

## کاربرد آزمایش واکنش آکروزومی در پیش بینی لقاح خارج رحمی

دکتر محمود دهقانی اشکذری<sup>۱\*</sup>، دکتر سید مهدی کلانتر<sup>۲</sup>، دکتر کاظم پریور<sup>۳</sup>، دکتر عباس افلاطونیان<sup>۴</sup>

### چکیده

مقدمه نوایکنش آکروزومی یکی از آزمایش های عملکردی توانمندی است که پیش نیاز فرآیند لقاح می باشد. پیشنهاد شده است که آزمایش واکنش آکروزومی در سیکل های درمانی IVF می تواند موفقیت لقاح را پیش بینی کند. این تحقیق به منظور سنجش توان واکنش آکروزومی القاء شده به وسیله مایع فولیکولی، برای پیش بینی میزان لقاح در سیکل های IVF انجام شد.

روش بررسی: این تحقیق از نوع تجربی (Experimental) است که طی ۹ ماه بر روی ۵۴ زوج نابارور، بدون علت ناباروری مشخص زنانه، انجام شد. نمونه های اسپرمی شستشو داده شده با محیط کشت Ham's F10، پس از دو ساعت ظرفیت یابی در انکوباتور  $CO_2$  دار و در حرارت  $37^{\circ}C$  و رطوبت ۹۵٪، در ۳ لوله فالکون ریخته شد. یکی به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. واکنش آکروزومی در لوله دوم توسط ماده دی متیل سولفونکساید DMSO و در لوله سوم توسط مایع فولیکولی ۵۰ درصد تحریک شد. پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون مجدد، اسپرم ها تثبیت شدند، گسترش های اسپرمی تهیه و پس از رنگ آمیزی به روش دو گانه، مطالعه میکروسکوپی انجام شد لازم تقسیم تعداد سلول های تخم حاصله بر تعداد اووسیت های در مرحله متافاز II اولیه و ضرب نتیجه حاصله در عدد ۱۰۰، درصد لقاح به دست آمد.

نتایج: معنی داری بین میانگین واکنش آکروزومی القاء شده با مایع فولیکولی در دو جمعیت با لقاح مساوی یا کمتر از ۵۰ درصد و بیشتر از ۵۰ درصد ملاحظه گردید. ارتباط معنی داری بین واکنش آکروزومی تحریک به وسیله (DMSO) و لقاح وجود نداشت. آنالیز ROC نشان داد، برای داشتن موفقیت بیش از ۴۵ درصد در IVF، واکنش آکروزومی تحریک شده با مایع فولیکولی باید ۱۰/۵ درصد یا بیشتر باشد.

نتیجه گیری: جهت انتخاب دقیق تر نوع درمان در روش های باروری کمک شده و تخمین میزان موفقیت IVF و پیش گیری از عوارض احتمالی، استفاده از آزمایش عملکردی واکنش آکروزومی، توصیه می گردد.

### واژه های کلیدی:

IVF، واکنش آکروزومی، پیش بینی لقاح، مایع فولیکولی

### مقدمه

عوامل مردانه، زنانه، ترکیبی از عوامل مردانه و زنانه و ناباروری با علت نامشخص تقسیم بندی می کنند<sup>(۱)</sup>. طبق آمار، در حدود ۴۰٪ از موارد ناباروری به مردان اختصاص دارد. استفاده از روش های مختلف باروری کمک شده، نظری روش های درمانی لقاح خارج رحمی (IVF) و تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) و تزریق درون رحمی اسپرم (IUI)، بخشی از این مشکل را برطرف نموده است. با وجود گذشت بیش از ۲۰ سال

نzedیک به ۱۵٪ از زوج های در سنین باروری، از مشکل نازایی رنج می برند. به طور کلی علل ناباروری متعدد و شامل:

- ۱- نویسنده مسئول: عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر  
تلفن: ۰۹۱۳ ۳۵۳ ۵۱۲۹ Email: mdashkezary@yahoo.com
- ۲- دانشیار گروه ژنتیک بالینی - مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری  
۳- استاد گروه زیست شناسی سلوی و تکوینی  
۴- دانشیار گروه زنان و مامایی - مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری  
۵- دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات - تهران  
۶- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد  
تاریخ دریافت: ۸۴/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۴/۴/۲۵

با برنامه آماری ROC ، به این نتیجه رسیدند که در cut-off واکنش آکروزومی ۱۰ درصد، میزان لقادیر بیش از صفر در صد می باشد. Carver در سال ۱۹۹۶ با مطالعه بر روی ۱۲۹ زوج به این نتیجه رسید زمانی که واکنش آکروزومی ۱۰ درصد باشد احتمال موفقیت IVF بیش از ۳۰ درصد است<sup>(۵)</sup> اختلاف در استفاده از القاء کننده های مختلف، روش های متفاوت رنگ آمیزی و انجام تحقیقات در جوامع مختلف، نتایج متفاوتی را در ارتباط با میزان ارزش پیش گویی کنندگی تست واکنش آکروزومی ارایه کرده است<sup>(۶)</sup>. با این که تعداد زیادی از دانشمندان بر توانایی آزمایش واکنش آکروزومی تأکید دارند تعدادی از محققان چنین نظری ندارند. با توجه به شرایط فوق در این تحقیق نقش واکنش آکروزومی در پیش گویی میزان موفقیت IVF مورد ارزیابی قرار گرفت.

### روش بررسی

جمعیت مورد مطالعه افرادی بودند که جهت درمان ناباروری به مراکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوqi و یمارستان مادر یزد مراجعه می نمودند . جمعاً ۵۶ زوج مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه گیری از مهر ماه ۱۳۸۲ شروع و تا خرداد ۱۳۸۳ ادامه داشت. تحقیق از نوع Exprimental بود. نمونه، از افرادی گرفته شد که ناباروری با علت زنانه مشخص نداشته اند. هر نمونه پس از حداقل ۲ وحدات ۷ روز خودداری از تماس جنسی در ظروف پلاستیکی استریل جمع آوری و به منظور مایع شدن (Liquefaction)، به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. نمونه های اسپرمی با محیط کشت  $\text{Ham's F}_{10}$  شستشو داده شدند و پس از سانتریفیوژ در دور ۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، رسوب اسپرمی در  $600\text{ }\mu\text{l}$  محیط کشت حل و سوسپانسیون حاصل برای انجام ظرفیت یابی (Capacitation) در درون انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  و  $\text{CO}_2$  دار و با رطوبت ۹۵٪ قرار داده شد. سپس به منظور القاء واکنش آکروزومی، سه لوله فالکون انتخاب و درون هریک،  $200\text{ }\mu\text{l}$  سوسپانسیون اسپرمی ریخته شد. یکی از لوله ها به عنوان کنترل انتخاب و به لوله دوم  $200\text{ }\mu\text{l}$  مایع فولیکولی اضافه شد تا

