

Akrosomska reakcija pri morfološko različnih tipih človeških semenčic

Acrosome reaction in morphologically different types of human spermatozoa

Mojca Čížek Sajko, Borut Kovačič, Veljko Vlasisavljevič

Oddelek za
reproduktivno medicino
in ginekološko
endokrinologijo,
Univerzitetni klinični
center Maribor,
Ljubljanska 5, 2000
Maribor

Korespondenca/ Correspondence:

prof. Veljko Vlasisavljevič,
University Clinical Centre
Maribor, Gynecology
and Perinatology,
Department of
Reproductive Medicine
Ljubljanska 5,
2000 Maribor, Slovenia
eMail: vlai@ukc-mb.si

Ključne besede:

akrosomska reakcija,
Ca²⁺ ionofor, človeške
semenčice, morfologija
semenčic, stroga merila
Tygerberg

Key words:

acrosome reaction,
Ca²⁺ ionophore,
human sperm, sperm
morphology, Tygerberg
strict criteria

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2011;
80: 1-58-1-63

Prispelo: 3. dec. 2009,
Sprejeto: 16. nov. 2010

Izvleček

Izhodišča: Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti, ali se funkcionalnost akrosoma razlikuje med različnimi morfološkimi tipi semenčic pri človeku.

Metode: Štirinajst semenskih izlivov moških smo oprali v gojišču, s čimer smo odstranili semensko plazmo in tako povzročili kapacitacijo semenčic. Iz vzorcev smo osamili samo gibljive semenčice. Vsak oprani vzorec smo razdelili na dva dela. Prvemu smo dodali ionofor Ca²⁺ za sprožitev akrosomske reakcije (AR). Drugi del je služil kot kontrola za spontano aktiviranje akrosoma. Po obdelavi smo semenčice fiksirali v etanolu in akrosom obarvali s FITC fluorokromom. Preparate smo opazovali z imunofluorescenčnim mikroskopom. Delež semenčic s funkcionalnim akrosomom (angl. acrosome reaction to ionophore challenge, ARIC) smo izrazili z razliko med deležem semenčic s spodbujeno in deležem semenčic s spontano akrosomsko reakcijo za vsak morfološki tip posebej.

Rezultati: Povprečni odstotek spontane AR pri analiziranih semenskih vzorcih je bil $1,6 \pm 1,8$ %, spodbujene AR $51,8 \pm 18,3$ % in ARIC $50,1 \pm 19,1$ %. Različni morfološki tipi semenčic so se med seboj razlikovali po deležu uspešno induciranih aktivacij akrosoma ($\chi^2 = 87,62$; $p < 0,001$) in tudi po izračunanem deležu funkcionalnih akrosomov (ARIC; $\chi^2 = 101,45$; $p_{0,001}$). Vse morfološko neoptimalne semenčice (razen semenčic okrogle oblike in semenčic z nepravilnostmi jedra) so imele v primerjavi z normalnimi semenčicami statistično pomembno nižji odstotek funkcionalnih akrosomov ($p < 0,05$).

Zaključki: Funkcionalnost akrosoma je povezana z morfološkimi lastnostmi semenčic. Najvišji odstotek normalnih akrosomov imajo morfološko optimalne semenčice, najnižjega pa semenčice elongiranih in amorfnih oblik.

Abstract

Background: The aim of our study was to ascertain if the acrosome functionality differs between various morphological types of spermatozoa in human.

Methods: Fourteen ejaculates were resuspended in the culture medium with the aim to wash the spermatozoa from the seminal plasma and to induce sperm capacitation. Only motile spermatozoa were isolated from the washed sperm. Each sample was divided into two aliquots. The Ca²⁺ ionophore was added to the first aliquot to induce sperm acrosome reaction. The second aliquot served as control for evaluating the spontaneous activation of the acrosome. After the treatment, the spermatozoa were fixed in ethanol and their acrosomes were stained with FITC fluorochrome. The samples were observed under an immunofluorescence microscope. The proportion of spermatozoa with functional acrosome (ARIC – acrosome reaction to ionophore challenge) was calculated for each morphological type as a difference between the proportions of spermatozoa with induced and spontaneous acrosome reaction.

