

Programma

9:00 - 9:50	Ontvangst en Koffie
	OCHTENDPROGRAMMA <i>Voorzitter: Dr. A.M.M. Wetzels</i>
9:50 - 10:00	Opening <i>Dr. F.A.L. van der Horst</i>
10:00 - 10:30	Spermatogenese: overzicht <i>Prof. dr. G.M.F. Verhoeven</i>
10:30 - 11:00	Vruchtbaarheid van de man <i>Dr. G.R. Dohle</i>
11:00 - 11:20	Het Y-chromosoom en fertiliteit <i>Dr. S. Repping</i>
11:20 - 11:40	Koffie
11:40 - 12:10	Spermakwaliteit en fertiliteit <i>Dr. R.F.A. Weber</i>
12:10 - 12:40	Ontwikkelingen bij semenonderzoek <i>Dr. J.C. Romijn</i>
12:40 - 13:20	Lunch
	MIDDAG PROGRAMMA <i>Voorzitter: Dr. R.F.A. Weber</i>
13:20 - 13:50	Kwaliteit wat nou kwaliteit? <i>Dr. F.A.L. van der Horst</i>
13:50 - 14:20	Semenparameters en ART <i>Dr. W. Ombelet</i>
14:20 - 14:40	Koffie/Thee
14:40 - 15:10	Klinische aspecten van ART <i>Prof. Dr. B.C.J.M. Fauser</i>
15:10 - 15:40	Zaad hoe nu verder? <i>Dr. A.M.M. Wetzels</i>
15:40	Sluiting en borrel

Tentoonstelling en Sponsors

Anthos Labtec BV

Beverlandseweg 54
1703 AX Heerhugowaard

Biomerieux BV

Boseind 15
5280 AB Boxtel

Diagnostic Products Corporation Nederland BV

Weidehek 53
4824 AT Breda

Lucron Bioproducts BV

Ovenberg 12
6596 DP Milsbeek

Roche Diagnostics Nederland BV

Transistorstraat 41
1322 CK Almere

Inhoud

Spermatogenese: overzicht <i>Prof. dr. G.M.F. Verhoeven</i>	7
Vruchtbaarheid van de man <i>Dr. G.R. Dohle</i>	17
Het Y-chromosoom en fertiliteit <i>Dr. S. Repping</i>	27
Spermakwaliteit en fertiliteit <i>Dr. R.F.A. Weber</i>	33
Ontwikkelingen bij semenonderzoek <i>Dr. J.C. Romijn</i>	39
Kwaliteit wat nou kwaliteit? <i>Dr. F.AL. van der Horst</i>	43
Semenparameters en ART <i>Dr. W. Ombelet</i>	49
Klinische aspecten van ART <i>Prof. Dr. B.C.J.M. Fauser</i>	61
Zaad hoe nu verder? <i>Dr. A.M.M. Wetzels</i>	63

Sprekers

Prof. dr. G.M.F. Verhoeven
Endocrinoloog
Katholieke Universiteit , Leuven

Dr. G.R. Dohle
Uroloog
Erasmus MC, Rotterdam

Dr. S. Repping
Klinisch Embryoloog
Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Dr. R.F.A. Weber
Androloog
Erasmus MC, Rotterdam

Dr. J.C. Romijn
Biochemicus
Erasmus MC, Rotterdam

Dr. F.AL. van der Horst
Klinisch Chemicus
St Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Dr. W. Ombelet
Gyneacoloog
St Jans Ziekenhuis, Genk

Prof. Dr. B.C.J.M. Fauser
Gyneacoloog
UMC, Utrecht

Dr. A.M.M. Wetzels
Klinisch Embryoloog
UMC St Radboud, Nijmegen

Voorwoord

In de westerse maatschappij heeft circa 15 % van de paren problemen met het vervullen van hun kindervens.

Het mannelijke aandeel heeft lange tijd in de schaduw gestaan van de diagnostische en therapeutische mogelijkheden die de vrouw konden worden geboden.

Als gevolg van nieuwe diagnostische en therapeutische opties neemt de laatste jaren de interesse in de mannelijke infertiliteit toe.

Deze interesse wordt verder aangewakkerd doordat eind vorige eeuw verontrustende artikelen verschenen in de wetenschappelijke- en lekenpers over de waarneming dat de zaadkwaliteit door de jaren heen achteruit zou zijn gegaan. Dit heeft onder andere geleid tot aandacht voor de rol van omgevingsfactoren, zoals de invloed van chemicaliën, op de mannelijke fertiliteit.

In de jaren negentig is tevens de belangstelling vanuit de verschillende laboratorium disciplines gewekt voor de kwaliteitsaspecten van zaadonderzoek. In Nederland is hierbij op verschillende gebieden een uniek samenwerkingsverband ontstaan tussen de klinische chemie, klinische embryologie en de andrologie, waarvan de onderlinge kruisbestuiving tot vruchtbare resultaten heeft geleid zoals het SKZL-kwaliteitsprogramma, de ESHRE-cursus en recent een gemeenschappelijke stuurgroep met als doel professionele aspecten verder te stroomlijnen.

De PAOKC-cursus is eveneens een gevolg van het bovengenoemde samenwerkingsverband. Bij de opzet van deze cursus is ervan uit gegaan om enkele voor de praktijk relevante onderwerpen te belichten op het gebied van de diagnostiek en therapie bij mannelijke subfertiliteit.

Frans A.L. van der Horst

Het organisatiecomité

Dr. F.A.L. van der Horst

St Antonius Ziekenhuis
Nieuwegein

Dr. H. Kemperman

Universitair Medisch Centrum Utrecht
Namens PAOKC-commissie van de NVKC

Dr. R.F.A. Weber

Erasmus Medisch Centrum
Rotterdam

Dr. A.M.M. Wetzels

Universitair Medisch Centrum St Radboud
Nijmegen

De PAOKC-cursus wordt georganiseerd onder auspiciën van de NVKC en de KLEM

Spermatogenese: overzicht

G.M.F. VERHOEVEN

*Laboratorium voor experimentele geneeskunde en endocrinologie,
Katholieke Universiteit, Leuven*

Spermatogenese is zonder twijfel één van de meest complexe processen in ons organisme. De enorme vooruitgang in celbiologische en moleculair-biologische technieken maakt het langzamerhand mogelijk dit proces niet alleen fenomenologisch, maar ook mechanistisch te analyseren, zelfs tot op moleculair niveau. In deze bijdrage wordt getracht dit te illustreren aan de hand van enkele gebieden waarop recentelijk aanzienlijke vooruitgang werd geboekt. Achtereenvolgens komen aan de orde: de belangrijkste determinanten van spermatogene capaciteit, de rol van apoptose, de relatieve bijdrage van hormonale en lokale controlemechanismen, de mogelijkheid tot transplantatie van germinale stamcellen, en de toenemende kennis van spermatogene genen. Het is duidelijk dat veel van deze recente kennis gestoeld is op studies in diermodellen. De opmerkelijke conservatie van talrijke basiselementen in de spermatogenese van *Drosophila* tot de mens laat echter vermoeden dat deze nieuwe inzichten en verworvenheden weldra vertaald zullen worden in bijkomende diagnostische en therapeutische mogelijkheden voor de mens.

Inleiding

Mannelijke organismen investeren veel energie in hun fertiliteit. Vanaf de puberteit worden continu grote hoeveelheden zaadcellen aangemaakt via een uniek proces van proliferatie en differentiatie waarbij diploïde stamcellen (spermatogonia) zich uiteindelijk ontwikkelen tot haploïde en uiterst gesofisticeerde spermatozoa. Klassiek onderscheidt men in spermatogenese drie grote fasen: 1. mitotische deling van spermatogonia waarbij enerzijds precursoren worden geproduceerd voor verdere ontwikkeling en waarbij anderzijds de reserve aan stamcellen wordt onderhouden; 2. intrede van de zogenaamde type-B-spermatogonia in de meiose met achtereenvolgens vorming van primaire spermatocyten, secundaire spermatocyten en haploïde ronde spermatiden; en 3. spermiogenese, een complexe cascade van differentiatie waarbij spermatiden worden omgevormd tot potentieel functionele zaadcellen die dan in de epididymis een verdere rijping zullen ondergaan. Spermiogenese omvat onder meer een aantal frappante morfologische veranderingen zoals de vorming van een flagellum, de ontwikkeling van een acrosoom, elongatie van de spermatiden gepaard gaand met condensatie van het chromatine en vrijkomen van de afgewerkte zaadcellen in het lumen van de zaadbuisjes met achterlating van het overbodige cytoplasma dat zal worden gefagocyteerd door de Sertoli-cellen.

Spermatogenese vertoont een opmerkelijke coördinatie, zowel in de ruimte als in de tijd. Ruimtelijk ontwikkelen de zaadcellen zich in nauwe associatie met de Sertoli-cellen. Ze schuiven daarbij van de periferie van de zaadbuisjes (spermatogonia) naar het centrum (spermatozoa). Daartoe moeten ze zich een weg banen doorheen de 'tight junctions' die aangrenzende Sertoli-cellen met elkaar verbinden en die het anatomisch substraat vormen van de zogenaamde bloedtestisbarrière. Binnen deze barrière (in het adluminaal compartiment) komen ze terecht in een specifiek milieu waarvan de samenstelling wordt gecontroleerd door de Sertoli-cellen (Fig. 1). Op grond

van de tijd is zowel de totale duur van de spermatogenese als de duur van elke stap in dit complexe proces merkwaardig constant. Dit brengt mee dat op dwarse doorsneden van de tubuli slechts welbepaalde associaties van germinale cellen worden teruggevonden. Deze associaties noemt men de stadia van de spermatogenese. Bij de mens worden zes stadia onderscheiden. Een spermatogene cyclus is de tijd nodig om deze zes stadia te doorlopen (16 dagen bij de mens). De totale ontwikkeling van spermatogonium tot zaadcel vraagt ongeveer 74 dagen (dus meer dan vier cycli).

Ook in de lengteas van de zaadbuisjes volgen de stadia van spermatogenese elkaar op. Hier spreekt men van een golf van spermatogenese. Sertoli-cellen vertonen cyclische veranderingen afhankelijk van de stadia van spermatogenese. Dit is mooi aan te tonen bij proefdieren zoals de rat, waar bij dwarse doorsnede de gehele tubulus zich in eenzelfde stadium bevindt. Zo blijken androgeenreceptorconcentratie en androgeengevoeligheid van Sertoli-cellen maximaal rond stadium VII en VIII, daar waar FSH-effecten culminereren in stadia XII tot II [1]. Bij de mens vertonen dwarse doorsneden meerdere sectoren in een verschillend stadium van spermatogenese, vermoedelijk omdat de golven van spermatogenese zich in de lengteas van de tubuli helicoïdaal met elkaar verweven [2].

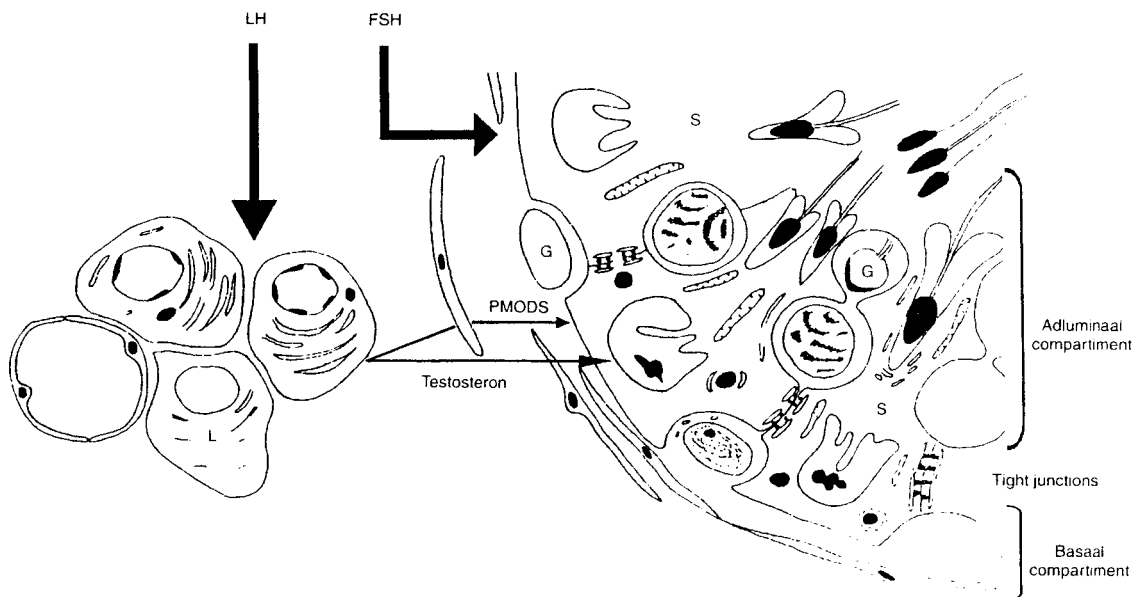


Fig. 1: Algemene organisatie en hormonale controle van spermatogenese.
L = Leydig-cel; S = Sertoli-cel; G = germinale cel.

Determinanten van spermatogene efficiëntie

De capaciteit van de testis om zaadcellen te produceren varieert aanzienlijk van species tot species. Zo is de totale dagelijkse zaadcelproductie bij de mens, uitgedrukt per gram testisgewicht, zowat vijfmaal kleiner dan die van de rat, het konijn of de resusaap. De spermatogene capaciteit hangt onder meer af van het aantal Sertoli-cellen, van het maximale aantal zaadcellen dat door een individuele Sertoli-cel kan worden ondersteund gedurende het rijpingsproces, van de input van spermatogonia en van het

eventuele verlies aan germinale cellen tijdens hun ontwikkeling [3]. Sertoli-cellen prolifereren slechts gedurende de prepubertaire periode, en dit in hoofdzaak o.i.v. FSH. Deze proliferatie stopt met het ontstaan van 'tight junctions' aan de basis van de Sertoli-cellen en, gekoppeld daaraan, het instellen van de bloed-testisbarrière, een proces dat op zijn beurt samenvalt met de eerste golf van spermatogenese. Dit verklaart waarom unilaterale orchidectomie (of testisbeschadiging) alleen prepubertair leidt tot compensatoire volumetoename van de contralaterale testis. Recentelijk is gebleken dat ook andere hormonen, zoals het schildklierhormoon, de proliferatie van Sertoli-cellen kunnen beïnvloeden. Prepubertaire hypothyreoïdie resulteert in een groter aantal Sertoli-cellen en in testiculaire hypertrofie, vermoedelijk door het verlengen van de periode waarin FSH proliferatie van deze cellen kan bevorderen [4]. De capaciteit van individuele Sertoli-cellen om het rijpingsproces van germinale cellen te ondersteunen varieert sterk van species tot species. Zo vindt men bij knaagdieren tien tot twaalf spermatiden per Sertoli-cel en bij de mens slechts vier. Ook de instroom van spermatogonia in de germinale cyclus lijkt bij de mens minder optimaal dan bijv. bij knaagdieren [3]. Tenslotte gaat gedurende het hele rijpingsproces een aanzienlijke fractie van de ontwikkelende zaadcellen verloren, vermoedelijk hoofdzakelijk via apoptosis. Bij de mens treedt dit verlies (circa 40%) vooral op het niveau van de meiose. bij knaagdieren meer op het niveau van de spermatogonia. Stoornissen in spermatogenese resulteren in een belangrijke toename van apoptosis. De fysiologische betekenis van apoptose ligt vermoedelijk ten dele in de eliminatie van afwijkende germinale cellen, ten dele in het aanpassen van het aantal ontwikkelende zaadcellen aan de capaciteit van de testis om deze ontwikkeling te ondersteunen [5]. Samenvattend kan worden gesteld dat de globale efficiëntie van de spermatogenese bij de mens eerder laag is, vooral door een beperkte aanvoer van precursorcellen, een belangrijk verlies tijdens de meiose en een beperkte capaciteit van Sertoli-cellen om rijpende zaadcellen te ondersteunen.

Controle van spermatogenese

De controle van spermatogenese gebeurt ten dele hormonaal, ten dele via cel-cel interacties. Beide systemen zijn complementair.

Hormonale controle

Het is reeds lang bekend dat de beide gonadotrofines, LH en FSH, essentieel zijn voor een normale spermatogenese. Geen van deze hormonen blijkt echter rechtstreeks actief op de germinale cellen. LH stimuleert de Leydig-cellen tot aanmaak van testosteron. Dit androgeen heeft een hele reeks endocriene effecten waarvan sommige noodzakelijk zijn voor normale reproductie. Daarnaast werkt het echter binnen de testis als een paracriene factor waarvan hoge lokale concentraties noodzakelijk zijn voor normale spermatogenese. De doelwitcellen van testosteron zijn voornamelijk de Sertoli-cellen en de peritubulaire myoïde cellen die, via nog slecht bekende paracriene mediators (PModS), de androgeeneffecten op Sertoli-cellen mediëren of moduleren. Ook FSH heeft vermoedelijk als enig aangrijpingspunt de Sertoli-cellen (Fig. 1) [3,6].

Een indrukwekkende hoeveelheid onderzoek werd verricht om het relatieve belang van testosteron en FSH bij de initiatie, het onderhoud of de reïnitiatie van spermatogenese te omschrijven. In samenhang daarmee werd getracht af te bakenen bij welke stappen van de spermatogenese testosteron of FSH onmisbaar is. Een gedetailleerde bespreking van

dit onderzoekswerk is onmogelijk in het kader van dit korte overzicht. Bovendien slaan de meeste van deze experimenten op proefdiermodellen en heeft een belangrijk gedeelte van de controverse te maken met verschillen tussen en experimentele beperkingen inherent aan deze modellen. Voor de mens kan worden gesteld dat kwantitatief normale spermatogenese slechts mogelijk is wanneer zowel androgenen als FSH beschikbaar en actief zijn. Dit belet niet dat androgenen althans kwalitatief volledige spermatogenese kunnen initiëren, onderhouden en reïniëren in afwezigheid van, of minstens bij zeer lage concentraties FSH. Bij prepubertaire jongens met bijvoorbeeld een Leydig-celtumor ziet men volledige spermatogenese in de aangrenzende tubuli, maar niet in verder afgelegen zaadbuisjes. Analoog leiden activerende mutaties in het LH-receptorgen tot premature initiatie van de spermatogenese [7]. Omgekeerd blijken inactiverende mutaties van het FSH-receptorgen compatibel met mannelijke fertiliteit [8]. Tenslotte kan na suppressie van de gonadotrofinesecretie (door hoge dosissen androgenen) spermatogenese worden hersteld door toediening van LH. Ook FSH kan onder dezelfde omstandigheden spermatogenese herstellen maar dan slechts ten dele [9]. Het vermogen van FSH om een kwalitatief normale spermatogenese te onderhouden, blijkt verder uit het feit dat LH-deficiënte mannen wel degelijk fertiliteit kunnen vertonen ('fertile eunuch syndrome'). Tenslotte is er de merkwaardige casus van een hypofysectomiepatiënt met een activerende mutatie van de FSH-receptor, lage androgeenspiegels, normaal testiculair volume en fertiliteit onder substitutie met androgenen [10].

Een intrigerend probleem blijft waarom spermatogenese concentraties androgenen vereist die zowat twintigmaal hoger zijn dan die welke noodzakelijk zijn voor maximale effecten in andere doelwitweefsels. Een deel van de verklaring zou te vinden kunnen zijn in het feit dat in de testis testosteron zelf als actief androgeen optreedt en dat er slechts een beperkte omzetting is tot de actieve metabooliet 5α -dihydrotestosteron [11]. Deze actieve metabooliet heeft namelijk een affiniteit voor de androgeenreceptor die tienmaal hoger is dan die van testosteron zelf. Onder omstandigheden waar de intratesticulaire testosteronconcentratie verlaagd is, blijkt het vermogen om 5α -dihydrotestosteron te vormen wel een belangrijke determinant voor de resterende fertiliteit.

