

INTERACTIE TUSSEN MENSELIJKE ZAADCELLEN EN HAMSTEREICELLEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT ROTTERDAM,
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS PROF. DR. J. SPERNA WEILAND
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATSVINDEN OP
WOENSDAG 27 JANUARI 1982 DES NAMIDDAGS
TE 3.45 UUR

DOOR

JACQUES COHEN

geboren te Den Haag



krips repro meppel

PROMOTOR: PROF. DR. G. H. ZEILMAKER
CO-REFERENTEN: PROF. DR. A. C. DROGENDIJK
PROF. DR. M. F. KRAMER

Omslagtekening en ontwerp: Albert Kuilman

INHOUD

Hoofdstuk 1

INLEIDING

1.1	Verminderde vruchtbaarheid.	1
1.2	Historische aspecten van de kennis omtrent het voortplantingssysteem bij de man.	1
1.3	Oorzaken en therapie van verminderde vruchtbaarheid bij de man.	3
1.4	De functie van het sperma-onderzoek.	4
1.5	Standaardisering en normalisering van sperma-onderzoek.	5
1.5.1	Zaadcelconcentratie.	5
1.5.2	Zaadcelmorfologie.	6
1.5.3	Zaadcelbeweeglijkheid.	8
1.5.4	Indexering van het sperma-onderzoek; de zogenaamde vruchtbaarheidsindex.	9
1.6	Doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek.	9
1.7	In vitro bevruchting.	10
1.7.1	Historische aspecten van de in vitro bevruchting bij zoogdieren.	10
1.7.2	In vitro bevruchting van de menselijke eicel.	12
1.7.3	In vitro bevruchting en diagnostiek.	12
1.7.4	Heterospecifieke bevruchting en diagnostiek.	13
1.8	Het kwantificeren van zaadcelbeweeglijkheid.	14

Hoofdstuk 2

METHODOLOGISCHE EN CELBIOLOGISCHE ASPECTEN VAN DE HAMSTEREICELTEST

2.1	Capacitatie en acrosoom-reactie.	17
2.1.1	Capacitatie.	17
2.1.2	De acrosoom-reactie.	18
2.2	De opwerking van zaadcellen.	20
2.3	Het verkrijgen van eischilvrije hamstereicellen.	21
2.4	Algemene criteria voor bevruchting en bevruchtungsparameters.	23
2.4.1	Criteria voor bevruchting.	23
2.4.2	Het bevruchtingspercentage.	25
2.4.3	De bindings-score.	25
2.4.4	Gemiddeld aantal gepenetreerde zaadcellen per eicel.	25
2.5	Kinetiek van de hamstereiceltest.	26
2.6	Zaadcelconcentratie en in vitro bevruchtend vermogen.	31
2.7	Morfologie van de zaadcel en in vitro bevruchtend vermogen.	32

2.8	Het invriezen van hamstereicellen.	33
-----	------------------------------------	----

Hoofdstuk 3

EEN SEMI-AUTOMATISCHE ANALYSE VAN DE BEWEEGLIJKHEID VAN ZAADCELLEN

3.1	Meervoudige belichtingsfotografie (MBF).	38
3.2	Omzetting van de informatie in XY-coördinaten.	44
3.3	Definities en berekeningen van sperma-karakteristieken.	45
3.4	Verwerking en presentatie van de gegevens.	47
3.5	Subjectieve bepaling van beweeglijkheid.	48
3.6	Nauwkeurigheid van de meervoudige belichtingsfotografie.	48

Hoofdstuk 4

BETEKENIS VAN DE HAMSTEREICELTEST VOOR DE PROGNOSE VAN DE MOGELIJKHEID OP EEN CONCEPTIE. EEN VERGELIJKENDE STUDIE VAN VRUCHTBARE DONOREN EN ONVRUCHTBARE OF VERMINDERD VRUCHTBARE PATIENTEN