تجربه جهانی در زمینه لقادیر خارج رحمی و انتقال جنین، میزان موفقیت در حدود ۱۵ تا ۲۵ درصد باقی مانده است<sup>(۷)</sup>. یکی از اهداف متخصصین IVF یافتن شاخص های دقیق برای پیش بینی میزان موفقیت IVF بوده است. این شاخص ها می توانند آن ها هر انتخاب روش مناسب برای درمان ناباروری کمک کند . آزمایش های استاندارد مایع منی (Seminal Analysis) شامل غلظت ، تحرک و مورفوЛОژی به طور گسترده ای به عنوان شاخص تشخیص ناباروری استفاده شده است . تعدادی از این تحقیقات مورفولوژی نرمال اسperm و حرکت پیش رونده اسperm ، غلظت اسperm و تحرک آن ، تعداد اسperm و تحرک آن را به عنوان فاکتور های مناسب برای پیش گویی ناباروری می دانند و در مقابل ، تعدادی از دانشمندان ارتباط معنی داری بین فاکتورهای آنالیز منی و پیش گویی لقادیر نیافتند<sup>(۸)</sup>. در مجموع، نتایج حاصل از این آزمایشات برای تشخیص یا پیش گویی ناباروری در *in vivo* و *in vitro* قابل اعتماد نیستند. مردان ناباروری وجود دارند که از لحاظ آزمایشات منی کاملاً نرمال محسوب می شوند؛ ولی در لقادیر با شکست مواجه می شوند و در مقابل این گروه افرادی وجود دارند که نتایج آزمایشات استاندارد منی مطلوبی ندارند؛ ولی در لقادیر موفق هستند<sup>(۹)</sup> همچنین در یک تحقیق منتشر شده ای از نویسندهای این مقاله به اثبات رسید که آزمایشات SA در پیش گویی لقادیر در IVF مطمئن نیستند. در تحقیقات اخیر برای پیش گویی موفقیت در IVF از آزمایش های عملکردی استفاده شده است . آنالیز حرکت اسperm به کمک کامپیوتر، آزمایش واکنش آکروزومی القاء شده، سنجش نفوذ اسperm و اندازه گیری میزان اتصال اسperm به لیه شفاف از جمله این آزمایش ها می باشد<sup>(۱۰)</sup>، ولی نتایج این آزمایش ها نیز با هم متفاوت است . با توجه به نقش واکنش آکروزومی در لقادیر *in vivo* و در IVF آزمایش عملکردی واکنش آکروزومی در پیش گویی لقادیر مورد بررسی قرار گرفته است . تحقیقات مختلفی ارتباط بین واکنش آکروزومی و میزان آزمایش گویی لقادیر را مورد بررسی قرار داده است . Calvo و همکاران در سال ۱۹۹۴ در مطالعات خود بر روی ۲۳۲ زوج کاندید IVF ، و آنالیز اطلاعات حاصله

پایان آزمایش ها هیچ کدام، از نتایج هم اطلاعی نداشتند . جهت لقاح، از اسپرم ها نمونه اولیه که با محیط کشت شستشو داده شده بود، استفاده شد. اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز گردید. ابتدا همبستگی (Correlation) بین فراوانی لقاح و واکنش آکروزومی اندازه گیری شد (Pearson Correlation). سپس جمعیت بر اساس لقاح کمتر یا مساوی 50 و بالاتر از 50 درصد به دو جمعیت شکسته شد و آن گاه آنالیز واریانس بین میانگین های پارامتر، در دو جمعیت انجام شد . همچنین برای پیش گویی لقاح از آنالیز ROC استفاده گردید.

## نتایج

اسپرم های واکنش آکروزومی انجام داده در گروه های سه گانه ی کنترل (AR-control)، واکنش آکروزومی القاء شده با دی متیل سولفوكساید (AR-DMSO) و واکنش آکروزومی (AR-FF50) محاسبه گردید (نمودار 1). نتایج حاصل نشان داد که در بین لقاح و واکنش آکروزومی القاء شده توسط مایع فولیکولی 50 درصد ارتباط معنی داری وجود دارد ( $p<0.05$ ) ولی بین لقاح و واکنش آکروزومی القاء شده توسط DMSO ارتباط معنی داری ملاحظه نگردید (جدول 1). با شکستن جمعیت به دو گروه با لقاح کمتر یا مساوی 50 درصد و لقاح بیش از 50 درصد و مقایسه میانگین ها با استفاده از آنالیز واریانس، م شخص گردید که دو جمعیت جدید در ارتباط با میانگین واکنش آکروزومی تحریک شده با DMSO اختلافی ندارند اما بین میانگین واکنش آکروزومی القاء شده به وسیله مایع فولیکولی با غلظت 50 درصد در دو جمعیت، اختلاف معنی داری وجود داشت ( $p<0.05$ ) (جدول 2).

در آنالیز ROC (Receiving Operating Characteristics) افراد بالقاح 45 درصد یا کمتر در گروه 1 و افراد بالقاح یشتر از 45% در گروه 2 قرار گرفتند با انتخاب این cut-off لقاح، بهترین cut-off عبارت از واکنش آکروزومی 10/5 درصد مشخص گردید.

غلظت مایع فولیکولی در لوله به 50 درصد برسد . به لوله سوم DMSO غلظت نهایی در  $1\mu\text{l}/\text{ml}$  اضافه شد. مایع فولیکولی از افراد مراجعه کننده به مرکز، که جهت تحریک اوولاسیون در آنها از HMG و HCG استفاده می شد، تهیه گردید . مایع از فولیکول هایی انتخاب می شد که درشت تر از همه بوده و در آنها فقط یک اووسیت موجود بود و آلدودگی خونی نداشت . برای ایجاد شرایطی یکسان، مقدار مایع فولیکولی مورد نیاز تا پایان آزمایش ها جمع آوری گردید و به مقدار  $200\text{ }\mu\text{l}$  در لوله های فالکون استریل ریخته و منجمد می شد و در موقع لزوم، پس زاذوب شدن و رسیدن به درجه حررا رت آزمایشگاه از آنها استفاده می شد . تمامی لوله ها به مدت 18 ساعت در انکوباتور  $\text{CO}_2$  دار 37 درجه قرار داده شدند. در مرحله بعد محتويات لوله ها، سانتریفیوژ گردید . برای عمل فیکساسیون به رسوب اسپرمی،  $200\text{ }\mu\text{l}$  محلول 3 درصد گلوتر آلدئید اضافه شد، پس از 30 دقیقه محتويات لوله ها به مدت 5 دقیقه در 500g سانتریفیوژ گردید. پس از چند بار شستشو با آب مقطر، گسترش های اسپرمی از نمونه ها تهیه و در هوای خشک گردید . گسترش ها کد گذاری شدند . سپس نمونه ها با روش رنگ آمیزی دو گانه (یسمارک براون - رزبنگال) طی مراحل زیر رنگ آمیزی گردیدند:

- رنگ آمیزی با یسمارک براون 0/8 درصد با  $\text{PH}=1.8$  و حرارت  $37^\circ\text{C}$  به مدت 10 دقیقه
- شستشو با آب مقطر دو بار (هر بار 10 ضربه)
- رنگ آمیزی با رزبنگال 0/8 درصد در تریس بافر  $0.1\text{ M}$  با  $\text{PH}=5.3$  به مدت 20 دقیقه و حرارت  $22^\circ\text{C}$
- شستشو در آب مقطر دو بار (هر بار 10 ضربه)
- آب گیری با الکل اتیلیک با درجات صعودی و شفاف سازی با گزیریل به مدت 10 دقیقه و موئته کردن.

در این روش، ناحیه آکروزومی در اسپرم های واکنش داده بدون رنگ و در اسپرم های واکنش نداده به رنگ قرمز روشن است درصد لقاح از تقسیم تعدی اسلول های تخم بر تعداد اووسیت های در مرحله متافاز دو و ضرب نتیجه حاصل در عدد 100 به دست می آمد . این بررسی برای محقق و متخصصان آزمایشگاه ART، دو سویه کور (Double blind) بود، یعنی تا



جدول ۱: بررسی میزان همبستگی واکنش آکروزومی با لقاد

P Value	ضریب همبستگی بارامتر با لقاد (Pearson correlation)	Range	SD ± Mean	پارامترهای اسپرمی	نوع
-	0/589	0-54	25/66 ± 13/49	AR-DMSO(%)	۱
(P<0.05)+	0/041	0-48	11/82 ± 12/18	AR-FF50(%)	۲

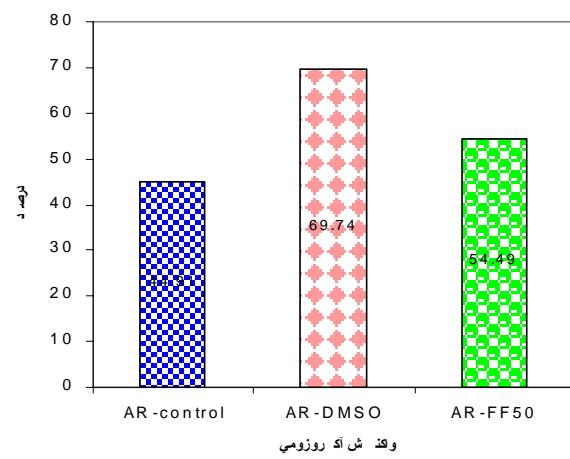
جدول ۲: مقایسه میانگین های واکنش آکروزومی در دو جمعیت

معنی دار بودن اختلاف میانگین P<0.05	FR=<50% n=14		FR>50% n=40		پارامترهای اسپرمی	نوع
	Range	SD ± Mean	Range	SD ± Mean		
+	6/14 ± 7/86	0-22	13/86 ± 12/88	0-48	*واکنش آکروزومی خالص القاء شده با مایع فولیکولی	۱
-	23/96 ± 17/7	0-54	6/27 ± 11/84	9-51	**واکنش آکروزومی خالص القاء شده با DMSO	۲

\*واکشن آکروزومی خود به خودی - واکشن آکروزومی القاء شده به وسیله مایع فولیکولی = واکشن آکروزومی خالص القاء شده با مایع فولیکولی  
\*\* واکشن آکروزومی خود به خودی - واکشن آکروزومی القاء شده به وسیله DMSO = واکشن آکروزومی خالص القاء شده با DMSO

باروری اسperm استفاده شده است . از بین تست های عملکردی اسperm، بررسی وضعیت آکروزومی اسperm از لحاظ مرغولوزی و

عملکرد، اهمیت ویژه ای دارد <sup>(6)</sup>. اسperm برای انجام عمل لقاد در محیط in vivo و در شرایط IVF، باید قادر به انجام عمل واکنش آکروزومی باشد اسperm های سرگرد (round-headed) بدون آکروزوم، نمی توانند به ZP متصل شوند و یا به آن نفوذ کنند در نتیجه این افراد عقیم هستند <sup>(7)</sup>. افراد ناباروری نیز وجود دارند که دارای آکروزوم می باشند ، ولی در یکی از مراحل واکشن آکروزومی نقص دارند . با انجام آزمایش عملکردی واکشن آکروزومی، اسperm در مقابل یک محرك مناسب قرار می گیرد و در صورت عدم نقص فیزیولوژیکی و ساختمانی، واکشن آکروزومی انجام می دهد. امروزه از محرك های بیولوژیکی و شیمیایی از قبیل پروژستررون، مایع فولیکولی و کلسیم یونوفور A23187 و گلیکوپروتئین ZP، به طور وسیعی برای القاء واکشن آکروزومی در محیط آزمایشگاه استفاده می شود <sup>(8)</sup>. به دلایل مختلف از القاء کننده های شیمیایی استفاده نشد. از مهم ترین آنها این که، محرك های شیمیایی از فرآیندهای فیزیولوژیکی طبیعی استفاده نکرده و رسپتورهای غشایی را دور می زند و مستقیماً نفوذ پذیری غشاء را به کلسیم افزایش می دهند <sup>(9)</sup> با توجه به بعضی تحقیقات قبلی و انجام پیش



نمودار ۱: نتایج میانگین واکشن آکروزومی تحریک شده با مایع فولیکولی و گروه DMSO کنترل

## بحث

اندازه گیری و تخمین میزان پتانسیل باروری در نمونه های انزالی از گذشته مورد توجه محققین بوده و معمولاً با آنالیز پارامترهای تراکم اسperm، حرکت و مورفولوژی، میزان قدرت باروری مردان سنجیده می شود . به دلیل محدود بودن ارزش کلینیکی آزمایش های آنالیز استاندارد منی، درسال های اخیر در کنار آزمایش های استاندارد منی (SA)، از آزمایش های عملکردی اسperm (sperm function test) برای تعیین ظرفیت

cut-off واکنش آکروزومی ۱۰ درصد باشد، cut-off لقاح بیشتر از ۳۰ درصد است ( $r=0/68$ ).