Vermelden wij tenslotte dat uit recent dierexperimenteel onderzoek blijkt dat ook een tweede 'actieve metabooliet' van testosteron, namelijk oestradiol, noodzakelijk is voor normale fertiliteit. Mannelijke muizen met een totale knockout van de oestrogenreceptor ondergaan namelijk normale geslachtelijke differentiatie, maar blijken infertiel [12]. De belangrijkste stoornis ligt vermoedelijk in de resorptie van tubulair vocht ter hoogte van de ductuli efferentes (welke inderdaad hoge concentraties oestrogenreceptoren hebben). Accumulatie van dit vocht heeft retrograde en nefaste gevolgen op de spermatogenese. Bij één mannelijke patiënt met een analoog receptordefect bleek het spermioqram partieel gestoord. De fertiliteit van deze patiënt blijft echter voorlopig onbekend.

Cel-celinteracties en lokale controle

Aangezien niet de germinale cellen zelf, maar Sertoli-cellen het directe aanknopingspunt vormen voor de hormonen betrokken bij de controle van de spermatogenese (LH, testosteron), moeten de Sertoli-cellen deze informatie op één of

andere manier doorspelen naar de zich ontwikkelende germinale cellen. De informatieoverdracht tussen deze beide celtypes is uiterst complex en kan gebeuren via verschillende wegen [13-15]. Gespecialiseerde celjuncties tussen Sertoli-cellen en germinale cellen bieden een mogelijkheid tot onmiddellijke signaaloverdracht. Daarnaast zijn er echter diverse indirectere vormen van communicatie. Zo zorgen Sertoli-cellen voor een intratubulair milieu met specifieke ionensamenstelling en leveren ze nutriënten (zoals melkzuur) en andere groeifactoren (bijv. transferrine en ijzer) aan zich ontwikkelende zaadcellen. Tenslotte bestaat er een uitgebreid netwerk van paracriene en autocriene communicatie tussen de cellen van de tubulus onderling en zelfs tussen de tubuli en het interstitiële compartiment. Wij gaan hier niet in op alle mogelijke groeifactoren die een rol kunnen spelen bij de bilaterale communicatie tussen Sertoli-cellen en germinale cellen. De belangrijkste kandidaten zijn samengevat in tabel I. De meerderheid van de momenteel beschikbare gegevens steunt echter op in-vitro-experimenten met geïsoleerde cellen van proefdieren en veel meer onderzoek is vereist om de exacte rol van dit complexe regelsysteem in vivo en bij de mens in te schatten. Wij vermelden bij wijze van voorbeeld alleen de c-Kit-receptor en het bijhorende Kit-ligand. Dit is een typisch systeem waarvan het primordiale belang voor spermatogenese ondubbelzinnig bewezen is. Kit-ligand wordt geproduceerd door Sertoli-cellen (o.m. onder controle van FSH). De c-Kit-receptor is een tyrosine-kinase dat wordt teruggevonden op de membraan van primordiale germinale cellen en type-A spermatogonia [16]. Muizen waarbij Kit-ligand of zijn receptor worden geïnactiveerd, vertonen afwezigheid van spermatogenese (naast gestoorde melanocytoproductie en deficiënte hematopoëse).

Tabel I: Paracriene communicatie tussen Sertoli-cellen en germinale cellen: kandidaat-mediators.

Factoren geproduceerd door Sertoli-cellen	Factoren geproduceerd door germinale cellen
Activine, inhibine TGF- β IGF-1 Interleukine-1 en -6 bFGF Leukaemia inhibitory factor Hepatocyte growth factor Oestradiol PDGF Kit-ligand (Steel factor, SCF)	Nerve growth factor Pro-encefaline Proöpiomelanocortine Interleukine-1 bFGF GHRH (en een verwant peptide)

Een nieuw en uiterst beloftevol studie- en toepassingsdomein van deze cel-celinteracties ligt in de transplantatie van germinale cellen [17]. Recentelijk werd deze techniek met succes toegepast zowel bij muizen met aangeboren steriliteit (t.h.v. een mutatie in de c-Kit-receptor) als bij muizen met secundaire steriliteit na behandeling met busulfan. Ruwe preparaten van tubulaire cellen van fertiele donoren werden ingespoten in de zaadbuisjes van steriele acceptormuizen en deze bleken met succes spermatogenese te

initiëren en te onderhouden. Dit toont aan dat deze preparaten stamcellen bevatten die in staat zijn zich te enten in een steriel tubulair epitheel en de novo spermatogenese op te starten. Zelfs xenogenetische transplantatie van rat naar (immunodeficiënte) muis en transplantatie met vooraf ingevroren materiaal bleken mogelijk. Het is duidelijk dat deze techniek nieuwe klinische perspectieven opent bijv. in de context van intensieve chemotherapie of bestraling op jonge leeftijd. al stelt toepassing bij de mens ons nog voor vele technische en ethische problemen. Eerste successen werden reeds gerapporteerd bij cynomolgusapen [18]. Echter, afgezien van deze toepassingen biedt deze techniek ook een nieuw experimenteel model dat het mogelijk moet maken de interacties tussen somatische elementen en germinale elementen in het tubulair epitheel en hun relatieve bijdrage in de controle van spermatogenese beter af te bakenen.

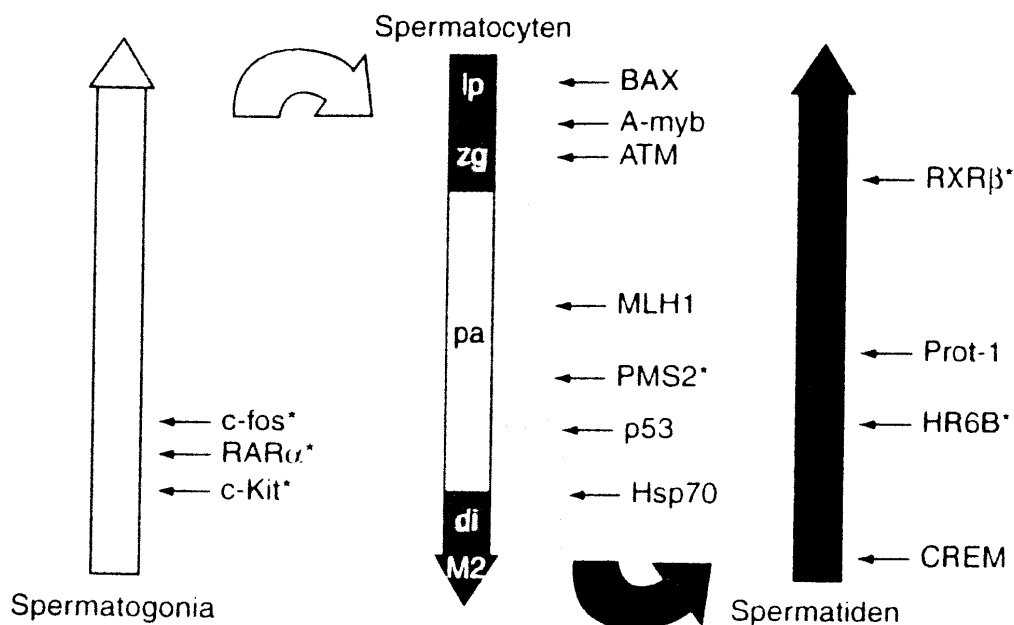


Fig. 2: Tentatieve lokalisatie van het aangrijpingspunt van een aantal genen die bij knockout leiden tot een volledige of onvolledige (*) stilstand in de spermatogene ontwikkeling (stadia van ontwikkeling van spermatocyten: leptoteen (Lp), zygooteen (zg), pachyteen (pa), diplotteen (di), tweede meiotische deling (M2)).

Spermatogene genen

Stoornissen in spermatogenese kunnen uiteraard te wijten zijn aan defecten van en interferenties met de multiple endocriene en andere regelfactoren betrokken bij de ontwikkeling en de functionele controle van de volwassen testis of aan omgevingsfactoren (hitte, toxische substanties). Daarnaast moet het echter duidelijk zijn dat spermatogenese zelf een uniek proces is, waarvan het verloop ook afhangt van een programma van genactivatie en -inactivatie binnen de germinale reeks zelf en binnen de ondersteunende somatische cellen (Sertoli-cellen). Defecten in deze genen of in de intracellulaire regelmechanismen verantwoordelijk voor de controle van hun expressie kunnen eveneens aan de basis liggen van pathologische afwijkingen. Op basis van

klinisch en dierexperimenteel onderzoek is recentelijk belangrijke vooruitgang geboekt in de identificatie van dergelijke ‘spermatogene genen’.

Klinisch is gebleken dat niet alleen grote deleties van de lange arm van het Y chromosoom, maar ook zogenaamde microdeleties, kunnen leiden tot infertiliteit [19]. De genen die verondersteld worden daarvoor verantwoordelijk te zijn, worden collectief aangeduid als AZF (azoöspermie-factoren). Mapping van de betrokken regio van het Y-chromosoom (Yq11) wijst op de aanwezigheid van minstens drie zones die bij deletie kunnen leiden tot infertiliteit. Deze zones worden aangeduid als AZFa, AZFb en AZFc. Het grootste gedeelte van de geïdentificeerde microdeleties blijkt zich te bevinden ter hoogte van een kleine genfamilie (DAZ: ‘deleted in azoospermia’) gesitueerd in AZFc. De exacte rol van DAZ is voorlopig onbekend, maar de afgeleide aminozuursequentie bevat een structureel motief dat kan wijzen op interacties met RNA. Bovendien blijkt een autosomaal analoog van DAZ (boule) reeds essentieel voor spermatogenese bij *Drosophila*. Microdeleties van het Y chromosoom zijn relatief frequent bij patiënten met azoöspermie (circa 12%) of oligozoöspermie (circa 3%). De meeste ontstaan de novo en leiden tot infertiliteit. Bij fertiliteitsbevorderende technieken zoals ICSI kan het defect echter worden doorgegeven aan het nageslacht en daar opnieuw leiden tot mannelijke infertiliteit. Grondig genetisch onderzoek en correcte voorlichting van de betrokken patiënten zijn hier dan ook een absolute vereiste.

Dierexperimenteel onderzoek heeft geleid tot een reeks nieuwe modellen die kunnen bijdragen tot een moleculaire analyse van het gehele proces van spermatogenese. Bijzonder interessant is hier een aantal transgene muizen waar de functionele eliminatie van gekende genen leidt tot een totale ontwikkelingsstop op een welbepaald stadium van de spermatogenese (‘spermatogenic arrest’) [20]. Dit duidt er inderdaad op dat de betrokken genen een cruciale rol spelen in wat er bij dat preciese stadium gebeurt (Fig. 2). Zo blijkt het proto-oncogen c-Kit, dat codeert voor de hoger vermelde Kit-membraanreceptor, essentieel voor de migratie en het overleven van spermatogonia. Een ontwikkelingsdefect op dit vroege stadium wordt ook gezien bij knockout van c-fos, een ander proto-oncogen, een snel reagerende transcriptiefactor, en bij knockout van één van de retinoïdereceptoren (RAR α), een andere transcriptieregulator. Veruit de meeste van de op deze manier geïdentificeerde spermatogene genen echter veroorzaken een stop gedurende de ontwikkeling van de spermatocyten. Dit is niet verwonderlijk gezien het unieke karakter en de complexiteit van het meiotisch proces. Genen die op dit niveau cruciaal blijken, zijn onder meer de transcriptieregulator A-myb, een aantal genen betrokken bij de controle van de celcyclus (ATM, p53) en/of bij inductie van apoptose (p53, BAX), genen verantwoordelijk voor het herstellen van breuken (ATM) of fouten (MLH1, PMS2) in DNA-ketens, en genen betrokken bij de vorming van het synaptonemale complex (Hsp 70). Een stop op het niveau van de spermatiden werd onder meer geobserveerd bij knockout van de transcriptiemodulatoren CREM en RXR β , bij vervroegde expressie van protamine 1 (essentieel voor nucleaire condensatie) en bij uitval van HR6B, een gen dat codeert voor een ubiquitine-conjugerend enzym met een vermoedelijke rol bij meiose en condensatie van chromatine. Merkwaardig is dat de meeste vermelde defecten gepaard gaan met toegenomen apoptose en dat veelal de fertiliteit van de vrouwelijke dieren met dezelfde knockout onaantast is. Uiteraard zijn al deze studies uitgevoerd bij proefdieren (meestal muizen) en moet het belang van voornoemde genen voor spermatogenese bij de mens verder worden aangetoond.

Preliminare studies wijzen er echter op dat ook sommige mannen met een arrest van de spermatogenese op het stadium van de spermatiden verminderde immuno-expressie hebben van CREM [21]. Ook bij patiënten met ataxia teleangiectasia (ATM-gen) werd gestoorde zaadcelvorming gezien.

Conclusie

Dit beknopte overzicht illustreert hoe, vanuit diverse invalshoeken, nieuwe inzichten groeien aangaande het complexe proces van de spermatogenese. Er blijft een lange weg te gaan, maar het is nu reeds duidelijk dat sommige recente bevindingen, wellicht sneller dan verwacht, repercussies zullen hebben op diagnose en therapie van mannelijke infertiliteit. Een grondig inzicht in de diverse regelsystemen die spermatogenese sturen, is een absolute vereiste om met kennis van zaken te kunnen oordelen over milieu- en andere factoren waarvan gevreesd wordt dat ze een bedreiging vormen voor de mannelijke fertiliteit. Vanuit wetenschappelijk en maatschappelijk standpunt verdient dit soort onderzoek dan ook meer belangstelling dan het momenteel krijgt.

Referenties

1. Parvinen M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev* 1982; 3: 404-17.
2. Schulze W, Rehder U. Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell Tissue Res* 1984; 237: 395-407.
3. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E. Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. Second edition. New York: Raven Press Ltd: 1994. p. 1363-434.
4. Kirkby JD, Jetton AE, Cooke PS. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. *Endocrinology* 1992; 131: 559-65.
5. Blanco-Rodriguez J. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int J Androl* 1998; 21: 236-48.
6. Verhoeven G. Androgens and the testis. *Verh Koninkl Acad Geneesk , België LIV* 1992; 4: 299-327.
7. Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ, Minegishi T, Cutler GB. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial precocious puberty. *Nature* 1993 ; 365: 652-4.
8. Vaskivuo T, Aittomäki K, Huhtaniemi IT, Tapanainen JS. Follicle-stimulating hormone receptor mutation and fertility. In: Stefanini M, Boitani C, Galdieri M, Geremia R, Palombi F. editors. *Ernst Schering Research Foundation Workshop -Supplement 3. Testicular function: from gene expression to genetic manipulation*. Berlin: Springer: 1998: 295-306.
9. Matsumoto AM, Karpas AE, Pauken CA, Bremner WJ. Reinitiation of sperm production in gonadotropin-suppressed normal men by administration of follicle-stimulating hormone. *J Clin Invest* 1983; 72:1005-15.
10. Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1367-70.
11. Van Rooijen JH, Ooms MP, Weber RF, Brinkmann AO, Grootegoed JA, Vreeburg IT. Comparison of the response of rat testis and accessory sex organs to treatment with testosterone and the synthetic androgen methyltrienolone (R1881). *J Androl* 1997; 18: 5 1-61.
12. Korach KS. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* 1994; 266: 1524-7.
13. Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 1991 ; 12:-15-77.
14. Verhoeven G. Local control systems within the testis. *Baillière's Clin Endocrinol Metab* 1992; 6: 313-33.
15. Gnessi L, Fabbri A, Spera G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 1997; 18: 541-609.
16. Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11287-9.

17. Russell LD, Nagano M, Brinster RL. Spermatogonial transplantation. In: Stefanini M, Boitani C, Galdieri M, Geremia R, Palombi F, editors. Ernst Schering Research Foundation Workshop -Supplement 3. Testicular Function: from gene expression to genetic manipulation. Berlin: Springer 1998; 41-57.
18. Schlatt S, Roliepen G, Weinbauer GF, Rolt C, Brook PF, Nieschlag E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. Hum Reprod 1999; 11-1-50.
19. Gromoll J, Simoni M, Weinbauer GF, Nieschlag E. Spermatogenesis-specific genes deleted in infertile men: DAZ/DAZH clinical aspects and animal models. In: Stefanini M, Boitani C, Galdieri M, Geremia R, Palombi F, editors. Ernst Schering Research Foundation Workshop - Supplement 3. Testicular function: from gene expression to genetic manipulation. Berlin: Springer. 1998; 273-94.
20. Verhoeven G. Maturation arrest in spermatogenesis. In: Ombelet W, Bosmans E, Vandeput H, Vereecken A, Renier M, Hoerrans E, editors. Studies in profertility series. Volume 8. Modern art in the 2000s. Andrology in the nineties. London: The Parthenon Publishing Group, 1998: 191 - 204.
21. Weinbauer GF, Behr R, Bergmann 17, Nieschlag E. Testicular cAMP responsive element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. Mol Hum Reprod 1998: 9-15.

Bron: Tijdschrift voor Fertilitets Onderzoek, juni 2000

Onvruchtbaarheid: de mannelijke factor

G.R. DOHLE

Erasmus MC, Rotterdam

1. Inleiding

Definitie

"Infertility is the inability of a sexually active, non-contracepting couple to achieve pregnancy in one year" (WHO, 1995¹). We spreken van infertiliteit - of liever subfertiliteit - wanneer een zwangerschap gedurende meer dan 12 maanden bij onbeschermd, op conceptie gerichte coïtus, uitblijft. Als de kinderwens korter dan een jaar bestaat, wordt gesproken van 'uitblijven van zwangerschap'. Van primaire subfertiliteit bij de man is sprake wanneer hij nog nooit een zwangerschap tot stand heeft gebracht, van secundaire wanneer dat wel het geval is. In het algemeen hebben paren met een secundaire subfertiliteit een betere prognose en zijn genetische afwijkingen of ernstige stoornissen in de menstruele cyclus of de spermatogenese onwaarschijnlijker. Een bezwaar tegen de term infertiliteit is dat de conditie die bedoeld wordt in feite subfertiliteit is, omdat de man eventueel wel vruchtbaar zou kunnen zijn met een andere partner.

Prevalentie

Ongeveer 25% van de Nederlandse paren zoekt op enig moment tijdens de reproductieve leeftijd een huisarts op met de klacht geen kinderen (meer) te kunnen krijgen. Hiervan wordt zo'n 15% doorverwezen naar een specialist. Onvervulde kinderwens die korter bestaat dan 1 jaar, is bij 5% van de paren reden van verwijzing omdat er klachten bestaan die verder wachten zinloos maken (amenorrhoe, azoöspermie) of ongeduld. De life-time incidentie van subfertiliteit bedraagt 10% van de paren. Uiteindelijk blijven minder dan 5% van de paren ongewenst kinderloos².

Prognostische factoren

- Duur van de infertiliteit.
- Primaire of secundaire infertiliteit.
- Resultaat semenanalyse.
- Leeftijd en fertiliteitsstatus van de vrouw.

De oorzaak van ongewenste kinderloosheid ligt globaal in 1/3 van de gevallen bij de vrouw, in 1/3 van de gevallen bij de man en in 1/3 bij beiden. Paren stellen tegenwoordig het krijgen van kinderen vaak uit en hebben daardoor een kortere periode voor het krijgen van kinderen. Daarnaast zijn de mogelijkheden om met technische middelen het tot stand komen van zwangerschap te bevorderen (geassisteerde voortplanting) sterk toegenomen; deze mogelijkheden krijgen ruime aandacht in de media. Het succes van geassisteerde voortplanting (Assisted Reproductive Technique, ART) bij mannelijke subfertiliteit heeft als gevolg dat onderzoek naar behandelbare oorzaken en de pathofysiologie van mannelijke vruchtbaarheid wordt overgeslagen.

Bovendien zijn de risico's voor het nageslacht bij toepassing van met name ICSI (Intracytoplasmatische Sperma Injectie) (nog) onbekend³.

