

Analizy funkcjonalne i molekularne plemników w ocenie zdolności rozrodczej samców ssaków*)

DOROTA BUKOWSKA, BARTOSZ KEMPISTY*, JACEK SIKORA**,
MAGDALENA WOŻNA, MARTA JACKOWSKA, KATARZYNA ZAORSKA*,
PAWEŁ ANTOSIK, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI

Katedra Weterynarii Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UP, ul. Wojska Polskiego 52, 60-628 Poznań

*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego II UM, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

**Katedra Biologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk o Zdrowiu UM, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań

Bukowska D., Kempisty B., Sikora J., Woźna M., Jackowska M., Zaorska K., Antosik P., Jaśkowski J. M.

Functional and molecular analysis of mammalian spermatozoa in the assessment of male fertility potential

Summary

The development of assisted reproduction methods requires the application of techniques for the assessment of sperm quality of animals kept for breeding purposes. At present there are a number of methods for the parametric evaluation of spermatozoa, used to determine the reproductive potential of males. Owing to the large number of factors influencing the maturation and capacitation of sperm and the complexity of the fertilisation process, it is difficult to accurately estimate fertilising potential. None of the presently used methods is fully reliable. Conventional laboratory methods, such as the microscopic analysis of the number, mobility, morphology and vitality of spermatozoa or the computer-assisted CASA method, do not provide reliable results as to the functional properties of semen. Most of these methods make it possible to analyse only a single determinant of sperm fertilization potential. High heterogeneity in sperm population makes semen analysis even more difficult. In order to achieve more reliable results, a number of functional analyses are applied, such as flow cytometry, sperm-zona binding tests, HZA and SPA tests. Other such methods include the evaluation of apoptosis and DNA damage as well as acrosome reaction assessment and the use of the molecular marker of spermatozoa. All the above methods make it possible to observe a number of influences and transformations occurring in spermatozoa prior to fertilization.

A detailed analysis of the stages by which sperm acquires the ability to fertilize an egg is not only essential for the evaluation of sperm quality, but it is also a source of valuable information on molecular and cellular mechanisms of the fertilization process, some aspects of which still remain elusive.

Keywords: fertility, sperm function, spermatozoa

Istnieją liczne metody parametrycznej oceny plemników stosowanych w celu określenia potencjału rozrodczego samców wielu gatunków ssaków. Klasyczną metodą oceny płodności jest mikroskopowe badanie liczebności, ruchliwości, żywotności i morfologii plemników. Metoda ta jednak pozwala na analizę stosunkowo niewielkiej populacji plemników, co negatywnie wpływa na wartość statystyczną wyników (17). Powszechnie stosowane metody laboratoryjne obrazują wyniki w sposób niejednoznaczny oraz słabo skorelowany ze zdolnością plemników do zapłodnienia (20). Ważnym udoskonaleniem metod opartych na pomiarze konwencjonalnych parametrów było wprowadzenie analizy wspomaganą komputerowo (CASA – computer assisted semen analysis) (10, 44). Dodatkowo o ograniczonej przydatności metod oceny cech morfologicznych plemników stanowi fakt, że część zabu-

rzeń plemników, jak uszkodzenia DNA, upośledzających ich zdolność do zapłodnienia nie wpływa na parametry określane za pomocą tradycyjnych technik, a więc wykrycie ich wymaga zastosowania innych metod (19).

W celu uzyskania bardziej miarodajnych wyników stosuje się szereg analiz funkcjonalnych określających w warunkach *in vitro* zdolność plemników do penetracji osłonki przejrzystej i fuzji z oocytom. Zaletą tych metod jest fakt, że uwzględniają one szereg oddziaływań i przemian poprzedzających zapłodnienie zachodzących w drogach rodnych samicy (1, 43).

Złożoność procesów, jakim podlegają plemniki w drogach rodnych samicy, utrudnia opracowanie jednej optymalnej metody, dającej wyniki wysoko skorelowane ze zdolnością rozrodczą samca i jednocześnie, w przypadku upośledzenia płodności, wskazujące na

jej podłoże (34). Poniższe opracowanie ma na celu przegląd wybranych metod pozwalających ocenić parametry plemników, istotne z punktu widzenia ich zdolności do zapłodnienia.

Zastosowanie cytometrii przepływowej

Istotnymi kryteriami, jakie powinna spełniać metoda, są: powtarzalność wyników, łatwość standaryzacji i optymalizacji procedury, względnie niska cena i możliwie wysoka wartość diagnostyczna oraz łatwość i szybkość wykonania (19, 42).