Results: The mean proportion of spontaneous AR in the analysed sperm samples was $1,6 \pm 1,8$ %, induced AR $51,8 \pm 18,3$ % and ARIC $50,1 \pm 19,1$ %, respectively. Various morphological types of sperm differed significantly from each other by the proportion of successfully induced acrosome reactions ($\chi^2 = 87,62$, $p < 0,001$) and also by the proportion of functional acrosomes (ARIC; $\chi^2 = 101,45$, $p_{0,001}$). All types of morphologically nonoptimal spermatozoa (except the types with round heads and nuclear abnormalities) had a significantly lower percentage of functional acrosomes ($p < 0,05$) in comparison with morphologically optimal type.

Conclusions: The acrosome functionality is related to morphological characteristics of spermatozoa. Optimal morphology types have the

highest, while elongated and amorphous types of spermatozoa have the lowest proportion of normal acrosome.

Uvod

Eden ključnih dogodkov oploditve pri človeku je vezava semenčice na ovojnico ali zono pellucido (ZP) jajčne celice. Pogoj za vezavo semenčice na ZP, prehod skozi in zlitje njene membrane s plazmalemo jajčne celice – oolemo je morfološka in funkcionalna neokrnjenost akrosoma semenčice,¹ katerega vsebina se mora sprostiti šele ob stiku z zono pellucid. Gre za t. i. akrosomsko reakcijo. Normalno se sproži akrosomska reakcija ob vezavi semenčice na receptorje na zoni pellucid.² Možno pa je, da akrosom ni funkcionalen in se AR sproži predčasno ali pa se sploh ne sproži. Takšna semenčica, ki ni sposobna normalne akrosomske reakcije, ne more oploditi jajčne celice.¹ Motnje v aktiviranju akrosoma so torej lahko vzrok za zmanjšano moško plodnost ali za sterilnost. V praksi obstajajo različni testi za ugotavljanje funkcionalnosti akrosoma: določanje akrosomalnega indeksa, ki predstavlja delež semenčic z morfološko normalnim akrosomom v semenskem vzorcu,³ ugotavljanje aktivnosti akrosomalne hidrolaze–akrozina⁴ in določanje deleža semenčic v semenskem vzorcu, ki so sposobne akrosomske reakcije po spodbujanju z umetnim dražljajem – Ca²⁺ ionoforjem A23187 (*angl.* acrosome reaction to ionophore challenge, ARIC).⁵ Na podlagi odstotka AR, sprožene z ionoforjem, lahko namreč sklepamo na oploditveno sposobnost semenčic *in vitro*.^{5,6}

Poleg funkcionalnega akrosoma so za oploditev pomembne tudi morfološke lastnosti semenčic. Zona pellucida in plazmalema jajčne celice namreč selektivno vežeta samo semenčice normalnih oblik⁷. Številne raziskave potrjujejo, da je morfolologija semena pomemben pokazatelj oploditvene sposobnosti moškega, ter poročajo o klinični pomembnosti tega parametra in njegovi napovedni vrednosti *in vitro*⁸ in *in vivo*.⁹

Za določanje morfolologije semena najpogosteje uporabljamo merila WHO¹⁰ in strožja merila, ki so jih določili na kliniki

Tygerberg (*angl.* Tygerberg strict criteria).⁸ Številni avtorji menijo, da so za ocenjevanje morfolologije semenčic stroga merila Tygerberg primernejša kot merila WHO.^{11,12} Prednosti strogih meril so dobra ponovljivost, korelacija s funkcionalnimi testi in dobra napovedna vrednost za stopnjo oploditve in zanositve pri postopkih zunajtelesne oploditve (IVF).¹¹

V naši raziskavi smo morfolologijo semenčic določali po Tygerberših merilih, ki jih tudi sicer uporabljamo v diagnostičnem postopku pred postopkom IVF. Zanimalo nas je, ali se sposobnost semenčic za akrosomsko reakcijo razlikuje med različnimi morfološkimi tipi semenčic.