Oorzaken van subfertiliteit bij de man

- Testiculaire insufficiëntie
 - Cryptorchisme
 - (Virale) Orchitis
 - Torsio testis
 - Cytotoxische therapie (chemotherapie)
 - Radiotherapie
 - Genetische oorzaken (Klinefelter, Y-deleties)
- Endocriene stoornissen
 - Syndroom van Kalimann
 - Syndroom van Prader-Willy
 - Hypofysaire aandoeningen (adenoom, infectie)
- Obstructies van de tractus genitalis
 - Congenitale afwezigheid van het vas deferens/epididymis
 - Mullerse prostaatcysten
 - Epididymis obstructies (infecties, aangeboren)
 - Na chirurgie van lies of scrotum
- Sperma-antilichamen
- Geneesmiddelen, milieu, stress, ziekte
- Varicocele
- Seksuele problemen/ejaculatiestoornissen
- Idiopatisch

2. Anamnese en Diagnostiek

Het belang van diagnostiek van de mannelijke infertiliteit ligt in het verrichten van goed onderzoek van de subfertiele man, op zoek naar oorzaken die het probleem verklaren en soms behandelbaar zijn. Dit geldt voor iedere man met een verminderde semenkwaliteit. Het stellen van de diagnose is belangrijk voor het starten van de juiste behandeling en kan ook voorkomen dat het paar te snel richting geassisteerde voortplanting wordt gestuurd, terwijl een oorzakelijke behandeling wordt overgeslagen.

Bij de anamnese is het met het oog op de intercollegiale communicatie van belang om ook de naam en de geboorte datum van de vrouwelijke partner te noteren. Bovendien verdient het aanbeveling een globale gynaecologische anamnese af te nemen en een basale temperatuur curve (BTC) te laten noteren, ofschoon een cyclus tussen 25 en 35 dagen vrijwel altijd ovulatoir is. Onderstaande tabel geeft een overzicht van etiologische factoren die bij anamnese nagevraagd dienen te worden. Ook een zorgvuldig afgenomen

seksuele anamnese hoort hierbij: seksuele problemen komen voor bij circa 5 procent van de onvruchtbare paren. Tot slot dient aandacht te worden besteed aan medicijngebruik (b.v. anabole steroïden) en alcohol- en druggebruik.

Anamnese bij mannelijke fertiliteitsproblemen

- Infertiliteitsduur
- Primaire- of secundaire subfertiliteit
- Etiologische factoren en medische voorgeschiedenis:
 - Cryptorchisme/maldescensus testis (leeftijd/behandeling)
 - Operaties: scrotum, liesgebied, pelvis, retro-peritoneum
 - Urogenitale infecties, venerische ziektes, TBC
 - Urologische pathologie en behandelingen
 - Trauma, torsio testis Parotitis epidemica (tijdens of na puberteit)
 - Acute pijn in scrotum, al of niet met koorts
 - Toxische invloeden (straling, chemicaliën)
 - Warme zitbaden, sauna, intensieve sportbeoefening
 - Puberteitsontwikkeling (leeftijd), gynaecomastie
 - Diabetes Mellitus, schildklierpathologie, nierziektes.
- Familie-anamnese:
 - Infertiliteit
 - Congenitale afwijkingen
 - Habituele spontane abortus
 - Gehandicapte of overleden kinderen.
- Beroep:
 - Beroepsmatige blootstelling aan chemicaliën of straling.
- Seksuele anamnese:
 - Coitusfrequentie, al of niet gericht op vruchtbare periode
 - Erectiestoornissen
 - Ejaculatiestoornissen
 - Libidostoornissen.
- Algemene + tractus anamnese, medische voorgeschiedenis (o.a. reuk, visusstoornissen, chronische ziektes)
- Roken, geneesmiddelen, alcohol, drugs (anabolica)

Lichamelijk onderzoek

Algemeen

- lichaamsbouw, gynaecomastie, beharingspatroon, lengte, gewicht
- onderzoek van de regio inguinalis (hernia, litteken, lymfadenopathie).

Specifiek/Genitalia

- Onderzoek in liggende en staande houding:
 - Penis: epispadie, hypospadie
 - Testes: volume, consistentie, ligging
 - Epididymis: zwelling, defecten, induratie, cystes
 - Vas deferens: afwezig?, structurele afwijkingen.
 - Funiculus spermaticus: varicocele (staand onderzoeken, Valsalva manoeuvre, Dopplersonderzoek).
 - Prostaat en vesicula seminalis (pijn, zwelling, noduli).

Semenanalyse

De semenanalyse vormt het uitgangspunt voor eventueel verder Andrologisch onderzoek. Bij een 'normale' semenanalyse wordt geen verder onderzoek verricht, tenzij er uit de anamnese mannelijke seksuele problemen aan het licht zijn gekomen. Tot nog toe was semenanalyse een weinig gestandaardiseerd onderzoek, met grote interen intra observer variabiliteit. Om aan deze grote verschillen in de bepaling van hetzelfde spermamonster een eind te maken, is onder auspiciën van de Wereld Gezondheids Organisatie (WHO) een standaardwerk uitgebracht dat als leidraad moet dienen bij de evaluatie van het subfertiele paar⁶. Aangezien nog steeds belangrijke beslissingen over de toe te passen behandeling worden gemaakt op de uitkomsten van het spermaonderzoek, is een standaardisatie van het volledige onderzoek zeer gewenst.

Overzicht van de normaalwaarde van het semen onderzoek volgens de WHO criteria van 1992

Volume	2.0 ml of meer
pH	7.2-8.0
Sperma concentratie	20 x 10 ⁶ spermatozoa/ml of meer
Totaal aantal zaadcellen	40 x 10 ⁶ spermatozoa per ejaculaat of meer
Motiliteit	50% spermatozoa of meer met progressieve beweeglijkheid of 25% spermatozoa of meer met snelle beweeglijkheid binnen 60 minuten na ejaculatie
Morfologie	14% of meer normale vormen (*)
Leucocyten	Minder dan 1 x 10 ⁶ /ml
Immunobeadtest	Minder dan 20% spermatozoa met adherente partikels
MAR test	Minder dan 10% spermatozoa met adherente partikels

(*) criteria volgens Kruger en Menkfeld

Aantal semenanalyses: bij normale (WHO-criteria) uitslagen volstaat 1 onderzoek. Pas bij afwijkingen in de semenanalyse van minimaal 2 onderzoeken volgt nader andrologisch onderzoek. Het sperma onderzoek vindt bij voorkeur plaats binnen 2 uur na productie. Bij afwijkingen in het ejaculaat is het van belang eerst naar mogelijke verklaringen te zoeken zoals recente ziekte- koortsperiode, artefacten met de opvang (abstinentie periode, verkeerd potje of te warm of te koud) en wordt de semenanalyse herhaald. Bij ziektes moet men zich realiseren dat de duur van de spermatogenese inclusief zaadceltransport circa drie maanden is en dat tenminste deze periode moet worden gewacht voordat het onderzoek wordt herhaald.

In de dagelijkse praktijk is het van belang om een onderscheid te maken tussen oligozoöpermie (<20 miljoen zaadcellen/ml), astenozoöpermie (< 50% motiele zaadcellen) en teratozoöpermie (< 30% normale vormen). Vaak komen deze 3 afwijkingen gezamenlijk voor als het OAT-syndroom. In geval van een extreme OAT (< 1 miljoen zaadcellen per ml) is er net als bij azoöpermie een verhoogde incidentie van obstructies van de tractus genitalis en genetische afwijkingen.

Hormonaal onderzoek

De prevalentie van endocriene afwijkingen bij subfertiele mannen is hoger dan in de algemene populatie maar toch nog zeer laag. Hormonale screening kan beperkt blijven tot het bepalen van het FSH, LH en testosteron. Bij mannen met een azoöpermie of extreme OAT is het van belang onderscheid te maken tussen een obstructieve en niet-obstructieve oorzaak. Een criterium met een redelijke voorspellende waarde met betrekking tot obstructie is: een normaal FSH met bilateraal een normaal testisvolume. Echter, 29% van de mannen met normaal FSH heeft toch een gestoorde spermatogenese. Inhibine-B lijkt een betere voorspellende waarde te hebben.

3. Behandeling

Counseling

Soms zijn 'life-style' gewoontes de oorzaak van de slechte spermakwaliteit: overmatig alcohol gebruik, anabole steroïden, intensieve sportbeoefening (marathon training, intensieve krachtsport training), scrotale temperatuursverhoging door isolerend ondergoed, saunabezoek, warme zitbaden of beroepsmatige blootstelling aan warmtebronnen. Een groot aantal geneesmiddelen kan invloed hebben op de spermatogenese: bekende voorbeelden zijn Salazopyrine, Indomethacine, Ranitidine, Cimetidine, Nitrofurantoin, Spironolactone, Allopurinol, Azathioprine, Ciclosporine en diverse hormoonpreparaten. Ook chronische stress (bijvoorbeeld over het uitblijven van de zwangerschap) lijkt van invloed te zijn op de spermakwaliteit, een gerichte medicamenteuze behandeling hiervoor ontbreekt nog.

- **Medicamenteuze (hormonale) behandelingen**

Er bestaan geen studies die aantonen dat hormonale therapie, zoals HMG/HCG, androgenen, anti-oestrogenen (Clomifeen en Tamoxifeen), prolactine remmers (Bromocriptine) en steroïden een significant betere zwangerschapskansen gaven dan een placebo bij mannen met een idiopathische OAT¹¹.

Chirurgische behandelingen

De varicocele

De behandeling van een varicocele is een controversieel onderwerp in de klinische Andrologie. De controverse berust niet alleen op het belang van de behandeling van de varicocele, maar ook op de betekenis van de varicocele als oorzaak van semenafwijkingen. Er is een aanzienlijk hoeveelheid literatuur zonder dat randomisatie heeft plaats gevonden, die 'aantoont' dat een varicocele de oorzaak is van de subfertiliteit¹⁴. Een recent prospectief gerandomiseerd onderzoek liet geen verschil zien in zwangerschapsresultaten tussen behandeling en counseling¹⁵. Kleinere onderzoeken en niet gepubliceerde studies lieten wel een verschil zien ten gunste van de varicocele behandeling. Behandeling van een varicocele kan bestaan uit een embolisatie of verschillende chirurgische technieken, afhankelijk van de expertise van het centrum. Chirurgische of radiologische behandeling van de varicocele leidt bij 44% van de mannen tot een significante verbetering van de semenkwaliteit.

Microscopische Epididymale Sperma Aspiratie (MESA)

MESA in combinatie met ICSI is geïndiceerd wanneer geen reconstructie (vasovaso-, vasoepididymostomie) gerealiseerd kan worden, zoals bij CBAVD en na mislukte microchirurgie¹⁸. Een alternatief is de percutane aspiratie van zaadcellen uit het caput epididymis (PESA). Indien er bij de MESA/PESA geen zaadcellen verkregen worden kan een testisbiopsie worden verricht met testiculaire sperma extractie (TESE¹⁹) voor ICSI.

4. Geassisteerde voortplanting (ART)

ART neemt een belangrijke plaats in de behandeling van ernstige mannelijke subfertiliteit. Er zijn drie typen ART:

- Intra-Uteriene Inseminatie (IUI)
- In Vitro Fertilisatie (IVF)
- Intra-Cytoplasmatische Sperma Injectie (ICSI).

IUI

Het doel van IUI is om de kans op bevruchting te vergroten door geconcentreerd en bewerkt sperma in nauw contact te brengen met de eicel. Bij IUI wordt sperma ten tijde van de ovulatie in de baarmoeder gebracht. 'Opwerken' van sperma betekent het scheiden van de zaadcellen van de seminaalvloeistof, die onder andere prostaglandine's bevat en die baarmoedercontracties kan veroorzaken. Door het semen te centrifugeren in een medium of de zaadcellen te laten opzwellen in een medium wordt een geconcentreerde hoeveelheid zaadcellen verkregen met goede motiliteit geschikt voor inseminatie. Voor een kansrijke IUI zijn na opwerken tenminste één miljoen goed bewegende zaadcellen noodzakelijk. IUI is vooral geschikt als behandeling van oligozoöpermie, waarbij een vrouwelijke factor niet kan worden aangetoond. Gebleken

is dat een 'milde ovariële stimulatie' de kans op zwangerschap verbetert. Gebruikelijk is om 3 - 6 IUI cycli aan te bieden alvorens tot IVF over te gaan.

IVF

In November 1997 publiceerde de Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie nieuwe richtlijnen voor IVF. Eén van de indicaties is: mannelijke subfertiliteit meteen duur van tenminste 3 jaar. Ofschoon er geen wetenschappelijk bewijs is dat IVF op deze indicatie, vergeleken met afwachten, de zwangerschapskans verbetert is het in de praktijk zo dat onvruchtbare paren en hun arts de toepassing van IVF na 3 jaar wachten, als meer dan gerechtvaardigd beschouwen.

De indicaties voor IVF zijn:

- minstens 3 jaar infertiliteit
- minstens 1 miljoen motiele zaadcellen in het totale ejaculaat
- na mislukte IUI
- tuba pathologie.

Prognostische factoren zijn:

- de leeftijd van de vrouw
- de duur van onvruchtbaarheid
- primaire of secundaire mannelijke onvruchtbaarheid
- de IVF succesratio van het centrum.

Verschillende punten zijn opvallend. Ten eerste is er een groot verschil in de succesratio's van de verschillende Nederlandse IVF-centra.(8-28%) In het licht van de belangrijke vraag 'hoe groot moet het verschil tussen de spontane- en IVFzwangerschapskans zijn' om een relatief gecompliceerde en kostbare behandeling als IVF te rechtvaardigen is het duidelijk dat een verschil van 10 - 20% niet verkregen kan worden in centra met een succesratio van slechts 10% in de eerste IVF cyclus. Ten tweede is duidelijk dat het verschil tussen de spontane- en IVF-zwangerschapskans ten voordele van IVF toeneemt met het stijgen van de leeftijd van de vrouw, met de kanttekening dat de kans boven de leeftijd van 40 jaar dermate klein is geworden dat de voordelen van IVF niet opwegen tegen de medische risico's en de kosten. in de toekomst zal het mogelijk zijn om deze arbitraire leeftijdsgrens te individualiseren. Tenslotte is duidelijk dat de prognose voor wat betreft zwangerschap veel beter is voor secundaire -versus primaire subfertiliteit.

ICSI

Met de komst van ICSI als behandeling van extreme oligozoöpermie in 1993 ontstond een behandelingsoptie voor voorheen onbehandelbare mannelijke infertiliteit²³. Bij ICSI wordt een morfologisch normale zaadcel direct in de eicel geïnjecteerd. De aanwezigheid van slechts enkele normale zaadcellen is dus voldoende voor een fertilisatie. De bevruchtungskans is hoger dan bij IVF, de zwangerschapskans is echter vergelijkbaar, circa 20% doorgaande zwangerschappen per behandelingscyclus. in de

praktijk blijkt dat ongeveer 1 op de 3 paren met IVF of ICSI een zwangerschap bereikt na een of meerdere pogingen.

De indicaties voor ICSI zijn:

- extreme oligozoöpermie (< 1 miljoen motiele zaadcellen per ejaculaat)
- Total Fertilisation Failure bij IVF in combinatie met chirurgisch verkregen zaadcellen bij azoöpermie (MESA/ICSI of TESE/ ICSI).

Voor deze laatste indicatie bestaat in Nederland een behandelingsmoratorium van de NVOG, in verband met onbekende genetische risico's, verbonden aan het gebruik van onrijpe of oude zaadcellen. Tevens is de kans op genetische afwijkingen bij azoöpermie duidelijk toegenomen.

Referenties

1. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge University Press, 1993.
2. Guidelines prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility, 1996. Hum Reprod 4, August 1996.
3. E.S.H.R.E. Unexplained infertility: proceedings of a Human Society Reproduction workshop. Hum Reprod 1992;8:977-980.
4. Weber R.F.A., Dohle G.R., van Roijen J.H, te Velde E.R., van Kooij R.J., Vreeburg J.T.M. De rol van andrologie bij de diagnostiek en behandeling van fertiliteitsstoornissen. NTVG 1995; 139(18) 922-925.
5. Swerdloff R.S., Wang C., Kandeel F.R. Evaluation of the infertile couple. Endo Metab Clin 1988;17:301-37.
6. WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 1992.
7. Sharma R., Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology 1996, 48:835-850.
8. Meschede D. and Horst J. The molecular genetics of male infertility. Mol. Hum. Reprod. 1997, 13, 419-430.
9. Reijo R., Lee T., Salo P. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nat. Genet., 1995,10:383-393.
10. Braekeleer cle M. and Ferec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. Mol. Hum. Reprod.,1996,2(9), 669-677.
11. Jarow J.P., Transrectal ultrasonography in the diagnosis and management of ejaculatory duct obstruction. J. Andr. 1996,17:467-472.
12. Johnson S.G. Testicular biopsy score count. A method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones, 1970,11 -24.
13. Sigman M., Howards S.S. Male infertility. In: Walsh P.C., Retik A.B., Vaughan E.D., Wein A.J., editors. Campbell's urology, 7 th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997: 1287-1320.
14. Hargreave T.B. Debate on pros and cons of varicocele treatment-in favour of varicocele treatment. Hum Reprod 1995,10:151-157.
15. Nieschlag E., Hertle L., Fishedick A., Behre H.M. Treatment of varicocele: counselling as effective occlusion of the vena spermatica. Hum Reprod. 1995, 10:347-353.
16. Silber S.J. Results of microsurgical vasoepididymostomy: role of the epididymis in sperm maturation. Hum Reprod 1989;4:298-303.
17. Belker A.M., Thomas A.J., Fuchs E.F., Konnak J.W., Sharlip I.D. Results of 1469 microsurgical vasectomy reversals by the vasovasotomy study group. J. Urol 1991;145:505-11.
18. Silber S.J., Ord T., Balmaceda J. Congenital absence of the vas deferens. N Engl J Med 1990;323:1788-92.

19. Devroey P., Liu J., Nagy Z., Tournaye H., Silber SJ., Van Steirteghem AC. Normal fertilisation of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (TESE and ICSI). *Fert Ster.* 1994;62:639-41.
20. Meacham R.B., Hellerstein D.K., Lipshultz L.I. Evaluation and treatment of ejaculatory duct obstruction in the infertile male. *Fert Ster* 1993;59:393-97.
21. Nehra A., Werner A. Vibratory stimulation and rectal probe electroejaculation as therapy for patients with spinal cord injury. *J.Urol* 1996,155:554-559.
22. Dohle G.R., Stam H.J., Weber R.F.A.. De behandeling van fertiliteitsstoornissen bij mannelijke dwarslaesie patiënten. *Revalidata* 1995 17:14-16.
23. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. Pregnancy after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992,340:17-18.

Y-chromosoom deleties en fertiliteit

S. REPPING

Centrum voor Voortplantingsgeneeskunde, AMC, Amsterdam

Bij de diagnose mannelijke subfertiliteit is in de overgrote meerderheid van de gevallen geen oorzaak vast te stellen. Over het algemeen wordt echter aangenomen dat genetische afwijkingen vaak de oorzaak vormen van verminderde spermakwaliteit.

Verreweg het meeste onderzoek naar genetische oorzaken van mannelijke subfertiliteit heeft zich gericht op afwijkingen aan het Y-chromosoom. Dit specifiek mannelijke chromosoom bevat vele genen die betrokken zijn bij spermatogenese en deleties op dit chromosoom zijn frequent te vinden in mannen met slecht sperma. De exacte frequentie van deze deleties varieert tussen 6 en 13% afhankelijk van de fenotypische criteria van de studie populatie (afwijkingen zijn frequenter bij azoosperme mannen dan bij oligozoosperme mannen).

Al 25 jaar geleden waren er aanwijzingen voor de betrokkenheid van het Y-chromosoom bij mannelijke fertiliteit. Een studie in 1976 liet zien dat in een klein percentage azoosperme mannen (~0.5%) de gehele lange arm van het Y-chromosoom afwezig was. De onderzoekers veronderstelden toen dat zich op de lange arm een AZoospermie Factor (AZF) bevond. Sindsdien is er druk gezocht naar *AZF*-genen, oftewel genen die betrokken zijn bij spermatogenese en die defect kunnen zijn in onvruchtbare mannen. Gedurende de laatste 10 jaar is duidelijk geworden dat er tenminste vijf deleties bestaan op de lange arm van het Y-chromosoom: *AZFa*, P5/proximal-P1 (voorheen ook wel *AZFb* genoemd), P5/distal-P1, *AZFc* en gr/gr deleties (figuur 1).

