

Προκλητή ακροσωμιακή αντίδραση

Θ. Ζεγκινιάδου¹, Δ. Γ. Γουλής², Ι. Ν. Μπόντης², Ι. Παπαδήμας²

1. Εργαστήριο Σπέρματος, Κλινική «Γαληνός», Θεσσαλονίκη

2. Μονάδα Ενδοκρινολογίας Αναπαραγωγής, Α' Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Περίληψη. Η μελέτη της μορφολογίας και της λειτουργικής ικανότητας του ακροσώματος προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σε ότι αφορά τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπερματοζωαρίου. Η προκλητή ακροσωμιακή αντίδραση έχει αποκτήσει μεγάλη σημασία: α) στην πρόβλεψη της γονιμοποιητικής ικανότητας ενός δείγματος σπέρματος, β) ως προγνωστικός δείκτης σε κύκλους κλασικής εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF), γ) στην επιλογή των περιπτώσεων όπου είναι υποχρεωτική η διενέργεια ενδοωαριακής έγχυσης σπερματοζωαρίου (ICSI) και δ) στην εκτίμηση της δυσμενούς επίδρασης της διαδικασίας κατάψυξης – απόψυξης στη γονιμοποιητική ικανότητα ενός δείγματος σπέρματος. Η προκλητή ακροσωμιακή αντίδραση έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και θεραπευτικά με τη χρήση διαφόρων φαρμακολογικών ουσιών στην προσπάθεια να βελτιωθεί το αποτέλεσμα της IVF.

Λέξεις ευρετηριασμού: ακρόσωμα, προκλητή ακροσωμιακή αντίδραση, ανδρική υπογονιμότητα

Abstract. T. Zeginiadou¹, D. G. Gouliis², I. N. Bontis², I. Papadimas². Challenged acrosome reaction. 1) Sperm Laboratory, clinic «Galinos», Thessaloniki. 2) Division of Endocrinology and human Reproduction, 1st Department of Obstetrics - Gynecology, Aristotle University of Thessaloniki, Greece. Adol Gynec Reprod Menop 2004, 16(4): 256-261.

The study of structure and function of the acrosome offers valuable information regarding sperm fertilizing capacity. The challenged acrosome reaction (Acrosome Reaction to Ionophore Challenge - ARIC) has been applied in a variety of fields including: a) prediction of fertilizing capacity of a sperm sample, b) prediction of success in classic in vitro fertilization (IVF) cycles, c) selection of cases where application of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is mandatory and d) evaluation of detrimental effect of freezing – thawing procedure in sperm fertilizing capacity. The challenged acrosome reaction has been used therapeutically through application of various pharmacologic substances in an attempt to enhance IVF results.

Keywords: acrosome, challenged acrosome reaction (ARIC), male subfertility

1. Εισαγωγικά στοιχεία

Το ακρόσωμα καλύπτει τα πρόσθια 2/3 της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Αποτελείται από δύο τμήματα, το πρόσθιο και το οπίσθιο, τα οποία φαίνεται ότι διαφέρουν τόσο στη σύνθεση τους, όσο και στο ρόλο που διαδραματίζουν κατά την ακροσωμιακή αντίδραση (AA). Το οπίσθιο τμήμα δεν συμμετέχει στην AA αλλά φαίνεται πως εμπλέκεται στην ένωση του σπερματοζωαρίου με το ωάριο. Η φυσιολογική μορφολογία του ακροσώματος θεωρείται σημαντικός προγνωστικός δείκτης της γονιμοποιητικής του ικανότητας και είναι δυνατό να μελετηθεί τόσο με το κοινό, όσο και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Η AA περιλαμβάνει κατά σειρά τη διάσπαση της κυτταρικής και της έξω ακροσωμιακής μεμβράνης και την απελευθέρωση των ενζύμων του ακροσώματος (1). Στην μελέτη της AA έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο προσδιορίζονται με μεγάλη ακρίβεια τα σπερματοζωάρια που έχουν ολοκληρώσει την AA, αλλά οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται πιο συχνά βασίζονται στη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου (2,3). Τα σπερματοζωάρια χρωματίζονται με τη χρήση διαφόρων χρωστικών και τα τελευταία χρόνια η χρήση φθοριζουσών λεκτινών ή φθοριζόντων αντισωμάτων έχει δώσει πιού αξιόπιστα αποτελέσματα (4,5). Ο φθορισμός επιτρέπει τον διαχωρισμό των σπερματοζωαρίων που έχουν εμφανίσει την AA από τα ακέραια σπερματοζωάρια, με μεγαλύτερη ευκολία και ακρίβεια (6,7,8). Όλες αυτές οι μέθοδοι βέβαια μελετούν την αυτόματη AA που έχει μικρή σχέση με τη γονιμοποιητική ικανότητα ενός δείγματος σπέρματος, διότι ως γνωστόν μόνον τα σπερματοζωάρια με άθικτο ακρόσωμα μπορούν να διεισδύσουν στο ωάριο και να το γονιμοποιήσουν.