4.1	Inleiding.	54
4.2	Bestudeerde patiënten en donoren.	55
4.3	Morfologie-bepalingen van de zaadcellen.	57
4.4	Frequentieverdelingen van het in vitro bevruchtend vermogen van patiënten en donoren.	57
4.5	Relatie tussen abnormaal semen, onbegrepen onvruchtbaarheid en de hamstereiceltest.	61
4.6	Reproduceerbaarheid van de hamstereiceltest.	63
4.7	De diagnostische waarde van de hamstereiceltest in een prognostische studie.	65
4.8	De duur van de onvruchtbaarheid en de prognostische waarde van de hamstereiceltest.	67

Hoofdstuk 5

DE HAMSTEREICELTEST EN ANDERE SEMENFACTOREN

5.1	Onderlinge relaties tussen bevruchtingsparameters.	68
5.2	De duur van de beweeglijkheid in vitro en de in vitro bevruchting.	68
5.3	Meervoudige belichtingsfotografie, zaadcelmorfologie en in vitro bevruchting.	71
5.4	Effecten van homoloog spermaplasma op de in vitro bevruchting.	74
5.5	Immunoglobulinen en het in vitro bevruchtend vermogen.	78
5.6	Fumarase-activiteit in relatie tot beweeglijkheid en in vitro bevruchting.	80

Hoofdstuk 6

EFFECTEN VAN CRYOPRESERVATIE VAN SPERMA OP HET IN VITRO BEVRUCHTEND VERMOGEN

6.1	Historische aspecten van kunstmatige inseminatie.	82
6.2	Historische aspecten van cryopreservatie van sperma.	83
6.3	Factoren die de overleving van zaadcellen na cryopreservatie beïnvloeden.	84
6.3.1	Koude-shock.	84
6.3.2	Het vriesproces.	84
6.3.3	Cryo-beschermende stoffen.	85
6.4	Doel van het onderzoek.	85
6.5	Materiaal en methoden.	86
6.5.1	Gebruikte cryobiologische media.	86
6.5.2	Invriezen, conserveren en ontdooien.	86
6.5.3	Opwerking van zaadcellen.	87
6.5.4	Statistische bewerkingen.	87
6.6	Effecten van het opzwellen van zaadcellen in een laag medium op het in vitro bevruchtend vermogen.	88
6.7	Experiment 1: vergelijking van cryo-beschermende media.	91
6.8	Experiment 2: effect van koelsnelheid.	91
6.9	Experiment 3: vergelijking van ontdooi-procedures.	92
6.10	Donor-selectie en hamstereiceltest.	94

Hoofdstuk 7

HETEROLOGE INCUBATIE VAN ZAADCELLEN VAN VRUCHTBARE MANNEN IN SPERMAPLASMA VAN ONVRUCHTBARE MANNEN EN VICE VERSA

7.1	Mannelijke accessoire gelachtsorganen en zaadceltransport.	97
7.2	Functie van het spermaplasma.	98
7.3	De relatie tussen de chemische samenstelling van het spermaplasma en de vruchtbaarheid.	99
7.4	Doel van het onderzoek.	100
7.5	Methoden.	101
7.6	Effecten van spermaplasma en kweekmedium op de beweeglijkheid.	103
7.7	Effecten van spermaplasma op de in vitro bevruchting.	105
7.8	Conclusies.	105

Hoofdstuk 8

SPLIT-EJACULATIE EN ZAADCELPARAMETERS

8.1	Inleiding.	106
8.2	Klinische relevantie van split-ejaculatie.	107
8.3	Doel van het onderzoek.	108
8.4	Statistische bewerking van de resultaten.	108
8.5	Experiment 1: beweeglijkheid en morfologie van zaadcellen in split-ejaculaten.	108
8.6	Experiment 2: beweeglijkheid van zaadcellen in split-ejaculaten opgevangen in medium.	112
8.7	Het in vitro bevruchtend vermogen van zaadcellen uit verschillende fracties van split-ejaculaten.	113

