مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
دوره سیزدهم ، شماره چهارم، پاییز 1384، صفحات 81- 76

کاربرد آزمایش واکنش آکروزومی در پیش بینی لقاح خارج رحمی

دکتر محمود دهقانی اشکذری [*1]، دکتر سید مهدی کلانتر[2]، دکتر کاظم پریور[3]، دکتر عباس افلاطونیان[4]

چکیده

مقدمه:واکنش 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 گویی میزان لقاح در سیکل های IVF انجام شد.

روش بررسی: این تحقیق از نوع تجربی(Exprimental) است که طی 9 ماه بر روی 54 زوج نابارور ،بدون علت ناباروری مشخص زنانه، انجام شد . نمونه های اسپرمی شستشو داده شده با محیط کشت Ham'sF10 ، پس از دو ساعت ظرفیت یابی در انکوباتور CO_2 دار و در حرارت 37°C و رطوبت 95% ، در 3 لوله فالکون ریخته شد. یکی به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. واکنش آکروزومی در لوله دوم توسط ماده دی متیل سولفوکساید DMSO و در لوله سوم توسط مایع فولیکولی 50درصد تحریک شد . پس از 18 ساعت انکوباسیون مجدد، اسپرم ها تثبیت شدند، گسترش های اسپرمی تهیه و پس از رنگ آمیزی به روش دو گانه، مطالعه میکروسکوپی انجام شداز تقسیم تعداد سلول های تخم حاصله بر تعداد اووسیت های در مرحله متافاز II اولیه و ضرب نتیجه حاصله در عدد 100، درصد لقاح به دست آمد.

نتایج: تفاوت معنی داری بین میانگین واکنش آکروزومی القاء شده با مایع فولیکولی در دو جمعیت با لقاح مساوی یا کمتر از 50 درصد و بیشتر از 50 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 45 درصد درIVF ، واکنش آکروزومی تحریک شده با مایع فولیکولی باید 10/5درصد 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 ازآزمایش عملکردی واکنش آکروزومی، توصیه می گردد.

واژه های کلیدی: IVF ، واکنش آکروزومی، پیش بینی لقاح، مایع فولیکولی

مقدمه

نزدیک به 15% از زوج های در سنین باروری، از مشکل نازایی رنج می برند. به طور کلی علل ناباروری متعدد و شامل: عوامل مردانه، زنانه، ترکیبی از عوامل مردانه و زنانه و ناباروری با علت نامشخص تقسیم بندی می کنند [1]. طبق آمار ، در حدود 40 درصد از موارد ناباروری به مردان اختصاص دارد . استفاده از روش های مختلف باروری کمک شده، نظیر 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 20 سال

[*] 1 - نویسندهٔ مسئول: عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر
تلفن: 0913 353 5129 Email: mdashkezary@yahoo.com
2- دانشیار گروه ژنتیک بالینی – مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری
3- استاد گروه زیست شناسی سلولی و تکوینی
4- دانشیار گروه زنان و مامایی – مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری
3 - دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات - تهران
4 و2- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
تاریخ دریافت:84/3/25 تاریخ پذیرش:84/4/25