W konwencjonalnych badaniach parametrów nasienia wykorzystuje się cytometrię przepływową. Badania te pozwalają na jednoczesną analizę wielu parametrów. Cecha ta jest niezwykle istotna w przypadku badania nasienia, jako że zdolność do zapłodnienia zależy od wielu czynników. Wśród tych czynników istotną rolę odgrywają: integralność błony i chromatyny, zdolność do przejścia reakcji akrosomalnej, funkcjonalność mitochondriów oraz żywotność i liczebność plemników (36). Cytometryczne badania parametrów nasienia mają znaczną przewagę nad badaniami opartymi na wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego. Są dokładniejsze, zautomatyzowane i dzięki temu pozwalają na znaczne przyspieszenie procedury oraz ocenę większej liczby komórek w znacznie krótszym czasie. Cytometria przepływowa pozwala na znaczne ograniczenie wpływu „czynnika ludzkiego” na jakość wyników.

W ciągu kilku minut cytometr dostarcza danych na temat wszystkich subpopulacji badanej próby, co czyni go doskonałym narzędziem do badań heterogennych populacji plemników. Za pomocą cytometrii przepływowej ocenia się takie parametry nasienia, jak: liczebność, żywotność, integralność chromatyny, akrosomu oraz błon mitochondrialnych, proces kapacytacji oraz płynność błony. Wybór fluorochromu zależy od badanego parametru oraz długości fali wzbudzenia dostępnej w danym cytometrze. Źródłem światła w większości cytometrów jest laser emitujący światło o określonej długości.

Plemniki przepływające pojedynczo przez promień lasera powodują rozproszenie światła, którego pomiar pozwala na ocenę wielkości/kształtu i ziarnistości poszczególnych komórek. Ponadto, detektory fluorescencji barwników, wzbudzonej światłem lasera pozwalają na pomiar jej intensywności na poszczególnych wyznakowanych komórkach, w zależności od liczby związanych cząsteczek barwnika (19).

Odkrycie szeregu fluorochromów umożliwiło dokładniejszą analizę nasienia na poziomie ultrastrukturalnym, biochemicznym i funkcjonalnym (37). Większość badań funkcjonalnych z użyciem barwników fluorescencyjnych polega na znakowaniu plemników wybranym fluorochromem i badanie z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego. Jednak analizy mikroskopowe pozwalają na zbadanie ograniczonej liczby plemników oraz są czasochłonne.

Niemale znaczenie w inicjatywie stosowania programów zachowania bioróżnorodności metodą *in situ* może mieć regulacja płci potomstwa. Najbardziej efektywną metodą odnoszącą się do tego problemu jest seksowanie plemników na frakcję męską i żeńską za pomocą cytometru przepływowego (13). Metoda ta wykorzystuje różnice występujące w zawartości DNA pomiędzy plemnikami niosącymi chromosom X i Y (15, 16, 38). Stosowanie najnowszych cytometrów przepływowych umożliwia separację plemników X i Y i uzyskanie w ciągu godziny około 15 mln plemników o czystości frakcji ponad 90% przy przepływie do około 40 000 komórek/sek. (23). W dostępnej literaturze dotyczącej badań terenowych obejmujących inseminację 1000 jałówek seksowanym nasieniem osiągnięto 90% potomstwa zakładanej płci przy jednoczesnym zachowaniu płodności inseminowanych jałówek na poziomie 90% w stosunku do grupy kontrolnej, która była inseminowana nasieniem niesortowanym (39). Coraz większą uwagę przywiązuje się do badań nad reintrodukcją gatunków zagrożonych, gdzie jednym z priorytetowych celów jest uzyskanie jak największej liczby potomstwa płci żeńskiej (33). Potencjalna możliwość wykorzystania seksowanego nasienia w celu kontrolowania płci potomstwa zwierząt zagrożonych wyginięciem ograniczyłaby w znacznej mierze chów wsobny w populacjach poprzez dobrze rozplanowane programy hodowlane (14). Istotne znaczenie ma również stosowanie cytometrii przepływowej do seksowania nasienia używanego do zapłodnień *in vitro*. Gatunkiem modelowym stosowanym w tego typu badań jest kot domowy ze względu na duże podobieństwo do wielu zwierząt egzotycznych. W dostępnej literaturze odnaleźć można doniesienia opisujące wykorzystanie seksowanego nasienia kota do zapłodnień *in vitro* w celu pozyskiwania 7-dniowych zarodków (14, 18).