Onze kennis van het Y-chromosoom is onlangs aanzienlijk vergroot doordat de volledige nucleotide sequentie van het manspecifieke deel van het Y-chromosoom (MSY) bepaald is. Het MSY is het gedeelte van het Y-chromosoom dat niet recombineert met het X-chromosoom tijdens meiose. Flankerend aan het MSY bevinden zich twee regio's die dat wel doen: de pseudo-autosomale regio's (figuur 1). Eén van de opmerkelijkste facetten van het MSY is de hoge concentratie van repeterende sequenties. Deze sequenties zijn gerangschikt als directe repeats en geïnverteerde repeats waaronder acht grote palindromen oftewel geïnverteerde repeats zonder tussenliggende sequentie. Zoals verderop duidelijk zal worden zijn deze repeats verantwoordelijk voor het in stand houden van het Y-chromosoom gedurende evolutie maar zijn ze ook de oorzaak van het ontstaan van deleties.

In tegenstelling tot wat vroeger gedacht werd, weten we nu dat het MSY tenminste 78 genen bevat waarvan er 60 testis-specifiek zijn. Het lijkt zo te zijn dat het Y-chromosoom zo geëvolueerd is dat het essentieel is voor de mannelijke voortplanting en dat deleties van dit chromosoom potentieel bedreiging voor mannelijke fertiliteit vormen.

***AZFa* deleties**

AZFa deleties komen zelden voor; er zijn slechts een aantal gevallen beschreven in de literatuur. De *AZFa* regio is ongeveer 800 Kb groot en bevat twee genen: *USP9Y* en *DBY*. Alle patiënten met een *AZFa* deletie zijn azoosperm en hebben geen kiemcellen in hun testis (Sertoli-Cell-Only syndroom). Er is één patiënt beschreven met een *de novo*

puntmutatie in *USP9Y* die wel enige spermatogenese vertoonde. Blijkbaar is dus de afwezigheid van beide genen nodig om het Sertoli-Cell-Only syndroom te veroorzaken.

P5/ proximal-P1 deleties

In het verleden dacht men dat er drie niet-overlappende deletie intervallen waren op het Y-chromosoom (*AZFa*, *AZFb* en *AZFc*). Vanwege het niet beschikbaar zijn van een gedetailleerde kaart van het Y-chromosoom was het echter niet mogelijk om de grenzen van de deleties te bepalen. Gebruik makend van de sequentie van het MSY is recent gebleken dat *AZFb* deleties beginnen in het P5 palindroom en doorlopen tot in de proximale arm van het P1 palindroom en dat ze 1.5 Mb van de *AZFc* regio verwijderen. Deze beide regio's overlappen dus en vormen geen aparte intervallen. De P5/proximal-P1 deletie (de nieuwe naam voor de *AZFb* deletie) verwijdert 33 genen of transcripten en is 6.2 Mb groot (bijna een kwart van het hele euchromatische MSY). P5/proximal-P1 deleties zijn iets frequenter dan *AZFa* deleties en komen in ongeveer 1% van de azoosperme mannen voor. Het fenotype behorende bij deze deletie is azoospermie met maturatie arrest van de kiemcellen in de testis. Omdat de deletie vele genen verwijdert en er nog geen deleties beschreven zijn die slechts één gen of gen-familie verwijderen, is de bijdrage van de afzonderlijke genen in de P5/P1 regio aan het fenotype nog onbekend.

P5/ distal-P1 deleties

Het proximale breekpunt van P5/distal-P1 deleties is hetzelfde als dat van P5/proximal-P1 deleties. Het distale breekpunt ligt echter, zoals de naam al doet vermoeden, in de distale arm van het P1 palindroom. De deletie overlapt met vrijwel de gehele *AZFc* regio, en laat slechts de laatste 550 kb intact. Deze deletie is zelfs de grootste deletie in het humane genoom (7.7 Mb) waarvan de deletie grenzen en de volledige nucleotide sequentie bekend zijn. De P5/distal-P1 deletie verwijdert 44 genen of transcripten en wordt in vergelijkbare frequenties gevonden als de P5/proximal-P1 deletie. Ook het fenotype is vergelijkbaar: azoospermie met maturatie arrest van de kiemcellen in de testis.

***AZFc* deleties**

Deleties van de *AZFc* regio worden gevonden in ongeveer 12% van de mannen met een azoospermie en in 6% van de mannen met een oligozoospermie. Deze deletie is dan ook de meest voorkomende bekende genetische afwijking die leidt tot falende spermatogenese. De *AZFc* regio is opgebouwd uit grote stukken repeterend DNA, ook wel amplicons genoemd, die gestructureerd zijn in directe repeats, geïnverteerde repeats of palindromen. De *AZFc* regio is 3.5 Mb groot en bevat acht gen-families met in totaal 21 genen welke allemaal specifiek tot expressie komen in de testis.

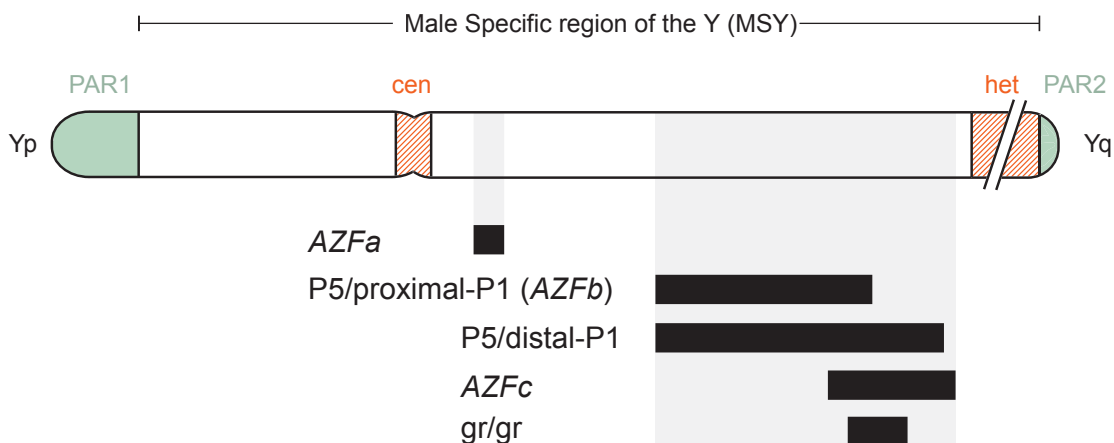
Hoewel alle *AZFc* deleties genomisch identiek zijn bestaan er toch fenotypische verschillen in mannen met een *AZFc* deletie (dit in tegenstelling tot mannen met een *AZFa* of P5/P1 deletie). Sommige mannen met een *AZFc* deletie zijn azoosperm terwijl andere slechts oligozoosperm zijn. Het histologisch beeld in de testis is ook variabel. Het lijkt aannemelijk dat andere factoren, hetzij genetische, hetzij omgevingsfactoren, bijdragen aan het specifieke fenotype.

De meeste *AZFc* deleties zijn *de novo* maar soms zijn ze ook aanwezig in de fertiele vader van de infertiele man. Het is echter ook goed mogelijk dat deze vaders

oligozoosperm waren ten tijde van de conceptie maar toch in staat waren om kinderen te krijgen zonder enige fertiliteitsbehandeling.

gr/gr deleties

De recent beschreven gr/gr deletie komt in circa 3% van mannen met verminderde spermakwaliteit voor. De deletie verwijdert 1.6 Mb van de *AZFc* regio en negen genen met testis-specifiek expressie. De deletie verwijdert geen enkele *AZFc* gen familie compleet maar reduceert het kopieaantal van acht families. In tegenstelling tot andere Y-chromosoom deleties wordt de gr/gr deletie vrij vaak doorgegeven van vader op zoon hetgeen aangeeft dat de deletie niet volledig penetrant is. Toch is de deletie significant geassocieerd met het risico op falende spermatogenese.



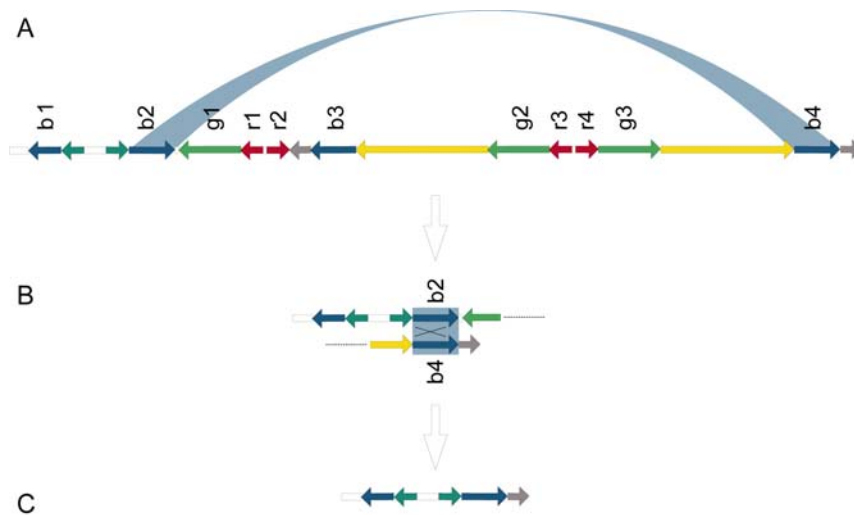
Figuur 1. Schematische tekening van deleties op het Y-chromosoom. Het gedeelte van het Y-chromosoom dat niet recombineert met het X-chromosoom heet het manspecifieke gedeelte van het Y (MSY). Flankerend aan het MSY bevinden zich twee regio's die wel met het X-chromosoom recombineren: de pseudo-autosomale regio's 1 en 2 (PAR1 en 2). De korte (Yp) en lange (Yq) arm van het chromosoom zijn gescheiden door een centromeer (cen) en op de lange arm bevindt zich een groot blok heterochromatine (het) dat in lengte varieert tussen verschillende individuen. De locatie en grootte van de vijf regio's die frequent gedeleteerd zijn in mannen met verminderde spermakwaliteit zijn aangegeven als zwarte balken.

Deletie mechanisme

Vrijwel alle Y-chromosoom deleties lijken veroorzaakt te worden door ectopische (niet-allelische) homologe recombinatie tussen vrijwel identieke sequenties die, zoals eerder gezegd, vaak voorkomen op het MSY (figuur 2). Zo wordt de *AZFa* regio geflankeerd door twee stukken sequentie van 10 Kb die voor 94% identiek aan elkaar zijn. Homologe recombinatie tussen deze twee sequenties veroorzaakt de deletie van de tussenliggende *AZFa* regio. Deze twee sequenties blijken te behoren tot de zogenaamde HERV15 klasse van endogene retrovirussen, hetgeen suggereert dat virale sequenties, die vaak voorkomen in het humane genoom, potentieel doelwit kunnen zijn voor deleties. Hoewel alle *AZFa* deleties binnen deze twee 10 kb regio's vallen kunnen de precieze breukpunten van afzonderlijke deleties van elkaar verschillen.

Zowel de P5/proximal-P1 als de P5/distal-P1 deletie wordt veroorzaakt door homologe recombinatie tussen homologe sequenties in het P5 en P1 palindroom. Het centrum van het P5 palindroom is 100 kb groot en is vrijwel identiek aan twee minipalindromen in P1: P1.1. en P1.2. Sommige P5/P1 deleties lijken niet direct veroorzaakt te worden door

homologe recombinatie maar hun breukpunten bevinden zich toch in het centrum van P5 en in de minipalindromen in P1. Blijkbaar vormen deze regio's deletie hotspots. De sequentie van *AZFc* laat hetzelfde mechanisme zien als voor *AZFa* en P5/P1 deleties (figuur 2). De substraten voor de *AZFc* deleties zijn echter voor meer dan 99.9% identiek en maar liefst 229 kb in lengte. Het precies bepalen van de breukpunten van *AZFc* deleties is vrijwel onmogelijk vanwege het vrijwel identiek zijn van de flankerende repeats. Het is interessant te vermelden dat de frequentie waarmee Y-chromosoom deleties voorkomen, gecorreleerd lijkt te zijn aan de grote van de repeats. Deleties van *AZFc*, veroorzaakt door homologe recombinatie tussen repeats van 229 Kb zijn veel frequenter dan deleties van P5/P1 met repeats van 100 Kb en nog frequenter dan *AZFa* deleties welke veroorzaakt worden door homologe recombinatie tussen repeats van 10 Kb.



Figuur 2. Illustratie van de *AZFc* regio en de ontstaanswijze de *AZFc* deletie via homologe recombinatie tussen directe repeats. **A**, De organisatie van de *AZFc* regio. Elke repeat is weergegeven als een gekleurde pijl; de richting van de pijl geeft de richting van de repeat aan terwijl de kleur aangeeft welke repeats identiek zijn aan elkaar. De blauwe boog geeft de twee repeats aan die de *AZFc* deletie veroorzaken (b2 en b4). **B**, Model van homologe recombinatie die de *AZFc* deletie veroorzaakt. Het blauw gekleurde vierkant geeft de repeats aan die recombineren. **C**, Organisatie van de repeats na de *AZFc* deletie.

Gr/gr deleties worden veroorzaakt door homologe recombinatie tussen repeats binnenin de *AZFc* regio. Sterker nog, de deletie nomenclatuur is gebaseerd op de substraten voor homologe recombinatie: repeats g1-r1-r2 en g2-r3-r4, afgekort als gr/gr. In dit geval zijn de targets zelfs 610 Kb.

Naast dat repeats deleties veroorzaken op het MSY, zijn ze ook van essentieel belang bij het in stand houden van het chromosoom. Omdat er geen paringspartner van het Y-chromosoom is tijdens de meiose, wat essentieel is om eventueel ontstane mutaties te herstellen, gebruikt het MSY deze repeats om fouten te herstellen. Dit proces is bekend als Y-Y genconversie en behelst het uitwisselen van DNA sequenties tussen repeats. Er wordt gedacht dat het Y-chromosoom op deze manier in staat is geweest om zich gedurende evolutie in stand te houden.

Klinische praktijk

Vanwege de hoge prevalentie van Y-chromosoom deleties onder subfertiele mannen, worden in veel centra voor voortplantingsgeneeskunde alle mannen met verminderde spermakwaliteit gescreend op deze deleties voorafgaand aan een eventuele fertiliteitsbehandeling. Omdat deze genetische afwijking (met het bijbehorende fenotype) altijd zal worden doorgegeven aan het mannelijke nageslacht, dienen mannen met een dergelijke afwijking hier van tevoren over gecounseld te worden. In sommige gevallen zien de paren af van de kindwens of vindt pre-implantatie genetische diagnostiek (PGD) plaats. In de meeste gevallen blijken echter de paren toch door te gaan met de fertiliteitsbehandeling ondanks de gevolgen voor het mannelijke nageslacht.

Referenties

S. Repping, J.W.A. de Vries en F. van der Veen. *Genetic considerations regarding azoospermic and severely oligozoospermic men*. In Assisted Reproductive Technologies: Quality and Safety. Eds. Gerris, Olivennes and de Sutter. Parthenon Publishing Group, London, 2004.

SPERMAKWALITEIT EN VRUCHTBAARHEID VAN DE MAN: NEMEN BEIDE ECHT AF?

R.F.A. WEBER
Erasmus MC, Rotterdam

Introductie

De mogelijke achteruitgang van de zaadkwaliteit is de afgelopen jaren een onderwerp van zorg. Deze achteruitgang van kwaliteit heeft met name betrekking op aantallen en concentratie van zaadcellen. Betekent dit nu ook dat de vruchtbaarheid is afgenomen?

Er zijn goede aanwijzingen dat er een positieve associatie bestaat tussen spermakwaliteit en de kans op het verkrijgen van een zwangerschap. Toch heeft de vermeende afname van de zaadkwaliteit niet geresulteerd in studies, die een afname van de vruchtbaarheid van de man aantonen. Bovendien zijn de uitkomsten van de vele studies over zaadkwaliteit niet eenduidig. Daarnaast is de bepaling van motiliteit en morfologie in het merendeel van de studies dermate slecht of in het geheel niet beschreven, dat uitspraken over achteruitgang van deze parameters nauwelijks te doen zijn. Ook is de beschrijving van de morfologie duidelijk veranderd de laatste jaren.

In 1941 rapporteerde Hotchkiss dat 88% van de zaadcellen een normale morfologie had; kennelijk gebruikte hij een andere definitie van normale morfologie dan thans wordt gebruikt. Twintig jaar terug werd van normale morfologie gesproken als meer dan 50% van de zaadcellen een abnormale morfologie had. Tot enkele jaren terug moest meer dan 70% van de zaadcellen afwijkend zijn om van teratozoöspermie te mogen spreken. Met de introductie van de laatste WHO Manual in 1999 wordt een spermamonster met 86% abnormale cellen nog als normaal beschouwd. De oorzaak van de daling van de the cut-off waarde normaal-abnormaal is niet het gevolg van een achteruitgang van de zaadkwaliteit, maar van een andere wijze van scoren. De afname van het percentage normale zaadcellen kan verklaard door het toepassen van zowel striktere criteria, zoals voorgesteld door Kruger et al., als door een meer kritische houding van de analisten met toenemende ervaring. Zelfs de World Health Organisation (WHO) Manual geeft geen ondubbelzinnige beschrijving van normale morfologie.

Het is algemeen bekend dat de variabiliteit van de spermakarakteristieken aanzienlijk is. Hiervoor zijn een aantal duidelijke factoren verantwoordelijk, zoals de periode van onthouding, recent doorgemaakte of nog aanwezige ziekte, gebruik van bepaalde medicamenten, drugs- en alcoholmisbruik, en de wijze waarop het monster is verkregen. Naast de welbekende fluctuaties van spermakwaliteit, hebben ook de bepalingmethoden vele beperkingen en inherent hieraan fouten. Deze onvolkomenheden worden nog eens versterkt door de verschillende bepalingmethoden die nog worden gebruikt, bijvoorbeeld voor het tellen van zaadcellen. Ofschoon de WHO Manual is bedoeld om de sperma-analyse te standaardiseren, wordt dit nog niet in het algemeen gedaan, zoals telkenmale blijkt bij het in Nederland bestaand externe kwaliteitscontrole programma. Uitvoerig is door anderen beschreven dat de sperma-analyse een grote interlaboratorium variatie vertoont voor zowel spermaconcentratie als morfologie. Een deel van de variatie is verklaard door het gebruik van verschillende telkamers en de wijze van verdunning van spermamonssters.

Samengevat zijn er twee belangrijke groepen van confounders: de eerste groep betreft de condities voor en tijdens productie van het spermamonster, de tweede groep betreft de laboratoriummethoden.

Daarnaast bestaat er bij het beoordelen van de publicaties over spermakwaliteit het probleem dat de onderzochte populaties verschillen (onvruchtbare mannen, sperma donoren met of zonder bewezen vruchtbaarheid en mannen die het zaad hebben laten invriezen voor vasectomie) in verschillende landen. Geen van deze populaties kan beschouwd worden als representatief voor de "normale" populatie.

Relatie tussen concentratie, motiliteit en morfologie en de fertiliteit

De sperma-analyse wordt verricht om zicht te krijgen op de vruchtbaarheid van de man. Helaas heeft de uitslag van de sperma-analyse maar een beperkte voorspellende waarde. Algemeen wordt aangenomen dat de waarde voor de zaadcelconcentratie, waar beneden de kans op de bevruchting gaat afnemen, 20×10^6 spermatozoa/ml is. Deze grenswaarde is in de loop der jaren veelvuldig ter discussie gesteld. Een afname van de fertiliteit is al gevonden bij een concentratie onder de 60×10^6 spermatozoa/ml. Lagere grenswaarden van 10×10^6 spermatozoa/ml of zelfs 5×10^6 spermatozoa/ml zijn aannemelijk gemaakt.

In een onderzoek van Ombelet et al. werd aangetoond dat 10% normale morfologie (strikte criteria) het best van alle sperma parameters discrimineert tussen fertiel en infertiel. In dit onderzoek bleek dat mannen met meer dan 10% normale vormen in 95% van de gevallen vruchtbaar zijn, terwijl mannen met minder dan 10% normale vormen in 27% van de gevallen onvruchtbaar zijn.

Andere onderzoekers bleken een betere voorspelling over de kans op fertiliteit te kunnen doen door het bepalen van de motiliteit.