SAMENVATTING	117
SUMMARY	121
IN DE TEKST VERMELDE REFERENTIES	126
INDEX VAN ONDERWERPEN	147
Nawoord	153
Curriculum vitae	155

HOOFDSTUK 1

INLEIDING

1.1 Verminderde vruchtbaarheid

Van verminderde vruchtbaarheid is sprake wanneer bij een echtpaar met kinderwens na een jaar nog geen zwangerschap is opgetreden. Het percentage echtparen dat hiermee wordt geconfronteerd, wordt op 10% geschat (MacNaughton, 1973; Aafjes en van der Vijver, 1976; Gottesman en Bain, 1980). In ongeveer 20 tot 40 % van de gevallen is een niet normaal functioneren van het mannelijk voortplantingssysteem de oorzaak van de onvervulde kinderwens (Aafjes en van der Vijver, 1976; Gottesman en Bain, 1980; Dubin en Amelar, 1980).

In dit proefschrift wordt vrijwel alleen aandacht besteed aan diagnostische en experimentele aspecten van het mannelijk voortplantingssysteem. Men dient echter te bedenken, dat men eigenlijk van verminderde vruchtbaarheid of onvruchtbaarheid van een bepaalde relatie zou moeten spreken.

1.2 Historische aspecten van de kennis omtrent het voortplantingssysteem bij de man

De eerste scherpzinnige waarnemingen betreffende de vruchtbaarheid van het mannelijk zaad werden 350 jaar voor het begin van onze jaartelling beschreven door Aristoteles, in zijn verhandeling "Historia Animalium". Aristoteles meende dat gezond sperma troebel en wit zou moeten zijn. Vruchtbaar sperma geplaatst in water zou moeten bezinken. Onvruchtbaar sperma daarentegen zou gemakkelijker in water oplossen.

De kennis omtrent het mannelijk zaad werd in 1677 door Van Leeuwenhoek ingrijpend gewijzigd. Deze nam waar, dat er zich in het sperma snel bewegende "kleine diertgens" (of zaaddiertjes, later zaadcellen genoemd) bevonden. Menig bioloog had zijn twijfels over de juistheid van deze waarnemingen. Men vroeg zich af of deze verschijnselen deel uitmaakten van de normale samenstelling van het sperma en in hoeverre deze diertjes levensvatbaar waren. Linnaeus beschouwde de zaaddiertjes als levenloze materie (Tyler, 1967). Deze veronderstelling was gebaseerd op een aantal hypothesen van Van Leeuwenhoek zelf. Gedurende de 5 jaar na

zijn gedenkwaardige ontdekking, bestudeerde Van Leeuwenhoek gelijksoortige microscopische verschijnselen bij diersoorten. Hij kwam tot de conclusie dat er op de één of andere wijze onderscheid zou kunnen worden gemaakt tussen vrouwelijke en mannelijke zaaddiertjes. Men meent vaak onterecht, dat Van Leeuwenhoek hiermee bedoelde dat het geslacht van het zaaddiertje aan de hand van de vorm herkend kon worden (Schierbeek, 1963). De sperma-diertjes werden door hem in de uterus van een hond teruggevonden. Hij veronderstelde dat de eicel nooit de uterus kon bereiken, omdat de eileider te nauw zou zijn. Men meende destijds immers, dat de follikel zelf de eicel was (Schierbeek, 1963). Zodoende kon Van Leeuwenhoek tot de conclusie komen, dat de foetus afkomstig is van één enkel zaaddiertje. Bewijzen kon Van Leeuwenhoek deze theorie niet. Hoewel hij zich er van bewust was, dat uit slechts één of twee zaaddiertjes tegelijkertijd nakomelingen voortkwamen, kon hij geen verklaring vinden voor de aanwezigheid van "duizenden" zaaddiertjes in één enkel ejaculaat (1683). Hij vergeleek dit verschijnsel met het selectieve ontstaan van één enkele appelboom uit vele zaden. De wortel van de jonge appelboom maakt het andere potentiële bomen onmogelijk zich te ontwikkelen.

