



## Zastosowanie pomiaru emisji fotonów do oceny wartości biologicznej nasienia

Marek Godlewski<sup>1</sup>, Piotr Gogol<sup>2</sup>, Teresa Kwiecińska<sup>1</sup>,  
Andrzej Laszczka<sup>2</sup>, Barbara Szczęśniak-Fabiańczyk<sup>2</sup>,  
Dorota Wierzuchowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Fizyki, Akademia Pedagogiczna, Kraków

<sup>2</sup>Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,  
Balice k. Krakowa

### The application of photon emission measurements for evaluation of semen biological value

#### Summary

Improvements in the single photon counting method have made it possible to measure total emission intensity, to monitor its kinetics and to make measurements (using cut-off filters) of the spectral distribution of electromagnetic radiation emitted from spermatozoa of three farm animals species. The association between peroxidation processes in cell membranes and the accompanying photon emission and sperm viability, sperm motility and metabolic processes was identified and further explored. The application part of the studies concerned the effect of stress factors on bull, ram and boar spermatozoa and the possibility of using ultraweak luminescence as a new biophysical method for evaluation of semen biological value. The obtained results indicate that measurements of ultraweak luminescence can prove useful for solving problems related to the evaluation, conservation and use of farm animal semen.

#### Key words:

semen quality, spermatozoa, ultraweak luminescence, photon emission, lipid peroxidation, cell membranes.

#### Adres do korespondencji

Marek Godlewski,  
Instytut Fizyki,  
Akademia Pedagogiczna,  
ul. Podchorążych 2,  
30-084 Kraków;  
e-mail:  
mgodlews@wsp.krakow.pl

## 1. Wstęp

Analiza aktualnego stanu wiedzy z zakresu cytobiologii oraz bioenergetyki plemników, uzyskanej stosowanymi dotychczas metodami fizjologicznymi, cytologicznymi oraz biochemicznymi

(w tym enzymatycznymi) wskazuje na potrzebę sięgnięcia po nowe, do tej pory jeszcze w biologii gamet męskich nie stosowane, interdyscyplinarne metody i narzędzia badawcze, na przykład z dziedziny biofizyki. Duże możliwości poznawcze, jak się wydaje, tkwią w zjawisku ultrasłabej luminescencji (1-5).

Szansę na wypracowanie nowego sposobu podejścia do problemu pogłębienia znajomości procesów bioenergetycznych plemników zarysowały się przy uwzględnieniu możliwości wykorzystania zjawiska ultrasłabej luminescencji. Wszystkie organizmy żywe są w swych procesach metabolicznych źródłem emisji fotonów (ultrasłaba luminescencja), jednakże natężenie tej emisji jest tak niskie, że zaobserwowanie jej nieuzbrojonym okiem nie jest możliwe. Do tego celu musi być stosowana ultraczuła aparatura pomiarowa.

Rozróżniana jest ultrasłaba luminescencja spontaniczna, charakterystyczna dla pełnej homeostazy komórki, oraz ultrasłaba luminescencja indukowana, wywoływana oddziaływaniem na komórkę, względnie organizm, zewnętrznych czynników fizykochemicznych, takich jak np. światło, temperatura, różne związki chemiczne i in. (6-13). W ostatnich latach wykazano, że procesy metaboliczne przebiegające w komórce, w szczególności zaś zaburzenia tych procesów, znajdują swe odbicie zarówno w spontanicznej, jak i indukowanej ultrasłabej luminescencji (13-15).

Metody bioluminescencyjne znalazły już praktyczne zastosowanie w medycynie, biologii i biochemii, a także w rolnictwie, np. w określaniu mrozoodporności roślin i siły kiełkowania zbóż (12,16-21).

Stopień aktywności biologicznej plemników związany jest, jak wiadomo, z intensywnością i prawidłowością procesów metabolicznych (22-27), można zatem przypuszczać, że znajduje on swe odbicie również w ultrasłabej luminescencji.

W przedstawionych badaniach skoncentrowano się przede wszystkim na poszukiwaniu takich parametrów ultrasłabej luminescencji (np. natężenie, kinetyka, skład spektralny), które byłyby skorelowane z aktywnością biologiczną plemników. Znajomość takich parametrów umożliwiłaby ocenę oddziaływania na plemniki tak czynników środowiska naturalnego, jak i stosowanych rozcieńczalników i metod konserwacji nasienia.

Pogłębienie znajomości podstaw aktywności biologicznej plemników oraz jej zakłóceń warunkuje dalszy postęp w praktyce konserwacji i długotrwałego przechowywania nasienia, wiążącej się z obecnością w procesie technologicznym kriokonserwacji szeregu czynników fizykochemicznych, czasem o niecałkowicie jeszcze rozpoznanych oddziaływaniach. Uzupełnienie zakresu poznawczego w tej dziedzinie, dzięki wprowadzeniu nowych kryteriów oceny może mieć również znaczenie, np. w badaniach nad zapłodnieniem pozaustrojowym.