www.SID.ir

تجربه جهانی در زمینه لقاح خارج رحمی وانتقال جنین، میزان موفقیت در حدود 15 تا 25 درصد باقی مانده است [2]. یکی از اهداف متخصصین IVF یافتن شاخص های دقیق برای پیش بینی میزان موفقیت IVF بوده است. این شاخص ها می توانند آن ها را در انتخاب روش مناسب برای درمان ناباروری کمک کند . آزمایش های استاندارد مایع منی (Seminal Analysis) شامل غلظت ، تحرک و مورفولوژی به طور گسترده ای به عنوان شاخص تشخیص ناباروری استفاده شده است . تعدادی از این تحقیقات مورفولوژی نرمال اسپرم و حرکت پیش رونده اسپرم ، غلظت اسپرمی و تحرک آن ، تعداد اسپرم 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 لقاح نیافتند[3]. 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 لقاح با شکست مواجه می شوند و در مقابل این گروه افرادی وجود دارند که نتایج آزمایشات استاندارد منی مطلوبی ندارند؛ ولی در لقاح موفق هستند[2]همچنین در یک تحقیق منتشر نشده ای از نویسندگان این مقاله به اثبات رسید که آزمایشات SA در پیش گویی لقاح در IVF مطمئن نیستند. در تحقیقات اخیر برای پیش گویی موفقیت در IVFاز آزمایش های عملکردی استفاده شده است . آنالیز حرکت اسپرم به کمک کامپیوتر، آزمایش واکنش آکروزومی القاء شده، سنجش نفوذ اسپرم و اندازه گیری میزان اتصال اسپرم به لایه شفاف از جمله این آزمایش ها می باشد [4]، ولی نتایج این آزمایش ها نیز با هم متفاوت است . با توجه به نقش واکنش آکروزومی در لقاح in vivo و در IVF، نقش آزمایش عملکردی واکنش آکروزومی در پیش گویی لقاح مورد بررسی قرار گرفته است . تحقیقات مختلفی ارتباط بین واکنش آکروزومی ومیزان پیش گویی لقاح را مورد بررسی قرار داده است . Calvo و همکاران در سال 1994 در مطالعات خود بر روی 232 زوج کاندید IVF ، و آنالیز اطلاعات حاصله با برنامه آماری ROC ، به این نتیجه رسیدند که در cut-off واکنش آکروزومی 10درصد، میزان لقاح بیش از صفر در صد می باشد. Carver در سال 1996 با مطالعه بر روی 129 زوج به این نتیجه رسید زمانی که واکنش آکروزومی 10 درصد باشد احتمال موفقیت IVF بیش از 30 درصد است[5]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[2]. 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 صدوقی و بیمارستان مادر یزد مراجعه می نمودند . جمعاً 56 زوج مورد مطالعه قرارگرفتند. نمونه گیری از مهر ماه 1382 شروع و تا خرداد 1383 ادامه داشت. تحقیق از نوع Exprimental بود. نمونه، از افرادی گرفته شد که ناباروری با علت زنانه مشخص نداشتند.هرنمونه پس از حداقل 2و حداکثر 7 روز خودداری از تماس جنسی در ظروف پلاستیکی استریل جمع آوری و به منظور مایع شدن (Liquefaction)، به مدت 30 الی 45 دقیقه در انکوباتور $37^{o}C$نگهداری شد .نمونه های اسپرمی با محیط کشت $Ham'sF_{10}$ شستشو داده شدند و پس از سانتریفیوژ در دور 400g به مدت 10 دقیقه، رسوب اسپرمی در $600\mu l$ محیط کشت حل و سوسپانسیون حاصل برای انجام ظرفیت یابی (Capacitation) در درون انکوباتور $37^{o}C$ و CO_2 دار و با رطوبت 95%قرار داده شد . سپس به منظور القاء واکنش آکروزومی، سه لوله فالکون انتخاب و درون هریک، $200\ \mu l$سوسپانسیون اسپرمی ریخته شد .یکی از لوله ها به عنوان کنترل انتخاب وبه لوله دوم $200\ \mu l$ مایع فولیکولی اضافه شد تا

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت مایع فولیکولی در لوله به 50درصد برسد . به لوله سوم DMSOبا غلظت نهایی در $1\mu l/ml$ اضافه شد. مایع فولیکولی از افراد مراجعه کننده به مرکز، که جهت تحریک اوولاسیون در آنها از HMG و HCGاستفاده می شد، تهیه گردید . مایع از فولیکول هایی انتخاب م ی شد که درشت تر از همه بوده و در آن ها فقط یک اووسیت موجود بود وآلودگی خونی نداشت .

برای ایجاد شرایطی یکسان، مقدار مایع فولیکولی مورد نیاز تا پایان آزمایش ها جمع آوری گردید وبه مقدار μl 200 در لوله های فالکون استریل ریخته ومنجمد می شد و در مواقع لزوم، پس‌زاذوب شدن ورسیدن به درجه حرا رت آزمایشگاه از آن ها استفاده می شد . تمامی لوله ها به مدت 18 ساعت در انکوباتور CO_2 دار 37 درجه قرار داده شدند. در مرحله بعد محتویات لوله ها، سانتریفیوژ گردید . برای عمل فیکساسیون به رسوب اسپرمی، μl 200 محلول 3 درصد گلوتر آلدئید اضافه شد. پس از 30 دقیقه محتویات 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 هوا خشک گردید .