In 1992 werd door Carlsen et al. een meta-analyse gepubliceerd die, over een periode van 1938 tot 1990, een significante afname van de concentratie van zaadcellen in het ejaculaat liet zien bij gezonde mannen. Sindsdien zijn er vele studies verschenen over de kwaliteit van sperma (Figuur 1). Behoudens het feit dat de resultaten van de verschillende studies elkaar tegenspreken, is zeer opmerkelijk dat geen enkele studie, waarin veranderingen van zaadkwaliteit zijn beschreven, melding maakt van een afgenomen vruchtbaarheid. Wel bestaan er suggesties dat het langer duurt om zwanger te worden, dus dat de zogenaamde "time to pregnancy" toeneemt.

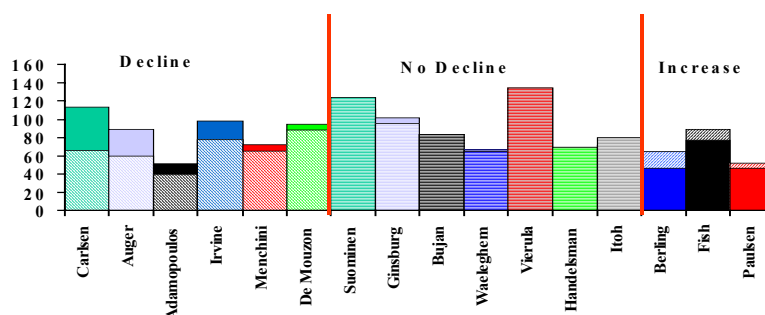


Figure 1. Studies on sperm concentration published since 1992. The hatched areas show sperm concentration after decline, no decline and increase, respectively.

Een mogelijke verklaring voor het verschil in waarnemingen, zoals in de literatuur beschreven, zou kunnen zijn verschil in, aan plaats gebonden, ongunstige invloeden van met name stoffen met oestrogene werking. Deze stoffen staan bekend als endocrine disrupters of hormoon ontregelaars.

Hypothese

In haar boek “Our stolen future” van Theo Colborn wordt uitvoerig geschreven over de in het milieu voorkomende pseudo-oestrogenen en welke bedreiging deze stoffen vormen voor de voortplantingsfuncties van in het wild levende dieren. Ook de mens staat bloot aan deze omgevingsfactoren, maar de gegevens over de effecten zijn niet eenduidig. Blootstelling van de zich ontwikkelende foetale testis aan oestrogenen staat centraal in de hypothese, die Sharpe en Skakkebaek enkele jaren geleden hebben gelanceerd.

Oestrogenen en de ontwikkeling van testes en tractus genitalis

De ontwikkeling en indaling van de testes in het scrotum vinden alle plaats tijdens het foetale leven. Het follikel stimulerend hormoon (FSH) uit de foetale hypofyse stimuleert zowel de productie van oestrogenen door de foetale Sertolicel, als de deling van Sertolicellen. Bovendien stimuleert het FSH mogelijkwijze de secretie van anti-Müllerian hormone (AMH) door de Sertolicel, dat verantwoordelijk is voor de regressie van de buizen van Müller. Aangezien het persisteren van de buizen van Müller geassocieerd is met het niet of onvoldoende indalen van de testes, wordt verondersteld dat AMH een rol speelt bij de normale testisindaling. AMH lijkt bovendien van belang bij de deling van germinale cellen tijdens het foetale leven. De gedachte bestaat nu dat abnormale germinale cellen tijdens de foetale periode mogelijkwijze betrokken zijn bij het ontstaan van testiscarcinoom op latere leeftijd. Oestrogenen zouden de ontwikkeling van de testes kunnen ontregelen door remming van het FSH. Ook zouden oestrogenen de deling van Leydigcellen kunnen remmen en een laag testosteron kunnen veroorzaken bij de foetus.

Als gevolg van de hormonale disregulatie wordt aangenomen dat er minder Sertolicellen worden gevormd, waardoor wellicht de spermaproductie op volwassen leeftijd is afgenomen.

Blootste

lling aan oestrogenen

De blootstelling aan oestrogenen kan op velerlei wijzen geschieden, onder andere via de voeding, het drinkwater, de lucht en de huid. Men kan grofweg twee groepen stoffen met een hormoonontregelende werking onderscheiden.

Ten eerste de natuurlijke en synthetische hormonen, zoals sommige medicijnen, fyto-oestrogenen en groeibevorderende stoffen, die gebruikt worden in de veehouderij.

Ten tweede chemicaliën anders dan hormonen zoals bestrijdingsmiddelen, bestanddelen en afbraakproducten van detergentia, monomeren en additieven, die worden toegepast in de plastic industrie, organometalen en persistente milieu contaminanten uit het verleden. Stoffen, waarvan bekend is dat ze een oestrogene werking hebben staan weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1. Stoffen met oestrogene werking

Stoffen	Producten
Ftalaten	Plastics, inkt, kaas, margarine
Alkylfenolen	Detergentia, shampoo, cosmetica
Bisfenol A	Plastic voor verpakking van voeding en dranken
Pesticiden	Bestrijdingsmiddelen
PCB's	Transformatoren

Van de meeste stoffen is evenwel niet bekend of zij een oestrogene werking hebben. Bovendien is slechts van een klein aantal stoffen bekend welke effecten ze op het hormonale systeem hebben. Een belangrijk probleem is om te bepalen welke stoffen een oestrogene werking zouden kunnen hebben en hoe deze werking het best kan worden getest. De stoffen waaraan de mens via het voedsel en drinkwater kan worden blootgesteld staan weergegeven in Tabel 2.

Ook kunnen werknemers bijvoorbeeld in de land- en tuinbouw worden blootgesteld aan hormoon-ontregelaars zoals pesticiden. In de woon- en leefomgeving kan blootstelling plaats vinden bijvoorbeeld door het gebruik van bestrijdingsmiddelen in moes- en volkstuinen en door direct hand-mond contact van kinderen met vervuilde grond.

Tabel 2. Stoffen waaraan de mens kan worden blootgesteld via voedsel en drinkwater

1. Fyto-oestrogenen, die van nature in plantaardig voedsel voorkomen (bijvoorbeeld isoflavonen)
2. Residuen van bestrijdingsmiddelen, die bij de voedselproductie worden toegepast en persistente stoffen in het milieu, die accumuleren in voedingsmiddelen zoals moedermelk, koemelk, vlees en vis
3. Stoffen, die uit verpakkingsmiddelen vrijkomen (bijvoorbeeld ftalaten)
4. Stoffen, die ontstaan bij voedselbereiding (bijvoorbeeld PAK's bij barbecuen)
5. Restanten van groeibevorderende stoffen (bijvoorbeeld anabolica in vlees)

Samenvatting

Er bestaan duidelijke aanwijzingen dat de voortplantingsfuncties van in het wild levende dieren bedreigd worden door omgevingsfactoren en met name door stoffen met een oestrogene werking.

Ook bij de man zijn er aanwijzingen dat de voortplantingsfuncties de afgelopen jaren negatief beïnvloed worden. Met name zou de zaadkwaliteit achteruitgaan en de incidentie van cryptorchisme, hypospadië en testiscarcinoom toenemen. Er zijn verder aanwijzingen dat de "time to pregnancy" toeneemt. Het bewijs dat blootstelling aan "oestrogenen" in utero hiervoor verantwoordelijk zijn moet evenwel nog geleverd worden.

Conclusies

Het is aangetoond dat bepaalde synthetische stoffen een hormoonontregelende invloed kunnen hebben op o.m. het voortplantingssysteem bij proefdieren. Ook effecten op de voortplanting van in het wild levende dieren lijkt plausibel. Effecten op de spermaproductie en de fertiliteit bij de mens zijn echter vooralsnog niet aangetoond maar is zeker in geselecteerde groepen of individuen niet onmogelijk.

Referenties

1. Colborn Th, Dumanoski D, Peterson Meyers J. Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence, and survival? A scientific detective story. Dutton Books, New York, 1996.
2. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993; 341: 1392-1395.
3. Weber RFA, Vreeburg JTM. Bias and confounding in studies of sperm counts. *Pure Appl Chem* 1998; 70: 1703-1711.
4. Weber RFA, Pierik FH, Dohle GR, Burdorf A. Environmental influences on male reproduction. *BJU international* 2002; 89: 143-148.

Romijn 1

Romijn 2

romijn 3

romijn 4

KWALITEIT...WAT NOU KWALITEIT ?

“Van willekeurige naar systematische chaos.....”

F.A.L. VAN DER HORST
St Antonius Ziekenhuis Nieuwegein

Inleiding

In het midden van de negentiger jaren van de vorige eeuw is bij de laboratoriumdisciplines interesse ontstaan voor de semenanalyse. Niet alleen bestond aandacht voor het klinische nut van deze diagnostiek maar ook voor de kwaliteit van de uitvoering ervan. De eerste publicaties op het gebied van de kwaliteit van semenanalyses lieten zien dat het slecht gesteld was met reproduceerbaarheid van de semen bepalingen maar ook met de standaardisatie ervan.

Na een aanloopfase, waarin meerdere initiatieven zijn ontwikkeld voor een extern kwaliteitsprogramma voor semenparameters, is in Nederland in 1997 de sectie semenanalyse van de SKZL opgericht. Aangezien internationaal weinig ervaring bestond met het opzetten van een dergelijke programma, zijn meerdere experimenten uitgevoerd om tot een optimalisatie van de modules te komen. Aan de hand van de resultaten die de afgelopen jaren zijn verkregen met behulp van de SKZL-semenanalyse rondzendingen kunnen enkele interessante conclusies worden getrokken.

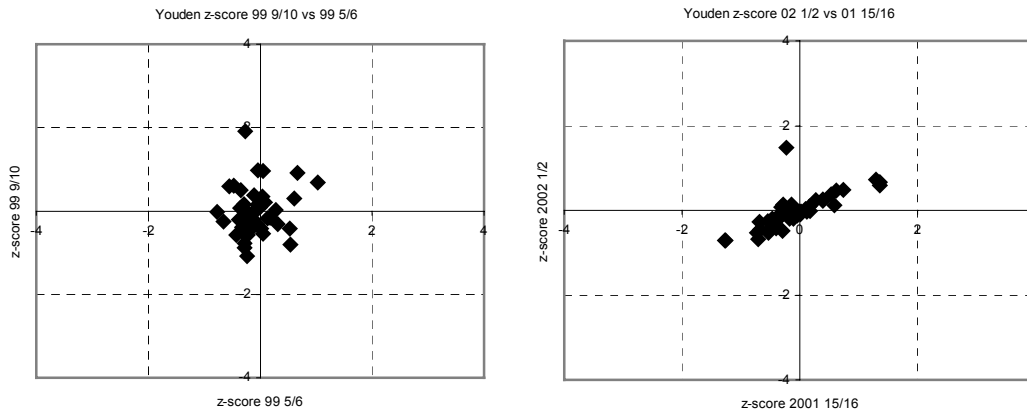
Kwaliteit van semenanalyses

Concentratie

De bepaling van de concentratie is in principe eenvoudig te standaardiseren. Tabel 1 toont aan dat er eigenlijk in de loop der jaren geen verbetering te zien is in de inter-laboratorium variatie van de concentratiebepaling. Tevens valt af te leiden dat in de praktijk de spreiding niet wezenlijk wordt beïnvloed door het type telkamer.

Tabel 1: De inter-laboratorium variatie van de concentratiebepaling van zaadcellen en de invloed van het type telkamer hierop.

		1999 /01							
		B-T	Makler	CellVision	Neubauer	Neubauer I	Horwell	div	total
n		31	12	5	2	32	0	0	82
n (%)		37,8	14,6	6,1	2,4	39,0	0,0	0,0	
mean		27,5	31,8	25,0	24,0	26,8	-	-	
sd		6,3	9,0	3,7	-	6,5	-	-	
cv (%)		22,9	28,4	14,7	-	24,1	-	-	
		2002/01							
		B-T	Makler	CellVision	Neubauer	Neubauer I	Horwell	div	total
n		26	13	2	1	37	1	3	83
n (%)		31,3	15,7	2,4	1,2	44,6	1,2	3,6	
mean		32,7	33,1	12,5	33,9	30,6	30,0	29,8	
sd		10,3	7,2	-	-	8,5	-	-	
cv (%)		31,5	21,8	-	-	27,9	-	-	



Figuur 1: Youdenplots van de concentratiebepaling in 1999 en 2002. In 1999 was hoofzakelijk sprake van een willekeurige fout, terwijl in 2002 vooral een gebrekkige standaardisatie van de bepaling de inter-laboratoriumspreiding heeft veroorzaakt.

Echter wanneer de resultaten nader worden geanalyseerd (figuur 1) dan blijkt een groot verschil in de oorzaak te bestaan van de inter-laboratorium variatie. In 1999 bleek dat de spreiding met name werd veroorzaakt door willekeurige fouten. In 2002 is echter sprake van spreiding als gevolg van een verschil van de standaardisatie van de gebruikte telmethode. Dit laatste is in principe eenvoudig te verhelpen door gebruikt te maken van de resultaten van de SKZL-enquête en de toepassing van referentiepreparaten, zoals gecalibreerde latex-suspensies.

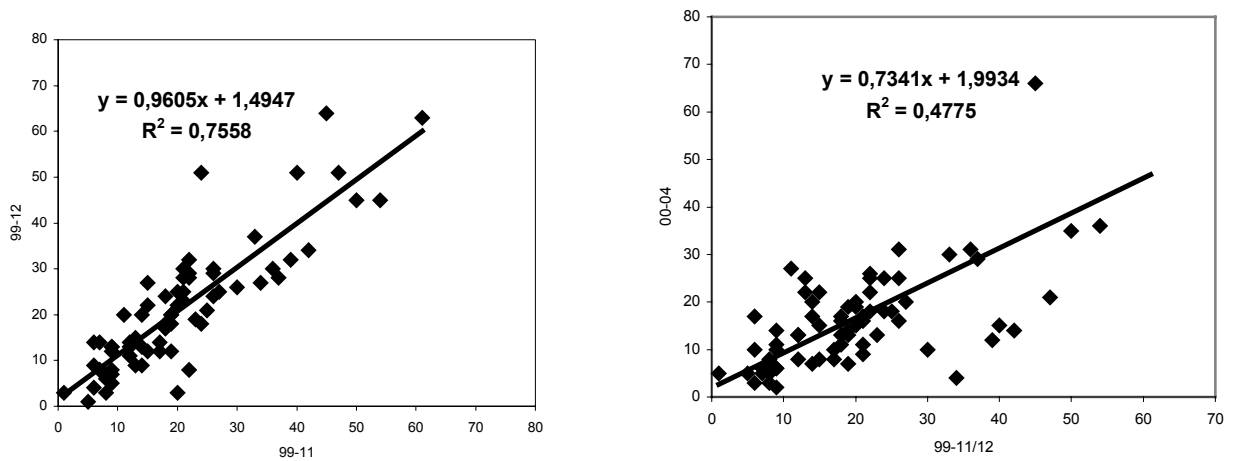
Morfologie

Tot op heden bestaat er veel discussie over de plaats van de morfologie van de zaadcel binnen de diagnostiek van de mannelijke subfertiliteit. Het is aannemelijk dat de grote spreiding van de interpretatie van de morfologische kenmerken en daarmee de beperkte uitwisselbaarheid van de resultaten tussen de laboratoria hiervan een belangrijke oorzaak is.

In Nederland is de wijze waarop de morfologie wordt gescoord de laatste jaren aan sterke wijzigingen onderhevig. Tabel 2 toont aan dat tussen 1999 en 2002 zo'n 50 % van de laboratoria de toegepaste morfologische criteria heeft gewijzigd.

Tabel 2: Toegepaste morfologische criteria en de wijzigingen hiervan in de loop der jaren.

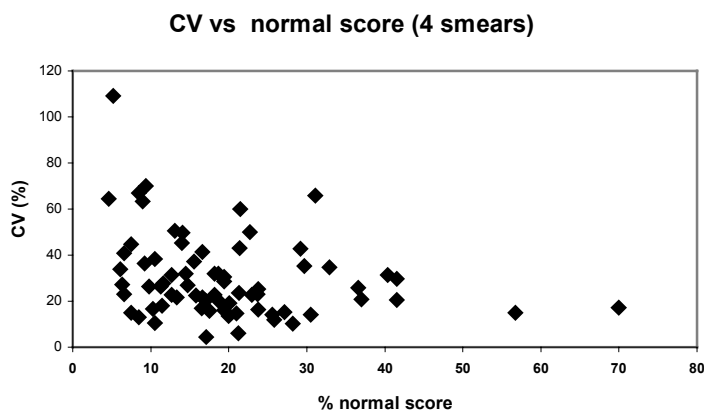
criterium (%)	1999	2000	2001	2002
who 87	2,9	2,8	2,8	1,4
who 92	57,1	45,8	34,7	31,9
strict	34,3	34,7	34,7	36,1
eigen	2,9	1,4	1,4	1,4
who 99	2,9	15,3	26,4	29,2
1e mutatie (%)	-	18,1	18,1	4,2
2e mutatie (%)	-	0,0	4,2	6,9
gewijzigd in jaar	-	18,1	22,2	11,1
cumulatief gewijzigd	-	18,1	40,3	51,4



Figuur 2: De vergelijking van de morfologische score van twee uitstrijkjes binnen één rondzending, waarbij een redelijke correlatie is waar te nemen, en tussen dezelfde uitstrijkjes, maar dan met een tussenpose van acht maanden.

Interessant is waar te nemen (figuur 2) dat de oorzaak in de grote spreiding tussen e laboratoria hoofdzakelijk wordt veroorzaakt door een systematische fout, met andere woorden elk laboratorium hanteert een eigen interpretatie van de morfologische criteria. Het linker paneel toont de relatie tussen de morfologie-score van twee uitstrijkjes binnen één rondzending. Er is sprake van een duidelijke correlatie. Het blijkt dat wanneer hetzelfde uitstrijkje acht maanden later wordt aangeboden deze correlatie beduidend slechter is. Dit betekent dat laboratoria moeite hebben om in de loop der tijd de eigen interpretatie en standaardisatie “vast te houden”.

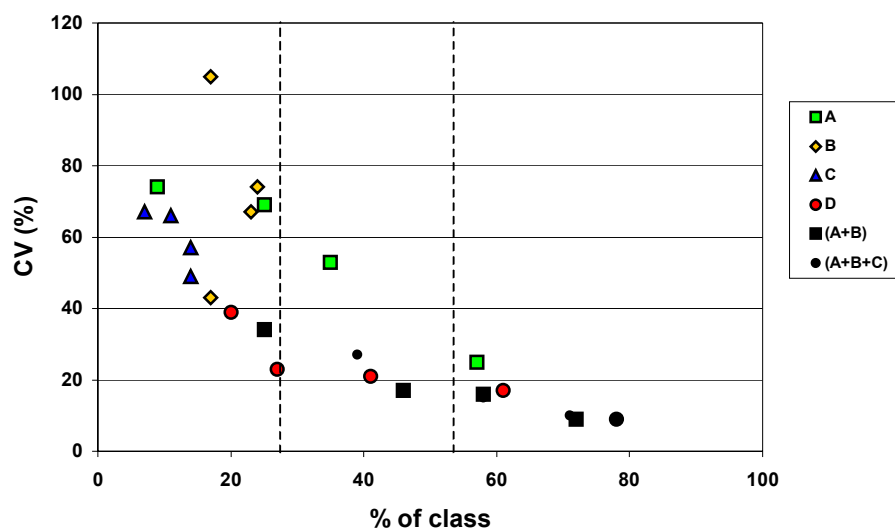
Wanneer gekeken wordt naar de intra-laboratorium spreiding (op grond van bovenstaande rondzendingen) (figuur 3), dan blijkt dat deze tussen de laboratoria sterk varieert. Sommige laboratoria blijken in staat om in een periode van 8 maanden een strikte toepassing van morfologische criteria te kunnen combineren met een acceptabele spreiding. Bij de meeste laboratoria is dit helaas niet het geval.



Figuur 3: De intra-laboratorium variatie coëfficiënt op grond van vier uitstrijkjes die in een periode van 8 maanden zijn gedistribueerd in het kader de SKZL semen enquête.

Motiliteit

In de praktijk blijkt het technisch moeilijk te zijn om goede preparaten te maken voor de beoordeling van de motiliteit. Tot op heden is nog geen bevredigende oplossing hiervoor gevonden. Op grond van de resultaten van de Belgische rondzending, waarbij video-banden werden toegepast, kan worden geconcludeerd dat de spreiding tussen de laboratoria in het scoren van de motiliteit groot is en in de buurt ligt van 50 % bij de WHO-referentiewaarde van 25 % voor een klasse A motiliteit.

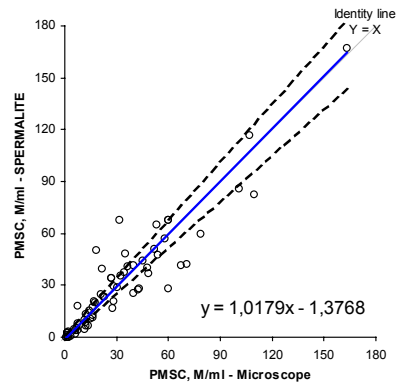


Figuur 4: De relatie tussen de inter-laboratorium variatie en het waargenomen percentage motiliteit van een bepaalde klasse

Automatisering

Op grond van SKZL semen enquête kan worden geconcludeerd dat de standaardisatie tussen de laboratoria slecht is en dat het voor laboratoria moeilijk is om een bepaalde standaardisatie vast te houden. Beide aspecten zouden mogelijk door middel van automatisering opgelost kunnen worden. Uit voorlopig onderzoek blijkt dat met behulp van de Spermalite (DPC Breda), in vergelijking met de handmethode een goede correlatie wordt gevonden voor de gemeten motiele (WHO klasse A+B) zaadconcentratie (figuur 5). Deze correlatie is niet bij voorlopers van de Spermalite gevonden. Tevens is uit dit onderzoek gebleken dat de spreiding van de gemeten parameters tussen twee Spermalites beperkt was en binnen 10 % viel. Aangezien nadien enkele modificaties door de leverancier zijn doorgevoerd, moeten deze bevindingen worden geverifieerd. Echter, automatisering van semenanalyses zou voor enkele semenparameters (met name concentratie en motiliteit) een oplossing kunnen bieden voor het standaardisatieprobleem.

	Coefficient	95% CI
Intercept	-1,377	-2,183 to 1,199
Slope	1,018	0,897 to 1,111



Figuur 5: De correlatie van de motiele spermaconcentratie handmatig en met behulp van de Spermalite gemeten.

Toekomstige ontwikkelingen

Een belangrijke uitdaging is het ontwikkelen van preparaten met een lange levensduur, waarmee op een grootschalige wijze zowel interne als externe kwaliteitscontroles kunnen worden uitgevoerd. Momenteel zijn suspensies van latex-deeltjes ontwikkeld die in belangrijke mate aan dit doel voldoen. Voor de morfologie worden in de praktijk de foto's van de SKZL-rondzending gebruikt. Tevens wordt onderzocht of morfologische preparaten via het internet kunnen worden aangeboden, zodat in principe geen verspreidingsbeperkingen meer bestaan. Hoewel video's en DVD's in principe goede informatiedragers zijn voor motiliteitspreparaten, blijkt dit in de praktijk nog niet naar behoren te functioneren. Dit zelfde geldt voor de distributie via het internet. Op grond van deze ontwikkelingen kan worden geconcludeerd dat binnen enkele jaren goed houdbare preparaten op een grootschalige wijze kunnen worden ingezet voor de kwaliteitsbewaking van de belangrijkste semenparameters.

Hoewel de laboratoria momenteel bewuster omgaan met semenanalyses, waardoor de willekeurige fout is afgenomen, blijkt de spreiding van de resultaten tussen de laboratoria de laatste tijd niet te zijn verbeterd. Dit laatste wordt veroorzaakt door verschil in standaardisatie en interpretatie. Aangezien het SKZL programma blikbaar geen verdere verbetering in de situatie oplevert, wordt gezocht naar alternatieve benaderingen gezocht om dit alsnog te bereiken. Recent zijn bij wijze van experiment drie zogenaamde "kwaliteitskringen" opgezet waarbinnen gespecialiseerde medewerkers van verschillende instituten relevante informatie uitwisselen, de SKZL-resultaten bespreken en een aanzet geven tot standaardisatie van protocollen. Hoewel het nog te vroeg is om vast te stellen of deze benadering een positieve bijdrage levert aan een verdere vermindering van inter-laboratorium spreiding, zijn de betrokkenen zeer positief over de kwaliteitskringen.

Het ultieme doel, waar jaren voorbereidingen voor worden getroffen, is een multi center studie waarbij eindelijk een relatie gelegd kan worden tussen herleidbare semenparameters en de prognose op infertiliteit, zodat de wijze waarop een semenanalyse wordt uitgevoerd op rationele gronden is gebaseerd. Hierbij is een belangrijke rol weggelegd voor laboratoria die zich bezig houden met het spermaonderzoek.

Semenparameters en ART

W. OMBELET

Genk Institute for Fertility Technology

Abstract

There is good evidence in literature that intrauterine insemination (IUI) is the best first line treatment and most cost-effective procedure for moderate male factor subfertility. It seems very difficult to identify individual semen parameters predicting the likelihood of pregnancy after IUI. This can be explained by a lack of standardization of semen analysis, but many other methodological variables may also influence IUI success rates such as the patient selection, type of ovarian stimulation and number of inseminations per cycle. A review of the literature confirmed that sperm morphology using strict criteria and the inseminating motile sperm count (IMC) after sperm preparation are the two most important sperm parameters to assess the real impact of semen quality on IUI outcome. A universal threshold level above which IUI can be performed with acceptable pregnancy rates has not been determined yet, although IUI success seems to be impaired with <5% normal spermatozoa and an IMC of $<1 \times 10^6$. Until now, no method of sperm preparation has been shown to be superior with regard to pregnancy rate after IUI. Whether supplementation of culture media with substances such as antioxidants and platelet activating factor may improve the results remains the subject of further research.

Introduction

Artificial insemination with the husband's semen (AIH) has been used in clinical medicine for over 200 years in the treatment of infertile couples. The first documented application of AIH was performed in London in the 1770s by John Hunter (Siegler, 1944). A patient with severe hypospadias was advised to collect the semen (which escaped during coitus) in a warmed syringe and to inject the sample into the vagina. JM Sims reported his findings on postcoital tests and 55 inseminations in 1873.

The rationale behind artificial insemination is the increase of gamete density at the site of fertilization (Allen et al., 1985). Until a few decades ago, homologous artificial insemination was performed only in cases of physiological and psychological dysfunction, such as retrograde ejaculation, vaginismus, hypospadias and impotence. With the routine use of post-coital tests, other indications were added such as immunological causes with the presence of antispermatozoal antibodies in the cervical mucus.

The refinement of techniques for preparation of washed motile spermatozoa has renewed interest in IUI. Washing procedures are necessary to remove prostaglandins, infectious agents and antigenic proteins. The removal of non-motile spermatozoa, leukocytes or immature germ cells is another substantial advantage of these techniques. This may enhance sperm quality by decreasing the release of lymphokines and/or cytokines and also by reducing the formation of free oxygen radicals after sperm preparation. The final result is an improved fertilizing capacity of the sperm in vitro and in vivo (Aitken and Clarkson, 1987). The term AIH covers a wide range of different

techniques. The insemination can be done intravaginally, intracervically, pericervically using a cap, intrauterine, intratubal or directly intraperitoneal. Intrauterine inseminations (IUI) seem to be the method of choice in most studies (Oei et al., 1992; Ripps et al., 1994; Ombelet et al., 1995a; Williams et al., 1995; Guzick et al., 1999).

Nowadays, the most common indications for IUI are unexplained and moderate male subfertility (Ombelet et al., 1995a). According to the literature, IUI can increase the chance of conception significantly in idiopathic and moderate male subfertility compared with the estimated spontaneous pregnancy rate or pregnancy rate after timed coitus (Cohlen et al., 2000). Two important studies performed in the Netherlands and the United Kingdom (Goverde et al., 2000; Philips et al., 2000) demonstrated that three cycles of IUI offer the same cumulative ongoing pregnancy rate as IVF, whilst being more cost-effective not only for unexplained subfertility, but also for moderate male factor subfertility.

Male subfertility and IUI: patient selection

To identify which couples can benefit from this treatment, it is necessary to investigate the power of different semen parameters in predicting success after IUI. A review of the literature on this topic is frustrating and difficult due to the lack of standardization of semen analysis (Ombelet et al., 1997a, 1997e, 1998). The World Health Organization (WHO, 1987, 1992, 2002) tried to standardize the performances of semen analysis and related procedures in order to reduce variation. It is generally agreed that standardization of semen analysis is useful and essential, but this is where the consensus ends. According to previous reported questionnaires (Helmerhorst et al., 1995; Ombelet et al., 1997b), there is a wide divergence in opinion as to what can be considered as normal semen. Sperm analysis results show a wide range of values for any given sample, most probably not only related to different methodology, but also as a result of persistent errors in laboratory evaluation of sperm samples (Matson, 1995). Taking into account this variation of results among centres, different studies have tried to investigate the predictive value of sperm parameters in IUI. It has previously been demonstrated that in a selected group of patients with normal ovarian response to clomiphene (CC) stimulation, inseminating motile sperm count (IMC) and sperm morphology turned out to be of little prognostic value in predicting success for the group as a whole (Ombelet et al., 1997a). However, sperm morphology becomes a very useful predictive tool in a subgroup of patients with an IMC of $<1 \times 10^6$. In terms of therapeutic strategy, this implies that above a cut-off value of 1×10^6 motile spermatozoa recovered after washing, CC-IUI can be promoted as a first-line therapy with a cumulative ongoing pregnancy rate (OPR) of 24% after three cycles. Furthermore, in cases with less than 1×10^6 motile spermatozoa, CC-IUI remains important as a first-line option provided the sperm morphology score is 4% or more (cumulative OPR of 21.9% after three IUI cycles) (Figure 1). In another retrospective analysis of 1100 IUI cycles (Ombelet et al., 1996), it was found that no individual semen parameter could predict success in IUI using the statistical approach of the receiver operating characteristic (ROC) analysis (Figure 2). It was shown that an IMC of 300,000 motile spermatozoa obtained in the washed insemination sample was sufficient to ensure an acceptable success rate in an IUI programme (cycle fecundity of 12.5% for an IMC of $0.4-1.0 \times 10^6$ and 13.5% for an IMC of $>5 \times 10^6$). According to the results of the two above-mentioned studies, IUI could be considered as a valuable first choice treatment in most cases of moderate and

severe male subfertility before starting more invasive techniques of assisted reproduction, considering that at least one tube is patent. In order to investigate the reported threshold levels of sperm parameters above which IUI pregnancy outcome is significantly improved, a literature search was performed. By means of a Medline search, the literature for a 20-year period, from 1983 until 2002, was reviewed using the keywords ‘intrauterine insemination’ and ‘IUI’. In the Cochrane Library, the same keywords were used in the search for reviews in which sperm parameters were measured against IUI outcome. Twenty-six articles met the criteria in the Medline search, none in the Cochrane Library search. According to this literature review, inseminating motile count (IMC) and sperm morphology are the most valuable sperm parameters to predict IUI outcome. A trend towards increasing conception rates with increasing inseminating motile count was found. The cut-off value above which IUI seems to be successful, however, ranges from 0.3 to 20×10^6 (Brasch et al., 1994; Ombelet et al., 1996; van der Westerlaken et al., 1998; Branigan et al., 1999; an Voorhis et al., 2001; Duran et al., 2002b; Miller et al., 2002). Sperm morphology using strict criteria is well known as one of the best predictors of IVF outcome (Kruger et al., 1986, Oehninger et al., 1988; Ombelet et al., 1995b).

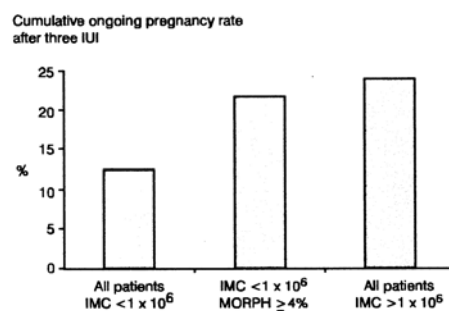


Figure 1. Cumulative ongoing pregnancy rate after three CC-IUI cycles. (IMC = inseminating motile count, MORPH= sperm morphology score using strict criteria).

Sperm morphology has also turned out to be a good predictive parameter in IUI. In a previous meta-analysis, a significant improvement in pregnancy rates above the 4% threshold for strict criteria was described (Van Waart et al., 2001). The present analysis confirmed the results of that report (Table 1). Total sperm motility before sperm preparation was mentioned four times with a cut-off level between 30 and 50% (Ombelet et al., 1996; Dickey et al., 1999; Montanaro et al., 2001; Lee et al., 2002). Two other parameters influencing the pregnancy rate after IUI were the hypo-osmotic swelling (HOS) test ($>50\%$, Tartagni et al., 2002) and sperm DNA fragmentation ($<12\%$, Duran et al., 2002a). Regarding sperm DNA integrity, a human sperm population with 100% sperm morphology abnormalities was reported to have chromatin integrity at the molecular level that is equivalent to sperm populations shown in previous studies to be highly fertile (Larson et al., 2001). This could explain why in some cases spermatozoa with poor morphology are equal in reproductive terms. The sperm chromatin structure assay (SCSA) provides an objective assessment of sperm chromatin integrity and can be used as a fertility marker in clinical practice (Richthoff et al., 2002). Calogero et al. (2003) showed that sperm aneuploidy seems to have a negative impact on assisted reproduction outcome.

Table 1. *Intrauterine insemination: a literature survey of studies between 1983 until 2002 describing male-derived determinants of IUI outcome. IMC = inseminating motile count after sperm preparation, TMC = total motile count in the initial sperm sample, CC = clomiphene citrate, HMG = human menopausal gonadotrophins, FSH = follicle stimulating hormone, GnRH_a = gonadotrophin-releasing hormone analogue, Nat = natural cycle, Ns = not specified, HOS = hypo-osmotic swelling test, DNA fragm = DNA fragmentation.*

Year of publication	Reference	Country	No. of couples	No. of cycles	Intervention	Sperm morphology (%)	IMC (x 10 ⁶)	TMC (%)	Others
1989	Horvath et al.	USA	232	451	CC, HMG	–	>1	–	–
1994	Brasch et al.	USA	546	1205	Ns	–	>20	–	–
1995	Matorras et al.	Spain	74	271	FSH, HMG	–	–	–	–
1995	Toner et al.	USA	126	395	FSH, HMG	>4	>2	–	–
1996	Burr et al.	Australia	163	330	HMG	>10	–	–	–
1996	Campana et al.	Switzerland	332	1115	Nat, CC, FSH, HMG	–	>1	–	–
1996	Huang et al.	China	939	1375	CC, HMG	–	>5	–	–
1996	Lindheim et al.	USA	42	172	HMG, FSH	>4	–	–	–
1996	Ombelet et al.	Belgium	412	1100	CC, HMG	–	>0.3	>40	HOS >40%
1997	Berg et al.	Germany	902	3037	CC, HMG	–	>0.8	–	–
1997	Karabinus and Gelety	USA	193	538	CC, HMG, FSH	–	–	–	–
1997d	Ombelet et al.	Belgium	373	792	CC	–	>1 if morphology >4%	–	–
1998	Shulman et al.	Israel	160	544	Ns	–	–	–	–
1998	Van der Westerlaken et al.	The Netherlands	566	1763	CC	–	>10	–	–
1999	Branigan et al.	USA	414	1160	Ns	–	>10	–	–
1999	Dickey et al.	USA	1841	4056	Nat, CC, HMG	–	–	>30	–
1999	Stone et al.	USA	3200	9963	Nat, CC, HMG, FSH	–	>2	–	–
2001	Hauser et al.	Israel	108	264	Ns	>4	–	–	–
2001	Khalil et al.	Denmark	893	2473	CC, HMG, FSH, GnRH _a	–	>5	–	–
2001	Montanaro et al.	South Africa	273	495	Nat, CC, LHMG	>4	–	>50	–
2001	Van Voorhis et al.	USA	1039	3479	Nat, CC, LHMG	–	>10	–	–
2002a	Duran et al.	USA	119	154	Nat, CC, HMGL	–	–	–	DNA fragm <12%
2002a	Lee et al.	China	209	244	HMG, FSH	>4	–	–	–
2002b	Lee et al.	Singapore	1479	2846	CC, HMG	–	>1	>30	–
2002	Miller et al.	USA	438	1114	Ns	–	>10	–	–
2002	Tartagni et al.	Italy		120	HMG, FSH	–	–	–	HOS >50%

Although it does not affect the fertilization rate, an elevated sperm aneuploidy rate is associated with a greater rate of pregnancy failure. According to this study, abnormally shaped spermatozoa are more likely to have chromosome abnormalities, particularly those with an enlarged head. More prospective studies are needed to establish the threshold values for IUI after different types of ovarian stimulation or in a natural cycle. Moreover, it is necessary to examine the predictive value of more validated sperm function assays such as the hemizona assay (HZA) and the induced acrosome reaction testing on IUI outcome (Duran et al., 2000b; Oehninger, 2000).

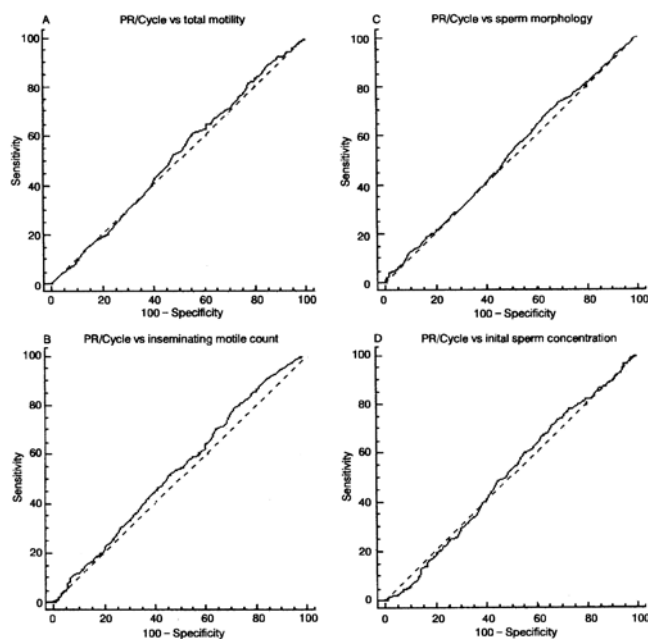


Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) analysis of four different semen parameters in a large IUI programme. (A) total motility; (B) inseminating motile count; (C) sperm morphology; (D) initial sperm concentration.

Immunological male subfertility

The clinical significance of antisperm antibodies (ASA) in male subfertility remains unclear (Jarow and Sanzone, 1992), but most studies demonstrate a clear association between sperm surface antibodies and the fertility potential of the male (Matson et al., 1988; Adeghe et al., 1992; Acosta et al., 1994). Barratt et al. (1992) described a lack of correlation between low (<10%) and moderate (<50%) ASA positive binding cases and the probability of conception or the time to conception. It is generally accepted that male subfertility may be caused by the presence of ASA, at least if a level of more than 50% binding is reached (Bronson et al., 1984; Barratt et al., 1992).

From a physiological point of view, immunological subfertility due to sperm surface antibodies can result from the effect on sperm transport, the destruction of gametes, acrosome reaction abnormalities, by inhibition of sperm–zona pellucida binding or prevention of embryo cleavage and early development of the embryo. The use of antibiotics is only worthwhile if spermatozoal autoimmunity is caused by genitourinary infection. Clinical benefit of immunosuppression using steroids is achieved only after at least 6 months of therapy (Adeghe, 1992; Peters and Coulam, 1992). Nowadays, the treatment with intrauterine insemination (after ovulation induction) and assisted

reproductive technology [IVF, intracytoplasmic sperm injection (ICSI)] is more popular and probably more effective in male immunological subfertility cases (Lombardo et al., 2001). In the most severe cases of male immunological infertility and when the sperm head is involved, ICSI is reported to be the primary choice of treatment and appears to circumvent all adverse effects of male sperm antibodies (McLachlan, 2002; Lombardo et al., 2001). Nevertheless, comparative studies between different methods of assisted reproduction and success rates in male immunological subfertility cases are still lacking. In 1997, a prospective study was published comparing the effectiveness of the first-line IUI approach versus IVF for male immunological subfertility (Ombelet et al., 1997c). The objective of this prospective study was to compare success rates after two different treatment protocols, ovarian stimulation with IUI versus IVF. The ejaculate was always collected in a sterile plastic jar containing a buffer solution (10 ml of Earle's balanced salt solution (EBSS, Life Science International, Paisley, UK) supplemented with penicillin, streptomycin, pyruvate and human serum albumin) in order to reduce the number of antibody-bound spermatozoa, as mentioned in previous studies (Elder et al., 1990). Both IUI and IVF yielded unexpected high pregnancy rates in this selected group of patients (IUI: 64.3% cumulative pregnancy rate after three treatment cycles, IVF: cycle fecundity of 44.4%). Since cost-benefit analysis comparing ovarian stimulation/IUI with IVF may favour a course of four IUI cycles, it was concluded that IUI could be used as an effective first line therapy in male immunological subfertility cases. There is a strong need for a large prospective randomized study comparing the value of IUI versus IVF/ICSI in immunological male subfertility.

IUI: improving sperm quality

Methods of sperm preparation

Several studies indicate that sperm preparation isolating a high concentration of morphological normal and motile spermatozoa is necessary for any assisted reproduction technique, including IUI. Two preparation techniques seem to be superior to all other techniques: the density gradient centrifugation and the glass-wool filtration technique. These clearly improve the number of morphological normal spermatozoa with grade Amotility and with normal chromatin condensation in the prepared sample (Erel et al., 2000; Sakkas et al., 2000; Tomlinson et al., 2001a, 2001b; Hammadeh et al., 2001). In addition, the reduction of reactive oxygen species (ROS) and leukocyte concentration is better when the latter techniques are used, and the spermatozoa show less chromatin and nuclear DNA anomalies and better nuclear maturity rates. Nevertheless, different methods of sperm washing can result in apparent differences of sperm recovery rates, and no one method offers superior cycle fecundity to another (Dodson et al., 1998). This can be explained by the fact that almost all methods of sperm washing surpass the low threshold number of 1×10^6 motile spermatozoa needed for conception in vivo after IUI.

Addition of substances in sperm preparation

Whether the addition of substances such as pentoxifylline, kallikreine and follicular fluid may improve the results remains unclear and certainly unproven. On the other hand, it is important to recognize that sperm preparation methods may induce damage to spermatozoa by increasing ROS generation by spermatozoa and by removing the scavengers from the seminal plasma. Pentoxifylline, a motility stimulator, can also act as an ROS scavenger by reducing the generation of superoxide anion by spermatozoa

(McKinney et al., 1996), and may have a clinical role in the treatment of patients susceptible to ROS-induced damage (e.g. genital infections, smokers). Supplementation of culture media with ROS scavengers can prevent the negative effect of in-vitro oocyte ageing on fertilization, cellular fragmentation and development of concepti until the blastocyst stage (Tarin et al., 1998). Until now, no study has investigated the possible role of antioxidants in culture media or as a dietary supplement on success rates in IUI cycles. It should be further investigated whether treating spermatozoa with solutions containing antioxidants during sperm preparation can improve IUI pregnancy rates in selected cases. Another option is the inclusion of platelet-activating factor into a semen processing protocol, before IUI, which seems to improve pregnancy rates significantly. Platelet-activating factor may have a stimulatory effect on centriole-intact spermatozoa, enhancing their motility and fertilization success and resulting in improved pregnancy rates (Claman, 2001; Wild and Roudebush, 2001).

Fallopian sperm perfusion (large volume of sperm suspension)

In Fallopian tube sperm perfusion (FSP) a large volume of a sperm suspension is subjected to IUI with excellent results in cases of unexplained infertility (Kahn et al., 1992a, 1993) and in a donor insemination programme (Kahn et al., 1992b). Since semen quality after a freezing–thawing procedure is comparable to a subfertile spermiogram, one might expect good results with FSP in male factor subfertility patients. A recent meta-analysis done by Trout and Kemmann (1999) showed that FSP is only beneficial in cases of unexplained infertility after ovarian stimulation with human menopausal gonadotrophin (HMG). More studies on this matter are strongly needed in male factor subfertility.

Effect of the abstinence period

The relation between the period of abstinence and sperm quality after sperm preparation has not yet been identified. Prolonged abstinence time increases ejaculate volume, sperm count, sperm concentration and the total number of motile spermatozoa (Cooper et al., 1993; Matilsky et al., 1993), although the effect on sperm concentration is only small for oligozoospermic men (Baker et al., 1981). Studying the optimal time of abstinence in IUI programmes is probably only valuable in selected male subfertility cases.

Treatment strategy in male subfertility

Figure 3 shows the treatment strategy used at the Genk Institute for Fertility Technology. In most cases, treatment starts with clomiphene citrate ovarian stimulation. Although the cycle fecundity and cumulative ongoing pregnancy rate is significantly lower compared with FSH and/or LH stimulation (Ombelet et al., 1996), this strategy offers the significant benefit of a very low multiple pregnancy rate of less than 7% per cycle.

Although the cumulative ongoing pregnancy rate after three IUI cycles is comparable to one IVF cycle (25%), more than 90% of couples, after full counselling, opt for IUI despite being aware of the higher success rate per cycle after IVF.

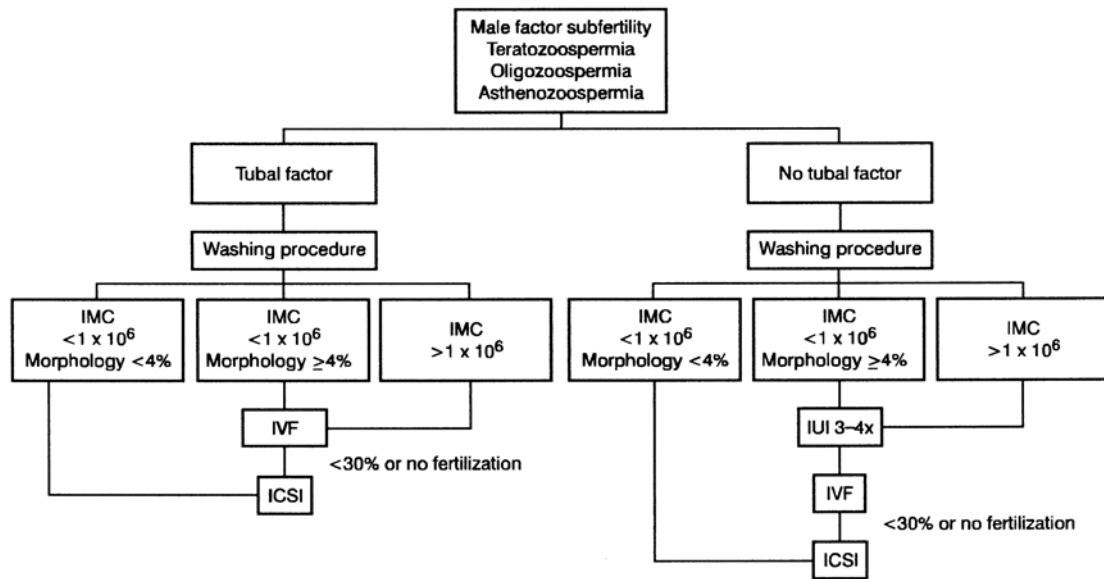


Figure 3. Opinion: proposed algorithm of male subfertility treatment at the Genk Institute for Fertility Technology (IMC = inseminating motile count; IUI = intrauterine insemination).

References

- Acosta AA, van der Merwe JP, Doncel Get al.1994 Fertilization efficiency of morphologically abnormal spermatozoa in assisted reproduction is further impaired by antisperm antibodies on the male partner's sperm. *Fertility and Sterility* 62, 826–833.
- Adeghe J-HA1992 Male subfertility due to sperm antibodies: a clinical overview. *Obstetrical and Gynecological Survey* 48, 1–8.
- Aitken RJ, Clarkson JS 1987 Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, 459–469.
- Allen NC, Herbert CM, Maxcon WSet al.1985. Intrauterine insemination: a critical review. *Fertility and Sterility* 44, 568–580.
- Baker HW, Burger HG, de Kretser DMet al.1981 Factors affecting the variability of semen analysis results in infertile men. *International Journal of Andrology* 4, 609–622.
- Barratt CLR, Dunphy BC, McLeod I, Cooke ID 1992 The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Human Reproduction* 7, 95–98.
- Berg U, Brucker C, Berg FD 1997 Effect of motile sperm count after swim-up on outcome of intrauterine insemination. *Fertility and Sterility* 67, 747–750.
- Branigan EF, Estes MA, Muller CH 1999 Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. *Fertility and Sterility* 71, 547–551.
- Brasch JG, Rawlins R, Tarchala S, Radwanska E 1994 The relationship between total motile sperm count and the success of intrauterine insemination. *Fertility and Sterility* 62, 150–154.
- Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D 1984 Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertility and Sterility* 42, 171–183.
- Burr RW, Sieberg R, Flaherty SPet al.1996 The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. *Fertility and Sterility* 65, 127–132.
- Calogero AE, Burrello N, De Palma Aet al.2003 Sperm aneuploidy in infertile men. *Reproductive BioMedicine Online* 6, 310–317.
- Campana A, Sakkas D, Stalberg A.et al.1996 Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Human Reproduction* 11, 732–736.

- Claman P 2001 Platelet-activating factor improves intrauterine insemination outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 185, 1277–1278.
- Cohlen BJ, Vandekerckhove P, te Velde ER, Habbema JD 2000 Timed intercourse versus intra-uterine insemination with or without ovarian hyperstimulation for subfertility in men. *Cochrane Database Syst Rev* 2, CD000360.
- Cooper TG, Keck C, Oberdieck U, Nieschlag E 1993 Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Human Reproduction* 8, 1251–1258.
- Dickey RP, Pyrzak R, Lu PY et al. 1999 Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with World Health Organization threshold values for normal sperm. *Fertility and Sterility* 71, 684–689.
- Dodson WC, Moessner J, Miller J et al. 1998 A randomized comparison of the methods of sperm preparation for intrauterine insemination. *Fertility and Sterility* 70, 574–575.
- Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S 2002a Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction* 17, 3122–3128.
- Duran EH, Morshedi M, Kruger T, Oehninger S 2002b Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Human Reproduction Update* 8, 373–384.
- Elder KT, Wick KL, Edwards RG 1990 Seminal plasma antisperm antibodies and IVF: the effect of semen sample collection into 50% serum. *Human Reproduction* 5, 179–184.
- Erel CT, Senturk LM, Irez T et al. 2000 Sperm-preparation techniques for men with normal and abnormal semen analysis. A comparison. *Journal of Reproductive Medicine* 45, 917–922.
- Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP et al. 2000 Intrauterine insemination or in-vitro-fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet* 355, 13–18.
- Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C et al. 1999 Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. *National Co-operative Reproductive Medicine Network. New England Journal of Medicine* 340, 177–183.
- Hammadeh ME, Kuhn A, Amer A et al. 2001 Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer. *International Journal of Andrology* 24, 360–368.
- Hauser R, Yogev L, Botchan A et al. 2001 Intrauterine insemination in male factor subfertility: significance of sperm motility and morphology assessed by strict criteria. *Andrologia* 33, 13–17.
- Helmerhorst FM, Oei SG, Bloemenkamp KWM, Keirse, MJNC 1995 Consistency and variation in fertility investigations in Europe. *Human Reproduction* 10, 2027–2030.
- Horvath PM, Bohrer M, Shelden RM, Kemmann E 1989 The relationship of sperm parameters to cycle fecundity in superovulated women undergoing intrauterine insemination. *Fertility and Sterility* 52, 288–294.
- Huang H-Y, Lee C-L, Lai Y-M et al. 1996 The impact of the total motile sperm count on the success of intrauterine insemination with husband's spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13, 56–63.
- Jarow JP, Sanzone JJ 1992 Risk factors for male partner antisperm antibodies. *Journal of Urology* 148, 1805–1807.
- Kahn JA, von Düring V, Sunde A et al. 1992a Fallopian tube perfusion: first clinical experience. *Human Reproduction* 7, 19–24.
- Kahn JA, von Düring V, Sunde A, Molne K 1992b Fallopian tube sperm perfusion used in a donor insemination programme. *Human Reproduction* 7, 806–812.
- Kahn JA, Sunde A, Koskemies A et al. 1993 Fallopian tube sperm perfusion (FSP) versus intra-uterine insemination (IUI) in the treatment of unexplained infertility: a prospective randomized study. *Human Reproduction* 8, 890–894.
- Karabinus DS, Gelety TJ 1997 The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertility and Sterility* 67, 536–541.
- Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K et al. 2001 Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 80, 74–81.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH et al. 1986 Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 46, 1118–1123.
- Larson KL, Brannian JD, Singh NP et al. 2001 Chromatin structure in globozoospermia: a case report. *Journal of Andrology* 22, 424–431.

- Lee RK-K, Hou J-W, Ho H-Yet al.2002a Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. *International Journal of Andrology* 25, 277–280.
- Lee VMS, Wong JSY, Loh SKE, Leong NKY2002b Sperm motility in the semen analysis affects the outcome of superovulation intrauterine insemination in the treatment of Infertile Asian couples with male factor infertility. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 109, 115–120.
- Lindheim SR, Barad DH, Zinger Met al.1996 Abnormal sperm morphology is highly predictive of pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13, 569–572.
- Lombardo F, Gandini L, Dondero F, Lenzi A2001 Antisperm immunity in natural and assisted reproduction. *Human Reproduction Update* 7, 450–456.
- McLachlan RI 2002 Basis, diagnosis and treatment of immunological infertility in men. *Journal of Reproductive Immunology* 57, 35–45.
- Matilsky M, Battino S, Ben-Ami Met al.1993 The effect of ejaculatory frequency on semen characteristics of normozoospermic and oligozoospermic men from an infertile population. *Human Reproduction* 8, 71–73.
- Matorras R, Corcostegui B, Perez Cet al.1995 Sperm morphology analysis (strict criteria) in male infertility is not a prognostic factor in intrauterine insemination with husband's semen. *Fertility and Sterility* 63, 608–611.
- Matson P1995 External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Human Reproduction* 10, 620–625.
- Matson PL, Junk SM, Spittle JW, Yovich JL1988 Effects of antisperm antibodies in seminal plasma upon sperm function. *International Journal of Andrology* 11, 101–106.
- McKinney KA, Lewis SE, Thompson W1996 The effects of pentoxifylline on the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation in human spermatozoa. *Andrologia* 28, 15–20.
- Miller DC, Hollenbeck BK, Smith GDet al.2002 Processed total motile count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology* 60, 497–501.
- Montanaro GM, Kruger TF, Coetzee Ket al.2001 Stepwise regression analysis to study male and female factors impacting on pregnancy rate in an intrauterine insemination programme. *Andrologia* 33, 135–141.
- Oehninger S 2000 Clinical and laboratory management of male infertility: an opinion on its current status. *Journal of Andrology* 21, 2068–2069.
- Oehninger S, Acosta AA, Kruger TFet al.1988 Failure of fertilization in in vitro fertilization: The 'occult' male factor. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 5, 181–187.
- Oei ML, Surrey ES, McCaleb B, Kerin JF 1992 Aprospective, randomized study of pregnancy rates after transuterotubal and intrauterine insemination. *Fertility and Sterility* 58, 167–171.
- Ombelet W, Puttemans P, Brosens I 1995a Intrauterine insemination: a first-step procedure in the algorithm of male subfertility treatment. *Human Reproduction* 10(suppl. 1), 90–102.
- Ombelet W, Menkveld R, Kruger TF, Steeno O 1995b Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility. *Human Reproduction Update* 1, 543–557.
- Ombelet W, Cox A, Janssen Met al.1996 Artificial Insemination (AIH) Artificial insemination 2: using the husband's sperm. In Acosta, AAand Kruger,TF (eds) *Diagnosis and Therapy of Male Factor In Assisted Reproduction*. Parthenon Publishing, pp. 397–410.
- Ombelet W, Bosmans E, Janssen M.et al. 1997a Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Human Reproduction* 12, 987–993.
- Ombelet W, Pollet H, Bosmans E, Vereecken A1997b Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Human Reproduction* 12, 1015–1020.
- Ombelet W, Vandeput H, Janssen Met al.1997c Treatment of male infertility due to sperm surface antibodies: IUI or IVF? *Human Reproduction* 12, 1165–1170.
- Ombelet W, Vandeput H, Van de Putte Get al.1997d Intrauterine insemination after ovarian stimulation with clomiphene citrate: predictive potential of inseminating motile count and sperm morphology. *Human Reproduction* 12, 1458–1463.
- Ombelet W, Wouters E, Boels Let al.1997e Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict versus WHO criteria in a fertile versus subfertile population. *International Journal of Andrology* 20, 367–372.
- Ombelet W, Bosmans E, Janssen Met al.1998 Multicentre study on reproducibility of sperm morphology

- assessments. *Archives of Andrology* 41, 103–114.
- Peters AJ, Coulam CB 1992 Review: sperm antibodies. *American Journal of Reproductive Immunology* 27, 156–162.
- Philips Z, Barazza-Llorens M, Posnett J 2000 Evaluation of the relative cost-effectiveness of treatments for fertility in the UK. *Human Reproduction* 15, 95–106.
- Richthoff J, Spano M, Giwercman Y et al. 2002 The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Human Reproduction* 17, 3162–3169.
- Ripps BA, Minhas BS, Carson SA, Buster JE 1994 Intrauterine insemination in fertile women delivers larger numbers of sperm to the peritoneal fluid than intracervical insemination. *Fertility and Sterility* 61, 398–400.
- Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M et al. 2000 The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Human Reproduction* 15, 1112–1116.
- Siegler SL 1944 *Fertility in Women*. JB Lippincott, Philadelphia, p. 403.
- Sims, JM 1873 *Uterine Surgery*. William Wood and Co., New York, p. 365.
- Shulman A, Hauser R, Lipitz S et al. 1998 Sperm motility is a major determinant of pregnancy outcome following intrauterine insemination. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15, 381–385.
- Stone BA, Vargyas JM, Ringler G et al. 1999 Determinants of the outcome of intrauterine insemination: analysis of outcomes of 9963 consecutive cycles. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 180, 1522–1534.
- Tarin JJ, Vendrell FJ, Ten J, Cano A 1998 Antioxidant therapy counteracts the disturbing effects of diamide and maternal ageing on meiotic division and chromosomal segregation in mouse oocytes. *Molecular Human Reproduction* 4, 281–288.
- Tartagni M, Schonauer MM, Cicinelli E et al. 2002 Usefulness of the hypo-osmotic swelling test in predicting pregnancy rate and outcome in couples undergoing intrauterine insemination. *Journal of Andrology* 23, 498–502.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC et al. 2001a Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reproduction* 16, 2160–2165.
- Tomlinson M, Turner J, Powell G, Sakkas D 2001b One-step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the World Health Organization's recommended methods? *Human Reproduction* 16, 121–124.
- Toner JP, Mossad H, Grow D et al. 1995 Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia* 27, 143–148.
- Trout SW, Kemmann E 1999 Fallopian sperm perfusion versus intrauterine insemination: a randomized controlled trial and metaanalysis of the literature. *Fertility and Sterility* 71, 881–885.
- van der Westerlaken LA, Naaktgeboren N, Helmerhorst FM 1998 Evaluation of pregnancy rates after intrauterine insemination according to indication, age, and sperm parameters. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15, 359–364.
- Van Voorhis BJ, Barnett M, Sparks A et al. 2001 Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 75, 661–668.
- Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombet W 2001 Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Human Reproduction* 16, 495–500.
- Wild MD, Roudebush WE 2001 Platelet-activating factor improves intrauterine insemination outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 184, 1064–1065.
- Williams DB, Moley KH, Cholewa C et al. 1995 Does intrauterine insemination offer an advantage to cervical cap insemination in a donor insemination program? *Fertility and Sterility* 63, 295–298.
- World Health Organization WHO 1987 *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- World Health Organization WHO 1992 *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- World Health Organization WHO 2002 *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen–Cervical Mucus Interaction*, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Klinische aspecten van ART

B.C.J.M. FAUSER

Afdeling Voortplantingsgeneeskunde, UMC Utrecht

Het is goed om terug te kijken op 25 jaar IVF wereldwijd en 20 jaar IVF in Nederland. De weerstanden bij de politiek en de wetenschappelijke wereld lijken goeddeels overwonnen, alhoewel recente discussie in Nederland te denken geeft.

In de media, maar ook in het Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde is de laatste jaren veel aandacht besteed aan IVF. Ontwikkelingen gedurende de afgelopen 20 jaar leken gedomineerd te worden door verbetering van ovariële hyperstimulatie regiems ter verkrijging van een maximale hoeveelheid oocyten voor bevruchting in het laboratorium en terugplaatsing van zo veel mogelijk embryo's in een poging tot het krijgen van zo hoog mogelijke kansen op zwangerschap per gestarte cyclus.

Ook maatschappelijk blijft de toepassing van geassisteerde voortplanting in de belangstelling staan; behandeling van alleenstaanden, draagmoederschap, maximum leeftijd van man of vrouw, gameet donatie, post-mortem behandeling en nog veel meer. Ook zij vermeld dat ontwikkelingen richting genterapie, clonen en het genereren van humane embryonale stamcellen niet plaats vinden zonder IVF.

Men wordt zich er toenemend van bewust dat veeleer als primaire uitkomstmaat gekeken dient te worden naar een optimale balans tussen kansen op de geboorte van een gezond kind (liefst afkomstig van een eenlingzwangerschap) per gehele IVF behandeling in relatie tot de belasting voor de patient, kans op bijwerkingen of complicaties and kosten. Deze benadering behelst een werkelijke paradigmashift en laat andere benaderingen toe, zoals minimale ovarie hyperstimulatie en terugplaatsing van slechts één embryo. In dit kader is nader prospectief onderzoek naar aangepaste gonadotropine doseringsschema in combinatie met GnRH antagonisten gewenst.

Voorts lijkt er duidelijke winst te behalen bij verdere verbetering van embryo kweekcondities en cryopreservatie van overtollige embryo's. Gebleken is dat de morfologische beoordeling van embryo's (tot op heden bepalend voor de keuze welke embryo terug te plaatsen) slechts van beperkte betekenis is. Een aanzienlijk deel (ongeveer 50%) van de verkregen embryo's blijkt chromosomaal afwijkend, ook al zien de embryo's er normaal uit. Bij terugplaatsing van dergelijke embryo's is de kans op implantatie gering en de kans op een miskraam groot. Onderzoek is gaande naar de chromosomale constitutie van het embryo (m.b.v. zgn. preimplantatie genetische screening (PGS) m.b.v. FISH) om te begroten in hoeverre toepassing van deze techniek de kansen op het krijgen van een eenlingzwangerschap na IVF zal vergroten.

Zaad, hoe nu verder?

A.M.M. WETZELS
UMC St Radboud, Nijmegen

Inleiding

“Zaad, hoe nu verder” , onder deze titel kan een breed scala aan onderwerpen worden besproken. In dit referaat beperk ik mij tot de ontwikkelingen op het gebied van semen analyse.

Semenanalyses worden in Nederland uitgevoerd door 100 tot 130 laboratoria uitgevoerd. Meestal gaat het om klinisch chemische of klinisch embryologische laboratoria, daarnaast wordt de semenanalyse uitgevoerd door een beperkt aantal andere laboratoria, zoals huisartsenlaboratoria, medische microbiologie en pathologie. Uit onderzoek blijkt dat wereldwijd, en dus ook in Nederland, een grote verscheidenheid aan technieken wordt toegepast ter evaluatie van de kwaliteit van semen, met alle gevolgen van dien. Het ontbreken van een goede standaard staat een klinische validatie en ook vernieuwing in de weg.

In dit stuk wordt een beschouwing gegeven van hoe de semenanalyse er voor staat en hoe we moeten handelen om verder te komen. Centraal staat daarbij standaardisatie, validatie en innovatie.

Waar staan we met de semenanalyse?

De semenanalyse is een belangrijke bouwsteen in het oriënterend fertiliteitsonderzoek, Traditioneel worden naast het algemeen aspect van het semen de parameters zaadcelconcentratie, motiliteit en morfologie bepaald. Ook traditioneel bestaat er een grote onenigheid over de referentie waarden voor deze parameters. De WHO manual (1) geeft hiervoor een volume van tenminste 2 ml, een zaadcelconcentratie van groter dan $20 \times 10^6/\text{ml}$ en minstens 25% motiliteit klasse A of 50% klasse A + B. De referentiewaarde voor morfologie is in de laatste versie van de manual achterwege gelaten. De referentiewaarden van de WHO zijn voornamelijk *authority based*, hetgeen al aangeeft dat er enkele moeilijkheden worden onderkend.

De geschiedenis nalopend is er veel literatuur verschenen over de waarde van de verschillende semenparameters voor de klinische praktijk, met veel tegengestelde waarnemingen, samengevat door Vreeburg (2). Neem bijvoorbeeld de zaadcelconcentratie: in 1951 gaf McLeod (3) als referentiewaarde $20 \times 10^6/\text{ml}$. David et al (4) kwam in zijn studie tot het $20 \times 10^6/\text{ml}$ afkappunt $60 \times 10^6/\text{ml}$, Bonde et al (5) op $20 \times 10^6/\text{ml}$ en Zinaman et al (6) op $30 \times 10^6/\text{ml}$. Een tweede voorbeeld betreft de waarde van de motiliteitsbepaling. Onder anderen Zinaman et al (6) en Ombelet (7) vinden motiliteit van ondergeschikte waarde ter vaststelling van de fertiliteit van de man ten opzichte van concentratie en morfologie. Echter, Barratt et al (8) en Eimers et al (9) beschouwen op basis van hun studies motiliteit als belangrijkste voorspellende parameter. Tenslotte de grenswaarden ter zinvolle behandeling met IUI en IVF. Voor IUI wordt vrij algemeen (NVOG richtlijn (10)) een ondergrens van 1 miljoen beweeglijke zaadcellen na bewerking aangehouden op basis van een studie van Cohlen

(11). Echter, er zijn veel verschillende bewerkingsmethoden voor semen in omloop, elk met hun eigen resultaat, zodat deze grenzen per lab zullen variëren.

De genoemde verschillen zijn voornamelijk te wijten aan problemen rond de standaardisatie van de methoden. Zonder eenduidige standaardisatie zijn alle studies ter klinische validatie van de semenanalyse alleen bruikbaar voor het laboratorium dat de studie uitvoerde. Daarnaast is het goed mogelijk dat we naar de verkeerde parameters kijken en moeten we wellicht meer energie stoppen in innovatie.

Standaardisatie, validatie en innovatie – wat is er gebeurd?

Het antwoord is: veel! Er is veel gebeurd, maar het heeft niet geholpen. Ombelet (7) spiegelde ons voor hoe het zit met de standaardisatie van de morfologiebepaling in een groot aantal klinieken. Hij kwam tot verschillen in wasmethode, fixatie, kleuring, gemeten aantal cellen en beoordelingscriteria. In theorie waren op basis van deze verschillen 3360 combinaties mogelijk, waarvan we zonder verder onderzoek mogen aannemen dat deze tot grote verschillen in gevonden waarden zullen leiden. Volgens DeJonge en Barratt (12) werd dit tekort aan standaardisatie ons in de schoot geworpen door de WHO manual: tot en met de derde editie werden niet-gestandaardiseerde technieken toegelaten, zelfs aangemoedigd. In de vierde druk van deze manual wordt echter, volgens deze auteurs, korte metten gemaakt met deze vorm van vrijheid. Waar of niet, dan komen we aan het volgende euvel: validatie.

Zoals gezegd, de vierde editie van de WHO manual (1) geeft slechts in beperkte mate referentiewaarden, die niet *evidence based* tot stand zijn gekomen. Dat is ook moeilijk, blijkt uit een in 2001 verschenen studie van Guzick et al (13), waarbij van een groot aantal mannen de fertiliteit bekeken werd in relatie tot de concentratie, motiliteit en morfologie van hun zaadcellen. De metingen werden door een beperkt aantal laboratoria gestandaardiseerd uitgevoerd. Daaruit werden grenswaarden voor fertiel en subfertiel gedefinieerd. Voor concentratie gold bijvoorbeeld een fertiele ondergrens van $48 \times 10^6/\text{ml}$ en een subfertiele bovengrens van $13,5 \times 10^6/\text{ml}$. Echter, de sensitiviteit en specificiteit waren nog steeds verre van optimaal en daarbij was er een aanzienlijke groep mannen die “intermediair” scoorden (dus in geval van concentratie tussen $13,5$ en $48 \times 10^6/\text{ml}$). Dit soort studies roept de vraag op of we wel naar de juiste parameters kijken bij ons onderzoek. Meer basaal gericht onderzoek is dus noodzakelijk ter verkrijging van een beter inzicht in de biologie van bevruchting. Op basis hiervan kunnen we dan onze methodes gaan innoveren. Maar heeft dit dan al die tijd stil gelegen?

Op verschillende fronten heeft de laatste decennia veel onderzoek plaatsgevonden. Daarbij werd vooral bekeken of bepaalde functionele tests de resultaten van IVF konden verklaren. Hamster eiceltest, acrosoomreactietest, zona bindingtest en hyperactivatietest zijn voorbeelden die tot enkele jaren geleden tot veel publicaties hebben geleid. Enkele hiervan worden nog genoemd in de nieuwe WHO manual, maar de meeste bleken niet geschikt voor standaard semenonderzoek. Een andere weg werd bewandeld met diverse computersystemen. Computer assisted sperm analysis (CASA) en automated sperm morphology analysis (ASMA) kwamen tot bloei, met als voornaamste doel de semenanalyse te standaardiseren. Echter, ook deze systemen leidden uiteindelijk niet tot

het gewenste eenduidige resultaat en zijn, voornamelijk uit kostenoverwegingen, nauwelijks meer in gebruik.

Een laatste ontwikkeling betreft de meting van de *sperm motility index* (SMI). Het betreft een geautomatiseerde methode waarbij de breking van een lichtstraal door de bewegende zaadcellen wordt gemeten en omgezet in een getal. Van der Horst (14) vond een goede reproduceerbaarheid van de metingen in combinatie met een 85% sensitiviteit ter voorspelling van mannelijke subfertiliteit in een groep van 77 mannen. Verdere studies zullen moeten uitwijzen in hoeverre de SMI bepaling nuttig is voor de toekomstige semenanalyse.

Waar moeten we naar toe?

Als uitgangspunt voor een nieuwe semenanalyse moeten we terug naar de basis: wat moet een zaadcel kunnen en wat heeft hij daarvoor nodig? Dan blijven er wellicht maar drie parameters over. Op de eerste plaats is evident dat een zaadcel beweeglijk moet zijn, althans als we uitgaan van het natuurlijke voortplantingsproces. Ten tweede moet de zaadcel in staat zijn aan de eicel te hechten en ten slotte moet hij de eicel kunnen voorzien van kwalitatief goed chromatine. Wellicht moeten we ons in de toekomst dus richten op een combinatie van deze drie aspecten: de relatie tussen het totaal aantal goed motiele, acrosoom-normale, DNA intacte zaadcellen.

Wat betreft de zaadcelkern zijn er de laatste jaren verschillende tests ontwikkeld met een hoog potentieel. Er kan op verschillende niveaus naar de kern worden gekeken. Allereerst kan de totale vorm en inhoud door middel van karyometrische technieken worden bepaald. Het gaat daarbij om totale DNA inhoud, chromatine textuur en algemene vorm van de kern. Meer gericht op de basale fysiologie van de zaadcel is het bepalen van de condensatiegraad van het DNA. Zaadcel DNA wordt tijdens de spermatogenese sterk gecondenseerd doordat histonen worden vervangen door protamines. Aansluitend op deze compactatie wordt een verdere condensatie verkregen tijdens het verblijf van de zaadcel in de epididymis door de vorming van S-S bruggen tussen de protamines. Uiteindelijk ontstaat een zeer compacte structuur die vrij ongevoelig is voor schadelijke stoffen. Door middel van kleuringstechnieken met bijvoorbeeld acridine orange (AO), chromomycine A3 (CMA3) of monobromobimaan (mBBR) kan inzicht worden verkregen in de chromatine structuur (zie o.m. Ramos (15)). Aanvullend kan door bijvoorbeeld de comet assay of TUNEL test schade aan het DNA worden bepaald. Verder kunnen via FISH chromosomen en chromosomale mutaties worden zichtbaar gemaakt. Voor een aantal tests (AO en TUNEL) is inmiddels bekend dat er een goede correlatie bestaat met mannelijke subfertiliteit.

Wat betreft motiliteit zou dan de voorkeur uitgaan naar een kleuring die gecombineerd kan worden met een acrosoom- en kernkleuring. Vooralsnog is deze echter niet beschikbaar. Als aanvulling op de huidige bepaling kan echter een meer functionele test worden uitgevoerd, waarbij de zaadcel moet voortbewegen in een viskeuze substantie, bijvoorbeeld cervicaal mucus (Ola et al, (16)) of een PVP oplossing. Een andere mogelijkheid is wellicht de hyaluronzuur bindingstest (HBA), waarover later meer.

Een normaal acrosoom is volgens de WHO ovaal en regelmatig gevormd en ter grootte van 40-70% van de oppervlakte van de zaadcelkop. Hoewel de acrosoomindex een redelijke voorspellende waarde heeft (zie Menkveld et al, (17)), zou wellicht ook hier de HBA van waarde kunnen zijn.

De hyaluronzuur bindings assay (HBA) is voornamelijk ontwikkeld door de groep van Huszar (18). Het is een eenvoudige test waarbij de binding van zaadcellen aan een coating van hyaluronzuur wordt bepaald. Uitgangspunt is dat rijpe zaadcellen het chaperone eiwit HspA2 tot expressie hebben gebracht. Dit eiwit komt daarna onder andere voor in de acrosomale membraan en is een receptor voor hyaluronzuur (hyaluronzuur is een tussencelstof die ondermeer voorkomt in het oocyt-cumulus complex). De eerste resultaten van de HBA zijn zeer bemoedigend. Het lijkt erop dat alleen de beste (motiel, acrosoom intact, DNA intact) zaadcellen binden aan het hyaluronzuur. De gekwantificeerde gebonden fractie zou dus een maat kunnen zijn voor de fertiliteit van de man. Tevens zou hyaluronzuur in ICSI procedures gebruikt kunnen worden ter selectie van te injecteren zaadcellen.

Al deze tests zullen zich in de nabije toekomst moeten gaan bewijzen. Daarbij komt nog de wijze van meten. Momenteel wordt door de WHO geadviseerd om ongeveer 200 zaadcellen bij een bepaling te betrekken. Dit geldt voor zowel de motiliteit als de morfologie. Dat hierbij statistisch gezien grote fouten optreden is duidelijk, nog afgezien van de fout die de analist kan maken bij het prepareren van het monster, het tellen en beoordelen. Met de introductie van de genoemde technieken zouden we direct een nieuwe manier van tellen moeten invoeren. Daarbij wordt momenteel vooral gestudeerd op flowcytometrische bepalingen. Voor de bepaling van de motiliteit is deze echter niet geschikt.

Hoe realiseren?

Belangrijk is dat we bij het begin beginnen. Dat wil zeggen dat er duidelijke landelijke afspraken komen over de uitvoering van de semenanalyse. Volgens DeJonge en Barratt (12) moeten een aantal stappen worden doorlopen om tot standaardisatie te komen. Allereerst moet een standaard worden vastgesteld, waarbij ondersteuning door de beroepsverenigingen van doorslaggevend belang is. De standaard dient geïmplementeerd te worden en daartoe is training erg belangrijk, maar ook een motivatie bij de hoofden van de laboratoria. Tenslotte moet de kwaliteit van de laboratoria en van de trainingen worden geborgd. DeJonge en Barratt geven verder aan dat wetgeving en richtlijnontwikkeling goede hulpmiddelen kunnen zijn in het standaardisatieproces.

Gelijk op met de standaardisatie, en deels zelfs daarop vooruitlopend, kan research starten naar de werkzaamheid van nieuwe methodieken. De eerste stappen zijn gezet (vide supra), maar tot nu toe zijn deze technieken nog niet beoordeeld op kosten en inzetbaarheid in het routinelab.

Als laatste zal een plan moeten worden gemaakt voor de klinische validatie van de methodes. Hierbij moet onderscheid worden gemaakt op basis van het doel waarvoor de

semenanalyse wordt aangevraagd (oriënterend fertiliteitonderzoek of ter indicatiestelling van geassisteerde voortplanting).

Voor een groot aantal zaken is de infrastructuur al aanwezig. Er is reeds 10 jaar een goede training voor semenanalyse (ESHRE cursus Rotterdam) en ook de externe kwaliteitscontrole staat op de rails via SKML. Onlangs werd de “stuurgroep semen” opgericht vanuit de NVKC en de KLEM, met als doel de activiteiten op het gebied van semenanalyse, IUI bewerking en spermabanken te stroomlijnen om zo tot standaardisatie en vernieuwing te komen. Hierbij hoort ook het opstellen van normen, zoals het recent opgestelde landelijk protocol spermabanken en het landelijk protocol IUI (conceptfase). Wat betreft innovatie lopen er in verschillende centra projecten met een groot potentieel.

Knelpunten zijn de capaciteit van de ESHRE cursus en het ontbreken van belangrijke parameters in de SKML controles zoals motiliteit. Verder ontbreekt nog een plan voor validatie. Hiervoor zal gecoördineerd een subsidieaanvraag moeten worden gedaan. Tenslotte is onbekend in hoeverre de laboratoriumhoofden de nieuwe plannen steunen, maar na deze PAOKC mag dat geen probleem meer zijn.....

Referenties

1. World Health Organization (1999) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press.
2. Vreebrug, JTM (2001) Semenanalyse, nut en onnut. Ned Tijdschr Klin Chem 26:277-282.
3. McLeod, J, Gold, RZ (1951) The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and 1000 cases of infertile marriage. J Urol 66:436-449.
4. David G, Jouannet P, Martin-Boyce A, Spira A, Schwartz D (1979) Sperm counts in fertile and infertile men. Fertil Steril 31: 453-455
5. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NHI, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T et al. (1998) Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. Lancet 352: 1172-1177.
6. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED (2000) Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. J Androl 21: 145-153.
7. Ombelet W. (1998) The value of sperm morphology and other semen parameters in diagnosis and treatment of human subfertility. Thesis Kath Univ Leuven, Belgium
8. Barratt CL, Tomlinson MJ, Cooke ID (1993) Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. Fertil Steril 60: 520-525.
9. Eimers JM, te Velde ER, Gerritse R, Vogelzang ET, Looman CW, Habbema JD (1994) The prediction of the chance to conceive in subfertile couples. Fertil Steril 61: 44-52
10. Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie (2000) Richtlijn Intra uterine inseminatie.
11. Cohlen, BJ (1997) Intrauteine insemination for treating male subfertility or cervical hostility. Thesis, Universiteit Utrecht.
12. DeJonghe CJ, Barratt CL (1999) WHO manual...Who should care? Hum Reprod 14:2431-2433.
13. Guzick, D.S. et al (2001) Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J Med, 345, 1388-1393.
14. Horst FA van der, Seidl-Prech BH, Kerst W. (2001) Analytische en klinische evaluatie van de sperm quality analyzer in vergelijking met de conventionele semenanalyse conform de WHO-criteria t.b.v. eerstelijns andrologisch laboratoriumonderzoek. Ned Tijdschr Klin Chem 26:288-292.
15. Ramos L. (2004) The quality of epididymal sperm in azoospermia. Thesis Kath Univ Nijmegen, The Netherlands.

16. Ola B, Afnan M, Papaioannou S, Sharif K, Bjorndahl L, Coomarasamy A Accuracy of sperm-cervical mucus penetration tests in evaluating sperm motility in semen: a systematic quantitative review. *Hum Reprod.* 2003 May;18(5):1037-46
17. Menkveld, R. et al (2001) Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod*, 16, 1165-1171.
18. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L (2003) Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 79 Suppl 3:1616-24