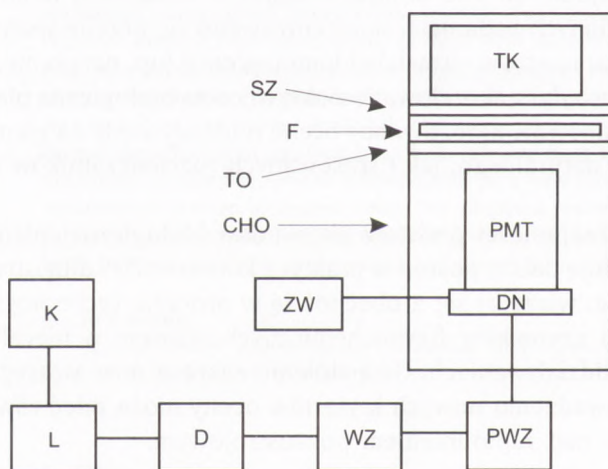


## 2. Pomiar ultrasłabej luminescencji

Do pomiarów ultrasłabej luminescencji (USL), ze względu na jej bardzo niskie natężenie, zastosowano metodę zliczania pojedynczych fotonów (SPCM, *Single Photon Counting Method*). Zasadniczymi częściami układu pomiarowego (rys. 1) są:

- światłoszczelna, termostatowana komora, w której umieszcza się badany materiał, oraz
- chłodzony fotopowielacz odizolowany od komory termoizolującym, próżniowym oknem kwarcowym.

Fotopowielacz dokonuje przetworzenia strumienia emitowanych przez próbkę i padających na fotokatodę fotonów na ciąg impulsów elektrycznych. Impulsy te wzmacniane są w szerokopasmowym przedwzmacniaczu i wzmacniaczu impulsowym. Chłodzenie fotopowielacza redukuje jego szumy własne, tzw. prąd ciemny. Impulsy ze wzmacniacza transmitowane są do dyskryminatora, gdzie następuje odseparowanie szumu i impulsów o amplitudach mniejszych lub większych od amplitudy impulsów indukowanych fotonami padającymi na fotokatodę fotopowielacza. Po przejściu przez dyskryminator impulsy zliczane są w połączonym z komputerem przeliczniku. Liczba zarejestrowanych impulsów zawiera zatem informację o liczbie fotonów emitowanych przez badaną próbkę. Światłoszczelna zasuwa umożliwia zmianę próbki w komorze. Filtry optyczne umieszczone pomiędzy badaną próbką a fotopowielaczem pozwalają na wyznaczenie rozkładu spektralnego luminescencji.



Rys. 1. Schemat blokowy układu pomiarowego. TK – termostatowa komora pomiarowa, SZ – światłoszczelna zasuwa, TO – termoizolujące okno, PMT – fotopowielacz (FEU38 lub EMI9558), DN – dzielnik napięcia, ZW – zasilacz wysokiego napięcia, CHO – chłodzona obudowa fotopowielacza, PWZ – przedwzmacniacz, WZ – wzmacniacz, D – dyskryminator, L – licznik, K – komputer, F – filtr typu *cutt-off*.

### 3. Pomiar rozkładu spektralnego emisji fotonowej

Do wyznaczania rozkładu spektralnego ultrasłabej luminescencji, czyli zależności natężenia emisji (I) od długości fali, zastosowano metodę filtrów granicznych. W metodzie tej używa się zestawu optycznych filtrów granicznych, które umieszcza się kolejno między badaną próbką a fotopowielaczem (rys. 1). Filtry te charakteryzują się ostrą granicą przejścia z obszaru o wysokiej transmisji do obszaru absorpcji padającego promieniowania. Pomiar rozkładu spektralnego polega na określeniu różnicy w natężeniu emisji w obszarach transmisji dwóch kolejnych filtrów. Różnica ta obliczana jest z uwzględnieniem spektralnych charakterystyk transmisji dla zastosowanych filtrów granicznych oraz charakterystyki spektralnej fotopowielacza.

### 4. Przygotowanie nasienia do badań emisji fotonowej z plemników

Emisja z plemników może być obserwowana po oddzieleniu ich od składników plazmy, która zawiera przeciwutleniacze, związki chelatujące i redukujące oraz enzymy i aminokwasy (27,28). Wiele z tych związków wykazuje działanie polegające na „zmiataniu” reaktywnych form tlenu i innych rodników oraz wiązaniu (chelataowaniu) jonów metali przejściowych i ciężkich, inicjujących reakcje oksydoredukcyjne. W celu prawidłowego przeprowadzenia pomiarów emisji niezbędne było zatem posłużenie się zawiesiną plemników wolną od składników osocza nasienia względnie użytych do jego konserwacji rozcieńczalników (29).