Testy wiązania osłonki przejrzystej (Sperm-zona binding tests)

Osłonka przejrzysta stanowi główną selektywną barierę dla plemników. Uważa się, że zdolność plemników do zapłodnienia zależy w znacznej mierze od ich zdolności do pokonania tej bariery (41). Oddziaływania między osłonką przejrzystą a plemnikami analizuje się, wykorzystując testy wiązania osłonki przejrzystej (sperm-zona binding tests), testy penetracyjne (sperm penetration assays) i testy zapłodnienia *in vitro* (*in vitro* fertilization assays). Testy wiązania osłonki przejrzystej opierają się na ocenie cząsteczek powierzchniowych plemników i ich zdolności do wiązania z białkami ZP na powierzchni osłonki przejrzystej oocyty. U zwierząt, w badaniach zdolności plemników do zapłodnienia korzysta się z wiedzy pozyskanej w badaniach procesu zapłodnienia u człowieka, gdzie test wiązania plemników do osłonki przejrzystej wydaje się dobrym prognostykiem powodzenia zapłodnienia *in vitro* (34).

Testy penetracyjne (SPA – Sperm Penetration Assays)

Metodę zastosowania oocytów chomiczych do oceny zdolności plemników do zapłodnienia opisano po raz pierwszy ponad 30 lat temu (44). W metodzie tej poddaje się analizie zdolność plemników do penetracji oocytu chomika pozbawionego uprzednio osłonki przejrzystej. Pozytywny wynik testu penetracyjnego świadczy o tym, że badane plemniki są zdolne do przejścia kapacytacji, reakcji akrosomalnej i fuzji z oocytem. Wynik negatywny natomiast świadczy o tym, że plemniki nie są zdolne do penetracji, ponieważ nie są zdolne do przejścia reakcji akrosomalnej oraz kapacytacji w drogach rodnych samicy. Jednak pozytywny wynik testu nie daje gwarancji, że w wyniku zapłodnienia powstanie zdrowe potomstwo. Wartość diagnostyczna tego testu jest przez niektórych autorów kwestionowana, ponieważ pomija się w tym badaniu etap wiązania plemnika z osłonką przejrzystą (5).

Pewne modyfikacje testu penetracyjnego pozwalają na uzyskanie dokładniejszych danych na temat defektów plemników. Przetrzywanie nasienia w środowisku hiperosmotycznym indukuje kapacytację. Sugeruje się, że proces ten polega na oddysocjowaniu białek związanych jonowo z błoną plemników, z których niektóre wpływają hamująco na kapacytację. Pozytywny wynik testu penetracyjnego plemników poddanych działaniu medium o podwyższonym poziomie chlorku sodu wskazuje na występowanie zaburzeń w procesie kapacytacji (2, 32). Zastosowanie wapniowego jonoforu A23187 (kalcimycyna) skutkuje napływem wapnia do komórek oraz indukuje reakcję akrosomalną. Zastosowanie tej metody w połączeniu z SPA pozwala zidentyfikować przyczynę obniżonej płodności jako upośledzenie mechanizmów indukujących reakcję akrosomalną pod wpływem jonów Ca^{2+} (32).

Test wiązania plemników z osłonką przejrzystą oocytów (HZA – Hemizona Assay)

Oceny zdolności plemników do wiązania się z osłonką przejrzystą można dokonać za pomocą testu HZA (12). W teście tym wykorzystuje się komórki jajowe poddane bisekcji za pomocą mikromanipulatora. Jedną połowę osłonki przejrzystej inkubowana jest z badanymi plemnikami, a druga z plemnikami płodnego samca (6, 31). Na podstawie wyników testu wyznacza się stosunek liczby plemników badanych wiążących się z połową osłonki przejrzystej do liczby plemników referencyjnych pozyskanych od płodnego samca, wiążących się z drugą połową tej samej osłonki. Parametr ten (HZA index) jest wskaźnikiem powodzenia zapłodnienia pozaustrojowego (43).

Ocena uszkodzeń DNA i apoptozy

Aneksyna V/PI. Jednym z przejawów apoptozy jest utrata asymetrii błony komórkowej. W „zdrowych” komórkach nieapoptotycznych fosfatydyloseryna jest

obecna po wewnętrznej stronie dwuwarstwy lipidowej. Natomiast podczas wczesnych etapów apoptozy fosfatydyloseryna przemieszcza się do zewnętrznej warstwy błony komórkowej.