Material in metode

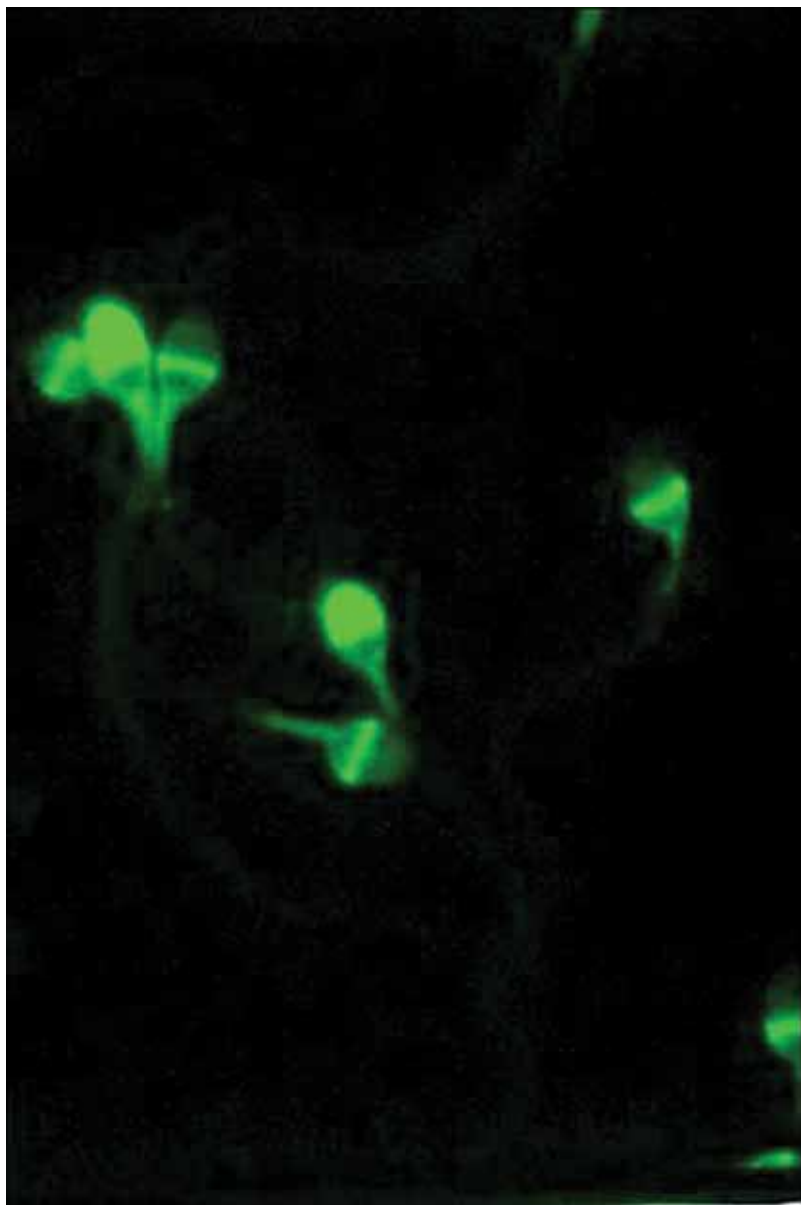
Semenski vzorci in priprava semena

V raziskavi smo analizirali 5600 semenčic iz semenskih vzorcev 14 preiskovancev, ki so prišli na diagnostični pregled pred postopkom IVF. Pri vsakem preiskovancu smo določili koncentracijo semenčic, gibljivost semenčic in odstotek morfološko normalnih semenčic.

Semenske vzorce smo centrifugirali v gojišču Sperm Preparation Medium (Medicult, Jyllinge, Danska), da smo odstranili semensko plazmo. Za ločitev gibljivih od negibljivih semenčic smo uporabili tehniko "swim-up", pri kateri so gibljive semenčice izplavale iz usedline v višje plasti čistega gojišča. Koncentracijo gibljivih semenčic smo uravnali na 5–10 x 10⁶/ml. Semenčice smo inkubirali 3 ure v inkubatorju pri 37 °C in atmosferi s 5-odstotnim CO₂, da je potekla kapacitacija. Po inkubaciji smo vzorce pripravili za določitev akrosomske reakcije.