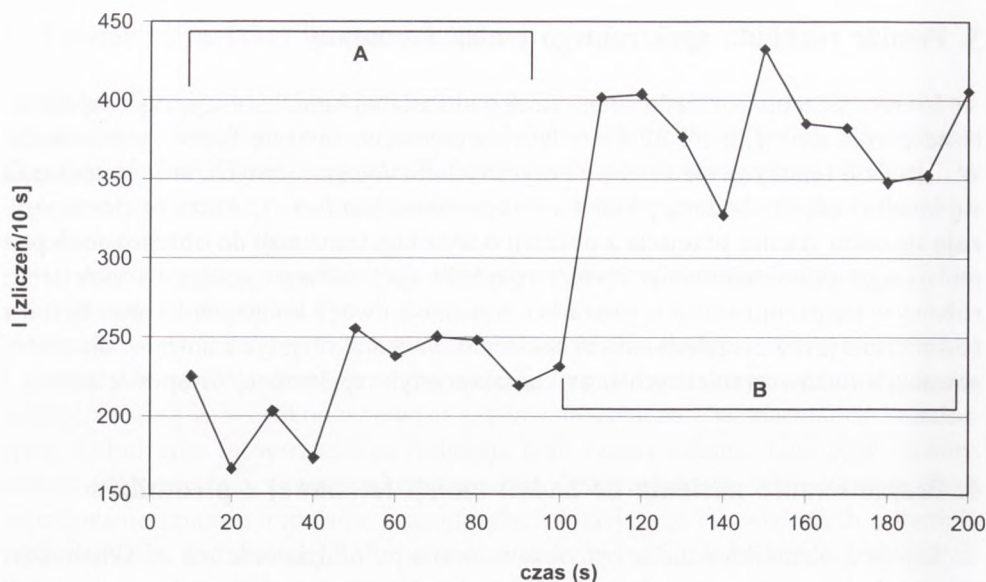
Próbki plemników świeżych lub rozmrożonych wstawiano do łaźni wodnej i inkubowano w temperaturze 44°C dla plemników buhaja oraz 40°C dla plemników tryka i knura. W określonych odstępach czasu pobierano próbki nasienia do badań.

### 5. Kinetyki indukowanej ultrasłabej luminescencji

Pomiary emisji fotonowej przeprowadzano poprzez rejestrację liczby impulsów w przedziałach czasu równych 10 s (4, 29-31). Przed każdym pomiarem określano tło fotopowielacza, tzn. liczbę zliczeń na jednostkę czasu przy zamkniętej światłoszczelnej zasuwie. Po otwarciu przesłony mierzona była emisja spontaniczna (100 s), emisja indukowana dodaniem do próbki układu askorbinian + Fe(II) (1000 s), a następnie dodaniem jonów Fe(II) (700 s). Końcowe stężenia askorbinianu i żelaza wynosiły odpowiednio 0,22 mM oraz 0,045 mM po dodaniu układu askorbinian + Fe(II) i 0,17 mM oraz 0,96 mM po dodaniu jonów Fe(II) (w postaci roztworu  $\text{FeSO}_4$ ). Przed zakończeniem pomiaru tło mierzone było powtórnie przy zamkniętej przesłonie. W trakcie pomiaru próbka była mieszana tlenem przepływającym ze stałą prędkością 5 l/h.

W przeprowadzonych pomiarach wykazano, że natężenie spontanicznej emisji fotonowej z zawiesiny plemników buhaja inkubowanych w 0,9% roztworze NaCl



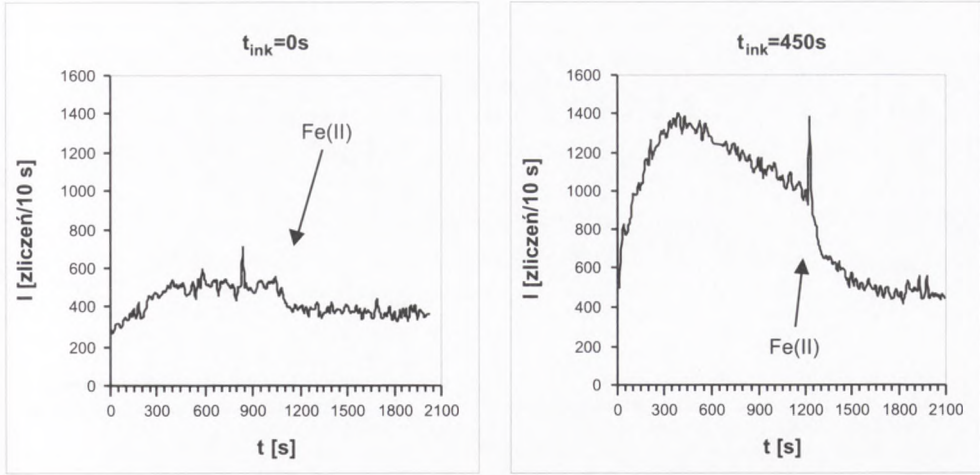


Rys. 2. Przykład ultrasłabej luminescencji ze świeżych plemników buhaja po czterech godzinach inkubacji. A – tzw. prąd ciemny fotopowielacza (tło), B – emisja spontaniczna.

w warunkach tlenowych wynosi około  $10^{-4}$ - $10^{-3}$  fotonów/(s×komórka), średnio około 20% ponad tło fotopowielacza (rys. 2).