گسترش ها کد گذاری شدند .سپس نمونه ها با روش رنگ آمیزی دوگانه (بیسمارک براون - رزبنگال) طی مراحل زیر رنگ آمیزی گردیدند:

1- رنگ آمیزی با بیسمارک براون 0/8 درصد با PH=1.8 و حرارت 37^{o} C به مدت 10 دقیقه

2- شستشو با آب مقطر دو بار (هر بار 10 ضربه)

3- رنگ آمیزی با رزبنگال 0/8 درصد در تریس بافر 0.1M با PH=5.3 به مدت 20 دقیقه و حرارت 22^{o} C

4- شستشو در آب مقطر دو بار (هر بار 10 ضربه)

5-آب گیری با الکل اتیلیک با درجات صعودی و شفاف سازی با گزیلل به مدت 10 دقیقه و مونته کردن.

در این روش، ناحیه آکروزومی در اسپرم های واکنش داده بدون رنگ و در اسپرم های واکنش نداده به رنگ قرمز روشن استدرصد لقاح از تقسیم تعد اد سلول های تخم بر تعداد اووسیت های در مرحله متافاز دو و ضرب نتیجه حاصل در عدد 100به دست می آمد . این بررسی برای محقق و متخصصان آزمایشگاه ART، دو سویه کور (Double blind) بود، یعنی تا 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 (Acrosome Reaction=AR)در گروه های سه گانه ی کنتر ل (AR-control)، واکنش آکروزومی القاء شده با دی متیل سولفوکساید (AR-DMSO) و واکنش آکروزومی القاء شده با مایع فولیکولی با غلظت 50 درصد (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 (جدول1). با شکستن جمعیت به دو گروه با لقاح کمتر یا مساوی 50 درصد و لقاح بیش از50 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 ($p<0.05$) (جدول2).

در آنالیزROC (Receiving Operating Characteristics) افراد با لقاح 45 درصد یا کمتر در گروه 1 و افراد با لقاح بیشتر از45% در گروه 2قرار گرفتند با انتخاب این cut-off برای لقاح، بهترینcut-offبرای واکنش آکروزوم ی 5/ 10 درصد مشخص گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1: بررسی میزان همبستگی واکنش آکروزومی با لقاح

ردیف	پارامترهای اسپرمی	Mean ± SD	Range	ضریب همبستگی پارامتر با لقاح (Pearson correlation)	P Value
1	AR-DMSO(%)	25/66 ± 13/49	0-54	0/589	-
2	AR-FF50(%)	11/82 ± 12/18	0-48	0/041	(P<0.05)+

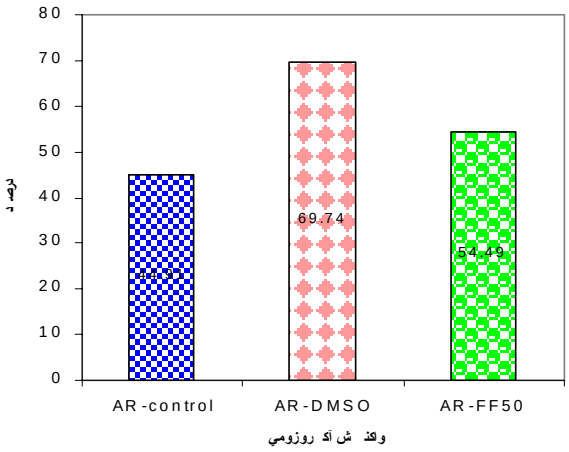
جدول:2 مقایسه میانگین های واکنش آکروزومی در دو جمعیت

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

***واکنش آکروزومی خود به خودی - واکنش آکروزومی القاء شده به وسیله مایع فولیکولی = واکنش آکروزومی خالص القاء شده بامایع فولیکولی**

