANDERSON DJ, LOUGHLIN KR. Generation of reactive oxygen species by leukocytes and sperm following exposure to urogenital tract infection. *Arch Androl* 1997, 39:11–17
- GUZMAN EG, OLLERO M, LOPEZ MC, SHARMA RK, ALVAREZ JG, THOMAS AJ ET AL. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 2001, 16:1922–1930
- SAKKAS D, MARIETHOZ E, MANICARDI G, BIZZARO D, BIANCHI P, BIANCHI U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999, 4:31–37
- GRIVEAU JF, LE LANNOU D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997, 20:61–69
- AITKEN RJ. The Amoroso lecture. The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999, 115:1–7
- JACOBSON MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* 1996, 21:83–86
- KROEMER G, ZAMZAMI N, SUSIN SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997, 18:44–51
- GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998, 281:1309–1312
- KROEMER G, REED JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000, 6:513–519
- WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001, 15:2922–2933
- MARZO I, BRENNER C, ZAMZAMI N, SUSIN SA, BEUTNER G, BRIDICZKA D ET AL. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998, 187:1261–1271
- POLLA BS, BANZET N, DALL'AVA J, ARRIGO AB, VIGNOLA AM. Les mitochondries: carrefour entre vie et mort cellulaire: role des protéines de stress et conséquences sur l'inflammation. *Med Sci* 1998, 14:18–25
- NAGATA S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000, 256:12–18
- LIU X, LI P, WIDLAK P, ZOU H, LUO X, GARRARD WT ET AL. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:8461–8466
- LOEFFLER M, KROEMER G. The mitochondrion in cell death control. Certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000, 256:19–26
- HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000, 407:770–776
- LI P, NIJHAWAN D, BUDHIHARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES ET AL. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997, 91:479–489
- PAN G, O'ROURKE K, DIXIT VM. Caspase-9, Bcl-XL and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998, 273:5841–5845
- YOUNGLAI EV, HOLT D, BROWN P, JURISICOVA A, CASPER RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001, 16:1950–1953
- MORTIMER D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failure of *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1991, 6:173–176
- 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

26. DONNELLY ET, O'CONNELL M, McCLURE N, LEWIS SEM. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000, 15:1552–1561
27. AITKEN RJ. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev* 1994, 6:19–24
28. SHARMA RK, AGARWALL A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996, 48:835–850
29. AITKEN RJ, WEST KM, BUCKINGHAM DW. Leucocyte infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1994, 15:343–352
30. AITKEN RJ, WEST KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 1990, 3:433–451
31. RAJASEKARAN M, HELLSTROM WJ, NAZ RK, SIKKA S. Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. *Fertil Steril* 1995, 64:166–171
32. RAJASEKARAN M, HELLSTROM WJ, SIKKA SC. Quantitative assessment of cytokines (GRO-alpha and IL-10) in human seminal plasma during genitourinary inflammation. *Am J Reprod Immun* 1996, 36:90–95
33. IWASAKI A, GAGNON C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992, 57:409–416
34. KRAUSZ C, MILLS C, ROGERS S, TAN SL, AITKEN RJ. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationships with motility and fertilization *in vitro*. *Fertil Steril* 1994, 62:599–605
35. McLEO D. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943, 138:512–518
36. AITKEN RJ, GORDON E, HARKIS D, TWIGG JP, MILNE P, JENNING Z ET AL. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998, 59:1037–1046
37. TWIGG JP, 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
38. TWIGG JP, IRVINE DS, AITKEN RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998, 13:1864–1871
39. AITKEN RJ, CLARKSON JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987, 81:459–469
40. ALVAREZ JG, TOUCHSTONE JC, BLASCO L, STOREY BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987, 8:338–348
41. ERNSTER L. Lipid peroxidation in biological membranes: Mechanisms and implications. In: Yagi K (ed) *Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants*. CRC Press, Boca Raton, 1993:1–38
42. CUMMINS JM, JEQUIER AM, RAYMOND K. Molecular biology of human male infertility: Links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress? *Mol Reprod Dev* 1994, 37:345–362
43. WARD WS. Chromosome organization in mammalian sperm nuclei. In: *Genetics of human male infertility*. Editions EDK, Paris, 1997:205–221
44. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989:2
45. BIANCHI PG, MANICARDI GC, BIZZARO D, BIANCHI U, SAKKAS D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and *in situ* nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993, 49:1083–1088
46. 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
47. SAKKAS D, UMER F, BIZZARO D, BIANCHI PG, WAGNER I, JACQUENOUD N. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Hum Reprod* 1996, 11:837–843
48. TOMLINSON MJ, MOFFAT O, MANICARDI GC, BIZZARO D, AFNAN M, SAKKAS D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: Implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001, 16:2160–2165
49. GORCZYCA W, TRAGANOS F, JESIONOWSKA H, DARZYŃKEWICZ Z. Presence of 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, 207:202–220
50. MANICARDI GC, TOMBACCO A, BIZZARO D, BIANCHI U, BIANCHI PG, SAKKAS D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick-translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 1998, 30:33–39
51. 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
52. HUGHES CM, LEWIS SEM, McKELVEY-MARTIN VJ, THOMSON WB. 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
53. 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, 10:231–237
54. COLLINS AR, DOBSON VL, DUSINSKA M, KENEDY G, STETINA R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997, 29:183–193

55. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. 4th ed. Press Syndicate for the University of Cambridge, Cambridge, 1999
56. ANGELOPOULOU R, DADOUNE JP. Apoptose dans la spermatogenese normale et pathologique. *Contr Fertil Sex* 1999, 27:99–106
57. ANGELOPOULOU R. Apoptosis and spermatogenesis. *Arch Hellen Med* 2000, 17:12–14
58. McPHERSON SMG, LONGO FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993, 37:109–128
59. McPHERSON SMG, LONGO FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: Possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol* 1993, 158:122–130
60. SAKKAS D, MANICARDI GC, BIANCHI PG, BIZZARO D, BIANCHI U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1995, 52:1149–1155
61. GORCZYCA W, GONG J, DARZYŃKIEWICZ Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993, 53:1945–1951
62. LOPES S, SUN JG, JURICOVA A, MERIANO J, CASPER RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality sperm samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998, 69:528–532
63. BACETTI B, COLLODEL G, PIOMBONI P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996, 28:587–596
64. 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
65. EVENSON DP, DARZYŃKIEWICZ Z, MELAMED MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980, 210:1131–1133
66. SHOUKIR Y, CHARDONNENS D, CAMPANA A, SAKKAS D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 1998, 13:1632–1637
67. MARTIN-DU PAN RC, SAKKAS D. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? *Hum Reprod* 1998, 13:2984–2985
68. LEWIS SEM, STERLING ESL, YOUNG IS, THOMSON W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997, 67:142–147
69. MARTIN-DU PAN RC, BISHOP P, CAMPANA A, MARABIA A. Relationship between etiological factors and total motile sperm count in 350 infertile patients. *Arch Androl* 1997, 39:197–210
70. DAWSON EB, HARRIS WA, TETER MC, POWEL LC. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril* 1992, 58:1034–1039
71. FRAGA CG, MOTCHNIK PA, SHIGENAGA MK, HELBOCK HJ, JACOB RA, AMES BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:11003–11006
72. ABEL BJ, CARSWELL G, ELTON R, HARGREAVE TB, KYLE K, ORR S ET AL. Randomized trial of clomiphene citrate treatment and vitamin C for male infertility. *Br J Urol* 1982, 54:780–784
73. 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, 68:519–523
74. GRIVEAU JF, RENARD JF, LE LANNOU D. An *in vitro* promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 1994, 17:300–307
75. OEDA T, HANKAL R, OHMORI H, SCHILL WB. Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? *Andrologia* 1997, 29:125–131
76. PARINAUD J, LE LANNOU D, VIEZT G, GRIVEAU JF, MILHET P, RICH-OILLEY G. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (sperm-fit) following ejaculation. *Hum Reprod* 1997, 12:2434–2436
77. DIPLOCK AT. *Fat-soluble vitamins*. Heinman, London, 1985
78. TRABER MG. Determinants of plasma vitamin E concentrations. *Free Radic Biol Med* 1994, 16:229–239
79. AITKEN RJ, CLARKSON JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988, 9:367–376
80. KARLSSON WJ, DANIELSSON A. Effects of vitamins E, C and catalase on bromobenzene and hydrogen peroxide induced intracellular oxidation and DNA single strand breakage in Hep G2 cells. *J Hepatol* 1997, 26:669–677
81. FORREST VJ, KANG YH, McCLAIN DE, ROBINSON DH, RAMAKRISHNAN N. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. *Free Radic Biol Med* 1994, 16:675–684
82. ROY S, SEN CK, TRITSCHLER HJ, PACKER L. Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by α -lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. *Biochem Pharmacol* 1997, 53:393–399
83. BIEWENGA GP, HAENEN GRMM, BAST A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 1997, 29:315–331
84. KAGAN VE, SHVEDOVA A, SERBINOVA A, SERBINOVA E, KHAN S, SWANSON C ET AL. Dihydrolipoic acid – A universal antioxidant both in membrane and in aqueous phase. *Biochem Pharmacol* 1992, 44:1637–1649
85. PACKER L, WITT EH, TRITSCHLER HJ. α -Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995, 19:227–250
86. BORCEA V, NOUROOZ-ZADEH J, WOLFF SP, KLEVESATH M, HOFMANN M, URICH H ET AL. α -Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria. *Free Radic Biol Med* 1999, 26:1495–1500
87. COOMBES JS, POWERS SK, DEMIREL J, JESSUP HK, VINCENT KL, HAMILTON KL ET AL. Effect of combined supplementation with vitamin E and α -lipoic acid on myocardial performance during *in vivo* ischaemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand* 2000, 169:261–269