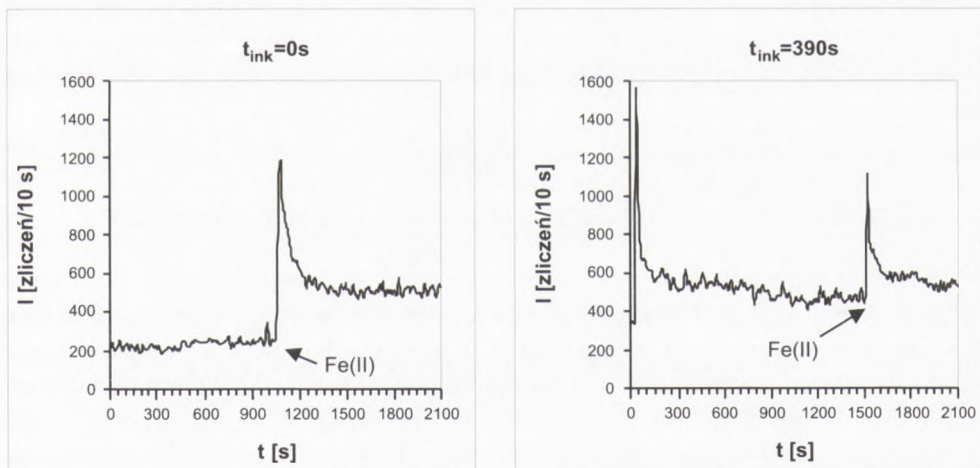
Dodatek jonów żelaza do zawiesiny plemników indukuje stosunkowo silną luminescencję. W przeprowadzonych pomiarach na plemnikach poddanych inkubacji w temperaturze wyższej niż fizjologiczna (stres termiczny) wykazano, że wraz ze wzrostem czasu inkubacji obserwujemy wzrost intensywności ultrasłabej luminescencji indukowanej dodaniem układu askorbinian + Fe(II) lub jonów Fe(II). Na rysunkach 3-5 przedstawiono przykłady krzywych kinetycznych ultrasłabej luminescencji indukowanej dla świeżych plemników buhaja, tryka i knura przed inkubacją oraz po różnych czasach inkubacji. Dodanie układu askorbinian + Fe(II) nastąpiło w czasie  $t = 0$  s, a dodanie jonów Fe(II) (na rysunku 3 zaznaczone jest strzałką) po czasie około 1000 s.

Dla świeżych plemników buhaja po dodaniu układu askorbinian + Fe(II) obserwujemy stopniowe narastanie emisji fotonowej, a po dodaniu jonów Fe(II) gwałtowny spadek jej natężenia (rys. 3). Kształt krzywej kinetycznej zależy od czasu inkubacji. Przed rozpoczęciem inkubacji ani wzrost, ani spadek natężenia emisji nie są tak znaczące. Wraz z wydłużeniem czasu inkubacji obserwujemy wzrost natężenia emisji po dodaniu układu askorbinian + Fe(II), oraz coraz wyraźniejsze maksimum w tej części kinetyki ultrasłabej luminescencji. We wszystkich przypadkach po dodaniu jonów Fe(II) obserwujemy spadek natężenia emisji. Końcowe natężenia emisji osiągają porównywalne wartości bez względu na czas trwania inkubacji.



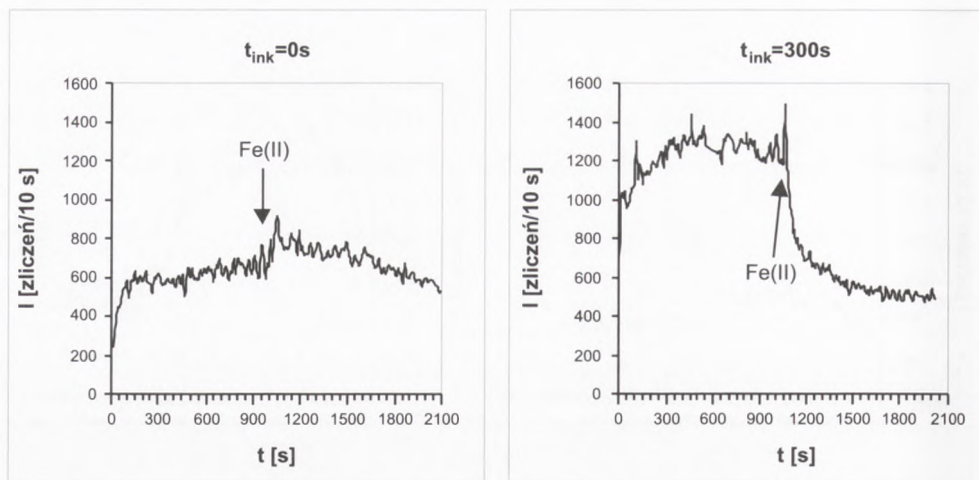
Rys. 3. Kinetyki USL indukowanej układem askorbinian + Fe(II) i Fe(II) świeżych plemników buhaja po różnych czasach inkubacji  $t_{ink}$ .

W przypadku indukowanej ultrasłabej luminescencji świeżych plemników tryka, po dodaniu układu askorbinian + Fe(II) nie obserwujemy znaczących zmian w natężeniu emisji, chociaż jej poziom wzrasta wraz ze wzrostem czasu inkubacji (rys. 4). Po dodaniu jonów Fe(II) następuje gwałtowny wzrost emisji, która osiąga wartość maksymalną po czasie około 30-40 sekund, a następnie gwałtownie spada osiągając wartość końcową wyższą niż przed dodaniem jonów Fe(II).



Rys. 4. Kinetyki USL indukowanej układem askorbinian + Fe(II) i Fe(II) świeżych plemników tryka po różnych czasach inkubacji  $t_{ink}$ .