De befaamde 18e eeuwse experimenteel bioloog Spallanzani (1776) was er van overtuigd dat de foetus al voor de bevruchting, in zijn geheel in het vrouwelijk lichaam aanwezig was. Dit was echter niet in overeenstemming met de resultaten van één van zijn belangrijkste experimenten. Hij toonde namelijk aan dat inseminatie met zaadcelvrij sperma-filtraat geen bevruchting tot gevolg had. Daarmee toonde hij aan, zonder zich daar bewust van te zijn, dat de zaadcellen de bevruchtende organismen uit het sperma waren. Pas een eeuw later werden deze gegevens door enkele biologen op de juiste wijze geïnterpreteerd.

In een correspondentie (1771) met de eminente bioloog Charles Bonnet uit Genève vat Spallanzani de betekenis van de zaaddiertjes in drie kernproblemen samen (Aloisi, 1974): Waar komen ze vandaan? Hoe planten ze zich voort? Waar dienen ze voor? Spallanzani meende dat vergelijkbare diertjes in water en in vissen konden worden waargenomen. Hij opperde de mogelijkheid dat een aantal van de op wormpjes gelijkende zaaddiertjes van insecten afkomstig was, maar kon dit niet met feiten staven. Bonnet daarentegen meende dat de wormpjes uit het bloed kwamen. De juiste conclusies uit Spallanzani's filtraat-experimenten werden door Prevost en Dumas in 1824(a en b) en door Newport (1853) getrokken. De meeste wetenschappers echter veronachtzaamden deze gegevens. Pas door Hertwig (1876) en Fol (1877 a en b) werd aangetoond dat de zaadcel de eicel binnendringt. Hierna werd de betekenis van de zaadcel voor de

embryo-ontwikkeling, algemeen aanvaard.

1.3 Oorzaken en therapie van verminderde vruchtbaarheid bij de man

Het is niet zinvol om het bevruchtend vermogen van één enkele geïsoleerde menselijke zaadcel te bepalen. Bij de paring komen er immers niet enkele, maar tussen de 5 en 500 miljoen zaadcellen in het vrouwelijk organisme terecht. Een bevruchtingsbepaling van zaadcellen is daarom gebaseerd op waarschijnlijkheidsanalyses van de samenhang tussen karakteristieken van het sperma en het aantal optredende zwangerschappen.

Oorzaken van verminderde vruchtbaarheid en resultaten van therapie zijn eveneens moeilijk exact te omschrijven. De reden hiervan werd dertig jaar geleden door Tyler (1951) op treffende wijze onder woorden gebracht; "the numerous constitutional and local conditions that can affect fertility of both partners are so diversified that in any critical analysis it is difficult to know where to start and when to stop." Talrijke therapeutische hulpmiddelen voor de behandeling van de man zijn sindsdien voorgesteld. Deze blijken slechts sporadisch succes te hebben. De situatie is sinds de uitspraak van Tyler vrijwel onveranderd en werd door Gottesman en Bain (1980) als volgt samengevat; "...our understanding of the various facets of male subfertility remains rudimentary."

De mannelijke vruchtbaarheid kan verminderen als gevolg van infecties, zoals onsteking van de testikel (orchitis), onsteking van de prostaat en de zaadblazen (prostatovesiculitis) en geslachtsziekten. Ook kunnen vruchtbaarheidsproblemen ontstaan als gevolg van een vaatopzwellings (varicocele), door chromosomale afwijkingen, door het niet of onvoldoende indalen van de testikels (cryptorchisme), door hormonale factoren, door obstructieve azoöspermie (geen zaadcellen aanwezig in het ejaculaat) of oligospermie (te weinig zaadcellen aanwezig in het ejaculaat, 1.5.1), en door immunologische factoren (Dubin en Amelar, 1971; van Zyl et al., 1975; Aafjes en van der Vijver, 1976; Gottesman en Bain, 1980). Bij het merendeel van dergelijke patiënten worden afwijkingen gevonden bij het sperma-onderzoek. Andere factoren die ook een invloed hebben op de bevindingen bij het sperma-onderzoek zijn stress, voeding, trauma, allergische factoren en verdovende middelen (Van Zyl et al, 1976).