Μια διαφορετική και πρόσφατη προσέγγιση στη μελέτη της AA είναι η πρόκληση της αντίδρασης με την χρήση ιονοφόρου (Acrosome Reaction to Ionophore Challenge - ARIC) (9). Η μέθοδος ARIC επιτρέπει τον διαχωρισμό με μεγάλη ακρίβεια των σπερματοζωαρίων που εμφανίζουν αυτόματη AA από τα σπερματοζωάρια στα οποία επιτυγχάνεται προκλητή AA.

Με την ανασκόπηση αυτή επιχειρείται η παρουσίαση των πρόσφατων δεδομένων της διεθνούς βιβλιογραφίας σε ότι αφορά τους μηχανισμούς της προκλητής AA αλλά και της κλινικής της σημασίας

και εφαρμογής.

2. Προκλητή ακροσωμιακή αντίδραση (ARIC)

Με τη δοκιμασία ARIC τα σπερματοζωάρια επωάζονται αρχικά με το ιονοφόρο και κατόπιν με φθοριζουσα λεκτίνη, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των σπερματοζωαρίων που ολοκλήρωσαν την AA από τα ακέραια σπερματοζωάρια. Στη δοκιμασία αυτή τα σπερματοζωάρια ενεργοποιούνται με επώαση για τρεις έως έξι ώρες σε θρεπτικό υλικό. Το ιονοφόρο που χρησιμοποιείται αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου, ώστε να λάβει χώρα η AA.

Η δοκιμασία ARIC ουσιαστικά είναι μία μέθοδος με την οποία είναι δυνατή η μελέτη της μέγιστης ικανότητας των σπερματοζωαρίων ενός δεδομένου δείγματος να εμφανίσουν AA. Με άλλα λόγια είναι η εκτίμηση των εφεδρειών των σπερματοζωαρίων σε ότι αφορά την AA. Το τελικό αποτέλεσμα δίδεται αφού αφαιρεθούν τα σπερματοζωάρια που ήδη είχαν ολοκληρώσει αυτόματη AA πριν την έναρξη της δοκιμασίας ARIC.

Στη δοκιμασία ARIC χρησιμοποιούνται διάφοροι τρόποι με τους οποίους επιτυγχάνεται η διευκόλυνση της εισόδου ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων με παράλληλη αύξηση του ενδοκυττάριου pH, συνθηκών που υποβοηθούν την πρόκληση της AA. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι τρόποι για την πρόκληση είναι οι εξής:

- α) Η διαφανής ζώνη και τα διαλυτά της προϊόντα: είναι γνωστό ότι η AA γίνεται στη διαφανή ζώνη μετά τη σύνδεση των σπερματοζωαρίων με την πρωτεΐνη-3 της εξωτερικής επιφανείας της διαφανούς ζώνης (ZP3) (10). Η τρισδιάστατη δομή της διαφανούς ζώνης έχει ιδιαίτερη σημασία για αυτό και η χρήση ολόκληρης της διαφανούς ζώνης έχει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με την χρήση των διαλυτών της προϊόντων (10). Επειδή ο αριθμός των διαθέσιμων διαφανών ζωνών δεν είναι αρκετός, υπάρχει αντικειμενική δυσκολία στην πρόκληση της AA με τη μέθοδο αυτή. Έτσι τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές πειραματίζονται με την σύνθεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης-3 της διαφανούς ζώνης (recombinant ZP3) η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην πρόκληση της AA (11).