Krausz مطالعات خود به این نتیجه رسید در زمانی که واکنش آکروزومی بیش از ۱۰ درصد باشد، موقعیت IVF بیش از ۵۰ درصد است ( $r=0/31$ ).

Pampiglione در سال ۱۹۹۳ IVF به این نتیجه رسید در شرایطی که واکنش آکروزومی بیش از ۳۱٪ باشد، موقعیت لقاح بیش از صفر درصد است.

Parinaud در سال ۱۹۹۵ با مطالعه بر ۱۱۷ زوج کاندید IVF، اثبات نمود که در cut-off واکنش آکروزومی ۲۰ درصد، موقعیت لقاح بیش از صفر درصد است ( $r=0/34$ ).

Cummins و همکاران در سال ۱۹۹۱ اثبات کردند که در cut-off واکنش آکروزومی ۱۰ درصد، cut-off برای لقاح بیش از ۵۰ درصد است.

در مجموع اختلافات موجود بین نتایج مطالعه ما با دیگر تحقیقات قبلی<sup>(4)</sup> را می‌توان به نوع القاء کننده واکنش آکروزومی (کلسیم یونوفور، مایع فولیکولی، درجه حرارت پایین)، روش بررسی واکنش آکروزومی (لکتین های علامت گذاری شده با فلورستن، فلوسیتومتری، رنگ آمیزی دو گانه و ...) و جمعیت مورد مطالعه نسبت داد.

### نتیجه گیری

با انجام این تحقیق که متناسب با ویژگی های جمعیتی کشور ایران است انجام تست واکنش آکروزومی و توجه به معیارهای به دست آمده در این تحقیق، برای تصمیم گیری در انتخاب نوع درمان ناباروری توصیه می شود . با انجام واکنش آکروزومی و تطبیق آن با نتایج حاصل از این تحقیق، میزان موفقیت لقاح مشخص می گردد و پزشک و بیمار با آگاهی بیشتر در مورد انتخاب نوع درمان تصمیم گیری نمایند . این کار مانع از هدر رفتن وقت و هزینه برای بیمار و تیم درمانی شده و از آسیب های روحی و جسمی که در اثر تکرار سیکل های درمانی برای بیمار ایجاد می شود، جلوگیری خواهد شد.

### References

مطالعه، از مایع فولیکولی با غلظت نهایی ۵۰٪ و زمان انکوباسیون ۲۰ ساعت برای ظرفیت یابی (Capacitation) استفاده شد<sup>(10)</sup>.

در مطالعه ما همبستگی بین درصد لقاح و میزان واکنش آکروزومی معنی دار بود ( $p<0.05$ ). نتایج تحقیقات Calvo (1991) و Cummins (1994) با نتایج مطالعه ما مشابه بودند در سال ۲۰۰۲ ثابت نمود که واکنش آکروزومی القاء شده به وسیله مایع فولیکولی یا پروژسترون، می تواند آسیب های فیزیولوژیکی در جریان واکنش آکروزومی را شناسایی نماید<sup>(11)</sup>، ولی مطالعات Liu و Baker در سال ۲۰۰۲ نشان داد که واکنش آکروزومی القاء شده به وسیله یونوفور A23187 برای تشخیص آسیب های بیولوژیکی واکنش آکروزومی مفید نیست که مغایر با مطالعات فوق است.

نتایج تحقیق ما به دو روش به شرح ذیر بردسی گردید:

- در روش اول، جمعیت براساس درصد لقاح به دو گروه با لقاح کمتر یا مساوی ۵۰ درصد و بیش از ۵۰ درصد تقسیم شد . آنالیز واریانس میانگین ها اختلاف معنی داری را در دو گروه نشان داد ( $P<0.05$ ).