Aneksyna V jest białkiem wiążącym się preferencyjnie w obecności jonów Ca^{2+} z fosfolipidami o ujemnym ładunku, takimi jak fosfatydyloseryna, równocześnie wykazując minimalne powinowactwo do fosfatydycholiny i sfingomieliny obecnych w zewnętrznej warstwie błony komórkowej żywych komórek, nie podlegających apoptozie. Zmiany rozmieszczenia fosfolipidów błonowych obserwuje się na wczesnych etapach apoptozy, zanim dojdzie do widocznych zmian morfologicznych i utraty integralności błony (29).

Wykorzystanie aneksyny V związanej z FITC (izotiozjanian fluoresceiny) pozwala na ilościowe określenie za pomocą cytometru przepływowego liczby komórek, które weszły na szlak apoptozy. Zastosowanie aneksyny V, wykazującej fluorescencję w zielonym zakresie widma, w kombinacji z jodkiem propidyny (PI), o fluorescencji w czerwonym zakresie widma, pozwala ocenić liczbę komórek żywych, nieapoptotycznych (A-/PI-), komórek we wczesnym etapie apoptozy (A+/PI-) i komórek w późnej fazie apoptozy lub nekrotycznych (A+/PI+).

Oceny żywotności komórek dokonuje się również, stosując kombinację barwników SYBR-14 i PI (17). SYBR-14 jest barwnikiem łatwo przenikającym przez błony, barwiącym kwasy nukleinowe żywych komórek, emitującym fluorescencję w zielonym zakresie światła.

Tunel. Metoda ta polega na wykorzystaniu terminalnej deoksynukleotydylo transferazy (TdT) do znakowania pofragmentowanej cząsteczki DNA. Enzym ten wprowadza biotynylowaną trójfosforodeoksyurydynę dUTP do 3' końca cząsteczki DNA. Wyznaczone cząsteczki wizualizuje się za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego lub analizuje przy użyciu cytometru przepływowego (8).

Metoda kometowa (comet assay). Elektroforeza żelowa pojedynczych komórek jest szeroko stosowana w ocenie uszkodzeń DNA w komórkach somatycznych. Metodę tę stosuje się także w badaniach wpływu czynników takich, jak promieniowanie jonizujące lub chemioterapia, mogących powodować zaburzenia w integralności DNA plemników. Wykazano, że uszkodzenia DNA stwierdzone za pomocą tej metody są skorelowane z płodnością samca (21). W metodzie tej badane komórki rozdziela się elektroforetycznie na szkiełku mikroskopowym po uprzedniej lizie i działaniu proteiny w celu eliminacji białek związanych z DNA. DNA tworzący po rozdzieleniu charakterystyczny wzór „komety” jest barwiony fluorescencyjnie, a następnie obrazy uzyskane pod mikroskopem fluorescencyjnym poddawane są analizie komputerowej. Parametry, takie jak długość ogona komety i odsetek DNA zawarty w ogonie komety pozwalają ocenić wielkość uszkodzeń DNA badanych komórek.

Metoda SCSA – Analiza struktury chromatyny plemnikowej (Sperm chromatin structure assay).

W trakcie dojrzewania plemników chromatyna przybiera strukturę skondensowaną i odporną na uszkodzenia. Jednak pod wpływem różnych czynników fizjologicznych, środowiskowych, mutacji lub nieprawidłowości chromosomowych może dojść do zaburzeń skutkujących obniżeniem płodności (40). SCSA jest metodą pozwalającą ocenić podatność DNA plemnikowego na denaturację. Po raz pierwszy opisana przez Evensona w 1980 r., była stosowana początkowo do oceny DNA ludzkich plemników, następnie buhajów (3), ogierów (28) i innych ssaków (9). Była pierwszą metodą wykorzystującą cytometrię przepływową do analiz nasienia. Metoda ta pozwala na określenie zwiększonej podatności DNA plemnikowego na denaturację. Z czasem denaturacja cieplna została zastąpiona denaturacją kwasową (10). Podatność DNA plemników na denaturację w środowisku kwasowym jest wskaźnikiem zaburzeń w strukturze chromatyny, a w szczególności obecności pęknięć w nici DNA (11).

SCSA opiera się na barwieniu plemników za pomocą oranżu akrydyny. Barwnik ten wnika pomiędzy zasady natywnego DNA. Wykazuje zieloną fluorescencję pod wpływem wzbudzenia światłem niebieskim, natomiast związany z cząsteczką jednoniciowego DNA emituje fluorescencję w czerwonym zakresie widma. Pozwala to ocenić proporcje jednoniciowego, zdenaturowanego DNA do DNA w formie natywnej.

