

Η ακροσωμική αντίδραση και η εργαστηριακή της διερεύνηση

Θ. Ζεγκενιάδου¹, Η. Μπίλη², Ι. Παπαδήμας², Σ. Μανταλενάκης².

1. Ανδρολογικό Εργαστήριο, Γενική Κλινική "Γαλινός", Θεσσαλονίκη

2. Μονάδα Ενδοκρινολογίας της Αναπαραγωγής, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Περιληψη. Είναι γνωστό από παλιά ότι, για να διεισδύσει το σπερματοζωάριο στο εσωτερικό του ωαρίου και να προκαλέσει την γονιμοποίησή του, είναι απαραίτητη η ακροσωμική αντίδραση. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την εργαστηριακή διερεύνηση της ακροσωμικής αντίδρασης, από τις οποίες η προκλητή ακροσωματική αντίδραση (Acrosome Reaction after Lonophore Challenge, ARIC) δίνει τις πιο χρήσιμες πληροφορίες. Στη μέθοδο ARIC τα σπερματοζωάρια επωάζονται αρχικά με ιουνοφόρο και κατόπιν ακολουθεί χρώση τους με φθορώντας χρωστικές. Με αυτό τον τρόπο ξεχωρίζουν τα σπερματοζωάρια, τα οποία ολοκλήρωσαν την ακροσωμική αντίδραση μετά την πρόκληση από τα σπερματοζωάρια που υπέστησαν την αντίδραση αυτόματα. Το αποτέλεσμα του ARIC μπορεί να εξηγήσει το χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης των ωαρίων ορισμένων δειγμάτων στην εξωσωματική γονιμοποίηση και επίσης να καθορίσει τη θεραπευτική αντιμετώπιση ορισμένων προβλημάτων.

Λέξεις ευρετηριασμού: ακροσωμική αντίδραση, σπερματοζωάρια, ανδρική υπογονιμότητα.

Abstract. T. Zeginiadou¹, H. Bili², J. Papadimas², S. Mantalenakis². Methods for the detection of the acrosome reaction. 1) Andrology Laboratory, "Galinos" General Clinic, Thessaloniki. 2) Special Unit for Reproductive Endocrinology, First Obstetrics and Gynaecology Clinic, Aristotle University of Thessaloniki, Greece. Adol Gynec Reprod Menop 2000, 12(3): 204-208.

The present review article deals with the methods the detection of the acrosome reaction. The most widely used methods use optical microscopy, of where spermatozoa are stained for the visualization of their acrosomal status. The Acrosome Reaction after Lonophore Challenge (ARIC) can separate spermatozoa that undergo spontaneous acrosome reaction from those that are induced, making the result more meaningful. Many different stimuli have been used so far for the induction of the acrosome reaction with different results. The ARIC test can provide information on the fertilizing ability of a semen sample, evaluate the outcome of in vitro fertilization and study the effect of freezing and thawing of a semen sample in liquid nitrogen. Therapeutic decisions can also be made based on the value of the ARIC test.

Key words: Acrosome reaction, spermatozoa, male infertility

Εισαγωγή

Τα σπερματογωάρια του ανθρώπου κατά τον σχηματισμό τους στα σπερματικά σωληνάρια δεν εμφανίζουν κινητικότητα και γονιμοποιητική ικανότητα. Για τον σκοπό αυτό μεταφέρονται στις επιδιδυμίδες, όπου υφίστανται μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές μεταβολές, το σύνολο των οποίων ονομάζεται ωρήμαση των σπερματογωαρίων (1). Άλλα και μετά την ολοκλήρωση της ωρήμασης των σπερματογωαρίων στις επιδιδυμίδες είναι απαραίτητα και άλλα θήματα προετοιμασίας των σπερματογωαρίων για τη γονιμοποίηση. Τα θήματα αυτά είναι η ενεργοποίηση των σπερματογωαρίων και η ακροσωμική αντίδραση, η οποία επισυμβάίνει όταν τα σπερματογωάρια πλησιάζουν ή έρχονται σε επαφή με τον ακτινωτό στέφανο και τη διαφανή ζώνη που περιβάλλουν το ωάριο. Τα θήματα αυτά αποτελούν επίσης απαραίτητα στάδια φυσιολογικών μεταβολών στα σπερματογωάρια που αποκτούν πλέον την ικανότητα να γονιμοποιήσουν το ωάριο και αναφέρονται ως θήματα πριν από τη γονιμοποίηση (2).

Η ακροσωμική αντίδραση, η οποία γίνεται αμέσως μετά τη σύνδεση της κεφαλής του σπερματογωαρίου με την επιφάνεια της διαφανούς ζώνης, οδηγεί στην απελευθέρωση των ενζύμων του ακροσώματος και τη δημιουργία διόδου διά μέσου της διαφανούς ζώνης, ώστε ένα από τα σπερματογωάρια να διεισδύσει μέσα στο ωάριο και να προκαλέσει τελικά τη γονιμότητα του (3). Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν πολλές εργαστηριακές μέθοδοι που έχουν ως στόχο την διερεύνηση της ικανότητας των σπερματογωαρίων για επίτευξη ακροσωμικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα των μεθόδων αυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν μαζί με άλλες παραμέτρους στην εκτίμηση της γονιμοποιητικής ικανότητας ενός δείγματος σπέρματος. Με την ανασκόπηση αυτή επικειρείται μια συνοπτική περιγραφή των νεοτέρων μεθόδων της εργαστηριακής διερεύνησης της ακροσωμικής αντίδρασης.

Ενεργοποίηση και ακροσωμική αντίδραση

Η ενεργοποίηση των σπερματογωαρίων περιλαμβάνει απαραίτητρες μεταβολές που θα δώσουν στο σπερματογωαρίο τη δυνατότητα να γονιμοποιήσει το ωάριο. Οι μεταβολές αυτές συμπεριλαμβάνουν βιοχημικά φαίνομενα, όπως α) αναδιάρθρωση αντιγόνων επιφανείας του σπερματογωαρίου που αυξάνουν την ρευστότητα της μεμβράνης (4), β) μεταβολές στην αναλογία κολποστερόλης / φωσφολιπιδίων λόγω δέσμευσης της κολποστερόλης από μόρια δέσμευσης, όπως η αλβουμίνη (5, 6) και

γ) φωσφορυλίδωση των πρωτεΐνων, που συμβαίνει τόσο στη φάση της ενεργοποίησης, όσο και στη φάση της ακροσωμικής αντίδρασης (7, 8, 9).

Η ολοκλήρωση της ενεργοποίησης γίνεται στην τραχυλική ζλέννα και κατά την πορεία των σπερματογωαρίων προς τις σάλπιγγες. Ακολουθεί σύνδεση των σπερματογωαρίων με τη διαφανή ζώνη διά μέσου της πρωτεΐνης Z της διαφανούς ζώνης (ZP 3), όπως δείχνουν τα δεδομένα που προέρχονται από έρευνες σε γαμέτες ποντικών (10). Στη συνέχεια το πρώτο σπερματοζωάριο διαπερνά τη διαφανή ζώνη μέσω της διόδου που δημιουργείται από την εξωκύτωση των υδρολυτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια της ακροσωμικής αντίδρασης. Ανάμεσα στα έννυμα που απελευθερώνονται βρίσκεται η ακροσίνη και η υαλουρονιδάση που παρουσιάζουν δράση θρυψίνης, δεδομένου ότι μετά από επεξεργασία του σπέρματος με τον αναστολέα της θρυψίνης από σάγια παρεμποδίζεται η διείσδυση των σπερματογωαρίων στη διαφανή ζώνη (11, 12).

Η σειρά των γεγονότων κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης μπορεί να είναι διαφορετική, όπως υποστηρίχθηκε από τον Aitken (13). Είσι μπορεί πρώτα να γίνεται η ακροσωμική αντίδραση και κατόπιν να ακολουθεί η σύνδεση του σπερματογωαρίου με τη διαφανή ζώνη του ωαρίου. Υπέρ της άποψης αυτής είναι η παρατήρηση ότι μεγάλος αριθμός σπερματογωαρίων συνδεδεμένων με τη διαφανή ζώνη έχουν ήδη ολοκληρώσει την αντίδραση ακροσώματος (13). Ακολουθεί η συγχώνευση του σπερματογωαρίου με την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου μέσω του τμήματος του ισημερινού (3) και η απελευθέρωση της ακροσίνης φαίνεται να επηρεάζει αυτή τη συγχώνευση (14, 15). Ως αποτέλεσμα το γενετικό υλικό του σπερματογωαρίου βρίσκεται στο εσωτερικό του ωαρίου και σχηματίζεται ο άρρην προπυρήνας.