Določitev akrosomske reakcije

Akrosomsko reakcijo smo ocenili po metodi, ki jo je opisal Cummins in sod.⁵ Opran in kapacitiran vzorec semenčic smo razdelili na dva dela. Enemu smo dodali Ca₂₊ iono-



Slika 1: Semenčice z neaktiviranim akrosomom (intenzivna zelena fluorescenca v celotnem akrosomu) in semenčice s sproženo akrosomsko reakcijo (intenzivno zeleno obarvano samo ekvatorialno območje glave); 1000-kratna povečava.

for A23187 (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Nemčija) za sprožitev akrosomske reakcije, drugi pa nam je služil kot kontrola za spontano aktiviranje akrosoma. Po eni uri inkubacije pri 37 °C in 5-odstotnim CO₂ smo vzorec centrifugirali skozi 60-odstotni gostotni gradient Percoll (Mediatech, Danska), ga sprali z gojiščem HT9 in seme resuspendirali v 95-odstotnem etanolu. Fiksirane semenčice smo nanесли na objektno steklo in naredili razmaz. Za določitev sprememb v akrosomalnem delu smo pripravili semenčice označili s FITC konjugiranim lektinom PSA (Sigma) in jih nato opazovali z epifluorescenčnim mikroskopom (Optiphot, Nikon) pri 1000-kratni povečavi. Če

so imele semenčice obarvano samo ekvatorialno območje glave ali ekvatorialno območje in delno obarvan apikalni del akrosoma, smo jih ovrednotili kot semenčice z aktiviranim akrosomom. Če je bil močno obarvan celoten akrosom, smo ocenili, da akrosomska reakcija še ni bila sprožena (Slika 1). Pri vsakem preparatu smo pregledali 200 semenčic in hkrati z ugotavljanjem aktiviranja akrosoma ocenili tudi morfologijo semenčic. Določili smo delež semenčic s spontano AR, delež semenčic z akrosomsko reakcijo po spodbudi s Ca²⁺ ionoforjem in delež semenčic, ki so sposobne odziva na spodbudo akrosomske reakcije s Ca²⁺ ionoforjem, t. j. funkcionalnost akrosoma.

Funkcionalnost akrosoma (ARIC) smo izrazili po formuli:⁵

ARIC (%) = spodbujena AR (%) – spontana AR (%).

Morfološka analiza

Hkrati z določitvijo akrosomske reakcije smo ovrednotili tudi morfologijo semenčic. Semenčice smo ocenjevali po strogih merilih Tygerberg.⁸ Kruger in sod.⁸ vključujejo semenčice med morfološko normalne le, če so te brez nepravilnosti v vseh treh območjih: glavi, vratu in repu. Semenski vzorec je po strogih merilih morfološko normalen, če ima 14 % ali več semenčic normalno obliko. Za razliko pa merila WHO postavljajo za mejno vrednost 30 % morfološko normalnih semenčic.¹⁰ Glede na morfološke značilnosti glave, vratu in repa smo semenčice po Menkveldu¹³ razdelili v 14 skupin (Tabela 1). Morfoloških nepravilnosti, kot so makrocefalna oblika, citoplazmatski ostanek, prelom vratu, aplazija mitohondrijev, nepravilnosti repa in pomnožene semenčice, pri naših vzorcih nismo opazili oziroma so bile izražene pri manj kot 5 % semenčic. Zato smo teh šest skupin pri vrednotenju povezanosti morfoloških lastnosti semenčic s sposobnostjo semenčic za aktiviranje akrosoma izpustili.

Statistična analiza

Za mejo statistične pomembnosti smo upoštevali $p < 0,05$. Povezanost morfoloških lastnosti semenčic s spodbujeno AR in

Tabela 1: Deleži semenčic posameznih morfoloških tipov v skupnem vzorcu 5600 semenčic.