- در روش دوم با آنالیز ROC مشخص گردید در زمانی که cut-off برای لقاح ۴۵ درصد باشد، بهترین cut-off برای واکنش آکروزومی ۱۰/۵ درصد است. طبق این نتیجه، می توان پیش بینی نمود زمانی که میزان واکنش آکروزومی القاء شده به وسیله مایع فولیکولی ۱۰/۵ درصد یا بیشتر باشد، احتمال لقاح بیش از ۴۵٪ است. Oehinger در سال ۲۰۰۰ مجموعه تحقیقاتی که در زمینه ارتباط بین آزمایش های عملکردی اسپرم و پیش گویی لقاح وجود داشت را آنالیز نمود . یافته های دسته بندي شلوغ در ارتباط با واکنش آکروزومی ، ضمن تأیید وجود ارتباط معنی دار بین واکنش آکروزومی و درصد لقاح نشان می دهد که یافته های حاصله در تحقیقات مختلف، به شرح زیر ارزش های پیش گویی کنندگی یکسانی ندارند:

Carver در سال ۱۹۹۶ در بررسی نقش پیش گویی کنندگی واکنش آکروزومی در IVF به این نتیجه رسید، در زمانی که

1. Quinn P, Jouannet P, Frydman R, Van Steirteghem, A. C, Wolf, J. P, Czyglik, F, Van der Abbeel, E. *Infertility , a comprehensive text;* 2nd ed; Seibel, Machelle, M., Eds, 1997. Appleton & Lange: Stamford, 793-807.
2. Liu and Baker, *Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI*, Asian Androl, 2002 Dec 4; 281-285.
3. Coetzee, T.E., Check, J.H., Choe, J., *An evaluation of couples with failure of fertilization in vitro*. Hum. Reprod., 1992 7, 978-981.
4. Oehninger S.,Franken D., Saged E., *Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta - analysis*. Human Reproduction update.2000, Vol. 6 No.2, 160-168.
5. Calvo L, Dennison-Lagos L, Banks, S.M. *Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in – vitro fertilization*, Hum. Reprod. 1994 9, 1880 – 1886.
6. Jedrzejczak P, Powelezyk L. *Predictive value of selected sperm parameters for classical invitro fertilization procedure of oocyte fertilization*. 2005 Andrologia. Vol. 37 Issue 2-3: 72.
7. Franken DR., Bastiaan HS and Oehninger SC. *Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a micro assay using minimal volumes of solubilized,homologous zona pellucida*, J Assist Reprod Genet, Aug 2000 17(7): 374-8.
8. Katsuki T, Hava T, Ueda K, Tanaka J, Ohema K. *Prediction of outcomes of assisted reproduction treatment using the calcium ionophore- Induced acrosome reaction*. 2005 Feb: 20 (2): 469-75.
9. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich 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 Mar-Apr;12(2):98-103.
10. Ceinwen, *Artificial induction of the acrosome reaction in human spermatozoa*, Human Reproduction, 1994, Vol 9, 77-82.
11. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forto G. *Signal transduction pathways in human spermatozoa*, J Reprod Immunol 2002 Jan: 53(1-2): 121-31.
12. Carver-Ward J.A., Hollanders J.M.G. *High fertilization prediction by flow cykometric analysis of the CD46 antigen on the inner acrosomal membrane of spermatozoa*. Hrtna. Repral, 1996 Tl, 1923-1928.
13. Krausz C, Bcxtaccorsi L. *Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in – vitro fertilization*. Hum. Reprod., 1996 11, 1661 – 1667.
14. Pampiglione J.S, Tan S. and Campbell S. *The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa*. Fertil. Stril, (1993)59, 1280 – 1284.
15. Parinaud J, Vietez G, Moutaffian H, Richoilley G, Labal B. *Variations in spontaneous and induced acrosome reaction: correlation with semen parameters and in-vitro fertilization results*. Hum reprod 1995 Aug;10(8):2085-9.

