



Proces apoptozy w plemnikach ssaków

Monika Trzcińska

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,
Balice k. Krakowa

Apoptosis in mammalian sperm

Summary

This physiological cell death, also known as programmed cell death, takes place during the entire growth period of an organism. In general, somatic cell apoptosis can be induced through extrinsic mechanisms acting at the plasma membrane, mitochondrial or nuclear levels.

Recent studies have demonstrated that apoptosis is an underlying mechanism of germ cell death during normal spermatogenesis and that it is a major mechanism in regulating spermatogenesis of various mammalian species. While apoptosis in somatic cells and in (testicular) spermatocytes and spermatids is well established, the presence and significance of apoptosis in ejaculated animals sperm is still unresolved.

Key words:

programmed cell death, detection methods, sperm maturation, apoptosis in sperm.

1. Wprowadzenie

W każdym żywym organizmie o liczbie komórek decyduje równowaga pomiędzy ich proliferacją i śmiercią. Równowaga ta niezbędna jest do prawidłowego funkcjonowania całego organizmu, a jej zachwianie prowadzi do zjawisk patologicznych. Istotne znaczenie ma tutaj mechanizm, który w naturalny sposób równoważy proliferację komórek zachodzący na drodze mitozy oraz proces, który eliminuje komórki zbędne lub zmienione patologicznie, czyli **zjawisko apoptozy**. Od wielu lat apoptoza budzi

Adres do korespondencji

Monika Trzcińska,
Dział Biotechnologii
Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa.

zainteresownie badaczy z różnych dziedzin nauk biologicznych. Przyczyniła się do tego świadomość, że zjawisko to – niezależnie czy występuje fizjologicznie czy jako objaw patologii – jest aktywnym i podlegającym regulacji rodzajem śmierci komórki. Znaczącą rolę pełni apoptoza w eliminacji komórek uszkodzonych i zmutowanych. Apoptoza jest bardzo ważnym procesem komórkowym; równie istotnym jak namnażanie się komórek. Fizjologiczna śmierć jest naturalnym regulatorem nie tylko w rozwijającym się, ale i w dojrzałym organizmie.

W ciągu ostatnich lat pojawiło się wiele prac prezentujących przebieg apoptozy w różnych subpopulacjach komórkowych. Opierają się one głównie na zmianach morfologicznych i wewnątrzkomórkowych, bowiem komórka apoptotyczna przechodzi charakterystyczny ciąg przemian. Przede wszystkim komórka w której zostaje uruchomiony program śmierci oddziela się od pozostałych i obkurcza się. Na jej powierzchni tworzą się liczne drobne, pęcherzykowate uwypuklenia, które pod mikroskopem skaningowym wyglądają jak bąbelki w czasie gotowania (1,2). Przynajmniej w początkowych fazach procesu zachowana jest integralność strukturalna i większość funkcji przez błonę cytoplazmatyczną (3,4). Mimo znacznego spadku potencjału mitochondrialnego organelle komórkowe pozostają nieuszkodzone (5). W przypadku śmierci apoptotycznej dominują zmiany w obrębie jądra komórkowego. Początkowo chromatyna jądrowa ulega zagęszczeniu w pobliżu błony jądrowej, po czym zaczyna wypełniać całe jądro, które staje się pyknotyczne. Następuje fragmentacja DNA, w trawieniu którego biorą udział własne endonukleazy komórki, a w dalszym etapie destrukcji powstają tzw. ciała apoptotyczne, zbudowane z fragmentów jądra i nieuszkodzonych organelli komórkowych, otoczonych szczelnie błoną komórkową (6,7).

2. Aspekty molekularne

W procesie apoptozy można wyróżnić trzy fazy: inicjacyjną, wykonawczą (efektorową) i zniszczenia (degradacyjną) (8). Zdolność reakcji komórki na rozmaite czynniki poprzez apoptozę jest procesem wieloetapowym. O przebiegu apoptozy decyduje stan fizjologiczny komórki oraz aktywacja procesów biochemicznych w komórkach. Duża liczba czynników wywołujących apoptozę oraz ich różnorodność jest przyczyną istnienia wielu dróg wzbudzenia tego procesu. Wśród czynników inicjujących apoptozę najczęściej wymienia się reakcje rozpoznawania i wiązania ligandów z odpowiednimi receptorami śmierci na powierzchni komórek, ich aktywację, a także aktywację kaspaz inicjujących. Kaspazy (ang. *caspases-cysteine-dependent aspartate specific proteases*) odpowiedzialne są za proteolityczny rozpad niektórych składników cytoskieletu (9). Sygnał apoptotyczny powoduje przeniesienie fosfatydyloseryny (PS) na powierzchnię błony komórkowej, co umożliwi wczesną diagnostykę apoptozy. Do wykrywania fosfatydyloseryny wykorzystywana jest, zależna od Ca^{2+} , aneksyna V (związana chemicznie z fluoresceiną) (10). Przemieszczenie PS

oraz aktywacja kaspaz jest sygnałem do rozpoczęcia fazy wykonawczej apoptozy (11). Za realizację nieodwracalnej fazy wykonawczej apoptozy odpowiedzialne są kaspazy. Uważa się, że są one centralnym punktem skupiającym różne sygnały apoptotyczne. Kaspazy syntetyzowane są jako nieaktywne proenzymy (zymogeny), składające się z dwóch podjednostek (~ 20 kDa i ~ 10 kDa), połączonych krótkim „łącznikiem” oraz tzw. prodomeny, polipeptydu o różnej długości. Prodomena uczestniczy w dimeryzacji cząsteczek prokaspaz, zostaje następnie odszczepiona podczas aktywacji (12). Obecnie przyjmuje się podział kaspaz na 3 grupy: 1) aktywatory cytookin – kaspazy 1, -4, -5, -11, -12, -13, -14; 2) inicjujące szlak apoptotyczny; kaspazy 8, -9, -10; 3) odpowiedzialne za fazę wykonawczą apoptozy; kaspazy – 3, -6, -7 (13).

Wszystkie poznane kaspazy charakteryzują się tym, że przecinają łańcuch białkowy substratu w miejscu obecności w nim kwasu asparginowego, oraz że same dla siebie są enzymami aktywującymi. W związku z tym, aktywacja jednej z kaspaz może wywołać kaskadową reakcję, podczas której uwalnia się z zymogenów wiele aktywnych kaspaz. Aktywowane kaspazy wykonawcze, bezpośrednio albo w kaskadzie kaspaz, dokonują proteolizy białek enzymatycznych i strukturalnych komórki. W większości komórek podczas apoptozy ulegają proteolizie takie białka jak laminy jądrowe, histony, polimeraza poli-ADP-rybozy (PARP), białka decydujące o prawidłowym przebiegu cyklu komórkowego. Na tym etapie apoptozy niezwykle istotną rolę odgrywają białka rodziny Bcl-2 (ang. B-cell *leukemia/lymphoma*-2), które mogą przyspieszać lub hamować proces apoptozy (14). Na rodzinę białek Bcl-2 składają się zarówno białka stymulujące apoptozę (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bok/Mtd) jak i hamujące ten proces (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1, NR-13) (15). Występują one w błonach siateczki śródplazmatycznej, okołojądrowej oraz mitochondrialnej. Białko Bcl-2 hamuje apoptozę wywołaną różnymi czynnikami, a jego obecność stwierdzono również w komórkach rozrodczych ssaków (16). Białka te regulują przepuszczalność błon mitochondrialnych. Produkt białkowy genu Bcl-2 blokuje jeden z krytycznych stopni w przekazywaniu sygnału apoptozy, a mianowicie wypływ jonów Ca^{2+} z mobilnej puli zlokalizowanej w siateczce śródplazmatycznej. Uwalniany z siateczki Ca^{2+} uczestniczy w aktywacji dwóch enzymów biorących udział w procesach dezintegracyjnych: endonukleazy DNA oraz transglutaminazy uczestniczącej w tworzeniu ciałek apoptotycznych (17).

W fazie wykonawczej dochodzi do otwarcia megakanałów mitochondrialnych, spadku mitochondrialnego potencjału transbłonowego ($\Delta\psi_m$), który prowadzi do uwolnienia czynnika indukującego apoptozę AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) oraz cytochromu c, który w trakcie apoptozy łącząc się z kaspazą 9 powoduje stymulację kaspaz i samobójstwo komórki (18). W przypadku apoptozy enzymy tną dwuniciowy DNA. Pęknięcia łańcucha DNA można wykrywać stosując metodę TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated d-UTP nick end-labeling*), przez wbudowanie dUTP sprzężonego z fluoresceiną, czy digoksygeniną w łańcuch DNA w miejscach pęknięć, przy zastosowaniu terminalnej transferazy lub polimerazy DNA (19). Wybór metody identyfikacji apoptozy zależy nie tylko od rodzaju induktora, ale także od rodzaju komórek i aktywacji w nich różnych procesów biochemicznych.

2.1. Apoptoza w gonadach i gametach męskich

Istnieje wiele przykładów apoptozy zachodzącej w rozwoju kończyn, chrząstek i kości czy zrastania się podniebienia. Zjawisko to jest nasilone w tkankach produkujących nowe komórki. Wydaje się, że zjawisko apoptozy może mieć też ogromne znaczenie w biologii rozrodu (20). Szczególnie w gonadach męskich komórki pochodzące z pnia są stale narażone na uszkodzenia genetyczne, gdyż spermatogeneza jest procesem kreuującym *de novo* materiał genetyczny. W trakcie tego procesu spermatydy podlegają charakterystycznym przekształceniom morfologiczno-biochemicznym prowadzącym do powstania dojrzałego, zdolnego do zapłodnienia plemnika (21). Jedną z charakterystycznych zmian jest kondensacja chromatyny jądrowej. Proces ten polega na zastąpieniu białek histoniowych chromatyny przez protaminy – niewielkie białka o dużej zawartości argininy i cysteiny. W obrębie jądra komórkowego zachodzą zmiany strukturalne na poziomie molekularnym polegające na utlenieniu grup sulfhydrylowych (-SH) protamin do postaci mostków dwusiarczkowych (-S-S-) stabilizujących chromatynę plemników. Po zakończeniu kondensacji DNA plemników jest w wysokim stopniu zagęszczony (22). Proces kondensacji chromatyny jest wrażliwy na czynniki, które mogą zakłócić jego przebieg. W badaniach przeprowadzonych na mrożonym nasieniu buhajów (23) wykazano występowanie wysokiej korelacji między uszkodzeniami chromatyny a płodnością uzyskiwaną po inseminacji tym nasieniem (24). Wadom struktury chromatyny towarzyszy obecność w plemnikach luźnych krótkich odcinków DNA, będących wynikiem degradacji chromatyny (25).

Próbując wytłumaczyć powody pofragmentowania DNA plemników wysunięto trzy hipotezy:

- Niewłaściwe upakowanie DNA i zaburzenia w tworzeniu mostków dwusiarczkowych (26).
- Reaktywne formy tlenu – ROS (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) indukują pęknięcia DNA prowadząc do powstania dużych fragmentów 1-2 miliony par zasad. Zjawisko to poprzedza dalszą fragmentację DNA (27,28).
- Fragmentacja DNA spowodowana zjawiskiem **apoptozy** (29).

Zagęszczenie chromatyny jest niewątpliwie konieczne ze względu na dostosowanie rozmiarów DNA do zmniejszonej objętości jądra w dojrzałych plemnikach (30). Specyficzna gatunkowo budowa morfologiczna i sztywność chromatyny pomagają prawdopodobnie w penetracji osłonki przejrzystej. Może ono służyć także innym celom takim jak ochrona materiału genetycznego przed niekorzystnym wpływem czynników zewnętrznych, ułatwianie rozpakowania, a także procesom zachodzącym po wnikięciu plemnika do komórki jajowej. Uszkodzenia DNA plemników, czy jego niewłaściwe przemiany w komórce jajowej mogą być przyczyną defektów genetycznych zarodków prowadząc do ich wczesnego obumierania (31).

W wielu doświadczeniach wskazuje się na stres oksydacyjny jako na jeden z czynników, który może powodować pofragmentowanie DNA oraz na główną rolę

mitochondriów w przebiegu apoptozy (32). Stres oksydacyjny jest bowiem jednym z czynników, który może spowodować otwarcie megakanalu mitochondrialnego. Otwarcie megakanalu i wypływ jonów wapnia z mitochondriów poprzedza zdaniem Kroemera i wsp. (1997) inne zmiany charakterystyczne dla apoptozy takie jak kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA i zmiany w błonie komórkowej. Może to prowadzić do tworzenia dużych ilości reaktywnych form tlenu. Wykazano, że ROS wyzwalają zmiany apoptotyczne komórek gametogenicznych w jądrze (16).

Szczególne zainteresowanie budzi zwłaszcza trzecia hipoteza.

Z przeprowadzonych doświadczeń na ludzkim materiale wynika, że jedno spermatogonium daje około 100 spermatyd, liczba ta odbiega zatem znacząco od teoretycznej liczby 4096 (33). Fakt ten wskazuje na zaangażowanie w proces spermatogenezy fizjologicznej śmierci komórek. Obecnie coraz więcej naukowców skłania się ku wnioskowi, że apoptoza komórek plemnikotwórczych jest podstawowym mechanizmem prawidłowej spermatogenezy (34). Wiadomo, że apoptoza jest nasiloną w tkankach produkujących nowe komórki. Do takich należy właśnie nabłonek plemnikotwórczy ssaków. W kanalikach krętych ssaków apoptoza jest regulowana głównie przez komórki somatyczne, tj. Sertoliego (podporowe) w nabłonku plemnikotwórczym i Leydiga w tkance śródmiąższowej oraz interakcje pomiędzy samymi komórkami gametogenicznymi. Apoptoza w procesie spermatogenezy pojawia się spontanicznie; w jądrach dorosłych szczurów obserwowana jest w każdym stadium cyklu spermatogenicznego (16). W jądrach młodych samców myszy podczas pierwszych cykli spermatogenezy zaobserwowano nasiloną apoptozę, która zbiega się z wysokim poziomem białka Bax warunkującego późniejszy, prawidłowy przebieg spermatogenezy u dorosłych osobników. U mężczyzn z azospermią i oligozoospermią obserwowano wzrost częstotliwości procesu apoptozy komórek plemnikotwórczych w tkance jądrowej w porównaniu z mężczyznami z prawidłową spermatogenezą (35-37). Spadek gonadotropin i testosteronu sprzyja apoptozie komórek plemnikotwórczych.

O ile wykonano wiele badań nad zjawiskiem apoptozy w procesie spermatogenezy, o tyle istnieje niewiele prac poświęconych temu zagadnieniu w ejakulowanych plemnikach. Górczyca i wsp. (38) jako pierwsi zasugerowali, że fragmentacja DNA ejakulowanych plemników jest analogiczna do apoptozy komórek somatycznych. Dotychczasowe badania w tym zakresie skoncentrowane są głównie na wykrywaniu apoptozy ejakulowanych plemników u mężczyzn, u których stwierdzono zaburzenia płodności. Zmiany apoptotyczne w plemnikach u tych mężczyzn były pozytywnie skorelowane z różnymi formami zmian morfologicznych tych plemników, np. zmiany w główce plemnika, wstawce i wtkach. Shen i wsp. (39) przeprowadzili doświadczenia na ludzkich plemnikach. Z przeprowadzonych badań wynika, że przeciętnie około 45% plemników w ejakulacie posiadało zmiany apoptotyczne, wykryte na podstawie barwienia przy użyciu aneksyny V-FITC. Wykazano pozytywną korelację pomiędzy zjawiskiem apoptozy a nieprawidłowościami morfologicznymi plemników, natomiast odwrotną korelację z ruchliwością i żywotnością plemników. Zini i wsp.

(40) zaobserwowali wysoką korelację pomiędzy denaturacją i fragmentacją DNA plemników oraz wysokim poziomem uszkodzeń DNA u nieplodnych mężczyzn w porównaniu z płodnymi. Można zatem wysunąć wniosek, że przynajmniej u ludzi bezpłodność jest związana z niską integralnością DNA. Istnieje również pogląd na temat braku korelacji pomiędzy uszkodzeniami chromatyny a zmianami morfologicznymi plemników (41). Wysunięto też przypuszczenie, że obniżona płodność może być uwarunkowana uszkodzeniami w genomie plemnika. W badaniach na plemnikach człowieka wykazano dużą zmienność dekondensacji chromatyny jądrowej w morfologicznie normalnych plemnikach. Badania przeprowadzone na plemnikach buhaja, knura, człowieka wskazują, że wzrost wrażliwości chromatyny na denaturację może być związany z zaburzeniami spermatogenezy, zwiększonym odsetkiem morfologicznie odbiegających od normy plemników i obniżoną płodnością. Jednocześnie, Evenson (42) stwierdził, że w nasieniu człowieka plemniki z chromatyną podatną na denaturację mogą stanowić nawet 100%. Wiąże się to prawdopodobnie z faktem, że chromatyna plemników człowieka jest bardziej wrażliwa na denaturację niż u innych gatunków.