Morfološki tip semenčic	Število (%) semenčic / skupni vzorec
normalne	562 (10,0)
mejno normalne	964 (17,2)
okrogle	281 (5,0)
nepravilnosti jedra	440 (7,9)
mikrocefalne	319 (5,7)
makrocefalne	47 (0,8)
elongirane	775 (13,8)
amorfne/nepravilnosti akrosoma	726 (12,9)
nepravilnosti vseh območij semenčice	1222 (21,8)
citoplazmatski ostanek	5 (0,1)
prelom vratu	81 (1,4)
aplazija mitohondrijev	1 (0,0)
nepravilnosti repa	178 (3,2)
pomnožene semenčice	4 (0,1)
skupaj	5600 (100,0)

s funkcionalnostjo akrosoma (ARIC) smo ugotavljali s testom hi-kvadrat. Pri spontani AR so bili deleži semenčic z akrosomsko reakcijo pri posameznih morfoloških tipih prenizki, da bi lahko razliko med njimi statistično ovrednotili. Posamezne nepravilne oblike semenčic smo pri spodbujeni AR in pri ARIC primerjali z normalnimi oblikami s testom hi-kvadrat z Yatesovo korekcijo. Za statistično analizo smo uporabili program Statistika (StatSoft Inc., USA).

Rezultati

Koncentracija semenčic v uporabljanih semenskih izlivih je bila od $8,8 \times 10^6$ do $208,0 \times 10^6$ /ml (srednja vrednost $81,4 \times 10^6$ /ml), gibljivost semenčic je bila 45 do 74 % (srednja vrednost 61,1 %). Med analiziranimi semenčicami je bil povprečni odstotek spontane AR $1,6 \pm 1,8$ % (spodnja in zgornja meja 0,0–6,5). Povprečni odstotek spodbujene AR je bil višji ($51,8 \pm 18,3$ %, spodnja in zgornja meja 17,0–77,6) in temu primerna tudi ARIC ($50,1 \pm 19,1$ %, spodnja in zgornja meja 14,0–76,6).

V povprečju je bilo normalnih oblik v semenskih vzorcih $10,0 \pm 4,5$ %, pri čemer so imeli trije preiskovanci več kot 14 % normalnih oblik, devet preiskovancev je imelo normalnih oblik med 4 in 14 %, dva preiskovanca pa sta imela manj kot 4 % morfološko normalnih semenčic.

Semenčice z nedotaknjnim akrosomom in semenčice, pri katerih je prišlo do akrosomske reakcije, so prikazane na Sliki 1.

Akrosomsko reakcijo pri morfološko različnih tipih semenčic prikazuje Tabela 2. Morfoloških skupin, ki so vključevale le nekaj semenčic (< 5 %), nismo upoštevali pri analizi. Tako smo izključili vse oblike nepravilnosti repa, makrocefalne semenčice in pomnožene semenčice. Morfološko različne semenčice se med seboj razlikujejo glede na akrosomsko reakcijo, spodbujeno z ionoforjem ($\chi^2 = 87,62$; $p < 0,001$). Prav tako je odzivnost različnih oblik semenčic na spodbudo akrosomske reakcije s Ca^{2+} ionoforjem (ARIC) statistično značilno različna ($\chi^2 = 101,45$; $p < 0,001$).

Razpravljanje in sklep

Naša raziskava je pokazala, da imajo morfološko različne semenčice različno sposobnost za aktiviranje akrosoma. Najvišji odstotek semenčic s funkcionalnim akrosomom smo ugotovili pri morfološko normalnih semenčicah in najnižjega pri amorfni semenčicah. Prav amorfne semenčice pa so tiste, ki imajo največje nepravilnosti v akrosomalnem območju. Lahko bi sklepali, da je za uspešno akrosomsko reakcijo pomembna ustrezna oblika akrosoma. O podobnih rezultatih poročajo Carrell in sod.¹⁴ Semenčice so po merilih WHO razdelili v sedem morfoloških skupin. Za spodbujanje AR so uporabili kumulativne celice in kalcijev ionofor A23187. V obeh primerih so ugotovili, da je bil odstotek semenčic z akrosomsko reakcijo pri morfološko nepravilnih semenčicah nižji kot pri normalnih.

Nasprotno pa nekatere raziskave kažejo, da morfološke lastnosti semenčic niso v povezavi z njihovo sposobnostjo za aktiviranje akrosoma po spodbujanju z umetnimi dražljaji.¹⁵ Pampiglione in sod.¹⁵ so ugotavljali, kakšna je akrosomska reakcija pri morfolo-

Tabela 2: Funkcionalnost akrosoma (ARIC), spontana in spodbujena AR pri različnih morfoloških tipih semenčic.

Morfološki tip semenčic	Spontana AR % (n / vse ocenjene)	Spodbujena AR % (n / vse ocenjene)	ARIC %
normalne	2,2 (7/320)	63,6 (154/242)	61,4
mejno normalne	2,1 (10/486)	55,4 (265/478) ^a	53,4 ^a
okrogle	0,0 (0/166)	60,9 (70/115)	60,9
nepravilnosti jedra	1,0 (2/203)	54,9 (130/237)	53,9
mikrocefalne	1,0 (2/196)	45,5 (56/123) ^b	44,5 ^b
elongirane	1,8 (7/395)	45,8 (174/380) ^c	44,0 ^c
amorfne/nepravilnosti akrosoma	1,6 (6/388)	30,8 (104/338) ^c	29,2 ^c
nepravilnosti vseh območij semenčice	1,8 (9/497)	53,1 (385/725) ^a	51,3 ^a

Statistično pomembna razlika med morfološko nepravilnimi semenčicami in semenčicami normalnih oblik: ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,005$; ^c $p < 0,0001$

ško različnih semenčicah po spodbujanju s folikularno tekočino. Pri semenčicah, ki jim niso dodali folikularne tekočine, je bila spontana akrosomska reakcija med različnimi morfološkimi skupinami značilno različna. Pri semenčicah, ki so jih inkubirali s folikularno tekočino, pa se deleži semenčic s spodbujeno AR med morfološkimi skupinami niso razlikovali. Razliko med našimi rezultati in omenjeno raziskavo lahko poskušamo pojasniti z uporabo drugačnega dražljaja za sprožitev akrosomske reakcije. Folikularna tekočina je biološki material in lahko zaradi vsebnosti različnih bioloških snovi izraža različno aktivnost.¹⁶

Zanimalo nas je tudi, kako se posamezne nepravilne oblike semenčic v funkcionalnosti akrosoma razlikujejo od normalnih. Ugotovili smo statistično pomembno nižji odstotek akrosomske reakcije pri morfološko nepravilnih tipih, razen pri okroglih oblikah in pri semenčicah z nepravilnostmi jedra. Morfološke tipe smo določili na podlagi modificirane Menkveldove klasifikacije.¹³ Tako smo uvrstili semenčice med okrogle, če je bila dolžina glave enaka njeni širini. Nekateri avtorji pa uvrščajo med okrogle semenčice tiste, ki so povsem brez akrosoma.¹⁷ Te semenčice seveda niso sposobne akrosomske reakcije in zato ne morejo oploditi jajčne celice. Na podlagi naših rezultatov ne moremo trditi, da imajo okrogle

semenčice zmanjšano sposobnost za AR v primerjavi z normalnimi. To lahko pomeni, da pri okroglih semenčicah akrosom ni toliko spremenjen, da se ne bi mogel normalno aktivirati. Enako tudi pri semenčicah z nepravilnostmi jedra nismo mogli potrditi zmanjšane sposobnosti za akrosomsko reakcijo v primerjavi z normalnimi. Če primerjamo odstotek ARIC pri semenčicah z nepravilnostmi jedra in pri mejno normalnih, je ta ugotovitev na videz presenetljiva. Možno je, da bi se tudi tu ob večjem številu semenčic pokazala statistično značilna razlika. To bi pomenilo, da na sposobnost za akrosomsko reakcijo ne vpliva le oblika akrosoma, ampak je pomembna morfologija celotnega območja glave.

