

**UJI BANDING MENGGUNAKAN HFF, WHS, DAN HSA SEBAGAI
SUPLEMEN MEDIA KAPASITASI IN-VITRO SPERMATOZOA**

oleh:

Julius Ch. Yapri¹

ABSTRACT

A Comparative study of HFF, WHS and HSA supplements in in-vitro capacitation of sperm.

In-vitro capacitation of sperm that yield hyperactivation (HA) was influenced by supplement added in medium of capacitation. HA will give good effect in in-vitro fertilization. The objective of this study is to compare the percentage of hyperactivated sperm in in-vitro capacitation by different supplemental cultural Earle's medium, with HFF (Human follicular fluid), WHS (Whole human serum), and HSA (Human serum albumin).

Samples were collected from donors, six normozoospermic and six oligoasthenozoospermic sperm specimen with negative antisperm antibody. Study was done by semen analysis, washing the semen twice, swim up, and incubated in Earle's medium with different supplement added in 37°C for 30 minutes and 4 hours, and then observation of the percentage of sperm HA was done after incubation. Analysis of variance was used with significancy (α) = 0,05 ; and contrast test.

WHS supplemented medium gave the highest percentage of sperm HA compared with HFF and HSA in thirty minutes also in 4 hours incubation. WHS was a better supplemental cultural medium capacitation compared with HFF and HSA.

Key words : HFF, WHS, HSA, In-vitro capacitation spermatozoa.

-
1. *Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara* (Dr. Julius Ch. Yapri, M Kes.)

Correspondence to : Dr. Julius Ch. Yapri, M Kes. Departement of Biology, Faculty of Medicine, Tarumanagara University, Jl. Let. Jend. S. Parman No. 1, Jakarta 11440, Indonesia.

ABSTRAK

Uji banding menggunakan HFF, WHS, dan HSA, sebagai suplemen media kapasitas in-vitro spermatozoa.

Kapasitasi in-vitro spermatozoa yang menyebabkan hiperaktifasi (HA) dipengaruhi oleh suplemen yang ditambahkan pada media kapasitas. HA ini akan mempengaruhi keberhasilan fertilisasi in-vitro. Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan persentase hiperaktifasi (HA) spermatozoa pada kapasitas in-vitro, dengan memakai medium Earle yang diberi suplemen HFF (Human follicular fluid), WHS (Whole human serum), dan HSA (Human serum albumin).

Sampel diperoleh dari donor, enam contoh semen normozoospermia dan 6 oligo-astenoospermia dengan kandungan ASA (Antisperm Antibody) negatif. Dilakukan analisis semen, pencucian 2 kali, uji renang naik, dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama 30 menit dan 4 jam. Kemudian pengamatan terhadap persentase HA dilakukan pada masa inkubasi 30 menit dan 4 jam. Analisis data memakai analisis varians dengan signficancy (α) = 0,05 ; dan uji kontras.

Suplemen WHS memberikan persentase HA paling besar dibandingkan dengan suplemen HFF dan HSA ; baik pada inkubasi selama 30 menit maupun 4 jam. Jadi sebagai suplemen media kapasitas in-vitro, WHS lebih baik dibandingkan dengan HFF dan HSA.

Kata-kata kunci: HFF, WHS, HSA, Kapasitas in-vitro, Spermatozoa

PENDAHULUAN

nfertilitas dapat diartikan sebagai suatu keadaan dimana istri yang dengan sanggama teratur belum juga hamil walau dihadapkan pada kemungkinan hamil selama 12 bulan berturut-turut. ⁽¹⁾ *Arsyad* dalam penelitiannya tahun 1994 mendapatkan faktor penyebab infertilitas pada pria sebesar 48,4 % ⁽²⁾ ; Sedangkan *Soebijanto* pada tahun 1993 mendapatkan angka 40 %. ⁽³⁾ *Jacob* mengatakan bahwa infertilitas idiopatik dapat disebabkan oleh kegagalan fertilisasi. ⁽⁴⁾

