



Seksowanie nasienia i ocena jakości plemników – najnowsze osiągnięcia cytometrii przepływowej

Michał Bochenek

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,
Balice k. Krakowa

Sperm sexing and semen quality measurement by flow cytometry – state-of the-art

Summary

Flow cytometry is a modern and powerful technique for the measurements of many sperm cells' parameters as well as sperm sexing. In sperm examination, it offers several advantages over the formerly used methods: high accuracy, possibility of measurements two or even three parameters simultaneously and analysis of large number of cells per second. Moreover, at present, it is the only technique which allows reliable sperm sorting of X- and Y-fractions with high purity.

The paper is a review of the flow cytometry applications in sperm sexing and measurements of sperm chromatin structure.

Key words:

flow cytometry, sperm sexing, sperm chromatin structure.

1. Wprowadzenie

Cytometria przepływowa jest metodą rozwijającą się w ostatnich dwudziestu latach niezwykle dynamicznie. Dzięki szybkiemu postępowi w elektronice powstały urządzenia pozwalające na analizę nawet 100 000 komórek w ciągu sekundy. Wprowadzane do użycia nowe markery o różnych właściwościach biofizycznych i spektralnych, a także rozbudowa samych cytometrów umożliwiają obecnie obserwację do kilkunastu barw – a zatem

Adres do korespondencji

Michał Bochenek,
Zakład Fizjologii Rozrodu
Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa.

biotechnologia

1 (60) 106–115 2003

i cech – równocześnie z każdej komórki. Odpowiednio wzrosła także szybkość sortowania badanych komórek, podnosząc wielokrotnie wydajność metody.

Cytometria przepływowa znajduje zastosowanie w badaniach dotyczących zarówno świata roślin jak i zwierząt; w badaniach cech strukturalnych jak i funkcjonalnych komórek; wykorzystywana jest w pracach badawczych i w standardowej diagnostyce. Nic zatem dziwnego, że metoda ta została wykorzystana również na potrzeby badań nasienia ssaków. Plemniki są z punktu widzenia cytometrii przepływowej niemal idealnym obiektem do badań. Występują one jako zawiesina pojedynczych komórek w osoczu nasienia, przy stosunkowo niewielkim udziale komórek innego typu. Duże koncentracje plemników w ejakulatach (w zależności od gatunku: od kilku milionów do kilku miliardów/ml), oraz łatwość ich uzyskania dają do dyspozycji odpowiedni „nadmiar” komórek do badań.

W artykule tym zostaną omówione dwa aspekty zastosowania cytometrii przepływowej w pracach z nasieniem ssaków: rozdział nasienia na frakcje plemników przenoszące chromosom X oraz Y – tzw. „seksowanie” nasienia oraz ocena jednej z cech jakości plemników – stopnia uszkodzenia struktury chromatyny.

2. Seksowanie nasienia

Możliwość regulacji płci jest ideą przyciągającą uwagę hodowców zwierząt z co najmniej dwóch powodów. Po pierwsze, możliwość dysponowania „na życzenie” większą liczbą samic w stadzie jest korzystne z punktu widzenia prac hodowlanych; po drugie, przewaga samców z ich wyższymi nawet o kilkanaście procent przyrostami masy ciała jest bardzo pożądana z ekonomicznego punktu widzenia w fermach towarowych, przeznaczających zwierzęta na ubój.

Zainteresowanie metodami rozdziału plemników zwierząt notuje się już od czasu szerokiego wprowadzenia inseminacji do praktyki hodowlanej bydła. Ze względów praktycznych byłaby to najwygodniejsza metoda regulacji płci – jednorodne frakcje plemników przenoszących chromosomy X lub Y mogłyby być zamrażane i wykorzystywane do standardowej inseminacji. Początkowo jednak zasadniczą barierą pozostawał brak wiarygodnych i szybkich metod identyfikacji „płci” plemników, a także możliwości skutecznego odseparowania „rozpoznanych” już frakcji. Już od lat pięćdziesiątych przeprowadzano próby fizycznego rozdziału nasienia buhajów na frakcje „męską” i „żeńską”. Opierały się one na wykorzystaniu zakładanych różnic pomiędzy plemnikami niosącymi chromosomy X i Y, a dotyczącymi wielkości i ciężaru (1), szybkości poruszania się (2), ładunku elektrycznego (3), właściwości powierzchni plemników (4), jak również różnic o charakterze immunologicznym (5,6). Wymienione metody okazały się jednak niezadowolające z powodu niskiej dokładności i wydajności, lub też jako dające możliwość odseparowania tylko jednej frakcji nasienia. Rozdzielone w ten sposób nasienie posiadało ponadto niewielką zdolność zapładniającą. W rezultacie żadna ze wspomnianych metod do dzisiaj nie znalazła praktycznego zastosowania.

Większość metod stosowanych dotąd do rozpoznawania plemników „męskich” i „żeńskich” opiera się na różnicy wielkości pomiędzy chromosomami X i Y. U większości gatunków ssaków chromosom Y jest najmniejszym, bądź jednym z najmniejszych elementów w całym komplecie (7). Różnicę tę wykorzystuje również cytometria przepływowa – obecnie jedyna metoda dająca praktyczną możliwość seksowania plemników. Pomysł jej wykorzystania do rozdziału nasienia według „płci” narodził się na początku lat osiemdziesiątych, kiedy Pinkel i wsp. (8) stwierdzili możliwość dokonania precyzyjnego pomiaru DNA oraz różnic jego zawartości pomiędzy plemnikami niosącymi chromosom X lub Y. Barwili oni utrwalone plemniki kilku gatunków ssaków bromkiem etydy, mitramycyną lub DAPI. Podobne badania z wykorzystaniem fluorochromu Hoechst 33342 przeprowadził Keeler i wsp. (9). Barwnik ten, stosowany do dzisiaj w seksowaniu nasienia, łatwo przenika przez nieuszkodzone błony żywych komórek, łączy się stechiometrycznie z DNA w okolicach par zasad A-T, a wzbudzany światłem ultrafioletowym fluoryzuje w paśmie 450 nm. Na podstawie wspomnianych badań określono dokładne różnice w ilości DNA pomiędzy plemnikami X i Y (tab.).

Tabela

Różnice w ilości DNA pomiędzy plemnikami niosącymi chromosomy X i Y

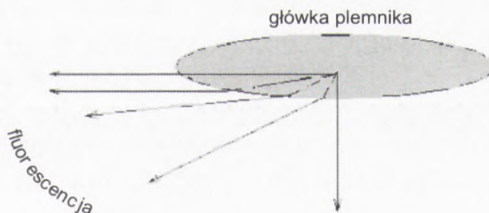
Gatunek	Różnice w ilości DNA (%)
człowiek	2,8
królik	3,0
knur	3,6
koń	3,7
buhaj	3,8
pies	3,9
tryk	4,2
szynszyl	7,5

W drugiej połowie lat osiemdziesiątych dokonano pierwszych prób sortowania nasienia tą metodą (10). Nasienie buhaja, knura i tryka zostało dla ułatwienia analizy pozbawione witek. W przeprowadzonej reanalizie nasienia świeżego, barwionego fluorochromem Hoechst 33342 wykazano, że dokładność separacji wynosiła 86% w przypadku plemników „żeńskich” oraz 81% w przypadku „męskich”. W kolejnych badaniach (11) wykazano, że barwione Hoechstem 33342 i sortowane plemniki buhaja i królika mogą zachować ruchliwość i zdolność zapładniającą. Po inseminacji sortowanym nasieniem buhaja uzyskano istotne przesunięcie proporcji płci potomstwa. Zanotowano jednak znaczne obniżenie płodności, gdyż w wyniku inseminacji wycieliło się zaledwie 30% krów.

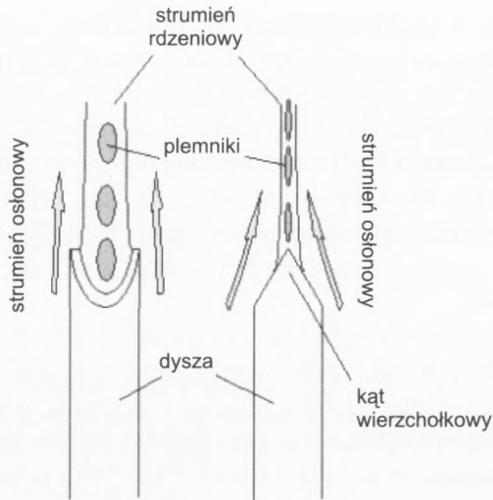
W pełni skutecznego rozdziału plemników dokonano w końcu lat osiemdziesiątych na nasieniu królika (12). W przeprowadzonej reanalizie nasienia świeżego,

barwionego Hoechstem 33342 wykazano, że dokładność separacji wynosiła 86% w przypadku plemników „żeńskich”, oraz 81% w przypadku „męskich”. Rozdzielone plemniki wprowadzane były chirurgicznie do macicy królic. Uzyskano ok. 28% wykotów; potomstwo urodzone po inseminacji frakcją X było w 94% płci żeńskiej, natomiast po inseminacji frakcją Y w 81% męskie. Nieco gorsze rezultaty osiągnięto sortując nasienie knura (13). Również w tym przypadku skuteczność rozdziału oceniano na podstawie reanalizy i inseminacji chirurgicznej loch. Odsetek prosiąt płci żeńskiej po inseminacji „żeńską” frakcją wyniósł 74%, a płci męskiej po inseminacji „męską” frakcją – 68%.

We wspomnianych pracach wykazano, że istnieje realna możliwość seksowania nasienia. W badaniach tych wskazano równocześnie na pewne istotne ograniczenia metody, z których najważniejsza była niewielka szybkość sortowania, osiągająca przeciętnie 100-200 komórek/sekundę. Na szybkość tę, oprócz niskiej wydajności samych sorterów, wpływał w sposób pośredni specyficzny płaski kształt główek plemników, powodujący zjawisko soczewkowania fluorescencji. Polega ono na ugięciu fluorescencji pochodzącej z wnętrza ku krawędziom główki plemnika. Fluorescencja nie jest zatem dystrybuowana równomiernie wokół całej główki, lecz soczewkowana w kierunkach zbliżonych do jej płaszczyzny (rys. 1). W przypadku analiz ilości DNA plemników, gdzie spodziewane różnice fluorescencji są niewielkie, zjawisko to ma skrajnie niekorzystny charakter. Płynące w punkcie analizy plemniki ustawiają się w sposób losowy w kierunku detektorów, zatem różnice intensywności fluorescencji wynikające z jej soczewkowania całkowicie zagłuszają różnice spowodowane rzeczywistą ilością DNA w komórce. Zjawisko to wymagało zastosowania specjalnych modyfikacji cytometrów przepływowych polegających na: a) zmianie kształtu dyszy wylotowej, b) odczytywaniu fluorescencji DNA plemników równocześnie przez dwa detektory umieszczone pod kątem 90° (14). Zmodyfikowana w ten sposób dysza powodowała spłaszczenie strumienia cieczy z plemnikami do postaci wstęgi tak, by ich główki układały się w większości w tej samej płaszczyźnie (rys. 2), natomiast przeniesienie detektora pozwoliło na odczyt fluorescencji DNA również z części plemników ustawionych „nieprawidłowo”. Mimo takich rozwiązań nadal część plemników była odrzucana z analizy i sortowania, zmniejszając tym samym wydajność seksowania.



Rys. 1. Zjawisko soczewkowania fluorescencji przez plemnik. Widoczny przekrój poprzeczny przez główkę plemnika.

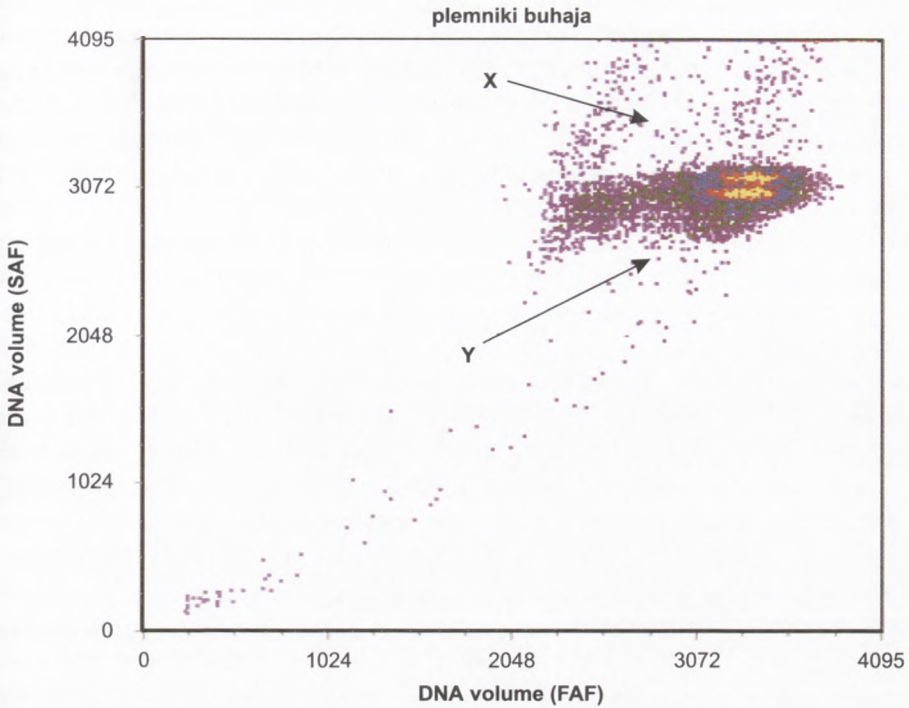


Rys. 2. Kształt zmodyfikowanej dyszy komory przepływowej. Schematycznie zaznaczono płynące plemniki.

Osobnym problemem pozostaje wpływ barwnika i wzbudzającego go światła laserowego na zdolność zapładniającą seksowanych plemników oraz późniejszy rozwój zarodka. Wspomniano, że stosowanym przy separacji nasienia fluorochromem jest Hoechst 33342, wzbudzany światłem UV o długości 350 nm. Wysuwane początkowo obawy nie znalazły jak dotąd potwierdzenia. W przypadku barwionych tym związkem plemników buhaja obserwowano wprawdzie nieznaczne obniżenie zdolności do zapłodnienia *in vitro*, jednak nie dotyczyło ono wszystkich badanych ejakulatów. Podobnie nie potwierdziły się zastrzeżenia dotyczące uszkodzeń chromosomów, czy też wad potomstwa jako rezultatu zapłodnienia barwionymi plemnikami (15). Także w przeprowadzonych badaniach wpływu wiązki światła UV na plemniki nie potwierdzono wcześniejszych zastrzeżeń (16).

W obecnych cytometrach przepływowych, specjalizowanych w seksowaniu nasienia wykorzystuje się omówione i udoskonalone modyfikacje razem z nowoczesną elektroniką. Pozwala to na osiągnięcie dobrej wizualizacji plemników X i Y (rys. 3) przy przepływie ok. 40 000 komórek/sekundę i uzyskanie w ciągu godziny ok. 11 mln ruchliwych plemników o czystości frakcji 90% (17). W szeroko zakrojonych doświadczeniach polowych, obejmujących inseminację seksowanym nasieniem 1000 jałówek (18) osiągnięto 90% potomstwa zakładanej płci przy zachowaniu płodności inseminowanych jałówek na poziomie 90% w stosunku do grupy kontrolnej inseminowanej zwykłym nasieniem.

W chwili obecnej, dwadzieścia lat po tym jak cytometria przepływowa została z powodzeniem zastosowana do rozpoznania plemników X i Y, seksowane nasienie



Rys. 3. Obraz plemników X i Y buhaja, uzyskany w cytometrze przepływowym MoFlo SX (Cytomation, USA). Na osiach x i y odczyt fluorescencji DNA z dwóch detektorów ustawionych pod kątem 90°.

jest już komercyjnie dostępne w takich krajach jak np. Stany Zjednoczone, Wielka Brytania, Niemcy.

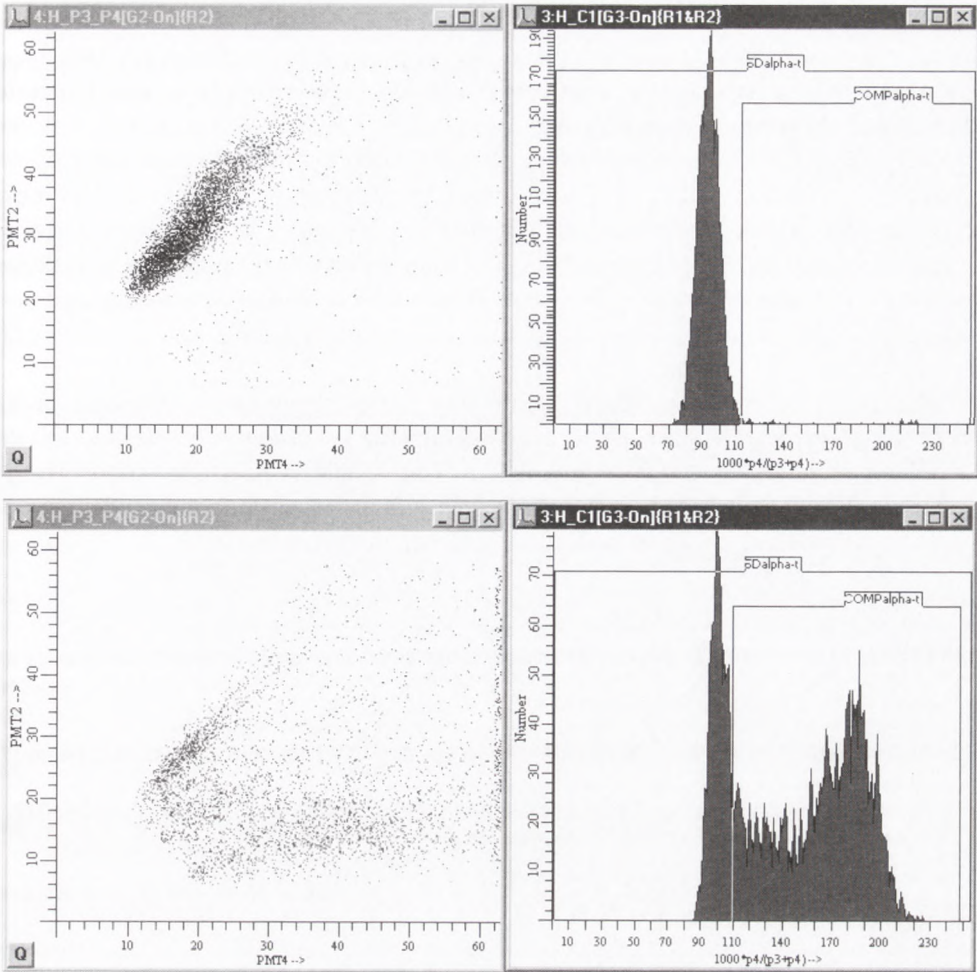
3. Ocena jakości nasienia

Stosowane szeroko mikroskopowe metody oceny jakości plemników posiadają szereg istotnych ograniczeń wpływających w poważny sposób na ich dokładność i wydajność. Badania mikroskopowe preparatów są żmudne i pracochłonne, a ich końcowy wynik w niemałym stopniu zależy od doświadczenia lub stopnia zmęczenia oceniającego. Plemniki ssaków posiadają wiele struktur i cech funkcjonalnych, które mogą być z powodzeniem badane zarówno za pomocą mikroskopu, jak i cytometru przepływowego. W wielu przypadkach zatem zamiana techniki mikroskopowej na cytometrię przepływową pozwala na znaczne przyspieszenie i obiektywizację analiz plemników. Dzieje się tak np. w przypadku oceny uszkodzeń błon komórkowych (19-21), aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych (22), aktywności mitochondrialnej (23), zmian zachodzących na powierzchni plemników w trakcie kapa-

cytacji, czy też uszkodzeń akrosomu (24-26). Wspomniane cechy razem z pozostałymi, badanymi tradycyjnie: ruchliwością i morfologią są jednak ściśle ze sobą powiązane. Dotyczą one oceny możliwości „dostarczenia” przez plemnik materiału genetycznego (chromatyny) do oocytu, natomiast nie dostarczają informacji o jakości samej chromatyny. Z tego powodu na szczególną uwagę zasługuje możliwość oceny uszkodzeń struktury chromatyny plemnikowej za pomocą cytometrii przepływowej.

W trakcie procesu spermatogenezy chromatyna plemników ulega poważnym przekształceniom. Proces ten nazywany niekiedy „dojrzewaniem” plemników polega na wymianie białek histonowych chromatyny na protaminy – niewielkie proteiny o dużej zawartości argininy i cysteiny, a następnie utlenianiu grup sulfhydrylowych (-SH) tych protamin do postaci mostków dwusiarczkowych (-S-S-), co prowadzi w efekcie do silnej kondensacji chromatyny. Złożony mechanizm kondensacji jest bardzo wrażliwy na czynniki zakłócające jego przebieg i powodujące liczne uszkodzenia struktury chromatyny, dobrze widoczne w mikroskopie elektronowym (27). Metoda cytometrycznej oceny struktury chromatyny plemnikowej (*Sperm Chromatin Structure Assay*, SCSA) (28) opiera się na rozpoznaniu charakterystycznej cechy jej uszkodzeń – zwiększonej wrażliwości na denaturację. W metodzie SCSA wykorzystuje się metachromatyczne właściwości oranżu akrydyny /AO/. Barwnik ten związany z podwójną nicią DNA fluoryzuje w paśmie zielonym, w połączeniu z RNA i pojedynczą nicią DNA – w paśmie czerwonym. Po indukowanej denaturacji chromatyny za pomocą temperatury, bądź obniżonego pH, u plemników z nieprawidłową jej strukturą następuje wzmocnienie fluorescencji w paśmie czerwonym. Ten wzrost świecenia wyrażony jest indeksem α_t , gdzie $\alpha_t = \text{czerwona} / (\text{czerwona} + \text{zielona})$ fluorescencja (rys. 4).

W licznych badaniach przeprowadzonych zarówno na nasieniu zwierząt (29-32) jak i ludzi (33-36) wykazano ścisłą zależność pomiędzy płodnością a stopniem uszkodzeń chromatyny plemnikowej. Nadal nie jest jednak jasne jakie jest podłoże podwyższonej wrażliwości chromatyny na denaturację. Z jednej strony wskazuje się, że może ona być wynikiem nieprawidłowej kondensacji zaburzonej takimi czynnikami środowiskowymi jak: podwyższona temperatura ciała (37) lub czynniki toksyczne (38-40), czy też wpływem składników rozcieńczalnika w jakim nasienie jest przechowywane (41,42). Z drugiej strony zauważono, że podwyższonej wrażliwości chromatyny na denaturację towarzyszy w plemnikach obecność luźnych krótkich odcinków DNA, będących wynikiem jej degradacji. Oba te zjawiska są charakterystyczne dla apoptozy – aktywnej, „samobójczej” śmierci komórek. Stąd wysuwana jest teoria (43-45), że uszkodzenia chromatyny plemnikowej może mieć bardziej skomplikowany mechanizm. Miałby on na celu wyeliminowanie plemników niosących genetyczne defekty. Ponieważ mechanizm ten uruchamiany jest w końcowym stadium spermatogenezy, w komórkach wysoce zróżnicowanych, część efektorów apoptotycznych jest już nieczynna. Cały proces ogranicza się zatem do aktywacji endonukleaz tnących DNA na charakterystyczne, krótkie fragmenty. Plemniki takie mogą odznaczać się



Rys. 4. Przykłady oceny struktury chromatynej plemnikowej (SCSA). Przykład A – 1,2% plemników z uszkodzoną chromatyną, przykład B – 73,6% uszkodzonych plemników. Histogramy po lewej – fluorescencja zdenaturowanej chromatynej (oś pozioma) i chromatynej prawidłowej (oś pionowa). Histogramy po prawej – parametr kalkulowany α_t .

normalną aktywnością mitochondrialną, ruchliwością, a w pewnych przypadkach nawet prawidłową morfologią.

W badaniach zwierząt stwierdzono ponadto, że wyższa wrażliwość chromatynej na denaturację występuje w sposób naturalny u samców młodych i zanika po osiągnięciu dojrzałości (31).

Mimo doniesień o istnieniu korelacji pomiędzy uszkodzeniami chromatynej a pozostałymi cechami jakości plemników (32,35) wydaje się, że istnieje mocniejsza argumentacja na rzecz braku takiej zależności (30,43,44). Uważa się ponadto, że –

przynajmniej w przypadku ludzi – uszkodzenia chromatyny mogą być odpowiedzialne za zamieranie zarodków w początkowych fazach ich rozwoju (33). Obserwacje te stanowią pośrednie potwierdzenie hipotezy o apoptotycznym mechanizmie uszkodzeń chromatyny plemnikowej.

Interesujące są szczegółowe obserwacje zależności uszkodzeń chromatyny plemnikowej i płodności u ludzi. Określono w nich granicę całkowitej niepłodności mężczyzn na bardzo niskim poziomie ok. 30% (34,46), lub nawet 25% plemników z uszkodzoną chromatyną (35). Te zaskakujące wyniki mogą świadczyć o tym, że w ejakulatach istnieje także proporcjonalna grupa plemników o niedających się wykryć metodą SCSA uszkodzeniach chromatyny. Niestety, nie istnieją jak dotąd podobne prace prowadzone na nasieniu zwierząt.

Koszty cytometrycznych analiz plemników są porównywalne z kosztami analiz mikroskopowych. Wysoką cenę samego urządzenia rekompensują większe możliwości tej techniki. Cytometria przepływowa już znalazła szerokie zastosowanie w badaniach i diagnostyce płodności w medycynie ludzkiej. Podobne tendencje obserwuje się obecnie także w badaniach nad rozrodem zwierząt.

Literatura

- Schilling E., (1966), *J. Reprod. Fertil.*, 11, 469.
- Beernink F. J., Dmowski W. P., Ericsson R. J., (1993), *Fertil. Steril.*, 59, 382.
- Blottner S., Bostedt H., Hewes K., Schill W. B., (1992), *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.*, Hague, 1, 411-414.
- Cartwright E. J., Harrington P. M., Cowin A., Sharpe P. T., (1993), *Mol. Reprod. Dev.*, 34, 323.
- Bennett D., Boyse E. A., (1973), *Nature*, 246, 308.
- Peter A. T., Jones P. P., Robinson J. P., (1993), *Theriogenology*, 40, 1177.
- George F. W., Wilson J. D., (1988), *Sex determination and differentiation, The physiology of reproduction*, Raven Press, New York, 3-26.
- Pinkel D., Lake S., Gledhill B. L., van Dilla M. A., Stephenson D., Watchmaker G., (1982), *Cytometry*, 3, 1.
- Keeler K. D., Mackenzie N. M., Dresser D. W., (1983), *J. Reprod. Fertil.*, 68, 205.
- Johnson L. A., Clark R. N., (1988), *Gamete Res.*, 21, 335.
- Morrell J. M., Dresser D. W., (1989), *Mut. Res.*, 224, 177.
- Johnson L. A., Flook J. P., Hawk H. W., (1989), *Biol. Reprod.*, 41, 199.
- Johnson L. A., (1991), *Reprod. Dom. Anim.*, 26, 309.
- Johnson L. A., Pinkel D., (1986), *Cytometry*, 7, 268-273.
- Smoraż Z., Ryńska B., Kańska L., Słota E., (1993), *Anim. Sci., Papers and Reports*, 11, 117.
- Guthrie H. D., Johnson L. A., Garrett W. M., Welch G. R., Dobrinsky J. R., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 87-92.
- Johnson L. A., Welch G. R., (1999), *Theriogenology*, 52, 1323-1341.
- Seidel G. E., Schenk J. L., Herickhoff L. A., Doyle S. P., Brink Z., Green R. D., Cran D. G., (1999), *Theriogenology*, 52, 1407-1420.
- Bochenek M., (1996), *J. Physiol. Pharm.*, 47, Suppl. 1, 144.
- Garner D. L., Johnson L. A., Yue S. T., Roth B. L., Haugland R. P., (1994), *J. Androl.*, 15, 620.
- Graham J. K., Kunze E., Hammerstedt R. H., (1990), *Biol. Reprod.*, 43, 55.
- Garner D. L., Pinkel D., Johnson L. A., Pace M. M., (1986), *Biol. Reprod.*, 34, 127.
- Evenson D. P., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R., (1982), *J. Histochem. Cytochem.*, 30, 279.

24. Ashworth P. J. C., Harrison R. A. P., Miller N. G. A., Plummer J. M., Watson P. F., (1995), *Mol. Reprod. Dev.*, 40, 164.
25. Fenichel P., Hsi B.L., Farahifar D., Donzeau M., Barrier-Delpech D., Yeh J. G., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 87, 699.
26. Tao J., Du J., Critser E. S., Critser J. K., (1993), *Human Reprod.*, 8, 1879.
27. Sartori Blanc N., Senn A., Leforestier A., Livolant F., Dubochet J., (2001), *J. Struct. Biol.*, (Apr.) 134, 76-81.
28. Evenson D.P., (1990), in: *Methods In Cell Biology*, 33, Academic Press, San Diego, 401.
29. Ballachey B. E., Hohenboken W. D., Evenson D. P., (1987), *Biol. Reprod.*, 36, 915.
30. Bochenek M., Smoraż Z., Pilch Z., (2001), *Theriogenology*, 56, 557-567.
31. Karabinus D. S., Evenson D. P., Jost L. K., Baer R. K., Kaproth M. T., (1990), *J. Dairy Sci.*, 73, 2364.
32. Sailer B. L., Jost L. K., Evenson D. P., (1996), *Cytometry*, 24, 167.
33. Evenson D. P., (1999), *Proc. 11th Congress on In Vitro Fertilization and Human Reproductive Genetics*, Parthenon Publishing Group, New York, 313-329.
34. Larson K. L., DeJonge C. J., Barnes A. M., Jost L. K., Evenson D. P., (2000), *Hum. Rep.*, 15, 1717-1722.
35. Zini A., Bielecki R, Phang D., Zenzes M. T., (2001), *Fertil. Steril.*, 75, 674-677.
36. Zini A., Kamal K., Phang D., Willis J., Jarvi K., (2001), *Urology*, 58, 158-161.
37. Evenson D. P., Jost L. K., Corzett M., Balhorn R., (2000), *J. Androl.*, 21, 739-46.
38. Evenson D. P., Higgins P. J., Grueneberg D., Ballachey B. E., (1985), *Cytometry*, 6, 238-253.
39. Potts R. J., Newbury C. J., Smith G., Notarianni L. J., Jefferies T. M., (1999), *Mutat. Res.*, 423, 103-111.
40. Spano M., Bartoleschi C., Cordelli E., Leter G., Tiveron C., Pacchierotti F., (1996), *Cytometry*, 24, 174-180.
41. Hammadeh M. E., Greiner S., Rosenbaum P., Schmidt W., (2001), *J. Androl.*, 22, 1012-1018.
42. Karabinus D. S., Evenson D. P., Kaproth M. T., (1991), *J. Dairy Sci.*, 74, 3836.
43. Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F., (1997), *Cytometry*, 27, 1.
44. Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z., (1993), *Exp. Cell Res.*, 207, 202.
45. Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G. C., Mariethoz E., Tarozzi N., Bizzaro D., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 1061-1067.
46. Evenson D. P., Jost L. K., Marshall D., Zinaman M. J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O. P., (1999), *Hum. Reprod.*, 14, 1039-1049.