****واکنش آکروزومی خود به خودی - واکنش آکروزومی القاء شده به وسیله DMSO = واکنش آکروزومی خالص القاء شده با DMSO**

باروری اسپرم استفاده شده است . از بین تست های عملکردی اسپرم، بررسی وضعیت آکروزومی اسپرم از لحاظ مرفولوژی و عملکرد، اهمیت ویژه ای دارد [6]. اسپرم برای انجام عمل لقاح در محیط in vivo و در شرایط IVF، باید قادر به انجام عمل واکنش آکروزومی باشد. اسپرم های سرگرد (round-headed) بدون آکروزوم، نمی توانند به ZP متصل شوند و یا به آن نفوذ کنند در نتیجه این افراد عقیم هستند [7]. افراد ناباروری نیز وجود دارند که دارای آکروزوم می باشند ، ولی در یکی از مراحل واکنش آکروزومی نقص دارند . با انجام آزمایش عملکردی واکنش آکروزومی، اسپرم در مقابل یک محرک مناسب قرار می گیرد و در صورت عدم نقص فیزیولوژیکی و ساختمانی، واکنش آکروزومی انجام می دهد. امروزه ازمحرک های بیولوژیکی و شیمیایی از قبیل پروژسترون، مایع فولیکولی و کلسیم یونوفور A23187 و گلیکوپروتئین ZP ، به طور وسیعی برای القاء واکنش آکروزومی در محیط آزمایشگاه استفاده می شود [8]. به دلایل مختلف از القاء کننده های شیمیایی استفاده نشد. از مهم ترین آنها این که، محرک های شیمیایی از فرآیندهای فیزیولوژیکی طبیعی استفاده نکرده و رسپتورهای غشایی را دور می زنند و مستقیماً نفوذپذیری غشاء را به کلسیم افزایش می دهند [9]. با توجه به بعضی تحقیقات قبلی وانجام پیش



نمودار1: نتایج میانگین واکنش آکروزومی تحریک شده با مایع فولیکولی و گروه کنترل DMSO

بحث

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

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعه، از مایع فولیکولی با غلظت نهایی 50% و زمان انکوباسیون 20ساعت برای ظرفیت یابی(Capacitation) استفاده شد[10].

در مطالعه ما همبستگی بین درصد لقاح و میزان واکنش آکروزومی معنی دار بود($p<0.05$). نتایج تحقیقات Calvo (1994) و Cummins (1991) با نتایج مطالعه ما مشابه بودند Baldi در سال 2002 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[11]، ولی مطالعات Liu و Baker در سال 2002 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 زیر بررسی گردید:

1- در روش اول، جمعیت براساس درصد لقاح به دو گروه با لقاح کمتر یا مساوی 50 درصد و بیش از 50درصد تقسیم شد . آنالیز واریانس میانگین ها اختلاف معنی داری را در دو گروه نشان داد($P<0.05$).

2- در روش دوم با آنالیز ROC مشخص گردید در زمانی که cut-off برای لقاح 45درصد باشد، بهترین cut-off برای واکنش آکروزومی 10/5 درصد است. طبق این نتیجه، می توان پیش بینی نمود زمانی که میزان واکنش آکروزومی القاء شده به وسیله مایع فولیکولی 10/5 درصد یا بیشتر باشد ،احتمال لقاح بیش از 45% است. Oehinger در سال 2000 مجموعه تحقیقاتی که در زمینه ارتباط بین آزمایش های عملکردی اسپرم و پیش گویی لقاح وجود داشت را آنالیز نمود . یافته های دسته بندی شلوهی 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 1996 در بررسی نقش پیش گویی کنندگی واکنش آکروزومی در IVF به این نتیجه رسید، در زمانی که cut-off واکنش آکروزومی 10 درصد باشد، cut-off لقاح بیشتر از 30 درصد است (r=0/68) .

Krausz و مطالعات خود به این نتیجه رسید در زمانی که واکنش آکروزومی بیش از 10 درصد باشد، موقعیت IVF بیش از 50 درصد است (r=0/31).

در سال 1993، Pampiglione در مطالعات خود بر روی 54 زوج کاندید IVF به این نتیجه رسید در شرایطی که واکنش آکروزومی بیش از 31% باشد، موقعیت لقاح بیش از صفر درصد است.

Parinaud در سال 1995 با مطالعه بر 117 زوج کاندید IVF، اثبات نمود که در cut-off واکنش آکروزومی 20 درصد، موفقیت لقاح بیش از صفر درصد است(r=0/34).

Cummins وهمکاران در سال 1991اثبات کردند که در cut-off واکنش آکروزومی 10 درصد ،cut-off برای لقاح بیش از 50 درصد است.

در مجموع اختلافات موجود بین نتایج مطالعه ما با دیگر تحقیقات قبلی[4] را می توان به نوع القاء کننده واکنش آکروزومی(کلسیم یونوفور، مایع فولیکولی، درجه حرارت پایین)، روش بررسی واکنش آکروزومی(لکتین های علامت گذاری شده با فلورسنت ، فلوسیتومتری، رنگ آمیزی دوگانه و ...) و جمعیت مورد مطالعه نسبت داد.

نتیجه گیری

با انجام این تحقیق که متناسب با ویژگی های جمعیتی کشورایران استانجام 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 وتطبیق 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

Archive of SID
www.SID.ir

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 Repraduction 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. Jedrzeiczak 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 inducation 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir