

Wykorzystanie metody cytometrii przepływowej w badaniu reakcji akrosomalnej ludzkich plemników

The use of flow cytometry in evaluation of acrosome reaction of human sperm

dr n. med. Grzegorz Bakalczuk¹,
mgr Wojciech Brakowiecki²,
dr n. med. Szymon Bakalczuk³

¹ Zakład Położnictwa, Ginekologii i Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego Wydziału Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polska

² Katedra i Zakład Zdrowia Publicznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polska

³ OVUM Rozrodczość i Andrologia, Lublin, Polska

**European Journal
of Medical Technologies**
2013; 1(1): 17-23

Copyright © 2013 by ISASDMT
All rights reserved
www.medical-technologies.eu
Published online 14.10.2013

Streszczenie

Umiejętność ludzkich plemników do wchodzenia w reakcje z dojrzałą komórką jajową jest złożonym i słabo poznanym zjawiskiem. Reakcja akrosomalna ludzkich plemników w przeciwieństwie do plemników innych ssaków jest trudna do obserwacji przy użyciu konwencjonalnych metod mikroskopowych. Idealną metodą do oceny reakcji akrosomalnej ludzkich plemników jest mikroskopia elektronowa, ale niestety jest to metoda zbyt czasochłonna, skomplikowana i kosztowna, aby móc ją wykorzystywać w rutynowej diagnostyce. Natomiast cytometria przepływowa jest wykorzystywana do badania reakcji akrosomalnej ssaków i była połączona z metodą wykorzystującą lektyny związane z FITC do badania ludzkiej reakcji akrosomalnej. Przeciwciało CD46, znane także jako

Adres do korespondencji:
Grzegorz Bakalczuk
ul. Sapiehy 2/60
20-095 Lublin

Słowa kluczowe:

reakcja akrosomalna,
cytometria
przepływowa,
preparatyka nasienia

proteina kofaktora błonowego, wiąże antygeny występujące na wewnętrznej błonie akrosomu plemnika. Wykorzystanie przeciwciał CD46 w połączeniu z cytometrią przepływową może dostarczyć szybkiego testu do rutynowej oceny reakcji akrosomalnej.

Abstract

The capability of human spermatozoa for penetrating the mature ovum is a complex and poorly recognized phenomenon. The acrosome reaction in human spermatozoa, opposite to spermatozoa of other mammals, is difficult to observe with the use of conventional microscopic methods. Electron microscopy is an ideal method for the evaluation of the human sperm acrosome reaction; however, this method is much too time consuming, complicated and costly to use in routine diagnostics while flow cytometry is applied to investigate acrosome reaction in mammals and has been combined with the method using FITC-conjugated lectins for examining human sperm acrosome reaction. CD46 antibody, also known as membrane cofactor protein binds antigens located in the inner acrosomal membrane of the spermatozoon. The use of CD46 antibodies in combination with flow cytometry may provide a quick test for routine assessment of acrosome reaction.

Key words:

acrosome reaction,
flow cytometry,
semen preparation

Zdolność ludzkich plemników do wchodzenia w reakcje z dojrzałą komórką jajową jest złożonym i słabo poznanym zjawiskiem [1]. W swoich pracach Wasarman [2] sugeruje bardziej skomplikowane badanie zależności plemnik–oocyt w celu dokładnego zdefiniowania mechanizmu zjawiska zapłodnienia.

Każdy plemnik może mieć wymagane parametry ruchliwości i może być zdolny do uzyskania stanu kapacytacji niezbędnego do przekroczenia barier oocytu, ale jeśli nie będzie się mógł związać z osłonką przejrzystą i dokończyć reakcji akrosomalnej, cała jego podróż będzie na marne. Byłoby bardzo korzystne, gdybyśmy mogli określać, które subpopulacje plemników nie są w stanie wejść w reakcję akrosomalną. Wiadomo z różnych prac [3,4,5], że tylko 15-45% prawidłowo ruchomych plemników wykorzystywanych w zapłodnieniu pozaustrojowym jest zdolnych do reakcji akrosomalnej w warunkach *in vitro*. Dalsze prace badające wiązanie plemnik–osłonka [6,7,8] i reakcję akrosomalną po ekspozycji na rozpuszczoną osłonkę przejrzystą tylko potwierdzają te obserwacje. Dlatego też zdolność do przewidywania, czy dany plemnik byłby zdolny do pełnego procesu

zapłodnienia, miałyby duże znaczenie w diagnostyce i leczeniu wcześniej niewyjaśnionych przypadków niepłodności.