88. FUCHS J, MILBRADT R. Antioxidant inhibition of skin inflammation induced by reactive oxidants: Evaluation of the redox couple dihydrolipoate/lipoate. *Skin Pharmacol Physiol* 1994, 7:278–284
89. PANIGRAHI M, SADGUNA Y, SHIVAKUMAR BR, KOLLURI SVR, ROY S, PACKER L ET AL. α -Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1996, 717:184–188
90. SEN CK, TIROSH O, ROY S, KOBAYASHI MS, PACKER L. A positively charged α -lipoic acid analogue with increased cellular uptake and more potent immunomodulatory activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 247:223–228
91. NARDINI M, D'AQUINO M, TOMASSI G, GENTILI V, DI FELICE M, SCACCINI C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydrocinnamic acid derivatives. *Free Radic Biol Med* 1995, 19:541–552
92. KOLTUKSUZ U, OZEN S, UZ E, AYDINC M, KARAMAN A, GULTEK A ET AL. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 1999, 34:1458–1462
93. RAJAN P, VEDERNIKOVA I, COS P, VANDEN BERGHE D, AUGUSTYNS K, HAEMERS A. Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants. *Bioorg Med Chem Lett* 2001, 11:215–217
94. IWAHASHI H, ISHII T, SUGATA R, KIDO R. The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 1990, 276:242–247
95. NARDINI M, PISU P, GENTILI V, NATELLA F, DI FELICE M, PICCORELLA E ET AL. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free Radic Biol Med* 1998, 25:1098–1105

Corresponding author:

R. Angelopoulou, 54 Anagnostopoulou street, GR-106 72 Athens, Greece
e-mail: rangelop@med.uoa.gr