Sebagaimana diketahui bahwa terdapat proses yang mendahului proses pembuahan yaitu kapasitas spermatozoa. Kapasitas adalah serangkaian proses yang dialami spermatozoa di dalam saluran reproduksi wanita, sehingga spermatozoa menjadi berkemampuan untuk membuahi ovum. Kapasitas menghasilkan hiperaktifasi (HA) spermatozoa yang memberi gambaran hipermotilitas, yang penting artinya dalam mempercepat transport spermatozoa di saluran reproduksi wanita dan juga penetrasinya ke dalam ovum. Selain itu kapasitas menyebabkan spermatozoa mengadakan reaksi akrosom. Hanya spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom saja yang dapat mengeluarkan enzim-enzim akrosom, dimana enzim-enzim tersebut digunakan oleh spermatozoa untuk menembus kumulus ooforus, korona radiata, dan zona pellusida dari ovum, untuk selanjutnya masuk ke ooplasma

ovum sehingga terjadi fusi.

Teknologi bantu reproduksi makin lama makin berkembang, di antaranya adalah program inseminasi intra uterin, Fertilisasi *in-vitro* (FIV), dan GIFT (*Gamet intra fallopian transfer*). Soebijanto tahun 1993 mengatakan bahwa tingkat keberhasilan FIV di cawan petri yang terbaik saat ini adalah antara 70 - 80 % ⁽³⁾ ; sedangkan Quigley tahun 1990 mendapatkan bahwa tingkat keberhasilan GIFT adalah sebesar 25 - 27 % . ⁽⁵⁾

Dalam teknologi bantu reproduksi diperlukan suatu tindakan kapasitasi *in-vitro*, yang kemudian dilanjutkan dengan tindakan inseminasi *in-vitro* (= mempertemukan spermatozoa dengan ovum) ; dimana pada saat itu diperlukan keadaan spermatozoa yang hiperaktifasi. Dengan demikian faktor yang dapat menentukan keberhasilan suatu fertilisasi secara *in-vitro* maupun *in-vivo* adalah kapasitasi.

Dikenal terdapat berbagai suplemen yang dapat meningkatkan kapasitasi secara *in-vitro*, antara lain : ⁽¹⁾ Ion kalsium dan bikarbonat ⁽⁶⁾; ⁽²⁾ *Human follicular fluid* (HFF) ^(7,8) ; ⁽³⁾ *Bovine serum albumin* (BSA) ⁽⁹⁾; ⁽⁴⁾ Serum (WHS = *Whole human serum*)⁽¹⁰⁾ ; ⁽⁵⁾ Kalsium ionosfor A 23187. ⁽¹¹⁾ Selain itu diketahui bahwa adanya ASA (*antisperm antibody*) dapat mengganggu proses kapasitasi. ⁽¹²⁾ Zaneveld dkk. mengatakan bahwa kapasitasi memerlukan estrogen. ⁽¹³⁾ Selain itu banyak peneliti mengatakan bahwa proses kapasitasi juga membutuhkan progesteron.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari suplemen media kapasitasi *in-vitro* terbaik antara HFF, WHS, dan HSA dalam rangka menentukan prosedur baku teknologi bantu reproduksi.

BAHAN DAN CARA

Sampel diperoleh dari ejakulat yang telah mengalami analisis semen dan uji MAR, sehingga didapatkan semen normozoospermia dan oligo-astenozoospermia, dengan ASA negatif, masing-masing sebanyak 6 buah. Dari ke 6 sampel normozoospermia masing-masing dibagi ke dalam 3 botol, sehingga diperoleh 3 kelompok botol dimana masing-masing kelompok terdiri dari ke 6 sampel normozoospermia tadi, masing-masing sebanyak 0,5 ml. Kemudian ke dalam masing-masing botol kelompok pertama ditambahkan 1,5 ml campuran medium *Earle* dengan HFF ; ke dalam masing-masing botol kelompok kedua ditambahkan 1,5 campuran medium *Earle* dengan WHS ; ke dalam masing-masing botol kelompok ketiga ditambahkan 1,5 ml campuran medium *Earle* dengan HSA. Hal yang sama dilakukan pula pada ke 6 sampel oligo-astenozoospermia. Selanjutnya terhadap isi masing-masing botol dilakukan pencucian sebanyak dua kali, kemudian dilakukan uji renang naik. Setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu 37°C dan dibaca hiperaktifitasnya berturut-turut setelah 30 menit dan 4 jam. Persentase HA dihitung per 100 spermatozoa, dengan menentukan jumlah jenis motilitasnya yaitu jenis HA (*whiplast, thrasing*, dan *star spin*), non HA dan *immotil*. Analisis data dilakukan dengan ANAVA dengan

$\alpha = 0,05$ dan uji *contrast*

WHS yang siap pakai diperoleh dengan cara pengambilan darah vena sebanyak 25 cc pada hari ke 9 (fase folikuler) pada wanita yang menjalankan induksi ovulasi kemudian diendapkan. Cairan bening di atasnya diambil dan disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Bagian atas yang bening diambil kemudian didekomplementasikan dalam *water bath* pada suhu 56 °C selama 30 menit. Akhirnya disaring dengan filter steril berukuran 0,22 μ m. Hasil saringan itulah yang disebut dengan WHS siap pakai, kemudian disimpan dalam lemari es bila belum dipakai.

HFF yang siap pakai diperoleh selama aspirasi ovum, diendapkan, dan bagian yang bening diambil. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Bagian atas yang bening diambil, kemudian dilakukan dekomplementasi pada *water bath* suhu 56 °C selama 30 menit. Cara seterusnya sama seperti pada pengambilan WHS. HSA diperoleh dalam bentuk jadi. Medium Earle dibuat dengan cara sebagai berikut : Kristal Earle 1,768 gr, penicillin 0,016 gr, dan natrium piruvat 0,02 gr, dilarutkan dalam cairan analar sebanyak $\pm$ 190 cc. Kemudian ditambahkan natrium bikarbonat 0,42 gr. Saring dengan filter ukuran 0,22 μ m. Akhirnya diukur osmolaritasnya sampai menjadi 280-285 μ osmolar/kg, dan pH sekitar 7,2 -7,4.

HASIL

Diperoleh data-data persentase HA sebagai berikut :

TABEL 1 :

Rangkuman % Hiperaktifasi Spermatozoa pada inkubasi 30 menit dan 4 jam pada masing-masing medium yang disuplementasikan :

	n	0,5 jam			4 jam		
		HFF	WHS	HSA	HFF	WHS	HSA
NORMOZOOSPERMIA (N)	1	72	85	82	45	64	60
	2	59	80	70	47	56	21
	3	52	81	60	47	58	48
	4	77	89	80	62	76	64
	5	75	82	77	62	66	55
	6	80	82	75	68	71	70
KEL. N		66,167	83,167	74	55,167	65,167	53
MEAN		11,125	3,312	8,025	9,948	7,6	17,39
SD		WHS > HFF p = 0,017 WHS > HSA p = 0,017			WHS > HFF p = 0,01 WHS > HSA p = 0,055		

	n	0,5 jam			4 jam		
		HFF	WHS	HSA	HFF	WHS	HSA
OLIGO-ASTENO-ZOOSPERMIA (OAT)	1	36	61	45	31	57	23
	2	75	86	87	61	77	68
	3	58	65	59	43	57	55
	4	57	69	83	10	58	47
	5	60	80	60	27	51	13
	6	73	89	78	67	79	69
KEL. OAT		59,833	75	65,333	39,833	63,167	45,833
MEAN		14,02	11,61	14,949	21,582	11,771	23,293
SD		WHS > HFF—p = 0,002			WHS > HFF—p = 0,008		
		WHS > HSA—p = 0,026			WHS > HSA—p = 0,035		

Setelah inkubasi selama 30 menit, pada kelompok normozoospermia, persentase HA pada WHS ternyata lebih besar dari pada HFF dengan berbeda bermakna ($p = 0,017$); dan juga lebih besar dari pada HSA dengan berbeda bermakna ($p = 0,017$). Jadi persentase HA tertinggi terjadi pada media yang diberi suplemen WHS. Pada kelompok oligoastenozoospermia, persentase HA pada WHS lebih besar dari pada HFF dengan berbeda sangat bermakna ($p = 0,002$); dan juga lebih besar dari pada HSA dengan berbeda bermakna ($p = 0,026$). Jadi persentase HA tertinggi terjadi pada media yang diberi suplemen WHS.

Setelah inkubasi selama 4 jam pada kelompok normozoospermia persentase HA pada WHS ternyata lebih besar dari pada HFF dengan berbeda bermakna ($p = 0,01$); dan juga lebih besar dari pada HSA, ($p = 0,055$). Jadi persentase HA tertinggi terjadi pada media yang diberi suplemen WHS. Pada kelompok oligoastenozoospermia persentase HA pada WHS lebih besar dari pada HFF dengan berbeda sangat bermakna ($p = 0,008$); dan juga lebih besar dari pada HSA dengan berbeda bermakna ($p = 0,035$). Jadi persentase HA tertinggi terjadi pada media yang diberi suplemen WHS.

Dengan demikian nampak bahwa suplemen WHS memberikan persentase HA yang paling besar dibandingkan dengan suplemen HFF maupun HSA, pada kelompok normozoospermia maupun oligo-astenozoospermia.

PEMBAHASAN

Dalam keadaan normal untuk menjadi fertil, spermatozoa harus mengalami kapasitasasi(14-16) yaitu serangkaian proses yang terjadi di dalam saluran reproduksi wanita, yang menjadikan spermatozoa mampu membuahi *ovum*. Proses kapasitasasi ini terjadi dengan pelepasan faktor-faktor dekapasitasi yang melekat pada permukaan membran plasma spermatozoa.

Zeneveld dkk. mengatakan bahwa membran plasma spermatozoa berada dalam keadaan stabil disebabkan adanya rasio kolesterol dengan fosfolipid yang normal. Bila rasio ini berubah, misalnya kolesterol ditarik keluar, maka terjadi pergeseran-

pergeseran lipid dan protein di membran plasma hal ini menyebabkan membran tidak stabil dan menjadi lebih permeabel, sehingga terjadi penyatuan membran luar akrosom dengan membran plasma, dan kemudian terbentuk pori-pori⁽¹³⁾; proses ini disebut dengan kapasitasi. Plasma semen dapat menjadi sumber kolesterol bagi spermatozoa, sehingga keadaan kapasitasi dapat secara *reversible* menjadi dekapasitasi.

Kapasitasi menyebabkan terjadinya hiperaktifasi (HA) spermatozoa⁽⁷⁾, yang penting untuk mempercepat transport spermatozoa di dalam saluran reproduksi wanita dan penetrasinya pada ovum. Kapasitasi yang berlangsung di uterus memerlukan bantuan hormon estrogen⁽¹³⁾ dan bila berlangsung di tuba memerlukan hormon progesteron.⁽³⁾

Burkman menggambarkan keadaan hiperaktifasi pada spermatozoa yang tampak pada gambaran mikroskopik, sebagai berikut: (a) *Wide amplitudo*, dapat dalam bentuk *Whiplast* (menyentak-nyentak) dan gerakan kepala ke lateral; (b) *Thrasing* (Berguling-guling); (c) *Star spin* (berputar-putar).⁽¹⁷⁾

HA adalah perubahan motilitas menjadi hipermotil, yang terjadi sebagai akibat adanya influks ion kalsium (masuknya ion kalsium ke intra seluler). *Uhler* dkk dan *Baldi* dkk meneliti bahwa progesteron dapat meningkatkan influks ion kalsium.^(18,19) *Tesarik* dkk, *Crozet* dan *Diaz* dkk mengatakan bahwa pada membran plasma spermatozoa terdapat reseptor yang dapat mengikat progesteron.⁽²⁰⁻²²⁾

Calvo dkk, *Feterolf* dkk dan *Fenichel* menyatakan bahwa HFF menyebabkan terjadinya kapasitasi spermatozoa dalam bentuk hiperaktifasi dan reaksi akrosom.^(7,23,24) Menurut *Hamamah* dkk HFF juga meningkatkan motilitas spermatozoa.⁽²⁵⁾ *Foresta* dkk juga mengatakan bahwa progesteron mencetuskan kapasitasi.⁽²⁶⁾ *Uhler* dkk meneliti bahwa progesteron menstimulasi hiperaktifasi spermatozoa manusia dalam waktu yang singkat yaitu 10 menit permulaan kapasitasi dengan konsentrasi progesteron 3,1 ng/ml; bila dosis progesteron ditingkatkan menjadi 10-100 kalinya, maka tidak akan terjadi peningkatan persentase HA secara bermakna.⁽¹⁸⁾ *Kulin* dkk mengatakan: Bila progesteron di dalam HFF dihilangkan, maka HFF tidak akan menimbulkan hiperaktifasi.⁽²⁷⁾ Dari hasil penelitian terdahulu dapat disimpulkan bahwa ternyata dalam HFF mengandung progesteron yang berperan dalam kapasitasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa WHS mengandung 0,68 ng/ml progesteron, 54,19 pg/ml estrogen dan 0,4 g/dl albumin; HFF mengandung > 400 ng/ml progesteron, 3.000 pg/ml estrogen, dan 0,3 g/dl albumin; HSA mengandung < 0,1 ng/ml progesteron, 2,12 pg/ml estrogen dan 0,3 g/dl albumin.

Jika pendapat mereka diterima, maka pilihan yang baik sebagai suplemen media kapasitasi adalah WHS dan HFF. Sedangkan penelitian ini menunjukkan bahwa suplemen WHS ternyata lebih baik dibandingkan dengan HFF maupun HSA pada inkubasi 0,5 jam maupun 4 jam; pada kelompok normozoospermia maupun oligo-astenozoospermia. Timbul dugaan bahwa kadar estrogen yang terlampau tinggi akan berakibat buruk bagi proses kapasitasi, hal ini dikuatkan dengan penelitian *Wang* tahun 1994 yang mengatakan bahwa belum dapat ditentukan peranan estrogen terhadap fungsi kapasitasi.⁽²⁸⁾ Dalam penelitian ini konsentrasi albumin pada ke tiga suplemen tidak mempengaruhi persentase hiperaktifasi, kadarnya hampir sama yaitu WHS = 0,4 g/dl, HFF = 0,3 g/dl, dan HSA = 0,3 g/dl.

Dengan demikian WHS dapat dipakai sebagai suplemen media kapasitas *in-vitro* yang utama dalam prosedur teknologi bantu reproduksi, misalnya : Inseminasi, FIV dan sebagainya. Mengenai mengapa HFF kurang baik dibandingkan dengan WHS, maka perlu suatu tindak lanjut berupa penelitian mengenai pengaruh estrogen terhadap kapasitas.

KESIMPULAN

WHS merupakan suplemen media kapasitas *in-vitro* terbaik dibandingkan dengan HFF dan HSA ;

SARAN

WHS dapat dipakai sebagai suplemen media kapasitas yang utama pada prosedur baku teknologi bantu reproduksi. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan estrogen dalam berbagai konsentrasi serta pengaruh anti estrogen terhadap kapasitas spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

1. Adimoelja A. Infertilitas, hormon seks, dan poros hipotalamus-pituitari- gonad. Program Pustaka Prodia. Seri Hormon Reproduksi 01. 1988
2. Arsyad KM. Penatalaksanaan infertilitas masa kini. Dexa Media, 1994; 7:6-11.
3. Soebijanto S. Pengaruh beberapa kondisi ginekologis/klinis, infeksi TORSH-KM lampau dan kondisi spermatozoa pada Fertilisasi In-vitro. Disertasi, Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1993.
4. Jacob T.Z. Faktor imunoendokrinologis dan seluler lingkungan mikro zaliir peritoneal yang berperan pada infertilitas idiopatik wanita. Disertasi, Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1990.
5. Quigley MM. In vitro fertilization-embryo transfer in the united stated : 1988 results from the IVF-ET registry. Fertil steril, 1990; 53: 13-20
6. Neill JM, Clarke PO. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. Gamete Research, 1987; 18: 121-40
7. Calvo L, Vantman 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: 1048-54
8. Liu DY, Baker HWG. Test of human sperm function and fertilization in vitro. Fertil steril, 1992; 58: 465-83
9. Dow MPD, Bavister BD. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. Gamete Research, 1989; 23: 171-80
10. Lamirande ED and Gagnon C. Quantitative assessment of the serum-induced stimulation of human sperm motility. International Journal of Andrology, 1991; 14 : 11-22
11. Pilikian S, Adeleine P, Czyba JC, Ecochard R, Guerin JF, Mimouni P. Hyperactivated motility of sperm from fertile donors and asthenozoospermic patiens before and after treatment with ionophore. Int. J Androl, 1991; 14 : 167-73
12. Zouari R, Almeida MD, Rodrigues D, Jouannet P. Localization of antibodies on spermatozoa and sperm movement characteristic are good predictors of in vitro fertilization succes in case of male autoimmune infertility. Fertil Steril. 1993; 59: 606-12
13. Zaneveld LJD, Jonge CJD, Anderson RA, Mack SR. Human sperm capacitation and the

- acrosome reaction. *J. Human reproduction*. 1991; 6:1265-74
14. Suhana N. Kapasitas dan reaksi akrosom dalam hubungannya dengan fertilisasi dan anti fertilisasi. Simposium Spermatologi. Surabaya : Perkumpulan Andrologi Indonesia, 1978: 390-5
15. Soupart P Fertilization. In : Hafez ESE (editor). *Human reproduction, con-ception and contraception*. 2nd edition Hagerstown : Harper & Row, 1980 : 453-87.
16. Soeradi O. Kapasitas sperma dan fertilisasi. Dalam : Jacob TZ, Soebijanto S, Tjokronegoro A (editor). *Penanganan infertilitas menuju fertilisasi in-vitro*. Prosiding Pra Kongres KOGI VII. Jakarta : Kelompok Studi Endokrinologi Reproduksi Indonesia. 1987 : 47-55
17. Burkman LJ. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation : Comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. *Archives of Andrology*. 1984; 13 : 153-65
18. Uhler ML, Leung A, Chan SYW, Wang C. Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil Steril*. 1992; 58 : 1191-8
19. Baldi E, Krausz C, Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M, Forti G. Actions of progesterone on human sperm : a model of non genomic effects of steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 1995; 53 (1-6) : 199-203
20. Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Carreras A. Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil Steril*, 1992; 58 (4) : 784-92.
21. Crozet N. Acrosome reaction and fertilization. *J. Contracept-Fertil-Sex*. 1994; 22(5): 328-30
22. Diaz CV, Martinez JA, Martinez LB, and Ortega FV. Progesterone induces human sperm chemotaxis. *Fertil Steril*, 1995; 64 : 1183-8
23. Fetterolf PM, Sutherland CS, Josephy PD, Casper RF, Tyson JE. Preliminary characterization of a factor in human follicular fluid that stimulates human spermatozoa motion. *Human Reproduction*, 1994; 9(8): 1505-11
24. Fenichel P. Why and how ameliorate capacitation without inducing in acrosome reaction ?. *J. Contraceptive Fertil-Sex*, 1994; 22(5): 319-24.
25. Hamamah S, Lanson M, Barthelemy C, Garrique MA, Lansac J, Muh JP, Royere D. Treatment of human spermatozoa with follicular fluid can influence lipid content and motility during in vitro capacitation. *Reprod. Nutr. Dev*. 1993; 33(5): 429 - 35
26. Foresta C, Rossato M, Mioni R, Zorzi M. Progesterone induces capacitation in human spermatozoa. *J. Andrologia*. 1992; 24(1): 33-5
27. Kulin S, Bastiaans BA, Hollanders HMG, Janssen HJG, Goverde HJM. Human serum and follicular fluid stimulate hyperactivation of human spermatozoa after preincubation. *Fertil Steril*, 1994; 62:1234-7
28. Wang G, Bhattacharyya N, Wilkerson C, Ramsammy RA, Eatman E, Anderson WA. Estrogen induced peroxidase secretion from the endometrial epithelium : a possible function for the luminal enzyme. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*. 1994; 26(3): 405-14