β) Το ιονοφόρο A23187: το ιονοφόρο αυτό ήταν η πρώτη ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση της ΑΑ (9). Σε συγκριτικές μελέτες με την χρήση ιονοφόρου A23187 και τη χρήση διαφανούς ζώνης δεν έγινε εν τούτοις δυνατή η ανεύρεση θετικής συσχέτισης μεταξύ των δύο αυτών μεθόδων της προκλητής ΑΑ (12).

γ) Άλλες ουσίες: εκτός από τη χρήση της διαφανούς ζώνης και του ιονοφόρου A23187 έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς και άλλες ουσίες για την πρόκληση της ΑΑ. Στις ουσίες αυτές συμπεριλαμβάνονται η προγεστερόνη (13), στοιχεία του ωοφόρου δίσκου του ωαρίου (14), όπως επίσης και η τραχηλική βλέννη ή το ωθυλακικό υγρό (15,16,17).

3. Η κλινική σημασία της προκλητής ακροσωμιακής αντίδρασης

Είναι γνωστό από παλιά ότι η παρουσία του ακροσώματος και η σωστή λειτουργία του αποτελούν ουσιαστικούς παράγοντες της γονιμοποιητικής ικανότητας του σπερματοζωαρίου, δεδομένου ότι σπερματοζώρια χωρίς ακρόσωμα δεν είναι σε θέση να διεισδύσουν στο εσωτερικό του ωαρίου (18). Επίσης δείγματα σπέρματος με σπερματοζώρια που είχαν σε σημαντικό ποσοστό στρόγγυλες κεφαλές λόγω ελλείψεως ακροσώματος παρουσίαζαν μειωμένη γονιμότητα (19). Η γονιμοποιητική ικανότητα ενός δείγματος μπορεί να εξασθενήσει όταν υπάρχουν προβλήματα τόσο στην δομή, όσο και στη λειτουργία του ακροσώματος (19). Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η ΑΑ συσχετίζεται με τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στην διαφανή ζώνη (20). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα γίνεται αντιληπτό ότι η ΑΑ μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σε ορισμένες περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας.

Είναι γνωστό ότι τα σπερματοζώρια γόνιμων ανδρών υφίστανται με την πάροδο του χρόνου αυτόματη ΑΑ, σε χαμηλό όμως ποσοστό (21, 22). Με την ARIC μελετάται η μεγίστη δυνατότητα των σπερματοζωαρίων να εμφανίσουν την ΑΑ, γεγονός που προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τη γονιμοποιητική τους ικανότητα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το αποτέλεσμα της μεθόδου ARIC λαμβάνεται μετά την αφάρεση του ποσοστού των σπερματοζωαρίων που εμφάνισαν αυτόματη ΑΑ από αυτά που εμφάνισαν προκλητή ΑΑ (9). Με

άλλα λόγια η προκλητή αυτή ΑΑ εμφανίζει τελικά τις δυνατότητες ή τις λειτουργικές εφεδρείες των σπερματοζωαρίων να εμφανίσουν κάτω από ορισμένες κατάλληλες συνθήκες στο μέγιστο βαθμό την ικανότητα τους για ΑΑ. Ένα δείγμα σπέρματος με φυσιολογικές παραμέτρους στο σπερμοδιάγραμμα δεν θα μπορέσει να γονιμοποιήσει το ωάριο εάν δεν ολοκληρώσει την ΑΑ. Πρόσφατα δεδομένα μάλιστα αναφέρουν ότι ένα ποσοστό 29% των ανδρών με φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα και ανεξήγητη υπογονιμότητα ακόμη και κατά την κλασική εξωσωματική γονιμοποιήση (IVF) παρουσίαζε πρόβλημα στην προκλητή ΑΑ (22).