Μέθοδοι ανίκνευσης της ακροσωμικής αντίδρασης

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν πολλές μέθοδοι που μπορούν να ανικνεύσουν τα σπερματογωάρια που έχουν ολοκληρώσει την ακροσωμική αντίδραση και να τα διαχωρίσουν από αυτά που είναι ακέραια. Όλες οι μέθοδοι βασίζονται στη διαφορετική εικόνα που παρουσιάζουν τα σπερματογωάρια στο μικροσκόπιο μετά από χρώση· οι πλέον διαδεδομένες περιγράφονται στη συνέχεια.

1. Μέθοδος με πλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η μέθοδος με πλεκτρονικό μικροσκόπιο αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο για την ανίκνευση σπερματοζω-

αρίων που έχουν ολοκληρώσει την ακροσωμιακή αντίδραση. Όλες οι καινούργιες μέθοδοι που αναπτύσσονται για τον προσδιορισμό της ακροσωμικής αντίδρασης συγκρίνονται για αξιολόγηση με την πλεκτρονική μικροσκοπία (16, 17). Το κόστος όμως του πλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι πολύ ψηλός και για τη χρήση του απαιτείται ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό. Είτε η μέθοδος αυτή περιορίζεται σε ερευνητικούς σκοπούς.

2. Μέθοδος με οπικό μικροσκόπιο

Οι Talbot και Chacon ήσαν οι πρώτοι ερευνητές που προσδιόρισαν την ακροσωμική αντίδραση με τη χρήση του οπικού μικροσκοπίου (18, 19), χρησιμοποιώντας την τριπλή χρώση με συνδυασμό των χρωστικών κυανού του τρυπανίου (Trypan blue), καφέ του Βίσμαρκ (Bismarck brown) και ροζ της Βεγγάλης (Rose Bengal). Αργότερα αναπτύχθηκαν και άλλες μέθοδοι με τη χρήση διαφορετικών χρωστικών, όπως ο νιτρικός άργυρος (20) και το κυανούν της κουμάστης (Coomassie blue) (21). Όλες οι τεχνικές που χρησιμοποιούν το οπικό μικροσκόπιο για τον προσδιορισμό της ακροσωμικής αντίδρασης χρωματίζουν με διαφορετικό τρόπο τα τμήματα των σπερματοζωαρίων, επιτρέποντας έτσι την διαχωρισμό των σπερματοζωαρίων που έχουν ολοκληρώσει την ακροσωμική αντίδραση από αυτά που είναι ακόμη ακέραια και διαχωρίζοντας συγχρόνως τα γωντανά σπερματοζωάρια από τα νεκρά. Σε όλες αυτές τις μέθοδους η μεμβράνη του σπερματοζωαρίου γίνεται διαπερατή από τη χρωστική λόδγη των ιδιαίτερα δραστικών συνθηκών της μονιμοποίησης και χρώσης.

Τα αποτελέσματα από την εκτίμηση της ακροσωμικής αντίδρασης με τη χρήση του οπικού μικροσκοπίου συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα από τη χρήση του πλεκτρονικού-μικροσκοπίου (16, 21). Οι μέθοδοι του οπικού μικροσκοπίου είναι απλές στην εφαρμογή και έχουν χαμπλό κόστος, παρουσιάζουν όμως το μειονέκτημα ότι ο διαχωρισμός των σπερματοζωαρίων που έχουν υποστεί ακροσωμική αντίδραση από τα υπόλοιπα δεν είναι σε αρκετές περιπτώσεις σαφής.

