

VLIV ZNEČIŠTĚNÉHO OVZDUŠÍ NA KVALITU LIDSKÝCH SPERMIÍ V PRAZE

Prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.
 RNDr. Roman Rybář, Ph.D.
 Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc.
 MVDr. Monika Kunetková
 Ing. Drahomíra Švecová
 MUDr. Radim J. Šrám, DrSc.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

*Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.
 a Zdravotní ústav Středočeského kraje, Praha*

ÚVOD

Ve velkých městech dochází často k vysoké koncentraci průmyslu a dopravy. Následkem toho dochází ke zvýšené emisi chemických látek, které mohou mít nepříznivý vliv na zdraví obyvatel. Hlavní město Praha se v poslední době stává jednou z oblastí s nejvyšším stupněm znečištění ovzduší v České republice, což způsobuje extenzivní nárůst dopravy, komplikovaný geomorfologií a architekturou vnitřního města [1]. Situaci zhoršuje i nedokonalé spalování fosilních paliv při vytápění domácností [2]. Mezi chemickými látkami znečišťujícími ovzduší se často vyskytují genotoxické a karcinogenní látky jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) [3]. PAU jsou poslední dobou středem zájmu z hlediska možného vlivu na etiologii nádorového onemocnění, vztahu k mortalitě, respiračních a kardiovaskulárních chorob [4,5], mohou být také příčinou poklesu plodnosti [6,7]. PAU reprezentují část organické hmoty vázané na respirabilní aerosolové částice (< 2,5 µm). Při jejich odbourávání dochází ke vzniku reaktivních intermediátů, které mohou způsobovat přímo poškození DNA. Navíc mohou reagovat s jinými polutanty, jako jsou oxidy dusíku nebo ozon a tvořit další potenciální karcinogenní látky [8]. V rámci „Programu Teplice“ zaměřeného na vliv znečištění ovzduší na zdraví obyvatelstva byl, mimo jiné, prokázán negativní vliv na reprodukci osob žijících v okrese Teplice zvýšením rizika růstové retardace plodu [9,10] a snížením kvality ejakulátu mladých mužů [11], včetně poškození DNA ve spermiích [12]. Zvýšené koncentrace PAU v studovaném regionu k tomu nepochybně významně přispěly [7,13].

Přesto, že lze studovat řadu parametrů kvality ejakulátu (koncentrace, motilita, vitalita a morfologie spermií), naše předchozí studie ukázaly, že poruchy integrity chro-

matinu spermií jsou jeden z nejcitlivějších indikátorů expozice, zejména mutagenními látkami [14,15]. DNA spermie může být porušena zlomy nebo kovalentní modifikací nukleotidů. Oba tyto typy poruch jsou jednou z příčin infertility [16–18]. Poruchami struktury chromatinu ve spermiích se zabývalo a zabývá mnoho studií, a to především v posledním desetiletí s cílem odhalit příčinu mužské neplodnosti. Struktura chromatinu může být narušena přítomností zlomů v DNA nebo nedokonalou kondenzací chromatinu, která může mít řadu příčin, z nichž expozice genotoxickými látkami patří k jedné z nejvýznamnějších. Narušení struktury chromatinu (fragmentace) může způsobovat subfertilitu bez ohledu na to, že ostatní parametry spermogramu jsou v normě [19]. Důsledkem může být selhání fertilizace, zhoršení morfologie embryí [20], abnormální vývoj blastocyst, selhání implantace embrya nebo opakované spontánní aborty [21].

Fragmentace DNA ve spermiích

Jedna z nejčastěji používaných metod, které zjišťují poruchu integrity chromatinu je SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). Tato metoda je jediná, která má přesně stanovený prognostický význam [22, 23]. Metoda stanovuje vlastnosti chromatinu ve spermiích, resp. citlivost k denaturaci jaderné DNA *in situ*. Tato citlivost je závislá na míře poškození DNA. Princip metody spočívá ve skutečnosti, že DNA chromatinu spermie, která neobsahuje jednořetězcové ani dvouřetězcové zlomy, je intaktní k denaturačním podmínkám nízkého pH. Porušená integrita chromatinu, charakterizovaná přítomností jednořetězcových (ssDNA) a dvouřetězcových (dsDNA) zlomů v molekule DNA, vede k tvorbě denaturovaných úseků, které se kvantifikují mírou intenzity červené fluorescence, ta je znakem asociace akridinové oranže s jednořetězcovou