3.1. Συσχέτιση της προκλητής ακροσωμιακής αντίδρασης με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος

Ένα σημαντικό θέμα που απασχολεί τους ερευνητές είναι εάν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των βασικών παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος και του αποτελέσματος της προκλητής ΑΑ (23,24,25). Δείγματα σπερμάτων με σημαντική ασθενοσπερμία εμφανίζουν σημαντική μείωση της προκλητής ΑΑ (23). Δείγματα επίσης σπερμάτων με βαρεία τερατοσπερμία εμφανίζουν σημαντική μείωση τόσο της αυτόματης, όσο και της προκλητής ΑΑ (24). Σε πρόσφατη δημοσίευση βρέθηκε ότι η ΑΑ που προκαλείται με την χρήση διαλυτών προϊόντων διαφανούς ζώνης είναι σαφώς μειωμένη σε δείγματα σπερμάτων με βαρεία τερατοσπερμία (25).

3.2. Συσχέτιση της προκλητής ακροσωμιακής αντίδρασης με το αποτέλεσμα της IVF και της κατάψυξης του σπέρματος

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες συσχετισμού του αποτελέσματος της προκλητής ΑΑ με την έκβαση της IVF. Πολλοί ερευνητές υιοθέτησαν την προκλητή ΑΑ ως διαγνωστική δοκιμασία και συσχέτισαν το αποτέλεσμα της με την έκβαση της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Έτσι οι Calvo και συν. βρήκαν ότι το αποτέλεσμα της προκλητής ΑΑ είναι μειωμένο στις περιπτώσεις ανεξήγητης υπογονιμότητας (26), εύρημα το οποίο επιβεβαιώνει παλαιότερη παρατήρηση ελαττωμένης δραστικότητας της ακροσίνης (27). Έχει επίσης διαπιστωθεί μειωμένη προκλητή ΑΑ σε περιπτώσεις επαναλαμβανόμε-

νης και ανεξήγητης αποτυχίας γονιμοποίησης μετά από IVF (22). Σε σπέρματα υπογόνιμων ανδρών με διαταραχή της κινητικότητας ή της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων έχει αποδειχθεί ότι τόσο με την αυτόματη, όσο και με την προκλητή AA είναι εφικτή η πρόβλεψη του αποτελέσματος της εξωσωματικής γονιμοποίησης σε υψηλό ποσοστό (20). Ένα θέμα που συζητείται από τους ερευνητές στη διεθνή βιβλιογραφία είναι το ποιο πρέπει να θεωρείται προγνωστικά το όριο που διαφοροποιεί μία φυσιολογική από μία παθολογική προκλητή AA. Το όριο αυτό κυμαίνεται σε διάφορες μελέτες από 5% έως 30% (9,28,29,30). Σημειώνεται τέλος ότι η προκλητή AA μπορεί να ανιχνεύσει τη μείωση της ποιότητας του σπέρματος που είναι δυνατόν να εμφανισθεί μετά την διαδικασία της κατάψυξης - απόψυξης. Έχει παρατηρηθεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ότι μετά τη διαδικασία αυτή επέρχονται βλάβες στο ακρόσωμα των σπερματοζωαρίων με συνέπεια τη μείωση της γονιμοποιητικής τους ικανότητας (31). Η ιμιακή λητή ΑΔΑ επίσης επλιγτωμένη ρυταρχετήματα που έχουν αποψυχθεί, ανεξάρτητα από την ουσία που χρησιμοποιείται για την πρόκληση της AA (32). Η επίδραση της κατάψυξης - απόψυξης δεν έχει πάντοτε το ίδιο αποτέλεσμα, έχει όμως βρεθεί ότι τα δείγματα που καταψύχθηκαν μετά από επιλογή των σπερματοζωαρίων με την τεχνική του swim-up παρουσιάζουν καλύτερα ποσοστά προκλητής AA μετά την απόψυξη (33).

4. Θεραπευτική χρήση της προκλητής ακροσωμιακής αντίδρασης

Εκτός από τη διαγνωστική χρήση έχουν γίνει προσπάθειες τα τελευταία χρόνια για την θεραπευτική χρήση της προκλητής AA με διάφορες φαρμακολογικές ουσίες (34,35,36). Η θεραπευτική αυτή προσέγγιση αποφασίζεται όταν η μέθοδος ARIC αποδεικνύει ότι η προκλητή AA δεν είναι φυσιολογική. Η μη φυσιολογική αυτή AA διακρίνεται σε δύο είδη: α) την ανεπαρκή AA: στη μορφή αυτή προκαλείται AA σε μειωμένο ποσοστό σπερματοζωαρίων και β) την πρόωρη AA: στη μορφή αυτή προκαλείται μεν AA σε υψηλό ποσοστό σπερματοζωαρίων, έχει όμως μεγάλο ποσοστό σπερματοζωαρίων που παρουσίασαν αυτόματη πρόωρη AA. Στην ανεπαρκή AA έχει προταθεί η χρήση φαρμακολογικών ουσιών που διεγείρουν μεμβρανικούς ή κυτταροπλασματικούς μηχανι-

σμούς. Για παράδειγμα, η χρήση πεντοξυφυλλίνης έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει μια τέτοια ανεπάρκεια (34). Μάλιστα η επώαση με πεντοξυφυλλίνη με σκοπό την ενίσχυση της ανταπόκρισης των δειγμάτων σπέρματος στο ιονοφόρο A23187 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού γονιμοποίησης των ωαρίων στην IVF (35). Η μέθοδος επομένως αυτή, με τον συνδυασμό πεντοξυφυλλίνης και ιονοφόρου A23187, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην IVF. Στην πρόωρη AA, η λέκιθος του αυγού προκαλεί βελτίωση της αυτόματης πρόωρης AA (36). Είναι αυτονόητο ότι στα δείγματα των σπερμάτων στα οποία χρησιμοποιούνται οι παραπάνω μέθοδοι εάν δεν επιτευχθεί βελτίωση της προκλητής AA και γονιμοποίηση τότε ακολουθεί ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI).

5. Συμπεράσματα

Ιδιμελείτη πτυχιακούς και πτυχιακούς ικανότητας του ακροσώματος προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σε ότι αφορά τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπερματοζωαρίου. Η προκλητή AA έχει αποκτήσει μεγάλη σημασία: α) στην πρόβλεψη της γονιμοποιητικής ικανότητας ενός δείγματος σπέρματος, β) ως προγνωστικός δείκτης σε κύκλους IVF, γ) στην επιλογή των περιπτώσεων όπου είναι υποχρεωτική η διενέργεια ICSI και δ) στην εκτίμηση της δυσμενούς επίδρασης της διαδικασίας κατάψυξης - απόψυξης στη γονιμοποιητική ικανότητα ενός δείγματος σπέρματος. Η προκλητή AA έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και θεραπευτικά με τη χρήση διαφόρων φαρμακολογικών ουσιών στην προσπάθεια να βελτιωθεί το αποτέλεσμα της IVF.