3. Μέθοδος με μικροσκόπιο φθορισμού και χρήση λεκτινών ή αντισωμάτων

Όπως αναφέρθηκε, η εκτίμηση της ακροσωμικής αντίδρασης των σπερματοζωαρίων γίνεται μετά από χρώση τους με διόφορα ειδικά επιλεγμένα μόρια. Τα τελευταία χρόνια στη λίστα αυτή προστέθηκαν οι λεκτίνες και τα φθορίζοντα αντισώματα. Οι λεκτίνες που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι οι συγκολλητίνης από φυστικιά (22) ή οι συγκολλητίνης από μπιζέλια (Pea agglutinin) που συνδέεται με την εξωτερική μεμβράνη του ακροσωματος (23). Στα αντισώματα που δημιουργήθη-

καν για τη μελέτη της ακροσωμικής αντίδρασης συμπεριλαμβάνονται αντισπερματικά αντισώματα, αντιορός ακροσίνης, αντιορός έναντι της εξωτερικής ακροσωμικής μεμβράνης, καθώς και μονοκλωνικά αντισώματα (24, 25, 26).

Η εκτίμηση της ακροσωμικής αντίδρασης με τη χρήση φθορισμού αποτελεί μια πολύ διαδεδομένη μέθοδο. Σε μια πρόσφατη εργασία χρησιμοποιήθηκαν συγχρόνως δύο μόρια επισημασμένα με φθορισμό για την αναγνώριση των σπερματοζωαρίων που είχαν ολοκληρώσει την ακροσωμική αντίδραση (27). Η μέθοδος αυτή είναι πολύ αξιόπιστη δεδομένου ότι τα σπερματοζωάρια που έχουν υποστεί την ακροσωμική αντίδραση μπορούν να διαχωρισθούν με ακρίβεια από τα υπόλοιπα, έχει όμως αναφερθεί ότι τα ποσοστά μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το επισημασμένο με φθορισμό μόριο που χρησιμοποιήθηκε (28).

4. Μέθοδος με μικροσκόπιο φθορισμού και χρήση χλωροτετρακυκλίνης

Η ακροσωμική αντίδραση μπορεί να μελετηθεί και με τη χρήση χλωροτετρακυκλίνης (17). Η χλωροτετρακυκλίνη παράγει τρία ή τέσσερα διαφορετικά πρότυπα φθορισμού που αποκαλύπτουν την ακροσωμική κατάσταση, ο μηχανισμός όμως της δράσης της παραμένει άγνωστος. Η μέθοδος της χλωροτετρακυκλίνης χρησιμοποιείται περισσότερο για την προσδιορισμό της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων.

5. Μέθοδος με κυππαρομετρία ροΐς

Η κυππαρομετρία ροΐς μελετά σπερματοζωάρια που είναι επισημασμένα με φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα (26, 29, 30) ή συγκολλητίνες (31, 32). Ο κυππαρομετρητής ροΐς μπορεί σε ελάχιστο χρόνο να μετρήσει τον φθορισμό σε πολύ μεγάλο αριθμό κυπτάρων ενός δείγματος. Για αυτό το λόγο η κυππαρομετρία ροΐς αποτελεί μια μέθοδο με εξαιρετική ευαισθησία και ακρίβεια, η οποία δεν είναι τόσο επίπονη και χρονοβόρα, όσο το οπικό μικροσκόπιο. Το κόστος όμως της μεθόδου είναι πολύ ψηλός και έτσι δεν χρησιμοποιείται ευρέως παρά τα πλεονεκτήματά της.

6. Πρόκληση της αντίδρασης ακροσωματος με ιονοφόρο (Aric)

Οι μέθοδοι που αναφέρθηκαν μέχρι σπιγμής μπορούν να ξεχωρίσουν τα σπερματοζωάρια που έχουν ολοκληρώσει την ακροσωμική αντίδραση από αυτά που είναι άθικτα, προσδιορίζουν δηλαδή την αντόματη ακροσωμική αντίδραση. Σπερματοζωάρια που έχουν υποστεί πρόωρη ακροσωμιακή αντίδραση δεν μπορούν να εισέλθουν στο ωάριο (μόνο σπερματοζωάρια με άθικτο

ακρόσωμα μπορούν να διαπεράσουν τον ωφόρο δίσκο) και έτσι δεν μπορούν να συνδεθούν με τη διαφανή ζώνη για τη μετέπειτα γονιμοποίηση του ωφόρου. Το ποσοστό της αυτόματης ακροσωμικής αντίδρασης λοιπόν φαίνεται να έχει πολύ μικρή συσχέτιση με την δυνατότητα για γονιμοποίηση ενός δείγματος και θεωρείται ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό. Ο Tesarik έδωσε έμφαση στις κατάλληλες συνθήκες *in vitro* διερεύνησης της ακροσωμικής αντίδρασης και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η εργαστηριακή δοκιμασία της ακροσωμικής αντίδρασης έχει ουσιαστικό κλινικό ενδιαφέρον μόνο μετά από διαφοροποίηση της αυτόματης αντίδρασης ακροσώματος από την προκλητή (33).