Swoista hipoglikozylowana izoforma dopełniacza regulatora białka kofaktora błonowego (*membrane cofactor protein* – MCP; CD46) umiejscowiona jest na wewnętrznej błonie akrosomalnej plemnika. Błona ta zostaje odsłonięta po wystąpieniu reakcji akrosomalnej, zjawisku egzocytozy występującym po kontakcie z osłonką przejrzystą komórki jajowej. MCP odgrywa znaczącą rolę w procesie rozmnażania [9]. Ekspresja MCP na ludzkich plemnikach jest ściśle ograniczona do wewnętrznej błony akrosomalnej [10,11]. Zmiany w ekspresji MCP na plemnikach zostały powiązane z niepłodnością [12,13], ponieważ MCP może być celem dla przeciwciał przeciwplemnikowych [14]. Inna hipoteza sygnalizuje zdolności MCP, szczególnie do wywoływania przepływu jonów wapnia przez wewnętrzną błonę akrosomalną [9]. Kolejna hipoteza dotyczy jego funkcji dopełniaczowo-regulatorowej, dzięki której może ochraniać plemnik, który wszedł już w reakcję akrosomalną podczas ostatnich etapów zapłodnienia.

Reakcja akrosomalna ludzkich plemników w przeciwieństwie do plemników innych ssaków jest trudna do obserwacji przy użyciu konwencjonalnych metod mikroskopowych [15]. Idealną metodą do oceny reakcji akrosomalnej ludzkich plemników jest mikroskopia elektronowa [16], ale niestety jest to metoda zbyt czasochłonna, skomplikowana i kosztowna, aby móc ją wykorzystywać w rutynowej diagnostyce. Cytometria przepływowa jest wykorzystywana do badania reakcji akrosomalnej ssaków [17] i była połączona z metodą wykorzystującą lektyny związane z FITC do badania ludzkiej reakcji akrosomalnej [18]. Przeciwciała CD46, znane także jako proteina kofaktora błonowego [19,20,21], wiąże antygeny występujące na wewnętrznej błonie akrosomu plemnika [22]. Wykorzystanie przeciwciał CD46 w połączeniu z cytometrią przepływową może dostarczyć szybkiego testu do rutynowej oceny reakcji akrosomalnej [22].

Większość autorów zgadza się co do roli, jaką odgrywa reakcja akrosomalna podczas penetracji plemnika na powierzchni osłonki przejrzystej komórki jajowej [23]. Jeśli reakcja akrosomalna występuje poza cumulusem, plemnik nie może migrować przez błonę, ponieważ plemniki, które wejdą w reakcję akrosomalną, żyją krótko. Reakcja akrosomalna obejmuje zmiany zachodzące w różnych błonach główki plemnika. Najpierw błona plazmatyczna znad akrosomu łączy się z leżącą poniżej zewnętrzną błoną akrosomalną. To połączenie prowadzi do powstania układu pęcherzyków hybrydowych, które ostatecznie są usuwane podczas przechodzenia plemnika przez osłonkę przejrzystą. Jedną z konsekwencji fuzji jest wydzielenie substancji rozpuszczalnej – proteazy plemnikowej (akrozyna), która może trawić składniki osłonki przejrzystej. Wraz ze wzrostem propulsji wtkowej plemnik zostaje przeprowadzony przez osłonkę przejrzystą. Każdy plemnik penetrujący komórkę jajową tworzy szczelinę penetracyjną, przez którą uzyskuje dostęp do przestrzeni okołozótkowej. Szczelina utworzona przez plemnik penetrujący do przestrzeni okołozótkowej może być rozpoznana przez rozpad osłonki przejrzystej w miejscu jego penetracji i pojawieniu się w tej okolicy związanego z plemnikiem trypsynopodobnego enzymu – akro-

zyny. Wigor samych plemników przy jednoczesnej nieobecności enzymów jest uważany za wystarczający do penetracji osłonki przejrzystej komórki jajowej [24]. Jednakże α -akrozyna (proakrozyna) mająca wysoką masę cząsteczkową może odgrywać także rolę proteiny wiążącej osłonkę. Inną sugerowaną funkcją proakrozyny jest drugorzędowe wiązanie do osłonki przejrzystej przez plemnik będący w trakcie reakcji akrosomalnej, angażującej proteinę osłonkową ZP2 [7,25].

Cytometria przepływowa rozwija się od 40 lat. Powstała początkowo jako metoda liczenia komórek, następnie również określania ich rozmiarów, aż osiągnęła poziom wyrafinowanego narzędzia do wieloparametrowej oceny biochemicznych i fizycznych właściwości komórek lub ich składowych [17].

Działanie cytometru można streścić następująco: znakowane komórki są pompowane pod niewielkim ciśnieniem do strefy pomiaru, gdzie następnie są nasświetlane dokładnie zogniskowaną wiązką laserową. Komórki rozpraszają światło i jednocześnie pobudzone są fluorochromy przyłączone do komórki. W każdym przypadku mierzone jest natężenie światła za pomocą specjalnych detektorów. Powstałe tam sygnały elektryczne są wzmacniane, formowane i przesyłane do komputera w celu dalszej obróbki, przechowywania i analizy. Proces ten zachodzi z dużą prędkością – od kilkuset do kilku tysięcy komórek na sekundę.

W cytometrze przepływowym można wyróżnić trzy główne układy:

1. Układ transportu cieczy i powiązany z nim układ powietrzny.
2. Układ optyczny.
3. Układ elektroniki.

Zadaniem układu powietrznego jest wytworzenie podciśnienia w zbiorniku z cieczą ogniskującą i w probówce z zawiesiną komórek. Układ transportu cieczy doprowadza ciecz ogniskującą do odpowiednio ukształtowanej dyszy pomiarowej, do której również powoli wstrzykiwana jest próbka. Na zasadzie ogniskowania hydrodynamicznego komórki są formowane w cienki strumień, który podąża w kierunku wiązki laserowej. Po pomiarze komórki i ciecz otaczająca przemieszczane są do pojemnika zbierają-

cego odpadki. Stabilność tego układu decyduje o jakości pomiaru.

Na układ optyczny składa się źródło światła – laser, układ kształtujący i ogniskujący wiązkę laserową na komórce oraz optyka zbierająca. Jej zadaniem jest odfiltrowywanie poszczególnych długości fal oraz zogniskowanie promieni świetlnych na fotokatodzie detektorów.

W nowoczesnych instrumentach jako źródła światła wykorzystuje się lasery. Światło, które one emitują, jest monochromatyczne, spójne, spolaryzowane pionowo, o małej średnicy wiązki i o wystarczającym natężeniu. W wielu laserach można zmieniać energię wiązki w szerokim zakresie od kilku mW do setek mW. W zależności od potrzeb używamy laserów emitujących światło o różnych długościach fal – od UV, poprzez światło niebieskie, zielonożółte, czerwone. Najczęściej w cytometrii używa się laserów argonowych, kryptonowych lub korzystających z mieszanin gazów np. Ar-Ne, He-Ne.

Ponieważ widmo fluorescencji jest przeważnie szerokie, aby umożliwić jednoczesny pomiar w dwóch lub trzech kolorach musimy stosować filtry przepuszczające tylko pożądane długości fal.

Filtry dzielimy na dwa typy:

1. Absorbcyjne.
2. Interferencyjne.

Filtry absorbcyjne są wykonane ze szkła napyłonego warstwą materiału pochłaniającego pewien zakres widma, a przepuszczającego pozostały. Są to filtry tania. Najczęściej używa się ich jako filtrów odcinających.

Działanie filtrów interferencyjnych polega na tym, że światło na takim filtrze ulega interferencji. Pewne długości fal są wzmacniane, inne wytłumiane. Filtry te należą do grupy filtrów pasmowych. W cytometrii używa się też zwierciadeł dichroicznych. Ustawiane są one pod kątem 45° do wiązki światła. Pewien zakres widma ulega odbiciu, reszta jest przepuszczana. Są one wykorzystywane do zmiany kierunku wiązki o 90° [26].

Jako detektorów używa się fotopowielaczy lub fotodiody.

Impuls z fotopowielacza przechodzi przez przedwzmacniacz znajdujący się zaraz za fotopowielaczem.

Jego zadaniem jest zamiana sygnału prądowego na napięciowy. Dzięki temu impuls może dotrzeć po kablu koncentrycznym do wzmacniacza. Można wybrać wzmocnienie logarytmiczne lub liniowe z dokładną regulacją. Stąd sygnał wędruje do układu odczytującego wartość szczytową każdego impulsu, porównuje ją z nastawionym progiem rejestracji i w przypadku gdy sygnał przekracza tę wartość, kieruje go do przetwornika analogowo-cyfrowego. Po przekształceniu sygnału na postać cyfrową jest on wysyłany do komputera celem dalszej analizy i przechowywania [26].

Współczesne cytometry mogą mierzyć kilka parametrów jednocześnie. Podstawowym pomiarem jest rejestrowanie światła rozproszonego na komórce oraz światła wysyłanego przez wzbudzony fluorochrom. Dwa detektory mierzą światło rozproszone. Pierwszy z nich rejestruje rozproszenie do przodu w niewielki kąt. Wielkość tę oznaczamy symbolem FSC (*forward scatter*). Drugi detektor rejestruje rozproszenie pod kątem 90° i oznaczamy tę wielkość symbolem SSC (*side scatter*). Jeśli analizujemy komórki w przestrzeni dwuwymiarowej w układzie FSC vs. SSC, to możemy je różnicować. FSC rozdziela komórki ze względu na ich wielkość, a SSC ze względu na ich kształt i wewnętrzną ziarnistość. Oprócz parametrów opisujących rozproszenie światła istotnym pomiarem jest ocena intensywności fluorescencji. W zależności od aparatu mamy różne ilości detektorów dla fluorescencji. Minimalnie powinny być dwa detektory. Najczęściej przy jednowiązkowym sposobie wzbudzania światła używa się trzech detektorów: FL1, FL2, FL3. Gdy dysponujemy drugą wiązką światła, możemy korzystać z bardziej skomplikowanego systemu zawierającego dodatkowe detektory: FL4 i FL5. Detektory są przydzielane poszczególnym kolorom lub mogą być dowolnie konfigurowane. Dodatkowo można otrzymywać parametry wyliczane z kształtu impulsów fluorescencji [27].

Integralną i niezbędną częścią każdego cytometru jest system komputerowy wraz z oprogramowaniem. Każda firma produkująca cytometr opracowała własny zestaw programów do zbierania i analizy danych. Część programu przeznaczona do zbierania danych powinna zawierać:

- moduł umożliwiający ustawianie napięcia na fotopowielaczach, wzmocnienia, kompensacji kolorów oraz dostarczający informacje o aktualnym stanie urządzenia;
- moduł rejestrujący próbki – dane pacjenta, preparatu i badania, nazwa zbioru, pod którym zbieramy dane, ilość zbieranych komórek;
- moduł pozwalający na bieżąco obserwować proces gromadzenia danych w różnych współrzędnych (FSC, SSC, FL1) oraz na bieżąco wybierać populacje komórek, które nas interesują – tzw. bramkowanie poprzez tworzenie regionów i ich logicznych połączeń [28].

Część programu służąca do analizy pozwala na wszechstronną obróbkę danych. Do ich zobrazowania stosuje się kilka typów wykresów:

- jednowymiarowe – histogram;
- dwuwymiarowe (wykres kropkowy – *dot plot*, wykres gęstości – *density plot*, wykres konturowy – *contour plot*);
- trójwymiarowe (wykres perspektywiczny).

Podczas analizy możliwe jest bramkowanie, ilościowa ocena komórek w każdym regionie, wyliczanie podstawowych wielkości statystycznych [29,30,31].

Wykrywanie cytometrem przepływowym reakcji akrosomalnej wzbudzonych ludzkich plemników przy użyciu przeciwciał monoklonalnych [32] oraz wiązaniu lektyn z matrycą akrosomalną [33,34] zostało opisane wcześniej przez wielu autorów i uznane za najdokładniejszą metodę oceny reakcji akrosomalnej [17].

Wielu z badaczy, którzy skupili się na sekwencji zmian związanych z reakcją akrosomalną [35], pokazało, że pierwsza faza reakcji akrosomalnej, która może być wizualizowana za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, jest związana z obecnością plemników z wciąż jeszcze nietkniętym akrosomem podczas barwienia.

Wywoływanie reakcji akrosomalnej poprzez jonofor wapnia nie jest procesem fizjologicznym, jednakże test ARIC (*acrosome reaction to ionophore challenge*) [36] jest polecany jako praktyczny test w diagnostyce niepłodności, ponieważ znaleziono korelację pomiędzy odpowiedzią ludzkich plemników na jonofor wapnia a ich zdolnością do zapłodnienia.

Cytometria przepływowa jest metodą umożliwiającą nie tylko wykrywanie subpopulacji plemników, w których wystąpiła lub nie wystąpiła reakcja akrosomalna, ale także ilościową ocenę ich morfologii, funkcji i parametrów metabolicznych. Brook wykazał występowanie dwóch subpopulacji ludzkich plemników z różnym wewnątrzkomórkowym pH uzyskanym po stymulacji reakcji akrosomalnej jonoforem wapnia [37]. Różnice w poziomach wewnątrzkomórkowego wapnia zostały opisane na dwóch subpopulacjach komórek po indukcji reakcji akrosomalnej plemników byka i knura [38,39]. Oczywiście jest, że cytometria przepływowa może mieć duże zastosowanie w badaniu mechanizmów reakcji akrosomalnej oraz jej nieprawidłowości, które mogą mieć wpływ na płodność.

Piśmiennictwo

3. Wassarman PM. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 1987; 235: 553-560.
4. Wassarman PM. The zona pellucida: a coat of many colors. *BioEssays* 1987; 6: 161-166.
5. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 1986; 15: 213-226.
6. De Jonge CJ, Mack SR, Zaneveld LJD. Synchronous assay for human sperm capacitation and the acrosome reaction. *J Androl.* 1989; 10: 232-239.
7. Takahashi K, Wetzels AM, Goverde HJ, Bastans BA, Janssen HJ, Rolland R. The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with in vitro fertilization. *Fertil. Steril* 1992; 57: 889-894.
8. Lee TH, Liu CH, Shih YT, Tsao HM, Huang CC, Chen HH, Lee MS. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum. Reprod.* 2010;25(4):839-46.
9. Falzone N, Huyser C, Franken DR. Comparison between propidium iodide and 7-amino-actinomycin-D for viability assessment during flow cytometric analyses of the human sperm acrosome. *Andrologia* 2010; 42(1): 20-6.

10. Giancesello L, Ferlin A, Menegazzo M, Pepe A, Foresta C. RXFP1 is expressed on the sperm acrosome, and relaxin stimulates the acrosomal reaction of human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1160: 192-3.
11. Riley-Vargas RC, Atkinson JP. Expression of membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa: just a complement inhibitor? *Modern Aspects of Immunobiology* 2003; 3: 75-78.
12. Anderson DJ, Michaelson JS, Johnson PM. Trophoblast/leukocyte-common antigen is expressed by human testicular germ cells and appears on the surface of acrosome-reacted sperm. *Biol. Reprod* 1989; 41: 285-293
13. Fenichel P, Dohr G, Grivaux C, Cervoni F, Donzeau M, His BL. Localization and characterization of the acrosomal antigen recognized by GB24 on human spermatozoa. *Mol.Reprod. Dev.* 1990; 27: 173-178.
14. Kitamura M, Matsumija K, Yamanaka M, Takahara S, Hara T, Matsomoto M et al. Possible association of infertility with sperm-specific abnormality of CD46. *J. Reprod. Immunol.* 1997; 33: 83-88.
15. Nomura M, Kitamura M, Matsumiya K, Tsujimura A, Okuyama A, Matsumoto M et al. Genomic analysis of idiopathic infertile patients with sperm-specific depletion of CD46. *Exp Clin Immunogenet* 2001; 18: 42-50.
16. Jiang H, Pillai S. Complement regulatory proteins on the sperm surface: relevance to sperm motility. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39: 243-248.
17. Anderson DJ, Abbot AF, Jack RM. The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc Natl Acad SCI USA* 1993; 90: 10051-10055.
18. Morales P, Vigil P, Franken DR, Kaskar K, Coetzee K, Kruger TF. Sperm oocyte interactions: studies on the kinetics of zona pellucida binding and acrosome reaction of human spermatozoa. *Andrologia* 1994; 26: 131-137.
19. Stock CE, Fraser LR. The acrosom reaction of human sperm from men of proven fertility. *Hum Reprod* 1987; 2: 109-119.
20. Garrido N, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Flow cytometry in human reproductive biology. *Gynecol Endocrinol.* 2002; 16(6): 505-21.
21. Purvis K, Rui H, Scholberg A, Hesla S et al. Application of flow cytometry to studies on the human acrosome. *J Androl* 1990; 11: 361-366.
22. Ballard LL, Seya T, Teckman J, Lublin DM, Atkinson JP. A polymorphism of the complement regulatory protein MCP (membrane cofactor protein or gp 45-70). *J Immunol* 1987; 138: 3850-3855.
23. Ballard LL, Bora NS, Yu GH, Atkinson JP. Biochemical characterization of membrane cofactor protein of the complement system. *J Immunol* 1988;141:3923-3929.
24. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 1991;9:431-455.
25. D'Cruz OJ, Haas GG. Flow cytometric quantitation of the expression of membrane cofactor protein as a marker for the human sperm acrosome reaction. *Fertil Steril* 1992;58:633-636.
26. Riley-Vargas RC, Lanzendorf S, Atkinson JP. Targeted and restricted complement activation on acrosome-reacted spermatozoa. *J Clin Invest* 2005;115(5):1241-9.
27. Lampiao F, du Plessis SS. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. *Asian J Androl* 2008;10(5):799-807.
28. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 2002; 48: 1819-1827.
29. Watson JV. The early fluidic and optical physics of cytometry. *Cytometry* 1999; 38: 2-14.
30. Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn M. *Flow cytometry and Sorting.* Wiley-Liss, New York 1990.
31. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 2002; 48: 1819-1827.
32. Herzenberg LA. FACS innovation: a view from Stanford *Clin Invest. Med* 2004; 5: 240-25.
33. Roliński J. Monitoring minimal residual disease by the flow cytometry methods. *Appl Biol Commun* 1996; 6: 135-143.
34. Bohring C, Skrzypek J, Krause W. Influence of antisperm antibodies on the acrosome reaction as determined by flow cytometry. *Fertil Steril* 2001; 76(2): 275-80.
35. Henley N, Baron C, Roberts KD. Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human

- spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain. *Int J Androl* 1994; 17: 78-84.
36. Miyazaki R, Fukuda M, Tekeuchi H, Itoh S, Takada M. Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Arch Androl* 1990; 25: 243-251.
37. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9: 367-376.
38. Brook PF, Lawry J, Cooke ID, Barratt CL. Measurement of intracellular pH in human spermatozoa by flow cytometry with the benzo[c]xanthene dye SNAFL-1: a novel, single excitation, dual emission, molecular probe. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 18-25.
39. Harrison RAP, Mairet B, Miller NG. Flow cytometric studies of bicarbonate-medium Ca²⁺ influx in boar sperm populations. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 197-208.
40. Nolan JP, Graham JK, Hammerstedt RH. Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Arch Biochem Biophys* 1992; 292: 311-322.
41. Carver-Ward JA, Jaroudi KA, Einspenner M, Parthar RS, Al-Sedairy ST, Sheth KV. Pentoxifylline potentiates ionophore (A23187) mediated acrosome reaction in human sperm: flow cytometric analysis using CD46 antibody. *Hum Reprod* 1994; 9: 71-76.