

# Wpływ zakażenia wirusem ektromelii na plemniki myszy BALB/c<sup>\*</sup>)

MONIKA BAŚ, RICARDO FAUNDEZ\*, IRMA SPOHR,  
ANNA CYWIŃSKA\*\*, MAREK NIEMIAŁTOWSKI

Pracownia Immunologii Zakładu Wirusologii, Mykologii i Immunologii, \*\*Zakład Patofizjologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa,

\*Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

Baś M., Faundez R., Spohr I., Cywińska A., Niemiałtowski M.

## Studies on spermatozoa morphology and acrosomal reaction in-vitro during experimental mousepox in BALB/c mice

### Summary

Inducing ectromelia (mousepox) virus (ECTV) infection in genetically susceptible BALB/c (H-2d) mice is an established model for investigating the pathology of generalized viral infections. The aim of this study was to determine the effect of ECTV on male reproductive cells. Evaluating the reproductive functions entails examining the quality of gametes. The study examined sperm morphology and motility and the onset of acrosomal reaction in-vitro. The results of the experiment indicated a diminished quality of murine spermatozoa at the peak of clinical signs of mousepox.

**Keywords:** ectromelia, BALB/c mice, spermatozoa, acrosomal reaction

Choroby zakaźne układu rozrodczego dotyczą nie tylko człowieka, ale stanowią też istotny problem w medycynie weterynaryjnej. Ustalenie skutecznych metod leczenia i zapobiegania chorobom zakaźnym jest możliwe w dużym stopniu dzięki doświadczeniom na zwierzętach laboratoryjnych, w tym na myszach, które mogą służyć do badań nad patogenezą zakażeń układu rozrodczego o różnej etiologii (1, 3, 16, 18). W naszym zespole od lat prowadzone są badania nad ospą myszy, której czynnikiem etiologicznym jest wirus ektromelii (ectromelia virus, ECTV) należący do rodzaju *Orthopoxvirus* i rodziny *Poxviridae*. ECTV stanowi dobry model do badania patogenezы chorób wywoływanych przez ortopokswirusy u naturalnych gospodarzy (13, 20, 21). Wirus ten znalazł też zastosowanie w badaniach z zakresu immunologii układu rozrodczego. Jacoby i Bhatt (8) badali możliwość wykorzystania rekombinowanego ECTV do opracowania szczepionki powodującej długotrwałą nieplodność u myszy. Coraz większego znaczenia w określaniu wpływu czynników zakaźnych na procesy zachodzące w narządach układu rozrodczego nabierają doświadczenia prowadzone pozaustrojowo. Badanie jakości gamet, procesu zapłodnienia, rozwoju i jakości zarodków *in vitro* jest istotnym elementem oceny prawidłowości funkcjonowania układu rozrodczego. Jednym

z podstawowych badań pozwalających na rozpoznanie nieprawidłowości funkcjonowania męskiego układu rozrodczego jest analiza nasienia. U większości gatunków ssaków badanie nasienia polega na ocenie objętości ejakulatu, barwy nasienia, jego konsystencji, gęstości, pH oraz ruchliwości, koncentracji i morfologii plemników (9, 12). Niewątpliwie ważne są wszystkie wymienione elementy oceny jakości plemników i plazmy nasienia, jednak, jak wynika z piśmiennictwa (5-7, 10, 11), w przypadku infekcji wirusowych mogących oddziaływać na układ rozrodczy, istotnym diagnostycznie zmianom ulega najczęściej koncentracja, morfologia i ruchliwość plemników. Nieprawidłowości budowy męskich komórek rozrodczych mogą dotyczyć każdej z podstawowych struktur składających się na ostatecznie wykształcony plemnik, a mianowicie: główki, szyjki, wstawki oraz witki. Należy pamiętać, że w fizjologicznym ejakulacie różnych gatunków ssaków występuje zawsze pewien odsetek nieprawidłowych form plemników. Ważnym testem diagnostycznym jest określanie ruchliwości plemników i sposób ich poruszania się (prawidłowy ruch jest prostoliniowy). Zdolność plemników do zapłodnienia komórki jajowej *in vitro* może być oceniana za pomocą różnych testów, które pozwalają, między innymi, ocenić przyłączanie się plemnika do receptorów białkowych na powierzchni osłonki przejrzystej bądź mierzą zdolność penetracji osłonki przez plemnik. Pokonanie bariery osłonkowej przez plemnik jest możliwe w głów-

<sup>\*</sup>) Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych (grant nr 6 PO4C 08719) oraz Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (grant nr 10/2000).

nej mierze dzięki reakcji akrosomalnej. Polega ona na fuzji błon akrosomu, uwolnieniu enzymów akrosomalnych i w efekcie – rozpuszczeniu osłonek komórki jajowej. Stopień reakcji akrosomalnej można ocenić, wykorzystując badanie mikroskopowe odpowiednio przygotowanego nasienia z zastosowaniem wybranych metod barwienia (2, 23).

Celem badań było określenie wpływu szczepu Moscow wirusa ektromelii (ECTV-Mos) na męskie komórki rozrodcze myszy BALB/c (H-2<sup>d</sup>), poprzez ocenę morfologii plemników i czasu wystąpienia reakcji akrosomalnej plemników *in vitro*.

### Materiał i metody

Genetycznie wrażliwe na zakażenie ECTV-Mos myszy BALB/c w wieku 5 tygodni, o masie 20-27 g zakażano poprzez śródskórną, dostopową (obie kończyny miedniczne) iniekcję ECTV-Mos, w dawce  $3,5 \times 10^3$  LD<sub>50</sub>/mysz (LD<sub>50</sub> =  $10^{3,75}$ /ml), w objętości 0,03 ml/kończynę. Grupę zwierząt kontrolnych stanowiły myszy niezakażone. Komórki rozrodcze badanych zwierząt izolowano w 5. dniu po zakażeniu (d.p.z.), tj. po pierwotnej wirerii ECTV-Mos i w 15 d.p.z. – w pełnoobjawowej postaci ektromelii. W celu uzyskania plemników od samców myszy BALB/c izolowano najądrza. Manipulacji na izolowanych komórkach dokonywano pod kontrolą mikroskopu stereoskopowego (PZO), zaopatrzonego w podgrzewany stolik (38°C). Hodowle plemników prowadzono w temperaturze 37°C, w atmosferze o 5% zawartości CO<sub>2</sub>.

**Objawy kliniczne ektromelii.** Pierwszym objawem klinicznym ektromelii u zakażonych dostopowo myszy BALB/c jest występujący w 7-9 d.p.z. obrzęk stóp (miejsce iniekcji wirusa). W kolejnych dniach pojawiają się grudkowe zmiany skórne początkowo na kończynach miedniczych i/lub ogonie, później na całej powłoce ciała. Zmiany te przerażają się w pęcherzyki, krosty i/lub owrzodzenia, których największe nasilenie notuje się około 14-16 d.p.z. Zmiany skórne na kończynach miedniczych i/lub ogonie mogą osiągać charakter rozległych zmian martwiczych, które w efekcie powodują autoamputację tych części ciała. Symptomatycznym, ciężkim objawom choroby ektromelia za wdzięcza swoją nazwę.

**Przygotowanie plemników do badań.** Najądrza umieszczano w preinkubowanym (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 12 h) podłożu T6 (Sigma) pod parafiną (Sigma). Uwolnione z ogona najądrzy plemniki inkubowano przez 25 min. Po inkubacji zawiesinę plemników przeniesiono do preinkubowanego przez 12 h podłoża T6 z dodatkiem 15 mg/ml BSA pozbawionej kwasów tłuszczowych (Sigma) i ponownie inkubowano w kropli pod parafiną przez 90 min., przy koncentracji  $1-2 \times 10^6$  plemników/ml, w celu kapacytacji plemników.

**Ocena morfologii plemników.** Część uwolnionych z najądrzy badanych plemników po 25 min. inkubacji w podłożu T6 i przeniesieniu do medium T6 + BSA posłużyła do wykonania preparatów (rozmary z zawiesiny plemników). Wysuszone w temperaturze pokojowej preparaty barwiono rutynowo metodą Pappenheima. Ocena morfologii plemników, przy użyciu mikroskopu Olympus BX60, polegała na określeniu odsetka komórek z wadami dotyczącymi struktur badanych plemników. W szczególności

uwzględniano wady morfologii główki, wstawki i wtki plemnika.

**Określenie czasu wystąpienia *in vitro* reakcji akrosomalnej i ruchliwości ogólnej plemników.** Czas wystąpienia reakcji akrosomalnej plemników badano przy użyciu metody Abdel-Halim Amina (23), stosując barwienie chlotetracykliną (CTC), która ma powinowactwo do dwudodatnich kationów na powierzchni plazmolemy plemnika. Plemniki, w których nie zaszła jeszcze reakcja akrosomalna, wykazują specyficzną fluorescencję (fluorescencja główki plemnika) w obecności CTC, na skutek jej związania z białkami błonowymi akrosomu. W wyniku reakcji akrosomalnej zanikają wiązania CTC z błonami akrosomu, a tym samym zanika fluorescencja wybarwionych komórek. Uwolnione z najądrzy gamety po 25 min. inkubacji w podłożu T6 przeniesiono do podłoża T6 + BSA i inkubowano przez 5 godzin. Następnie, w odstępach 60-minutowych z inkubowanego materiału pobierano próbki, które służyły do wykonania oznaczenia. Przygotowano 500 μM roztwór CTC (Sigma) w buforze Tris (20 mM Tris, 130 mM NaCl, 5 mM cysteiny) o pH = 7,8, który przechowywano w światłoszczelnym naczyniu, w 4°C. Do każdej próby używano 5 μl badanej zawiesiny plemników, którą inkubowano przez 10 sek. z taką samą objętością roztworu CTC ogrzanego do 37°C. Reakcję barwienia plemników hamowano, stosując 2 μl 12,5% aldehydu glutarowego. Kolejnym etapem badania było wykonanie preparatów bezpośrednich z barwionej CTC zawiesiny plemników. Preparaty oglądano w mikroskopie BX60 (Olympus). Równoległe z badaniem czasu wystąpienia reakcji akrosomalnej, prowadzono ocenę ruchliwości plemników. Z badanej zawiesiny plemników wykonywano preparaty bezpośrednie, które następnie oglądano w mikroskopie kontrastowo-fazowym BX60 (Olympus). Określano ogólną ruchliwość plemników, wyrażaną w wartościach procentowych.

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w poszczególnych doświadczeniach przeprowadzono przy użyciu testu Cochran-Coxa.

### Wyniki i omówienie

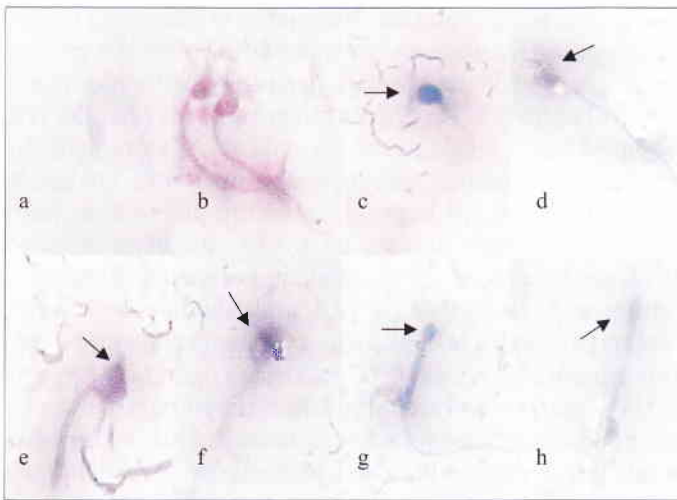
**Morfologia plemników myszy zakażonych ECTV-Mos.** Oceniając morfologię plemników myszy zakażonych ECTV-Mos, określano odsetek plemników z wadami strukturalnymi: główki, wstawki i wtki (ryc. 1.) Badanie wykazało istotny ( $p \leq 0,05$ ) wzrost odsetka plemników z wadami główki (31,7%) uzyskanych od samców w 15 d.p.z. w porównaniu z kontrolą i z grupą 5 d.p.z. Istotnie ( $p \leq 0,05$ ) wzrósł też w tej samej grupie doświadczalnej odsetek plemników z wadami wstawki (do 9,9%). Nie wykazano istotnych zmian w morfologii plemników izolowanych od samców w 5 d.p.z. w porównaniu z kontrolą. Wyniki badań zamieszczono w tab. 1.

**Czas wystąpienia reakcji akrosomalnej *in vitro* i ruchliwość plemników.** Doświadczenie z zastosowaniem metody barwienia CTC badanych plemników wykazało istotne różnice w reakcji akrosomalnej *in vitro* plemników izolowanych od myszy w 15 d.p.z. ECTV-Mos w porównaniu z wynikami z grupy kon-

Tab. 1. Odsetek plemników z wadami strukturalnymi (plemników izolowanych od myszy BALB/c zakażonych ECTV-Mos)

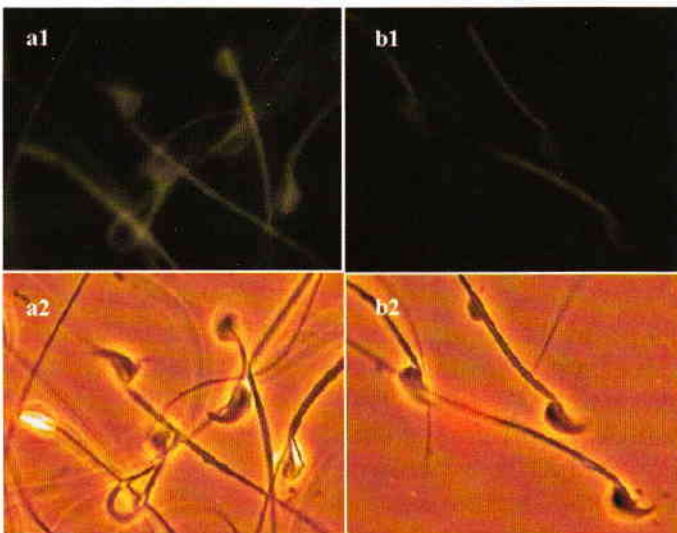
Grupa doświadczalna	% plemników				
	z wadami dotyczącymi:				prawidłowych
	główki	wstawki	witki	ogółem wszystkich struktur	
Kontrola	15,2	4,7	3,3	23,2	76,8
5 d.p.z.	17,8	7,5 ↑	2,8	28,1 ↑	71,9
15 d.p.z.	31,7 ↑ *	9,9 ↑ *	2,9	44,5 ↑ *	55,5

Objaśnienia: (↑) istotny statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) w stosunku do kontroli wzrost odsetka plemników wykazujących wady morfologiczne; (\*) istotny statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) w stosunku do 5 d.p.z. wzrost odsetka plemników wykazujących wady morfologiczne



Ryc. 1. Wady morfologiczne plemników myszy BALB/c zakażonych ECTV-Mos

Objaśnienia: a-b – plemniki prawidłowe; c – wada główki (główka okrągła); d – wada główki (główka amorficzna); e – wada wstawki (pogrubienie wstawki); f – wada witki (zapętlenie witki); g – wada wstawki (złamanie wstawki)



Ryc. 2. Plemniki myszy BALB/c zakażonych ECTV-Mos; barwienie CTC

Objaśnienia: a – plemniki, w których nie zaszła jeszcze reakcja akrosomalna; b – plemniki w reakcji akrosomalnej; 1 – swoista CTC fluorescencja główek plemników; 2 – to samo pole widzenia preparatu w obrazie kontrastowo-fazowym

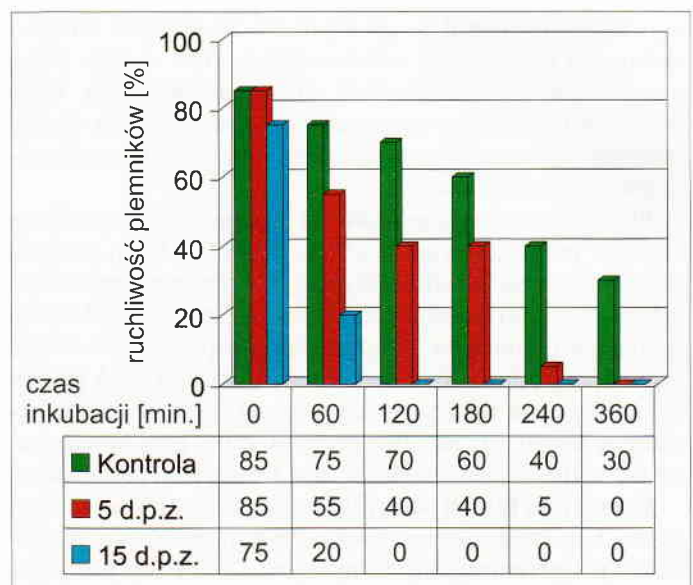
Tab. 2. Czas wystąpienia reakcji akrosomalnej *in vitro* plemników myszy BALB/c zakażonych ECTV-Mos

Grupa doświadczalna	% plemników wykazujących fluorescencję w:			
	60. min. inkubacji	120. min. inkubacji	180. min. inkubacji	240. min. inkubacji
K	19,8	4,7	0,0	0,0
5 d.p.z. ECTV-MOS	23,2 ↑	5,3	0,3	0,0
15 d.p.z. ECTV-MOS	38,6 ↑ *	33,1 ↑ *	32,6 ↑ *	13,7 ↑ *

Objaśnienia: (↑) istotny statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) wzrost odsetka plemników z opóźnioną reakcją akrosomalną w stosunku do kontroli; (\*) istotny statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) wzrost odsetka plemników z opóźnioną reakcją akrosomalną w stosunku do 5 d.p.z.

trojnej i grupy myszy 5 d.p.z. Stwierdzono znaczne wydłużenie czasu wystąpienia omawianej reakcji. W 240. min. inkubacji 13,4% plemników izolowanych od myszy w 15 d.p.z. ECTV-Mos wykazywało jeszcze swoistą fluorescencję (ryc. 2.), zatem nie zaszła jeszcze u nich reakcja akrosomalna. Wyniki badań przedstawiono w tab. 2. Analiza ruchliwości ogólnej badanych plemników wykazała znaczne pogorszenie ruchliwości badanych komórek izolowanych od myszy zakażonych. W grupie 15 d.p.z. ECTV-Mos odsetek ruchliwych plemników znacznie obniżył się już w 60. min. inkubacji. Całkowitą utratę ruchliwości plemników w tej grupie doświadczalnej stwierdzono w 180. min., zaś w grupie 5 d.p.z. – w 360. min. badania. Wyniki badania przedstawiono na ryc. 3.

Istnieje niewiele informacji na temat mechanizmów oddziaływania zakażeń wirusowych na jakość męskich komórek rozrodczych. Obecnie najwięcej badań prowadzi się nad patogenezą zakażenia HIV u ludzi (HIV, human immunodeficiency virus – ludzki wirus niedo-



Ryc. 3. Ruchliwość ogólna plemników myszy BALB/c zakażonych ECTV-Mos

Objaśnienia: (↓) istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu z kontrolą zmniejszenie ruchliwości plemników; (\*) istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu z 5 d.p.z. zmniejszenie ruchliwości plemników

boru immunologicznego) (19). Obniżenie ruchliwości i zwiększoną śmiertelność plemników obserwowano w doświadczeniach nad HPV (human papillomavirus – ludzki wirus brodawczaka) i AAV (adeno-associated virus, wirusy zależne od adenowirusów) oraz licznymi zakażeniami bakteryjnymi i pierwotniaczymi (15, 17). Obniżenie ruchliwości plemników może towarzyszyć chorobom autoimmunologicznym. Plemniki myszy z doświadczalnie wywołanym autoimmunologicznym zapaleniem jąder wykazują obniżoną ruchliwość oraz mniejszą skuteczność zapłodnienia komórek jajowych *in vitro* (22). W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy wykazano obniżenie jakości plemników izolowanych od myszy BALB/c w szczycie objawów klinicznych ektromelii (14-16 d.p.z.). Na uwagę zasługuje fakt obniżenia ruchliwości plemników i znaczny odsetek komórek wadliwych strukturalnie (głównie z defektem główki) w 15 d.p.z. Mechanizmy doprowadzające do zmiany jakości plemników muszą oddziaływać na proces ich różnicowania, a więc na etapie spermatogenezy. Shevchuk i wsp. (18) wykazali, że u mężczyzn chorych na AIDS około 30% wszystkich gamet znajdujących się wewnątrz kanalika nasieniowódzkiego jest HIV-dodatnich, natomiast komórkami niezakażonymi są prawie zawsze spermatydy w późnym stadium różnicowania. Ci sami badacze sugerują, że podatne na zakażenie HIV są spermatogonia, które w procesie różnicowania osiągają stadium HIV-dodatnich plemników u zakażonych mężczyzn. Obserwowane defekty morfologiczne plemników izolowanych od myszy z pełnoobjawową ektromelią wskazują na możliwość zaburzeń towarzyszących spermiogenezie obejmującej przekształcenia spermatyd w plemniki. Comhaire i wsp. (4) wykazali obniżenie aktywności akrosomalnej *in vitro* plemników mężczyzn ze stanem zapalnym dodatkowych gruczołów płciowych. Wyniki swoich badań tłumaczą biochemicznymi zmianami zachodzącymi w plazmie nasienia. W niniejszej pracy wykorzystano plemniki izolowane bezpośrednio z ogona najądrzy, co wykluczyło oddziaływanie płynu nasiennego na przebieg reakcji akrosomalnej badanych komórek.

### Podsumowanie

Na podstawie wykonanych badań można wnioskować, że u myszy BALB/c w szczycie objawów klinicznych ektromelii (15 d.p.z. ECTV-Mos) znaczne wydłużenie czasu wystąpienia reakcji akrosomalnej plemników jest ściśle związane ze zmianą ich jakości. Przyczyną defektów morfologicznych i czynnościowych plemników badanych myszy jest najprawdopodobniej zaburzony proces spermatogenezy, jako skutek zakażenia wirusowego. U samców myszy BALB/c z nasilonymi objawami klinicznymi ektromelii wirus pokonuje bariery ochronne narządów rozrodczych, czemu towarzyszy obniżenie jakości wytwarzanych w nich komórek rozrodczych.

Wprowadzenie modelu badawczego, tj. myszy BALB/c (H-2<sup>d</sup>) do programu badań nad zaburzeniami

układu rozrodczego, może przyczynić się do lepszego rozumienia patogenetyki zakażeń tego układu i posłużyć do opracowań efektywnych metod profilaktycznych i terapeutycznych w dziedzinie rozrodu różnych gatunków zwierząt.

### Piśmiennictwo

1. Bavoil P. M., Hsia R. C., Rank R. G.: Prospects for a vaccine against chlamydia genital disease. I. Microbiology and pathogenesis. Bull. Inst. Pasteur, 1996, 94, 5-54.
2. Bielański A., Tischner M.: Biotechnologia rozrodu zwierząt udomowionych. Drukol, Kraków 1997.
3. Cassone A., Boccanera M., Adriani D., Santoni G., de Bernardis F.: Rats clearing a vaginal infection by *Candida albicans* acquire specific, antibody-mediated resistance to vaginal reinfection. Infect. Immun. 1995, 63, 2619-2624.
4. Comhaire F. H., Mahmoud A. M., Depuydt C. E., Zalata A. A., Christophe A. B.: Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. Hum. Reprod. Update, 1999, 5, 393-398.
5. Dejucq N., Jegou B.: Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. Microb. Molecular. Biol. Rev. 2001, 65, 208-231.
6. Eaglesome M. D., Garcia M. M.: Disease risk to animal health from artificial insemination with bovine semen. Rev. Sci. Technol. 1997, 16, 215-225.
7. Foster N. M., Alders M. A., Luedke A. J., Walton T. E.: Abnormalities and virus-like particles in spermatozoa from bulls latently infected with bluetongue virus. Am. J. Vet. Res. 1980, 41, 1045-1048.
8. Jacoby R. O., Bhatt P. N.: Mousepox in inbred mice innately resistant or susceptible to lethal infection with ectromelia virus. II. Pathogenesis. Lab. Anim. Sci. 1987, 68, 2669-2673.
9. Komender A.: Układ płciowy męski. Histologia. Ostrowski K. (red.) PZWL, Warszawa 1988, 561-590.
10. Krieger I. N., Coombs R. W., Collier A. C., Koehler J. K., Ross S. O., Chaloupka K., Murphy V. L., Corey L.: Fertility parameters in men infected with human immunodeficiency virus. J. Infect. Dis. 1991, 164, 464-469.
11. Lai Y. M., Lee J. F., Huang Hy, Soong Y. K., Yang F. P., Pao C. C.: The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. Fertil. Steril. 1997, 67, 1152-1155.
12. Morstin J.: Spermatogeneza. Andrologia. Wierzbowski S. (red.) Platan, Kraków 1996, 17-26.
13. Niemiętowski M. G., Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Malicka E., Toka F. N., Schollenberger A., Popis A.: The inflammatory and immune response to mousepox (infectious ectromelia) virus. Acta. Virol. 1994, 38, 299-307.
14. Podlech J., Hengerer R., Fleck M., Walev I., Falke D.: Replication of human herpesvirus 1 and 2 in the medulla of the adrenal gland after vaginal infection of mice. Arch. Virol. 1996, 141, 1999-2008.
15. Reichart M., Kahane I., Bartoov B.: In vivo and in vitro impairment of human and rat sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted *Ureaplasma urealyticum*. Biol. Reprod. 2000, 63, 1041-1048.
16. Reifenberg K., Deutsche T., Wild J., Hanano R., Gastrock-Balitsch I., Schrmbeck R., Schlicht H. J.: The hepatitis B virus e antigen cannot pass the murine placenta efficiently and does not induce CTL immune tolerance in H-2<sup>b</sup> mice in utero. Virology 1998, 243, 45-53.
17. Rohde V., Erles K., Sattler H. P., Derouet H., Wullich B., Schlehofer J. R.: Detection of adeno-associated virus in human semen: does viral infection play a role in pathogenesis of male infertility? Fertil. Steril. 1999, 72, 814-816.
18. Rondinelli R. H., Haslam S. Z., Fluck M. M.: The role of ovarian hormones, age and mammary gland development in polyomavirus mammary tumorigenesis. Oncogene 1995, 11, 1817-1827.
19. Shevchuk M. M., Nuovo G. J., Khalife G.: HIV in testis: quantitative histology and HIV localization in germ cells. J. Reprod. Immun. 1998, 41, 69-79.
20. Spohr de Faundez I., Gieryńska M., Niemiętowski M. G., Malicka E., Popis A.: Ectromelia virus establishes a persistent infection in spleen dendritic cells and macrophages of BALB/c mice following the acute disease. Bancherou J., Schmitt D. (wyd.): Dendritic cells in fundamental and clinical immunology. Plenum Press, New York 1995, 2, 257-261.
21. Toka F. N., Niemiętowski M. G., Spohr de Faundez I., Gieryńska M.: Cytotoxic lymphocyte control during ectromelia (mousepox) virus infection: interaction between MHC-restricted cells analyzed by non-radioactive fluorometry. Acta Virol. 1996, 40, 239-244.
22. Tung K. S. K.: Experimental autoimmune orchitis in the mouse: immunoregulation and pathogenesis. Immunology of human reproduction. Kurpisz M., Fernandez N. (wyd.) Bios Scientific Publishers, Oxford 1995, 101-110.
23. Word C. R., Storey B. T.: Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. Develop. Biol. 1984, 104, 287-299.