Pričujoča študija kaže, da ima morfologija semenčic vpliv na akrosomsko reakcijo, spodbujeno s Ca^{2+} ionoforjem. V literaturi so opisane še druge metode, pri katerih so uporabili bolj naravne sprožilce AR, zono pellucido¹⁸ ali progesteron.¹⁹ Z nadaljnjimi raziskavami bi bilo potrebno ugotoviti, kateri dražljaj – kemijski ali fiziološki – je najboljše napovedni dejavnik.

Z vpeljavo funkcijskega testa, kot je določanje akrosomske reakcije, v klinične preiskave lahko pridobimo pomembne informacije o moški plodnosti. Ugotavljanje te dinamične značilnosti semenčic lahko pomaga pri reševanju uganke nepojasnjene

(idiopatske) neplodnosti in primerov ponavljajočih se ciklov zunajtelesne oploditve pri normozoospermikih, ki se končajo brez oploditve.¹⁹ Dokazano je bilo namreč, da ima ARIC najvišjo napovedno vrednost za zanositev, višjo kot jo imajo drugi parametri, kot so delež samo tistih semenčic ki so imele inducirano akrosomsko reakcijo, morfologija semenčic po strogih merilih in parameter gibljivosti semenčic.²⁰

Literatura

1. Yanagimachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. In: L. Mastroianni Jr and Biggers JD, eds. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. New York: Plenum Press; 1981. p. 81–182.
2. Florman HM, Storey BT. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. *Develop Biol* 1982; 91: 121–130.
3. Menkveld R, Rhemrev JPT, Franken DR, Vermeiden JPW, Kruger TF. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization *in vitro*. *Fertil Steril* 1996; 65: 637–644.
4. Kennedy WP, Kaminski JM, Van der Ven HH, Jeyendran RS, Reid DS, Blackwell J, et al. A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J Androl* 1989; 10: 221–231.
5. 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; 12: 98–103.
6. Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL. Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double-blind, randomized controlled study. *Fertil Steril* 1994; 61: 902–10.
7. Liu DY, Baker HWG. Acrosome status and morphology of human spermatozoa bound to the zona pellucida and oolemma determined using oocytes that failed to fertilize *in vitro*. *Hum Reprod* 1994; 9: 673–9.
8. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118–23.
9. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in interpretation of semen testing. *Hum Reprod* 1997; 12: 987–93.
10. World Health Organization. *WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
11. Menkveld R, Kruger TF. Advantages of strict (Tygerberg) criteria for evaluation of sperm morphology. *Int J Androl* 1995; 18: 36–42.
12. Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ, Toner JP, Swanson RJ, Kruger TF, et al. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large *in vitro* fertilization population. *Fertil Steril* 1994; 62: 559–67.
13. Menkveld R, Oettle EE, Kruger TF, Swanson RJ, Acosta AA, Oehninger S. *Atlas of human sperm morphology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991.
14. Carrell DT, Zobell RL, Middleton RG, Urry RL. A functional analysis and the potential clinical significance of 7 categories of sperm morphology. *J Urol* 1994; 151: 376–80.
15. Pampiglione JS, Tan SL, Campbell S. Acrosome reactivity in spermatozoa of different morphology in response to stimulation with follicular fluid. *Hum Reprod* 1993; 8: 412–5.
16. Morales P, Llanos M, Gutierrez G, Kohen P, Vigil P, Vantman D. The acrosome reaction-inducing activity of individual human follicular fluid samples is highly variable and is related to the steroid content. *Hum Reprod* 1992; 7: 646–51.
17. Aitken RJ, Kerr L, Bolton V, Hargreaves T. Analysis of sperm function in globozoospermia: implications for the mechanisms of sperm-oocyte interaction. *Fertil Steril* 1990; 54: 701–7.
18. Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC. Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 347–8.
19. Allgeyer M, Kirschenhofer N, Mann U, Brucker C. Measurement of induced acrosome reactions in human sperm using physiologic stimuli relevance for the prediction of fertilization outcome. *Andrologia* 2006; 38: 99–105.
20. Makkar G, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. The significance of the ionophore-challenged acrosome reaction in the prediction of successful outcome of controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination. *Hum Reprod* 2003; 18: 534–9.