Dotychczasowe prace na materiale zwierzęcym skoncentrowane są na wykrywaniu różnic w ilości apoptotycznych plemników pomiędzy świeżym i mrożonym nasieniem buhajów (43). W świeżym nasieniu zaobserwowano około 17% apoptotycznych plemników, natomiast po zamrożeniu i rozmrożeniu nasienia liczba ta wzrosła od 31 do 40%. Wykazano również znaczące różnice w ilości apoptotycznych plemników pomiędzy poszczególnymi osobnikami. Kriokonserwacja indukuje translokacje fosfatydyloseryny (PS) na zewnątrz błony i powoduje wzrost liczby komórek nekrotycznych i apoptotycznych w nasieniu. Wysunięto przypuszczenie, że obecność apoptotycznych plemników w świeżym nasieniu może być przyczyną obniżonej płodności buhajów hodowlanych. Podobne doświadczenie wykonano na nasieniu knura (44). Tu również zaobserwowano, że po rozmrożeniu w nasieniu drastycznie wzrasta procent komórek apoptotycznych nawet do 80% w porównaniu z nasieniem świeżym. Wiadomo, że nasienie knura jest bardzo wrażliwe na mrożenie, jak również po ejakulacji bardzo wrażliwe na szok chładowy. Ponadto głównym problemem w przypadku mrożenia nasienia, jak się wydaje, jest bardzo zróżnicowana indywidualna podatność nasienia knurów na proces zamrażania. W przypadku nasienia dyskusyjny pozostaje wybór metody identyfikacji tego procesu. Ze względu na specyficzną budowę plemnika i funkcje nie można opierać się na zmianach morfologicznych, charakterystycznych dla komórek somatycznych, lecz skoncentrować się na zmianach biochemicznych zachodzących w komórkach. Obecnie przyjęło się apoptozą nazywać „proces, w którym pośrednikami w przekazywaniu sygnału śmierci są kaspazy”. Uważa się bowiem, że bez kaspaz apoptoza w ogóle nie może zachodzić. Nadal zaangażowanie kaspaz w proces apoptozy w ejakulowanych plemnikach pozostaje nie wyjaśnione. W plemnikach myszy, kaspazy w ogóle nie są obecne, podczas gdy aktywność enzymatyczną kaspazy – 3 wykryto w niewielkich ilościach w ludzkich plemnikach o niskiej ruchliwości (45). Wysoki procent plemników z ak-

tywnymi kaspazami został znaleziony u bezpłodnych mężczyzn. Obecny stan wiedzy nie daje nam jednak pewności, że droga śmierci apoptotycznej w plemniku jest analogiczna z modelem śmierci w komórkach somatycznych.

Praca wykonana w ramach projektu promotorskiego nr 2 P06D02330.

Literatura

1. Darzynkiewicz Z., Juan G., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F., (1997), *Cytometry*, 27, 1-20.
2. Lowe S. W., Lin A. W., (2000), *Carcinogenesis*, 21 (3), 485-495.
3. Israel L. G., Israel E. D., (1999), *Apoptosis. Stem Cells*, 17, 306-313.
4. Nagata S., (2000), *Exp. Cell. Res.*, 256 (1), 12-18.
5. Pollack M., Leeuwenburgh Ch., (2001), *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56, B457-B482.
6. Cory S., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 12077-12079.
7. Halicka H. D., Bednar E., Darzynkiewicz Z., (2000), *Exp. Cell. Res.*, 260, 248-256.
8. Bartosz G., (1998), *Post. Bioch.*, 44 (1), 22-29.
9. Thornberry N. A., Lazebnik Y., (1998), *Science*, 281, 1312-1316.
10. Darzynkiewicz Z., Bednar E., Smolewski P., (2001), *Semin Hematol.*, 38 (2), 179-193.
11. Blankenberg F. G., Tait J. F., Strauss H. W., (2000), *Eur. J. Nucl. Med.*, 27, 359-367.
12. Bednar E., Smolewski P., Amstad P., Darzynkiewicz Z., (2000), *Exp. Cell. Res.*, 259, 308-313.
13. Chang H. Y., Yang X., (2000), *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 64, 821-846.
14. Cory S., Adams J. M., (1998), *Biochem. Biophys. Acta.*, 1377, R25-R44.
15. Gross A., McDonnell J. M., Korsmeyer S. J., (1999), *Genes & Development*, 13, 1899-1911.
16. Gączarzewicz D., Udała J., Błaszczuk B., (2000), *Med. Wet.*, 56 (10), 639-644.
17. Nakamura K., Bossy-Wetzel E., Burns K., Fadel M. P., Lozyk M., Goping I. S., Opas M., Bleackley R. Ch., Green D. R., Michalak M., (2000), *The Journal of Cell Biology*, 150 (4), 731-740.
18. Shimizu S., Matsuoka Y., Shinohara Y., Yoneda Y., Tsujimoto Y., (2001), *Journal of Cell Biology*, 152 (2), 237-250.
19. Fadeel B., Zhitovitsky B., Orrenius S., (1999), *The FASEB Journal*, 13, 1647-1654.
20. Darzynkiewicz Z., Bednar E., Smolewski P., (2001), *Semin Hematol.*, 38 (2), 179-93.
21. Print C. G., Loveland K. L., (2000), *Bioessays*, 22, 423-430.
22. Evenson D. P., (1990), *Methods In Cell Biology*, vol. 33, Academic Press, San Diego.
23. Ballachey B. E., Hohenboken W. D., Evenson D. P., (1987), *Biol. Reprod.*, 36, 915.
24. Bochenek M., Smoraż Z., Pilch Z., (2001), *Theriogenology*, 56, 557-567.
25. Karabinus D. S., Evenson D. P., Jost L. K., Baer R. K., (1990), *J. Dairy Sci.*, 73, 2364.
26. Sailer B. L., Jost L. K., Evenson D. P., (1995), *J. Androl.*, 16, 80-87.
27. Aitken R. J., (1999), *J. Reprod. Fertil.*, 115, 1-7.
28. Shen H. M., Ong C. N., (2000), *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 529-536.
29. Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi P. G., Bianchi U., (1999), *Rev. Reprod.*, 4, 31-37.
30. Yanagimachi R., (1994), *Zygote*, Nov; 2 (4), 383-384.
31. Rhim J. A., Connor W., Dixon G. H., Harendza C. J., Evenson D. P., Palmiter R. D., Brinster R. L., (1995), *Biol. Reprod.*, 52 (1), 20-32.
32. Bartosz G., (1998), *Post. Bioch.*, 44 (1), 22-29.
33. Woolveridge I., Morris I. D., (2000), in: Ed. Roberts R., *Apoptosis in toxicology*, Taylor and Francis, New York/London, 2707-2715.
34. Print C. G., Loveland K. L., (2000), *Bioessays*, 22, 423-430.
35. Lin W. W., Lamb D. J., Wheeler T. M., Abrams J., Lipshultz L. I., Kim E. D., (1997a), *J.Urol.*, 158, 1791-1793.
36. Lin W. W., Lamb D. J., Wheeler T. M., Lipshultz L. I., Kim E. D., (1997b), *Fertil. Steril.*, 68, 1065-1069.

37. Sinha Hikim A. P., Wang C., Lue Y., Johnson L., Wang X. H., Swerdloff R. S., (1998), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 152-156.
38. Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z., (1993), *Exp. Cell Res.*, 207, 202-205.
39. Shen H. M., Ong C. N., (2000), *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 529-536.
40. Zini A., Bielecki R., Phang D., Zenes M.T., (2001), *Fertil. Steril.*, 75 (4), 674-677.
41. Muratori M., Piomboni P., Baldi E., Filimberti E., Pecchioli P., Moretti E., Gambera L., Baccetti B., Biagiotti R., Forti G., Maggi M., (2000), *J. Androl.*, 21, 903-912.
42. Evenson D. P., (1999), *Proc. 11th Congress on In Vitro Fertilization and Human Reproductive Genetics*, Parthenon Publishing Group, New York, 313-329.
43. Anzar M., Henor L., Buhr M. M., Kroetsch T. G., Pauls K. P., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 354-360.
44. Pena F. J., Johannison A., Wallgren M., Rodriquez-Martinez H., (2003), *Theriogenology*, 60, 677-689.
45. Marchetti C., Gallego M. A., Deffosez A., Formstecher P., Marchetti P., (2004), *Hum. Reprod.*, 19 (50), 1127-1134.