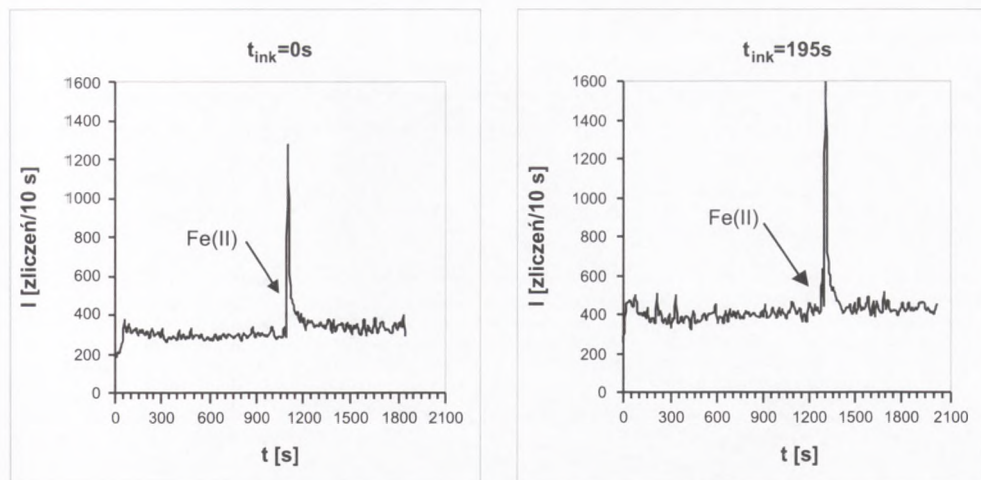
Rys. 5. Kinetyki USL indukowanej układem askorbinian + Fe(II) i Fe(II) świeżych plemników knura po różnych czasach inkubacji  $t_{\text{ink}}$ .

Kinetyki indukowanej ultrasłabej luminescencji świeżych plemników knura przedstawione są na rysunku 5. Przed rozpoczęciem inkubacji  $t_{\text{ink}} = 0$  zmiany w kształcie kinetyk wywołane czynnikami indukującymi luminescencję nie są wyraźne. Dla plemników inkubowanych obserwujemy stopniowe narastanie emisji po dodaniu układu askorbinian + Fe(II), jednak bez zaznaczonego wyraźnego maksimum. Po dodaniu jonów Fe(II) następuje spadek natężenia emisji do poziomu niezależnego od czasu inkubacji.

W przeprowadzonych badaniach parametrów USL z plemników buhaja poddanych stresowi oksydacyjnemu z zastosowaniem sond chemiluminescencyjnych (luminol, izoluminol, lucygenina) wykazano brak wzmocnienia USL plemników przez wymienione związki.

## 6. Wpływ kriokonserwacji na ultrasłabą luminescencję plemników

Proces kriokonserwacji wpływa na kształt krzywych kinetycznych (29,32). Wpływ ten pokazany jest na przykładzie emisji z kriokonserwowanych plemników buhaja (rys. 6). Dodanie układu askorbinian + Fe(II) nie wywołuje tak dużego jak w przypadku natywnych plemników wzrostu natężenia luminescencji. Dopiero dodanie jonów Fe(II), oprócz charakterystycznego „piku”, powoduje wzrost natężenia emisji. Wartości emisji po dodaniu Fe(II) są większe niż po dodaniu układu askorbinian + Fe(II), odwrotnie niż dla świeżych plemników. Decydującą rolę w zasadniczej zmianie kinetyki ma dodanie glicerolu do rozcieńczalnika. Kinetyki emisji z plemni-



Rys. 6. Kinetyki USL indukowanej układem askorbinian + Fe(II) i Fe(II) kriokonserwowanych plemników buhaja po różnych czasach inkubacji  $t_{ink}$ .

ków po przejściu pełnej ekwilibracji z glicerolem, ale jeszcze nie zamrażanych, są podobne do kinetyk luminescencji plemników kriokonserwowanych.

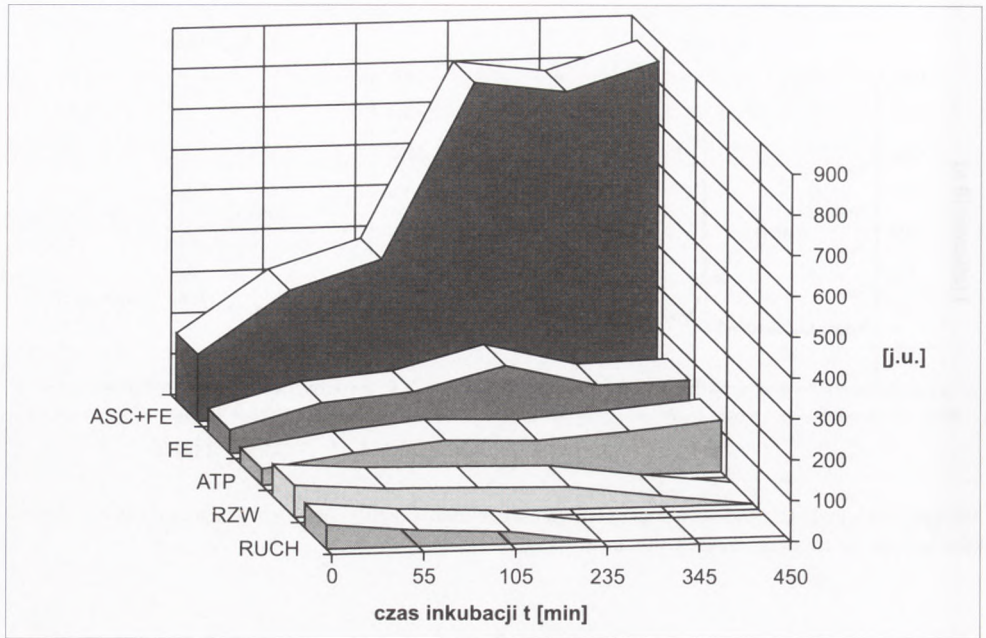
## 7. Zależność pomiędzy parametrami USL a wskaźnikami fizjologicznymi

Biologiczna analiza nasienia obejmowała mikroskopową ocenę koncentracji i ruchliwości plemników, próbę różnicową z eozyną-nigrozyną do wyznaczenia wskaźnika RZW (receptorowa zdolność wiązania specyficznych barwników błonowych wg Bloma), dawniej określaną jako test żywe-martwe oraz oznaczanie poziomu ATP w plemnikach spektrofotometryczną, enzymatyczną metodą Adama (33).

Stwierdzono istnienie zależności pomiędzy wskaźnikami stanu fizjologicznego plemników a natężeniem ultrasłabej luminescencji dla natywnych i kriokonserwowanych plemników buhaja (4,5,29,31). Zestawienie wartości parametrów fizjologicznych i biologicznych oraz wartości emisji całkowitych dla różnych czasów inkubacji natywnych plemników buhaja przedstawiono na rysunku 7.

W przeprowadzonej analizie zależności pomiędzy mierzonymi parametrami fizjologicznymi a parametrami emisji fotonowej wykazano istnienie ujemnej korelacji liniowej między wskaźnikiem RZW a całkowitym natężeniem emisji fotonowej po dodaniu układu askorbinian + Fe(II) w przypadku świeżego nasienia buhaja, tryka i knura. Obliczone współczynniki korelacji liniowej Pearsona  $r$  wynoszą dla świeżego nasienia buhaja, tryka i knura odpowiednio -0,82, -0,93 i -0,95 (29).

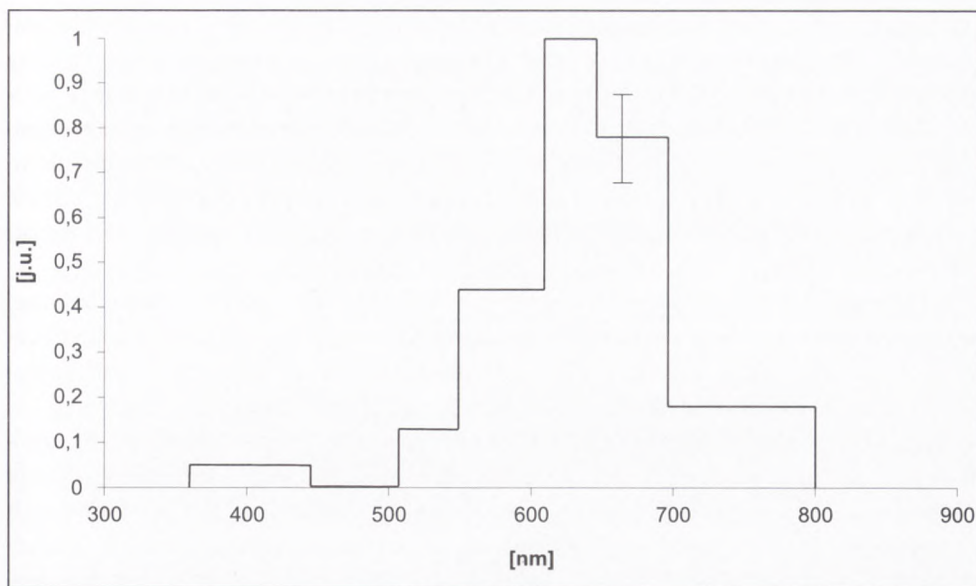




Rys. 7. Zależność USL oraz mierzonych parametrów fizjologicznych od czasu inkubacji dla świeżych plemników buhaja. RUCH – ruchliwość komórek; RZW – wskaźnik receptorowej zdolności wiązania; ATP – zawartość ATP; FE – emisja całkowita po dodaniu jonów Fe(II); ASC+FE – emisja całkowita po dodaniu układu askorbinian + Fe(II).

## 8. Rozkłady spektralne ultrasłabej luminescencji plemników

W wykonanych pomiarach rozkładów spektralnych ultrasłabej luminescencji plemników (31,34,35) wykazano występowanie głównego maksimum w obszarze czerwieni tzn. w zakresie 600-820 nm (rys. 8). Wszystkie rozkłady spektralne ultrasłabej luminescencji indukowanej układem askorbinian + Fe(II) i Fe(II), w granicach niepewności pomiarowych, są jednakowe dla plemników trzech badanych gatunków zwierząt. Proces kriokonserwacji nie ma statystycznie istotnego wpływu na rozkłady spektralne indukowanej ultrasłabej luminescencji plemników buhaja i tryka (34).



Rys. 8. Przykład rozkładu spektralnego ultrasłabej luminescencji z plemników buhaja po dodaniu układu Fe(II)-kwas askorbinowy; na wykresie zaznaczono niepewność maksymalną.

## 9. Podsumowanie

W normalnych warunkach fizjologicznych plemniki wykazują ekstremalnie słabą emisję fotonową. Stosunek rejestrowanego sygnału do szumu aparaturowego mieści się w przedziale 1-2. Pomiary w takich warunkach są bardzo trudne, co nie pozwala, na obecnym etapie, na zastosowanie spontanicznej ultrasłabej luminescencji do oceny jakości nasienia zwierząt użytkowych. Jako narzędzie do badania aktywności biologicznej (stanu fizjologicznego) plemników może służyć luminescencja indukowana.

Dodanie do zawiesiny inkubowanych komórek jonów żelaza inicjuje procesy peroksydacji, a następnie rozkład zakumulowanych w ich wyniku hydronadtlenków i nadtlenków lipidów. W łańcuchowych reakcjach rodnikowych powstają elektronowo wzbudzone cząsteczki aldehydów, ketonów i kwasów karboksylowych oraz cząsteczkowy tlen singletowy lub jego wzbudzone dimole. Ulegając radiacyjnej dezaktywacji emitują one fotony rejestrowane jako ultrasłaba luminescencja. Zmienione działaniem czynników stresowych natury środowiskowej i technologicznej błony plemników ulegają peroksydacji indukowanej układem askorbinian + Fe(II) i Fe(III), tym intensywniejszej, im silniejsze było oddziaływanie stresu. Otrzymane wyniki jednoznacznie dowodzą, że działanie stresu środowiskowego znajduje wyraźne odzwierciedlenie w parametrach USL. Kinetykę i intensywność indukowanej peroksydacji lipidów można obserwować na podstawie rejestracji zmian natężenia ultrasłabej luminescencji.



Kształt krzywych kinetycznych ultrasłabej luminescencji jest różny dla plemników różnych gatunków zwierząt i charakterystyczny dla danego gatunku. Procesy technologiczne, jakimi są poszczególne etapy kriokonserwacji, w zasadniczy sposób wpływają na zmianę kształtu kinetyki, co zostało zbadane w przypadku plemników buhaja. Częściowa penetracja lecytyny żółtka jaja oraz glicerolu w błony plemników zachodząca podczas procesu ekwilibracji nasienia prawdopodobnie chroni błony przed procesami peroksydacyjnymi i zmniejsza bezwzględne wartości emisji całkowitych.

W wyznaczonych rozkładach spektralnych wskazuje się, że w przypadku badanej ultrasłabej luminescencji źródłem emisji są, zlokalizowane w błonach plazmatycznych, procesy dezaktywacji promienistej tlenu singletowego i związków karbonylowych, produktów peroksydacji lipidów powstających w stanie wzbudzonym.

Brak wzmocnienia USL plemników badanych zwierząt gospodarskich przez luminol i jego pochodne sugeruje, że produkty peroksydacji lipidów są silnie związane z błoną komórkową plemników i nie dostają się do środowiska lub też błona tych komórek jest nieprzenikliwa dla zastosowanych związków luminogennych. Zagadnienie przenikalności nadtlenu organicznych,  $H_2O_2$  oraz sond chemiluminescencyjnych przez błony plemników nieuszkodzonych i zaburzonych działaniem stresu oksydacyjno-termicznego może wiązać się z różnicami gatunkowymi i/lub procesami kontrolującymi otwieranie kanałów jonowych i cząsteczkowych błon plemników. Plazmolema plemników badanych zwierząt, jak się zdaje, jest znacznie bardziej sztywne, a więc mniej przenikliwe dla reaktywnych form tlenu generowanych w komórce niż w przypadku plemników ludzkich.

Plemniki poddane działaniu stresu termicznego i oksydacyjnego w wyniku inkubacji w podwyższonej temperaturze szybko tracą ruchliwość. Nie jest to związane z brakiem energii, gdyż zawartość ATP w plemnikach rośnie ze wzrostem czasu inkubacji (rys. 7). Równocześnie spada wartość wskaźnika RZW. Oznacza to, że utrata zdolności ruchu związana jest z uszkodzeniami peroksydacyjnymi błon plemników. Proces ten jest ściśle powiązany ze zmianami emisji całkowitej i kształtu kinetyki ultrasłabej luminescencji. W przypadku plemników ze świeżego nasienia buhaja, tryka i knura zaobserwowano bardzo wysokie korelacje liniowe między całkowitą emisją a wartościami wskaźników fizjologicznych. Korelacje między parametrami luminescencji a intensywnością działającego stresu występują również dla nasienia buhaja poddanego poszczególnym etapom procesu kriokonserwacji. Nie są one jednak tak wysokie jak dla plemników z nasienia świeżego.

Podsumowując można stwierdzić, że luminescencja indukowana może służyć jako narzędzie do badania aktywności biologicznej (stanu fizjologicznego) plemników oraz, iż pomiar USL pozwala śledzić dynamiczne zmiany zachodzące w komórkach plemnikowych związane z procesami degradacji, a co za tym idzie, pogarszaniem się jakości nasienia. Korelacje parametrów USL indukowanej układem askorbinian + Fe(II) ze wskaźnikami biologicznymi, fizjologicznymi i biochemicznymi plemników mogą być wykorzystane do celów diagnostycznych.



## Literatura

1. Laszczka A., Godlewski M., Gumińska M., Kwiecińska T., Rajfur Z., Sławiński J., Szczeniak-Fabiańczyk B., Wierzychowska D., (1995), *Biul. Inf. IZ*, 33(2), 71.
2. Godlewski M., Kwiecińska T., Laszczka A., Rajfur Z., Sławiński J., Szczeniak-Fabiańczyk B., Wierzychowska D., (1997), *Curr. Topics Biophys.*, 21(1), 96-101.
3. Godlewski M., Kwiecińska T., Laszczka A., Sławiński J., Szczeniak-Fabiańczyk B., Wierzychowska D., (2000), *Acta Biol. Crac.*, 42, 79-86.
4. Godlewski M., Kwiecińska T., Wierzychowska D., Sławiński J., Laszczka A., Szczeniak-Fabiańczyk B., (2000), *Biophotonic and Coherent Systems*, Eds. L. Belusov, F. A. Popp, V. Voeikov, R. van Vijk, 281-288, Moscow Univ. Press.
5. Gumińska M., Kędryna T., Laszczka A., Godlewski M., Sławiński J., Szczeniak-Fabiańczyk B., Kwiecińska T., Rajfur Z., Wierzychowska D., (1997), *Acta Biochim. Polon.*, 44(1), 131-138.
6. Sławiński J., (1966), *Post. Bioch.*, 191-216.
7. Popp F. A., (1980), *Bio-Photon-Physic*, 6-19 (mit deutscher Fassung) Gesamtherstellung: BIOMED-Verlag GmbH, Wachtberg.
8. Wierciński J., (1980), *Med. Wet.*, 36 (12), 751-755.
9. Sławińska D., Sławiński J., (1983), *Photochem. Photobiol.*, 37 (6), 709-715.
10. Sławiński J., (1987), *Zagadnienia biofizyki współczesnej*, 12, 163-180.
11. Guenther K., (1988), *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 41 (10), 391-397.
12. Sławiński J., (1989), *Biospektroskopia* (pod red. J. Twardowskiego), 3, 107-214, PWN, Warszawa.
13. Godlewski M., Kwiecińska T., Wierzychowska D., Rajfur Z., Laszczka A., Szczeniak-Fabiańczyk B., Sławiński J., Gumińska M., Kędryna T., (1997), *Bioluminescence and Chemiluminescence – Molecular Reporting with Photons*, Eds. J. W. Hastings, L. J. Kricka, P. E. Stanley, J. Wiley and Sons, Ltd., 357-360, Chichester-New York-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto.
14. Sławiński J., Ezzahir A., Godlewski M., Kwiecińska T., Rajfur Z., Sitko D., Wierzychowska D., (1992), *Experientia*, 48, 1041-1058.
15. Godlewski M., Kwiecińska T., Rajfur Z., Sitko D., Sławiński J., Wierzychowska D., Laszczka A., Szczeniak-Fabiańczyk B., (1994), III Międz. Symp. Polskiej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN, Molekularne i Fizjologiczne Aspekty Regulacji Ustrojowej, Kraków, 84-90.
16. Sławiński J., Grabikowski E., Murkowski A., (1971), *Zesz. Nauk. WSR w Szczecinie*, 37, 301-317.
17. Mazurczak J., Owczarczyk B., Kostrzyński S., Russak G., (1978), *Med. Wet.*, 34 (10), 609-614.
18. Owczarczyk B., Mazurczak J., Russak G., (1978), *Med. Wet.*, 34 (9), 519-522.
19. Owczarczyk B., (1980), *Med. Wet.*, 36 (5), 292-295.
20. Salin M., Bridges S., (1981), *Plant Physiol.*, 67, 43.
21. Sławiński J., (1984), *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 271, 85-104.
22. Rothschild L., (1961), *The cell and the organism*, Eds. Ramsay J. A., Wigglesworth V. B., University Press, Cambridge.
23. Rikmenspoel R., (1965), *Biophys. Jour.*, 5, 365.
24. Rikmenspoel R., Sinton S., Janick J. J., (1969), *J. Gen. Physiol.*, 54, 782.
25. Rikmenspoel R., (1996), *J. Reprod. Fert.*, 12, 437.
26. Hiramoto Y., Baba S. A., (1978), *J. Exp. Biol.*, 76, 85.
27. Mann T., Lutwak-Mann C., (1991), *Male Reproduction Function and Semen*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
28. Strzeżek J., (1987), *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 340, 9-40.
29. Wierzychowska D., (1998), *Zależność między emisją fotonową a reakcją na stres środowiskowy i technologiczny plemników zwierząt gospodarskich* – praca doktorska, WSP, Kraków.
30. Rajfur Z., Godlewski M., Gumińska M., Kwiecińska T., Laszczka A., Sławiński J., Szczeniak-Fabiańczyk B., Wierzychowska D., (1995), IV Międz. Symp. Polskiej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN, Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej, Kraków, 272.
31. Sławiński J., Godlewski M., Gumińska M., Kędryna T., Kwiecińska T., Laszczka A., Szczeniak-Fabiańczyk B., Wierzychowska D., (1998), *Curr. Topics Biophys.*, 22, 195-203.



32. Godlewski M., Rajfur Z., Gumińska M., Kwiecińska T., Laszczka A., Sławiński J., Szczęśniak-Fabiańczyk B., Wierzuchowska D., (1995), IV Międz. Symp. Polskiej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN, Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej, Kraków, 108.
33. Adam H., (1965), *Methods of Enzymatic Analysis*, Ed. Bergmayer H.U., Verlag Chemie, 539-543, Academic Press, New York, London.
34. Godlewski M., Kwiecińska T., Laszczka A., Sławiński J., Szczęśniak-Fabiańczyk B., Wierzuchowska D., (1997), VI Międz. Symp. Polskiej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN, Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej, Kraków, 131-133.
35. Sławiński J., Godlewski M., Kwiecińska T., Wierzuchowska D., Laszczka A., Szczęśniak-Fabiańczyk B., (1997), *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 35(9), A118.