Η πρόκληση της ακροσωμικής αντίδρασης με τη χρήση ιονοφόρου (aric) αποτελεί μια διαφορετική προσέγγιση στη μελέτη της ακροσωμικής αντίδρασης, λόγω της δυνατότητας της δοκιμασίας να ξεχωρίζει την αυτόματη ακροσωμική αντίδραση από την προκλητή (34). Για την μέθοδο aric τα σπερματοζωάρια επωάζονται σε συνθήκες ενεργοποίησης με το ιονοφόρο του ασβεστίου A23187, ώστε να προκληθεί εισροή ασβεστίου στο εσωτερικό του σπερματοζωαρίου. Κατόπιν ακολουθεί μιονιμοποίηση του δείγματος και χρώση με φθορίζουσα λεκτίνη από Pisum sativum, που δεσμεύεται από το ακροσωμικό υλικό και έτσι γίνεται εφικτή η διάκριση των σπερματοζωαρίων. Το πρότυπο φθορίσμού διαφέρει ανάμεσα στα σπερματοζωάρια που είναι άθικτα και σε αυτά που έχουν ολοκληρώσει την αντίδραση ακροσώματος και έτσι γίνεται δυνατός ο διαχωρισμός ανάμεσα στις δύο κατηγορίες.

Συμπέρασμα

Όταν το σπερματοζωάριο δεν μπορεί να ολοκληρώσει την ακροσωμική αντίδραση, η γονιμοποίηση δεν μπορεί να επιτευχθεί. Είναι λοιπόν προφανές ότι η γνώση της ικανότητας για ακροσωμική αντίδραση ενός δείγματος σπέρματος είναι ένα χρίσιμο εργαστηριακό στοιχείο στη διερεύνηση του υπογόνιμου άνδρα. Με την ανάπτυξη νέων τεχνικών και τη δημιουργία ειδικών αντιδραστήρων μπορεί πλέον στο ανδρολογικό εργαστήριο να μελετηθεί με ακρίβεια η δυνατότητα των σπερματοζωαρίων να υποστούν ακροσωμική αντίδραση. Ιδιαίτερη σημασία έχει η μέθοδος aric, που μπορεί να διαχωρίσει την αυτόματη από την προκλητή ακροσωμική αντίδραση και έχει μεγαλύτερη διαγνωστική σημασία. Πρέπει επίσης να τονισθεί ότι υπάρχει ακόμη προβληματισμός όσον αφορά την πλέον κατάλληλη μεθοδολογία για την πρόκληση της ακροσωμικής αντίδρασης και πιο ποσοστό ακροσωμικής αντίδρασης

θα θεωρείται φυσιολογικό, ώστε να διαχωρισθούν τα γόνιμα από τα υπογόνιμα δείγματα σπέρματος. Γίνεται λοιπόν κατανοτό ότι απαιτείται ακόμη έρευνα πάνω στο θέμα αυτό, ώστε η ακροσωμική αντίδραση να αποτελέσει εξέταση ρουτίνας που θα παρέχει στον κλινικό ιατρό πληροφορίες για την θεραπευτική προσέγγιση του υπογόνιμου άνδρα.

Βιβλιογραφία

1. Cooper T.G., Yeung C.H. Physiology of Sperm Maturation and Fertilization In: Nieschlag E., Behre H.M. eds. Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction. Springer 1997: 61-78
2. Fraser L.R. Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction In: Fenickel P., Parinaud J. Human sperm acrosome reaction Colloques INSERM 1995: 17-34
3. Yanagimashi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, eds. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1994: 189-317
4. Koehler J.K., Gaddum-Rose P. Media induced alterations of the membrane associated particles of the guinea-pig sperm tail. *J Ultrastruct Res* 1975; 51:106-118
5. Davis BK. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7560-7564
6. Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Rosenfield DL and Hershlag A. Head specific mannose-ligand receptor expression in human cholesterol loss. *Human Reprod.* 1993; 8; 2141-2154
7. Naz RK, Ahmad K, Kumar R. Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoa function. *J Cell Sci.* 1991; 99: 157-165
8. Luconi M, Bannaccorsi L, Krauz C, Gervasi G, Forti G, Baldi E. Stimulation of protein phosphorylation by platelet-activating factor androsterone in human spermatozoa. *Mol. Cell Endo.* 1995; 108: 35-42
9. Visconti PE, Moore GE, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995; 121: 1139-1150
10. Wassarman PM. Gamete interactions during mammalian fertilization. *Theriogenology* 1994;