W metodzie tej bada się poziom fluorescencji w zielonym i czerwonym zakresie widma.

Na podstawie danych uzyskanych za pomocą cytometru wyznacza się wskaźnik DFI (DNA fragmentation index) wyrażający stosunek poziomu intensywności czerwonej fluorescencji do całkowitej (czerwonej i zielonej) fluorescencji badanej próbki nasienia. Wyniki pomiarów struktury chromatyny plemników są wysoko skorelowane z płodnością, natomiast słabo skorelowane z „konwencjonalnymi” parametrami nasienia.

Ocena reakcji akrosomalnej (Acrosome Reaction Assessment). Plemniki, które przeszły reakcję akrosomalną, mogą być wykryte za pomocą fluorescencyjnie znakowanych lektyn, przeciwciał, metodami histochemicznymi lub za pomocą kuleczek opłaszczonych przeciwciałami. Spośród lektyn stosuje się fluorescencyjnie znakowane PSA (*Pisum sativum* agglutinin) wiążące się do reszt α -mannozy i α -galaktozy macierzy akrosomalnej plemnika i PNA (*Arachis hypogaea* agglutinin) wiążące się do reszt β -galaktozy zewnętrznej błony akrosomalnej. PSA selektywnie wiąże się do glikoproteinowych struktur zawartych w akrosomie (27, 30).

mRNA-molekularny marker plemników. Ostermeier i wsp. (35), wykorzystując metodę mikromacierzy ekspresyjnych (microarrays), przedstawił profil transkrypcyjny plemników izolowanych z męskich ejakulatów (35). Badania nad zawartością mRNA w plem-

nikach są powszechnie wykonywane u człowieka, natomiast w analizach wykorzystujących model zwierzęcy marker ten wykorzystywany jest w znikomym stopniu (4, 26). Sugeruje się, iż zawarty w kroplach cytoplazmatycznych mRNA w plemnikach męskich jest markerem skorelowanym z ruchliwością plemników (22, 25). Ponadto badania przeprowadzone na gametach knura i człowieka wskazują na ważny udział plemnikowego mRNA w regulacji wczesnych etapów rozwoju zarodkowego (7, 24).

Podsumowanie

Diagnostowanie potencjału rozrodczego samców pozostaje wciąż trudnym zadaniem. Trudność ta wynika zarówno ze złożoności procesu zapłodnienia, dużej heterogenności plemników, jak i dużej liczby czynników wpływających na jakość nasienia. Każda ze stosowanych metod pozwala na ocenę jednego z aspektów istotnych z punktu widzenia zdolności plemników do zapłodnienia. W celu uzyskania wiarygodnej diagnozy konieczne jest stosowanie kombinacji odpowiednio dobranych metod.

Piśmiennictwo

1. Aitken R. J.: Sperm function tests and fertility. *Int. J. Androl.* 2006, 29, 69-75.
2. Aitken R. J., Wang Y. F., Liu J., Best F., Richardson D. W.: The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int. J. Androl.* 1983, 6, 180-193.
3. Ballachey B. E., Evenson D. P., Saacke R. G.: The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.* 1988, 9, 109-115.
4. Boerke A., Dieleman S. J., Gadella B. M.: A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology* 2007, 68, 147-155.
5. Braundmeier A. G., Demers J. M., Shanks R. D., Miller D. J.: The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 452-458.
6. Burkman L. J., Coddington C. C., Franken D. R., Krugen T. F., Rosenwaks Z., Hogen G. D.: The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil. Steril.* 1988, 49, 688-697.
7. Depa-Martynów M., Kempisty B., Lianeri M., Jagodziński P. P., Jedrzejczak P.: Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia. Histochem. Cytobiol.* 2007, 45, 79-85.
8. Erenpreiss J., Jepson K., Giwercman A., Tsarev I., Erenpreisa J., Spano M.: Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum. Reprod.* 2004, 19, 2277-2282.
9. Evenson D. P., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R.: Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980, 210, 1131-1133.
10. Evenson D. P., Higgins P. J., Grueneberg D., Ballachey B. E.: Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea. *Cytometry* 1985, 6, 238-253.
11. Evenson D. P., Larson K. L., Jost L. K.: Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 2002, 23, 25-43.
12. Franken D. R., Oehninger S.: The clinical significance of sperm-zona pellucida binding: 17 years later. *Front. Biosci.* 2006, 11, 1227-1233.
13. Gajda B., Smorag Z.: Wykorzystanie metod biotechnologii rozrodo w zachowaniu bioróżnorodności zwierząt. *Biotechnologia* 2007, 4, 55-65.
14. Garner D. L.: Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 2006, 65, 943-957.
15. Garner D. L.: Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J. Androl.* 2001, 22, 519-526.