Βιβλιογραφία

1. Aitken RJ. Evaluation of human sperm function. Br Med Bull 1990, 46: 654-674.
2. 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.
3. 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.
4. Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. J Reprod Fertil 1987, 81: 127-135.
 5. Holden CA, Hyne RV, Sathananthan AH, Trounson AO. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. Mol Reprod Dev 1990, 25: 247-257.
 6. Wolf DP, Boldt J, Byrd W, Bechtol DB. Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. Biol Reprod 1985, 32: 1157-1162.
 7. Amin AH, Bailey JL, Storey BT, Blasco L, Heyner S. A comparison of three methods for the acrosome reaction in human spermatozoa. Hum Reprod 1996, 11: 741-745.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Hoshi K, Sugano T, Endo C, Yoshimatsu N, Yanagida K, Sato A. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by human zona pellucida and effect of cervical mucus on zona-induced acrosome reaction. Fertil Steril 1993, 60: 149-153.
 11. Van Duin M, Polman JEM, De Breet ITM, Van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, Brindle J, Aitken RJ. Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. Biol Reprod 1994, 51: 607-617.
 12. Liu DY, Baker HWG. A simple method for the assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction. Hum Reprod 1996, 11: 551-557.
 13. Parinaud J, Labal B, Vieitez G. High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. Fertil Steril 1992, 58: 599-602.
 14. Stock CE, Bates R, Lindsay KS, Edmonds DK, Fraser LR. Human oocyte-cumulus complexes stimulate the human acrosome reaction. J Reprod Fertil 1989, 86: 723-730.
 15. Mortimer D, Camenzind AR. The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. Hum Reprod 1989, 4: 169-174.
 16. Zhu J, Barratt CLR, Lippes J, Pacey AA, Cooke ID. The sequential effects of human cervical mucus, oviductal fluid, and follicular fluid on sperm function. Fertil Steril 1994, 61: 1129-1135.
 17. Perry RL, Barratt CRL, Warren MA, Cooke ID. Comparative study of the effect of human cervical mucus and a cervical mucus substitute, Healonid, on capacitation and the acrosome reaction of human spermatozoa in vitro. Hum Reprod 1996, 11: 1055-1062.
 18. Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Kennedy WP, Health E, Perez-Pelaez M, Sobrero AJ, Zanefeld LJD. Acrosomeless sperm, a cause of primary male infertility. Andrologia 1976, 17: 31-35.
 19. Schill WB. Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. Hum Reprod 1991, 6: 969-978.
 20. Bastiaan HS, Windt M-L, Menkveld R, Kruger TF, Oehninger S, Franken DR. Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and in vitro fertilization. Fertil Steril 2003, 79: 49-55.
 21. Takahashi K, Wetzel AMM, Bastiaans BA, Jansen HJG, Rolland R. The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with in vitro fertilization. Fertil Steril 1992, 57: 889-894.
 22. Liu DY, Baker HWG. Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility. Fertil Steril 2003, 79: 74-80.
 23. Pillikian S, Guerin JF, Adeleine P, Ecchard R, Czyba JC. Spontaneous and ionophore induced acrosome reaction in as-

- thenozoospermic infertile semen. *Hum Reprod* 1992, 7: 991-992.
24. Oehninger B, Blackmore T, Morshedi I, Sueldo C, Acosta AA, Alexander NJ. Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia. *Fertil Steril* 1994, 61: 349-354.
25. Franken DR, Bastiaan HS, Kidson A, Wranz P, Habenicht U-F. Zona pellucida mediated reaction and sperm morphology. *Andrologia* 1997, 29: 311-317.
26. Calvo L, Vantaman D, Banks SM, Tezon J, Koukoulis GN, Dennison L, Sherins RJ. Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil Steril* 1989, 52: 1048-1042.
27. Schill WB. Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa. *Fertil Steril* 1974, 25: 703-712.
28. Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi B. Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991, 55: 994-999.
29. Pampiglione JS, Tan SL, Campell S. The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil Steril* 1993, 59: 1280-1285.
30. Henkel R, Muller C, Miska W, Gips H, Schill WB. Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1993, 8: 2128-2132.
31. Cross NL, Hanks SE. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum Reprod* 1991, 6: 1279-1283.
32. Rossato M, Zorzi M, Ferlin A, Garolla A, Foresta C. Effects of cryopreservation on progesterone-induced ion fluxes and acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000, 15: 1739-1743.
33. Esteves SC, Sharma RK, Thomas Jr, Agarwal A. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. *Hum Reprod* 2000, 15: 2173-2179.
34. Tesarik J, Mendosa C, Carreras A. The effect of phosphodiesterase inhibitors caffeine and pentoxifylline on spontaneous and stimulus induced acrosome reactions in human sperm. *Fertil Steril* 1992, 58: 1185-1190.
35. Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, Tanaka T. Pentoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1993, 8: 2102-2107.
36. Tesarik J, Mendosa C. Alleviation of acrosome reaction prematurity by sperm treatment with egg yolk. *Fertil Steril* 1995, 63: 153-157.