- 41: 31-44
- 11 Llanos M, Vigil P, Salgado AM, Morales P. Inhibition of the acrosome reaction by trypsin inhibitors and prevention of penetration of spermatozoa through the human zona pellucida. *J Reprod Fert* 1993; 97: 173-178
 - 12 Liu DY, Baker HWG. Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human penetration of the zona pellucida. *Biol Reprod* 1993; 48: 340-348
 - 13 Aitken R J. Evaluation of human sperm function. *British Medical Bulletin* 1990; 46 (3): 654-674
 - 14 Dravland JE, Meizel S. The effect of inhibitors of trypsin and phospholipase A2 on the penetration of zona pellucida hamster eggs by acrosome-reacted hamster sperm. *J Androl* 1982; 3: 388-395
 - 15 Takano H, Yanagimashi R, Ursh U. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with oolemma: inhibitors studies using the golden hamster. *Zygotes* 1993; 1: 79-91
 - 16 Mack SR, De Jonge C, Bielfeld P, Zaneveld LJD. Acrosome reaction of human spermatozoa: comparative evaluation by triple stain and electron microscopy. *Mol Androl* 1990; 2: 265-279.
 - 17 DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. Ca ++ related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 135-143
 - 18 Talbot P, Chacon RS. A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *Gamete Res* 1980; 3: 211-216.
 - 19 Talbot P, Chason RS. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 1981; 215: 201-208.
 - 20 Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, De La Torre J, Suja JA, Rufas JS. A method for visualizing the acrosome by light microscopy. *Stain Technol* 1986; 61: 227-230
 - 21 Aarons D, Boettger-Tong H, Biegler B, George G, Poirier GR. The acrosomal status of human sperm evaluated by coomassie blue staining and electron microscopy. *Mol Androl* 1993; 5: 31-37.
 - 22 Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 1986; 15: 213-226.
 - 23 Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 127-135.
 - 24 Wolf DP, Boldt J, Byrd W, Bechtol DB. Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 1985; 32: 1157-1162
 - 25 Sanchez R, Toepfer-Petersen E, Aitken RJ, Schill WB. A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. *Andrologia* 1991; 23: 197-203.
 - 26 Fenichel P, Hsi BL, Farahifar D, Donzeau M, Barrier-Delpech D, Yehy CJ. Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence activated cell sorter. *J Reprod Fertil* 1989; 87: 699-706
 - 27 Kawamoto A, Ohashi K, Kishikawa H, Zhu L-Q, Azuma C, Murata Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD 46 antibody to assess acrosomal status. *Fertil Steril* 1999; 71 (3): 497-501
 - 28 Kohn F.M., Mack S.R., Schill W.B., Zaneveld L.J. Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum* agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. *Hum Reprod* 1997; 12(4): 714-721
 - 29 Okabe M, Nagira M, Kawai Y, Matzno S, Mimura T, Mayumi T. A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona free hamster eggs. *Fertil Steril* 1990; 54: 1121-1126
 - 30 Tao J, Du JY, Critser ES, Critser JK. Assessment of the acrosomal status and viability of human spermatozoa simultaneously using flow cytometry. *Hum Reprod* 1993; 8: 1879 - 1885
 - 31 Purvis K, Rui H, Scholberg A, Hesta S, Clausen OP. Application of flow cytometry to studies on the human acrosome. *J Androl* 1990; 11: 361 - 366.
 - 32 Henley N, Bacon C, Roberts KD. Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravitral stain. *Int J Androl* 1994; 17: 78 - 84.
 - 33 Tesarik J. Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Human Reprod* 1989; 4: 95-98
 - 34 Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge; relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 1991; 2: 98 - 103.