16. Garner D. L., Gledhill B. L., Pinkel D., Lake S., Stephenson D., Van Dilla M. A., Johnson L. A.: Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 1983, 28, 312-321.
17. Garner D. L., Johnson L. A.: Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 1995, 53, 276-284.
18. Garner D. L., Seidel G. E.: Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Can. J. Anim. Sci.* 2003, 83, 375-384.
19. Gillan L., Evans G., Maxwell W. M.: Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 2005, 63, 445-457.
20. Graham J. K., Mocé E.: Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 2005, 64, 492-504.
21. Irvine D. S., Twigg J. P., Gordon E. L., Fulton N., Milne P. A., Aitken R. J.: DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J. Androl.* 2000, 21, 33-44.
22. Jedrzejczak P., Kempisty B., Bryja A., Mostowska M., Depa-Martynow M., Pawelczyk L., Jagodziński P. P.: Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Arch. Androl.* 2007, 53, 199-205.
23. Johnson L. A., Welch G. R.: Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999, 52, 1323-1341.
24. Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaskowski J. M., Jagodziński P. P.: Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, 20, 513-518.
25. Kempisty B., Depa-Martynow M., Lianeri M., Jedrzejczak P., Darul-Wasowicz A., Jagodziński P. P.: Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007, 45, 109-113.
26. Kempisty B., Jedrzejczak P., Jagodziński P. P.: Structure and role of protamines 1 and 2 in spermatogenesis and male infertility. *Ginekol. Pol.* 2006, 77, 238-245.
27. Kurz A., Viertel D., Herrmann A., Müller K.: Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction* 2005, 130, 615-626.
28. Love C. C., Kenney R. M.: The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 1998, 50, 955-972.
29. Martí E., Pérez-Pé R., Colás C., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J. A.: Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 106, 113-132.
30. Mattioli M., Barboni B., Lucidi P., Seren E.: Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 1996, 45, 373-381.
31. Mayenco-Aguirre A. M., Pérez Cortés A. B.: Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology* 1998, 50, 95-204.
32. Muller C. H.: The andrology laboratory in an Assisted Reproductive Technologies program. Quality assurance and laboratory methodology. *J. Androl.* 1992, 13, 349-360.
33. O'Brien J. K., Hollinshead F. K., Evans K. M., Evans G., Maxwell W. M. C.: Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. *Reprod. Fertil. Dev.* 2003, 15, 367-375.
34. Oehninger S., Franken D. R., Sayed E., Barroso G., Kolm P.: Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 2000, 6, 160-168.
35. Ostermeier G. C., Dix D. J., Miller D., Khatri P., Krawetz S. A.: Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002, 360, 772-777.
36. Peticarari S., Ricci G., Granzotto M., Boscolo R., Pozzobon C., Guarnieri S., Sartore A., Presani G.: A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Hum. Reprod.* 2007, 22, 485-494.
37. Petrunkina A. M., Waberski D., Günzel-Apel A. R., Töpfer-Petersen E.: Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 2007, 134, 3-17.
38. Pinkel D., Lake S., Gledhill B. L., Van Dilla M. A., Stephenson D., Watchmaker G.: High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry* 1982, 3, 1-9.
39. Seidel G. E., Schenk J. L., Herickhoff L. A., Doyle S. P., Brink Z., Green R. D., Cran D. G.: Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 1999, 52, 1407-1420.
40. Sikora J., Kempisty B., Jedrzejczak P., Jagodziński P. P.: Rola uszkodzeń DNA w plemnikach w ocenie ich zdolności do zapłodnienia. *Przegl. Lek.* 2006, 63, 800-802.
41. Talbot P., Shur B. D., Myles D. G.: Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* 2003, 68, 1-9.
42. Versteegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K.: Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002, 57, 149-179.
43. Waberski D., Magnus F., Mendonca Ferreira F., Petrunkina A. M., Weitze K. F., Töpfer-Petersen E.: Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology* 2005, 63, 470-484.
44. Yanagimachi R., Yanagimachi H., Rogers B. J.: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1976, 15, 471-476.

Adres autora: dr Bartosz Kempisty, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań;
e-mail: etok@op.pl