DNA po ozáření monochromatickým laserovým modrým světlem o vlnové délce 488 nm. Akridinová oranž navázaná na dvouřetězcovou molekulu emituje světlo zelené. Stupeň poškození DNA ve spermiích je kvantifikován pomocí DNA fragmentačního indexu (dále jen DFI), matematicky vyjádřeného jako poměr červené fluorescence k součtu červené a zelené fluorescence. DFI tak vypovídá o procentuálním podílu poškozených spermií (vykazující zlomy) v ejakulátu. Po analýze ejakulátu průtokovou cytometrií se na výsledném cytogramu objeví několik populací buněk. Hlavní populace spermií je charakterizovaná nedetekovatelným DFI, tj. populace spermií s nepoškozeným chromatinem, další populace spermií je s porušenou integritou chromatinu, spermie mají detekovatelný DFI. Tato populace spermií v ejakulátu je ještě rozdělena na populaci spermií se středním poškozením chromatinu (střední DFI) a s vysokým poškozením chromatinu (vysoké DFI). Dále se na cytogramu objevuje populace nezralých forem spermií, a to hlavně spermatid, které vykazují asi pětkrát nižší stupeň kondenzace chromatinu než zralé formy. Tuto populaci označujeme jako HDS (z anglického označení „high DNA stainability cells“). Existuje mnoho studií, které se zabývaly efektem zvýšené desintegrace chromatinu na fertilitu. Ty daly vznik kategorizaci poškození chromatinu. DFI v rozmezí 0–15 % odpovídá vysokému, DFI 16–29 % střednímu a DFI vyšší než 30 % velmi nízkému fertilizačnímu potenciálu muže [22]. Jiná studie poukazuje na to, že již při 27% DFI dochází k výraznému snížení fertility [23]. Narušená struktura chromatinu ve smyslu chybné kondenzace chromatinu spermie (tzv. HDS formy-high DNA stainability cells) by neměla být přítomna u více než 15 % spermií v ejakulátu muže.

Cílem studie bylo zjistit kvalitu chromatinu ve spermiích u stejné skupiny pražských městských stráž-

níků v období se zvýšenou koncentrací znečišťujících látek v ovzduší (zimní období) a v období s relativně nižší expozicí (jaro/léto).

METODY

Účastníci studie

Do studie bylo zahrnuto 46 městských strážníků z obvodů Prahy 1, 2, 3, 5 a 7. Odběry biologického materiálu proběhly v období 7. – 21. 2. 2007 a 23. – 30. 5. 2007. Pomocí řízeného pohovoru byly se všemi účastníky vyplněny dotazníky zahrnující všechny faktory, které by mohly ovlivnit získané výsledky. V souboru bylo 29 nekuřáků a 17 kuřáků.

Postup vyšetření klasických spermatologických parametrů

Byl stanoven objem ejakulátů pomocí kalibrovaných zkumavek. Koncentrace spermií byla určena hemocytometricky po znehybnění 0,5% roztokem chloraminu v komůrce typu Thoma hloubka 0,02 a Bürkera 0,1 mm. Stanovení motility spermií bylo provedeno nápočtem při mikroskopickém zvětšení 200krát a analýzou trajektorií při zvětšení 100krát a užitím systému LUCIA. K stanovení podílu živých a mrtvých spermií v ejakulátech a současně hodnocení integrity povrchových membrán bylo použito supravitálního barvení 1% eosinem v kombinaci s 10% nigrosinem.

Sperm Chromatin Structure Assay

Zmrazený ejakulát byl naředěn pufrům TNE (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris HCl, 0,001 M EDTA, pH 7,4 při 4 °C) na koncentraci 1,5 x 10⁶/ml. 200 μ l naředěného semene bylo smícháno s 400 μ l denaturačního roztoku (0,08 N HCl, 0,1% Tritonu X 100, pH 1,2, při 4 °C). Roztok s nízkým pH vyvolá denaturaci DNA, která obsahuje jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy. Přesně za 30 sec. bylo přidáno 1,2 ml akridinové oranže (AO) o koncentraci 6 μ g/ml ve fosfátovém pufru (0,1 M kys. citronové, 0,126 M Na₂HPO₄, 0,001 M EDTA, 0,15 M NaCl, pH 6,0, při 4 °C). Po 3 min následovalo měření v průtokovém cytometru (FACSCalibur™ flow cytometer, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Analýza dat probíhala pomocí softwaru SCSASoft™.

Statistické vyhodnocení

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SPSS

Tabulka 1: Průměrné hodnoty jednotlivých parametrů kvality semene u vyšetřených strážníků

	Parametry kvality semene	Počet vzorků	Průměr	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum
Únor	objem (ml)	46	3,2	1,25	1,2	5,9
	koncentrace (mil/ml)	46	131,4	82,9	7	380
	pohyblivé spermie (%)	46	58,4	9,67	40	80
	živé spermie (%)	46	77,3	7,23	65	92
	dDFI* (%)	46	12,6	5,78	3,5	23,8
	vysoký DFI (%)	46	7,4	3,64	1,6	17,2
Květen	nezralé spermie (%)	46	12,3	3,94	5,8	22,5
	objem (ml)	46	3,3	1,35	1,5	7,6
	koncentrace (mil/ml)	46	150,7	85,5	4	380
	pohyblivé spermie (%)	46	58,2	9,45	40	80
	živé spermie (%)	46	76,0	6,65	55	92
	dDFI (%)	46	10,1	4,84	2,8	25,1
	vysoký DFI (%)	46	5,5	3,21	0,9	16,5
nezralé spermie (%)	46	10,1	4,05	5,5	23,3	

*detekovatelný DNA fragmentační index

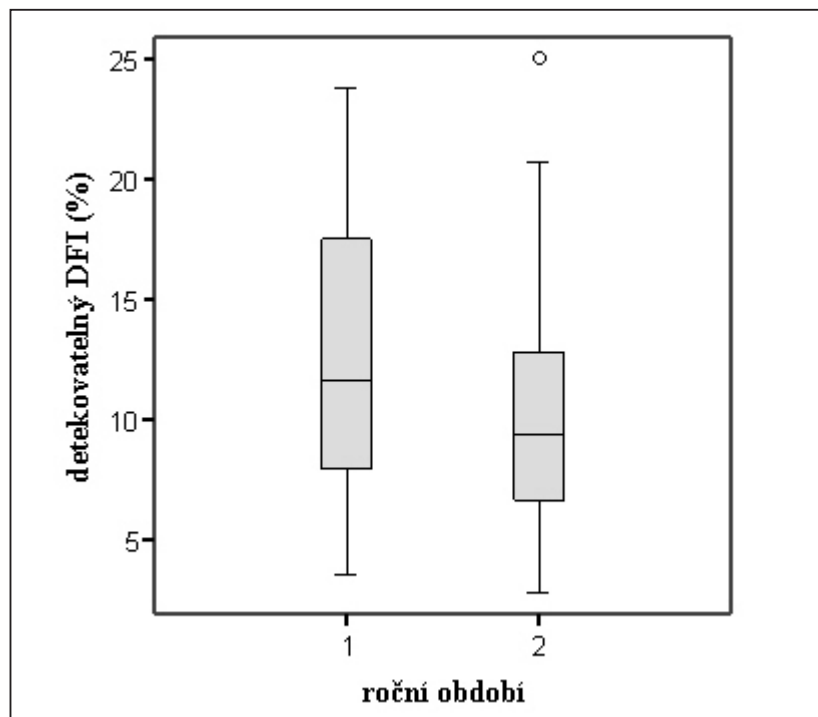
Tabulka 2: Počet vzorků semene nespňující referenční hodnoty WHO manuálu (1999) pro normální mužské semeno

Parametry kvality semene	Únor	Květen
objem ejakulátu	3	6
koncentrace spermií na ml	1	2
procento pohyblivých spermií	5	6

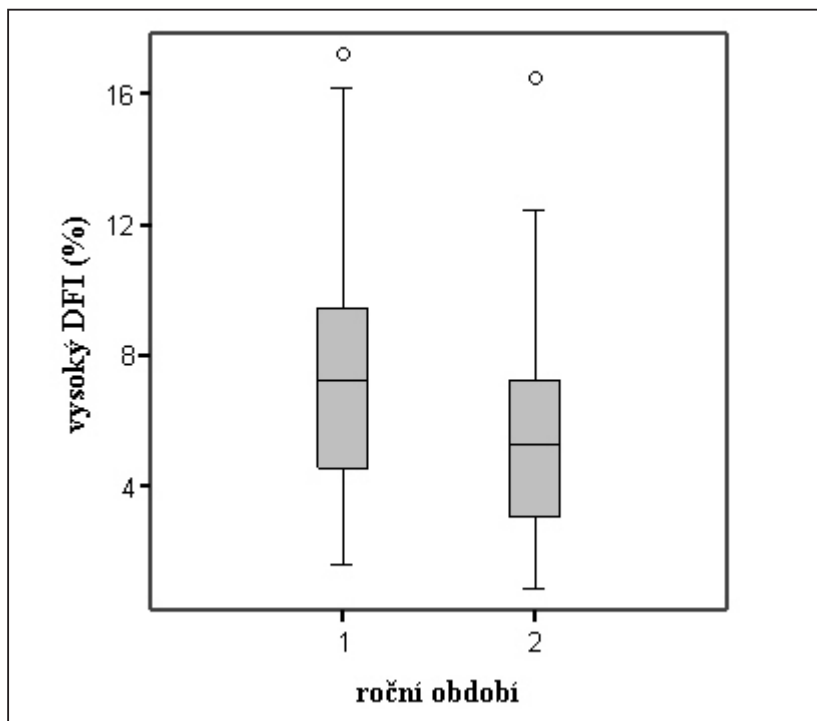
Tabulka 3: Počet vzorků semene pro jednotlivé kategorie integrity chromatinu spermií

Detekovatelný DNA fragmentační index (dDFI)	Únor	Květen
Vysoký fertilizační potenciál (dDFI do 15%)	30	42
střední fertilizační potenciál (dDFI 15–30%)	16	4
nízký fertilizační potenciál (dDFI nad 30%)	2	2
Zvýšené procento nezralých spermií (HDS nad 15%)	10	4

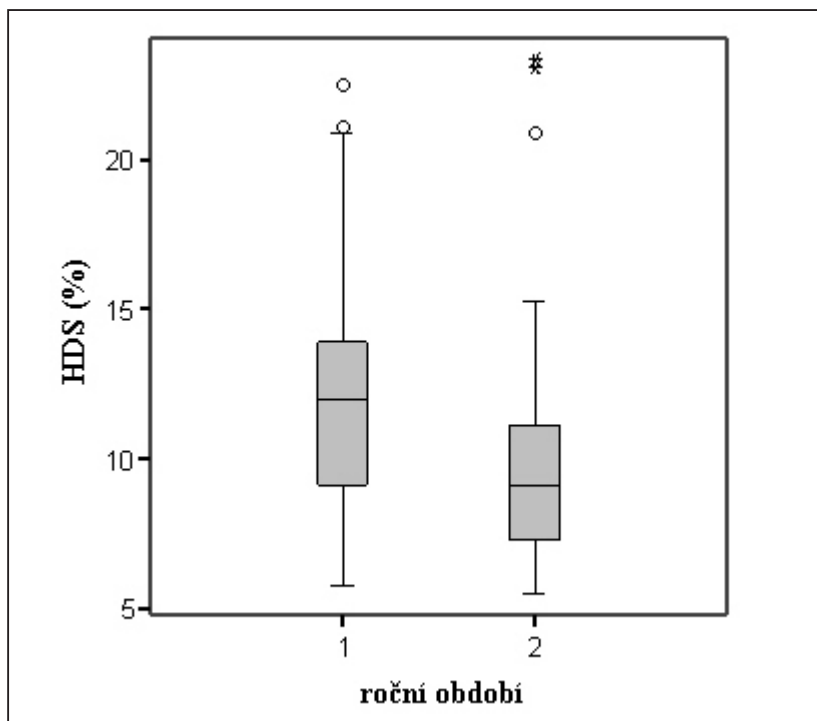
Obr.1. Box grafy – porovnání rozložení detekovatelného DFI u sledované skupiny strážníků v únoru (1) a v květnu (2). Vodorovná čára v boxu představuje medián. ? a * označují extrémní



Obr. 2. Box grafy – porovnání rozložení vysokého DFI u sledované skupiny strážníků v únoru (1) a v květnu (2).



Obr. 3. Box grafy – porovnání rozložení výskytu nezralých spermií (HDS) u sledované skupiny strážníků v únoru (1) a v květnu (2).



verze 15 pro Windows. Signifikance v rozdílech jednotlivých sledovaných parametrů mezi oběma obdobími byla vyhodnocena pomocí neparametrického párového exact testu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky vyšetření k spermatologickým parametrům jsou uvedeny v ta-

bulce 1. Mezi únorovým a květnovým odběrem nebyl v žádném ze sledovaných klasických parametrů kvality spermií (objem ejakulátu, koncentrace spermií, procento pohyblivých a živých spermií) zjištěn signifikantní rozdíl. Můžeme pouze pozorovat trend ve zvýšení koncentrace spermií v květnu (131,4 vs. 150,7 mil/ml). Ten je však pouze na hranici statistické významnosti ($P=0,06$). Většina mužů splňovala

doporučené referenční hodnoty WHO manuálu [24] pro mužské semeno (viz **tabulku 2**) a z toho hlediska lze považovat vyšetřovanou skupinu strážníků za vhodně vybranou se všemi předpoklady pro normální fertilitu. Objem ejakulátu je velmi závislý na dodržení pohlavní abstinence před odběrem. Krátká abstinence snižuje objem a naopak dlouhá abstinence může snižovat procento pohyblivých spermií. Tyto faktory hrají pravděpodobně hlavní roli u vzorků semene zahrnutých do **tabulky 2**.

Zcela odlišné výsledky jsme získali vyšetřením integrity chromatinu ve spermiích sledovaných strážníků. Ve všech vyšetřených parametrech, tj. procentu spermií s detekovatelným poškozením chromatinu (dDFI), vysokým poškozením chromatinu (hDFI) a v procentu nezralých spermií (HDS) je vysoce významně ($P < 0,001$) vyšší poškození v únoru (viz **obr. 1, 2 a 3**). Četnost vzorků semen s dDFI nad 15 % je vysoce významně vyšší v únoru oproti květnu (viz **tabulku 3**). Dva strážníci, kteří měli stabilně dDFI vyšší než 40 %, nebyli do hodnocení zahrnuti vzhledem k tomu, že jiné faktory než reálná expozice znečištěným ovzduším musí být příčinou takto vysokého poškození. Ačkoliv v daném stadiu studie nemůžeme detekovat specifické komponenty znečištění ovzduší, odpovídající za poškození DNA ve spermiích, jsou karcinogenní PAU (k-PAU) přítomné v PM frakci biologicky nejpravděpodobnější příčinou. Poškození DNA spermií expozicí PAU bylo popsáno jak u kuřáků, tak u profesionální expozice [25, 26]. Studie provedené na zvířatech ukazují, že c-PAU a jejich metabolity se mohou akumulovat ve varlatech i nadvarletu a poškozovat spermiogenezi [27, 28]. Významným faktorem je i to, že poškození DNA spermií vzniklé během pozdní spermiogeneze a zrání spermií v nadvarletu nemůže být reparováno, protože pátičný reparační aparát již chybí [29]. To činní chromatin velmi citlivý k poškození obzvláště v tomto období.

Je známo, že kuřáci mají vyšší množství PAU adduktů v DNA [25] a lze proto předpokládat, že vliv kouření se projeví i v narušení integrity chromatinu. Pokud jsme vyhodnotili zvláště nekuřáky zahrnuté do naší studie ($n=29$) všechny parametry poškození chromatinu nadále vykazovaly vysoce významné roz-

díly mezi únorem a květnem ($P=0,001$). Avšak při vyhodnocení kuřáků ($n=17$) se statisticky významné rozdíly neprojevily (dDFI $P=0,057$; hDFI $P=0,062$; HDS $P=0,08$). Podobné výsledky byly získány v lymfocytech městských strážníků v Praze při studiu vlivu k-PAU na chromozomové aberace (při použití sond barvicích chromozomy 1 a 4, metoda FISH – fluorescence in situ hybridizace). Frekvence genomových translokací byla významně vyšší u strážníků nekuřáků než kontrol nekuřáků, ale kuřáci se mezi sebou nelišili. [30]. To ukazuje, že kouření je významnějším faktorem expozice k-PAU než znečištění ovzduší.

Nelze se vyhnout otázce, co výše uvedené nálezy znamenají pro ovlivnění fertility u mužů v dané lokalitě. V naší předchozí studii jsme pozorovali zvýšení fragmentace DNA ve spermích při expozici 45 ng k-PAU/m³ (cca 8 ng B[a]P/m³) v průběhu 10 dnů před odběrem, která byla dále ovlivněna genotypem GSTM1 [31].

Infertilita je vzrůstající problém a její příčiny lze rozdělit do tří třetin. U jedné třetiny se na infertilitě párů podílí výhradně ženský faktor infertility, u druhé třetiny výhradně mužský faktor infertility a na třetí se podílejí poruchy jak u muže, tak u ženy. Muž se tedy podílí na dvou třetinách problémů s infertilitou [32]. I když nárůst narušení integrity chromatinu u strážníků v zimním období není nikterak dramatický, je nutné si uvědomit, že infertilita párů je většinou velmi komplexní jev a jakékoliv zhoršení fertility mužů rizikových párů může být tou pověstnou poslední kapkou, která učíní oplodnění nebo vývoj embryí neprůchodným. Jestliže je v únoru kvalita chromatinu horší o kategorii u 26 % vyšetřených strážníků (viz **tabulku 3**), musíme to považovat za rizikový faktor infertility.

ZÁVĚR

Integrita DNA spermíí je na jedné straně extrémně zranitelná a na druhé straně vysoce významná pro mužskou fertilitu.

Naše předchozí i zde uvedené výsledky ukazují, že integrita chromatinu je velmi citlivý indikátor expozice zejména genotoxickými látkami jako jsou např. k-PAU.

Narušení integrity chromatinu ve spermích znečištěným ovzdu-

ším je rizikový faktor infertility u mužů.

Poděkování

Studie byla provedena s finanční podporou Akademie věd ČR (grant IQS500390506).

LITERATURA

- [1] Binková, B., Šrám, R.J., Biroš, E., Černá, M., Pastorková, A., Jelínek, R., Beneš, I., Novák, J.: Biologická aktivita organických látek adsorbovaných na aerosolové částice v ovzduší: porovnání letního a zimního období 200 – 2001 v Teplicích a v Praze. *Ochrana ovzduší* č.5, 2002, s. 3-8.
- [2] Baek, S.O., Field, R.A., Goldstone, M.E., Kirk, P.W., Lester, J.N. and Perry, R.: A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior. *Water Air. Soil. Pollut.* 60, 1991, s. 273-300.
- [3] C.E. Boström, P. Gerde, A. Hansberg, B. Jernström, C. Johansson, T. Kyrklund, A. Rannung, M. Törnquist, K. Victorin, R. Westerholm: Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air, *Environ. Hlth. Perspec.* 110, Suppl.3, 2002, s. 451-487.
- [4] Pope, C.A., Dockery, D.W.: Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 56, 2006, s. 709-742.
- [5] Vineis, P., Husgafvel-Pursiainen, K.: Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* 26, 2005, s. 1846-1855.
- [6] Shiverick, K.T., Salária, C.: Cigarette smoking and pregnancy I: ovarian, uterine and placental effects. *Placenta* 20, 1999, s. 265-72.
- [7] Šrám, R.J., Binková, B., Rössner, P., Rubeš, J., Topinka, J., Dejmek, J.: Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutat. Res.* 428, 1999, s. 203-215.
- [8] Georgiadis, P., Topinka, J., Stoikidou, M., Kaila, S., Gioka, M., Katsouyanni, K., Šrám, R., Autrup, H., Kyrtopoulos, S.A.: AULIS Network. Biomarkers of genotoxicity of air pollution: bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmen-

tal tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis* 9, 2001, s.1447-1457, Erratum in: *Carcinogenesis* 10, 2001, s. 1733.

- [9] Dejmek, J., Selevan, S.G., Beneš, I., Solanský, I., Šrám, R.J.: Fetal growth and parental exposure to particulate matter during gestation. *Environ. Health Perspect.* 107, 1999, s. 475-480.
- [10] Dejmek, J., Solanský, I., Beneš, I., Leniček, J., Šrám, R.J.: The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ. Health Perspect.* 108, 2000, s. 1159-1154.
- [11] Selevan, S.G., Borkovec, L., Slott, V.L., Zudová, Z., Rubeš, J., Evenson, D.P., Perreault, S.D.: Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ. Health Perspect.* 108, 2000, s. 887-94.
- [12] Rubeš, J., Selevan, S.G., Evenson, D.P., Zudová, D., Vozdová, M., Zudová, Z., Robbins, W.A., Perreault, S.D.: Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum. Reprod.* 20, 2005, s. 2776-2783.
- [13] Binková, B., Lewtas, J., Míšková, I., Leniček, J., Šrám, R.: DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population. *Carcinogenesis* 16, 1995, s. 1037-1046.
- [14] Rubeš, J., Selevan, S.G., Šrám, R.J., Evenson, D.P. and Perreault, S.D.: Impact of air pollution on reproductive health in Northern Bohemia. In: Nicolopoulou-Stamati, P., Hens, L. and Howard, C.V.(eds.): *Reproductive Health and the Environment*. Dordrecht, The Netherlands, Springer 2007, s. 207-221.
- [15] Šrám, R.J., Rubeš, J.: Sperm Abnormalities in Exposed Humans. In: Anderson D. and Brinkworth MH (eds.): *Male-mediated Developmental Toxicity*. University of Bradford, UK, RSC Publishing 2007, s. 247-257.
- [16] Gaspari, L., Chang, S.S., Santella, R.M., Garte, S., Pedotti, P., Taioli, E.: Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutat. Res.* 535, 2003, s. 155-160.
- [17] Horák, S., Polańska, J., Widlak, P.: High levels of bulky DNA adducts in human sperm correlate with

- impaired fertility. *Acta Biochim. Polon.* 50, 2003, s. 197-203.
- [18] Paracchini, V., Chang, S.S., Santella, R.M., Garte, S., Pedotti, P., Taioli, E.: GSTM1 deletion modifies the levels of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm. *Mutat. Res.* 586, 2005, s. 97-101.
- [19] Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., Guérin, J.F.: Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* 18, 2003, s. 1023-1028.
- [20] Virant-Klun, I., Tomazevic, T., Meden-Vrtovec, H.: Sperm single stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI derived embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 19, 2002, s. 319-328.
- [21] Gopalkrishnan, K., Hurkadli, K., Padwal, V., Balaiah, D.: Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. *Androl.* 31, 1999, s. 277-282.
- [22] 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.* 23, 2002, s. 25-43.
- [23] Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K.A., Kasperson, K.M., Aamold, E.T., Evenson, D.P.: Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil. Steril.* 80, 2003, s. 895-902.
- [24] World Health Organization, WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interactions. 4.Ed., Cambridge University Press 1999, Cambridge, UK.
- [25] Zenzes, M.T., Bielecki, R., Reed, T.E.: Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. *Fertil. Steril.* 72, 1999, s. 330-335.
- [26] Hsu, P.C., Chen, I.Y., Pan, C.H., Wu, K.Y., Pan, M.H., Chen, J.R., Chen, C.J., Chang-Chien, G.P., Hsu, C.H., Liu, C.S., Wu, M.T.: Sperm DNA damage correlates with polycyclic aromatic hydrocarbons biomarker in coke-oven workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 79, 2006, s. 349-56.
- [27] Revel, A., Raanani, H., Younglai, E., Xu, J., Han, R., Savouret, J.F., Casper, R.F.: Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis cause by benzo(a)pyrene. *Reprod. Toxicol.* 15, 2001, s. 479-486.
- [28] Inyang, F., Ramesh, A., Kopsombut, P., Niaz, M.S., Hood, D.B., Nyanda, A.M., Archibong, A.E.: Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo(a)pyrene. *Reprod. Toxicol.* 17, 2003, s. 527-537.
- [29] Baarends, W.M., Van der Laan, R., Grootegoed, J.A.: DNA repair mechanisms and gametogenesis. *Reprod.* 121, 2001, s. 31-39.
- [30] Sram, R.J., Beskid, O., Binkova, B., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., Milcova, A., Solansky, I., Tulupova, E., Bavorova, H., Ocadlikova, D., Farmer, P.B.: Chromosomal aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms. *Mutat. Res.* 620, 2007, s. 22-33.
- [31] Rubes, J., Selevan, S.G., Sram, R.J., Evenson, D.P., Perreault, S.D.: GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat. Res.* 2007 – in press.
- [32] Marchesi, D.E., Feng, H.L.: Sperm DNA Integrity From Sperm to Egg. *J. Androl.* 28, 2007, s. 481-489.