1.4 De functie van het sperma-onderzoek

De drie belangrijkste parameters bij het sperma-onderzoek zijn zaadcelconcentratie, zaadcelvorm (zaadcelmorfologie) en zaadcelbeweeglijkheid (Katz, 1981). Deze factoren hangen onderling en met de vruchtbaarheid samen (Tyler, 1953; Eliasson, 1973; Amelar, 1980). Dit betekent niet dat er een absolute relatie bestaat tussen de uitkomst van een sperma-onderzoek en de kans op nakomelingschap van een bepaalde man. Zo zijn er voorbeelden van patiënten met zeer lage zaadcelconcentraties, die wel een zwangerschap veroorzaken, terwijl anderen met "normale" zaadcelconcentraties, nooit een nakomelingschap verwekken.

Het routine sperma-onderzoek kan worden uitgebreid, door het percentage levende zaadcellen te bepalen en vast te stellen of er voorstadia van zaadcellen of andere cellen in het ejaculaat voorkomen, welke kunnen wijzen op infecties of op een varicocèle (MacLeod, 1964; 1971 a en b). Ook kan aandacht worden besteed aan de klontering van zaadcellen (aggregatie, zie 5.4 en 5.5), de vloeibaarheid (viscositeit) en de zuurgraad van het spermaplasma en de concentraties van stoffen daarin aanwezig (Eliasson, 1973; hoofdstuk 7 en 8).

Sommige onderzoekers geven de voorkeur aan een bestudering van de doordringbaarheid van menselijk baarmoederhalsslijm voor zaadcellen (Kremer, 1968). Zo kan de in het laboratorium nagebootste penetratie van het baarmoederhalsslijm (cervixslijm), gekwantificeerd door middel van een doordringbaarheids- of penetratiemeter, als een hulpmiddel worden gebruikt om te voorspellen of kunstmatige inseminatie moet worden toegepast via de baarmoeder dan wel via de baarmoederhals (Kremer, 1965 en 1980). De penetratie van cervixslijm hangt samen met het percentage normale en beweeglijke zaadcellen. Indien de zaadcelconcentratie hoger is dan 5 miljoen per milliliter en indien het cervixslijm normaal doordringbaar is, kan de uitslag van de cervixslijmpenetratie met grote zekerheid voorspeld worden aan de hand van een volledig sperma-onderzoek (Hafez, 1973; David et al, 1979). Dit betekent dat de cervixslijmpenetratietest bij het onderzoek van de man niet als een onafhankelijke parameter kan worden beschouwd.

Het is vaak niet mogelijk om aan de hand van het sperma-onderzoek vast te stellen welk orgaan de in het sperma aangetoonde afwijking(en) veroorzaakt. Zo kan het functioneren van de testikel wel door bestudering van één stukje testisweefsel worden gekwantificeerd bij met name oligosperme mannen. De prognose van de vruchtbaarheid op basis van de

kwantificatie van testisweefsel, is echter alleen bij een geringe kans op een zwangerschap effectief (Johnson, 1970; Aafjes et al, 1978). Uit onderzoek van Aafjes en medewerkers (1978) bleek, dat de verhouding tussen de testisweefsel-score en de kans op een zwangerschap, bij een groep oligosperme mannen niet samenhangt met hormoonconcentraties of karakteristieken van het sperma-onderzoek. Blijkbaar kunnen de zaadcellen tijdens het verblijf in de bijbal (epididymis) of door menging met de vloeibare component van het sperma (spermaplasma), veranderen. Mede daardoor geeft het sperma-onderzoek minder directe informatie omtrent de werking van de testikel, dan een biopsie-score.

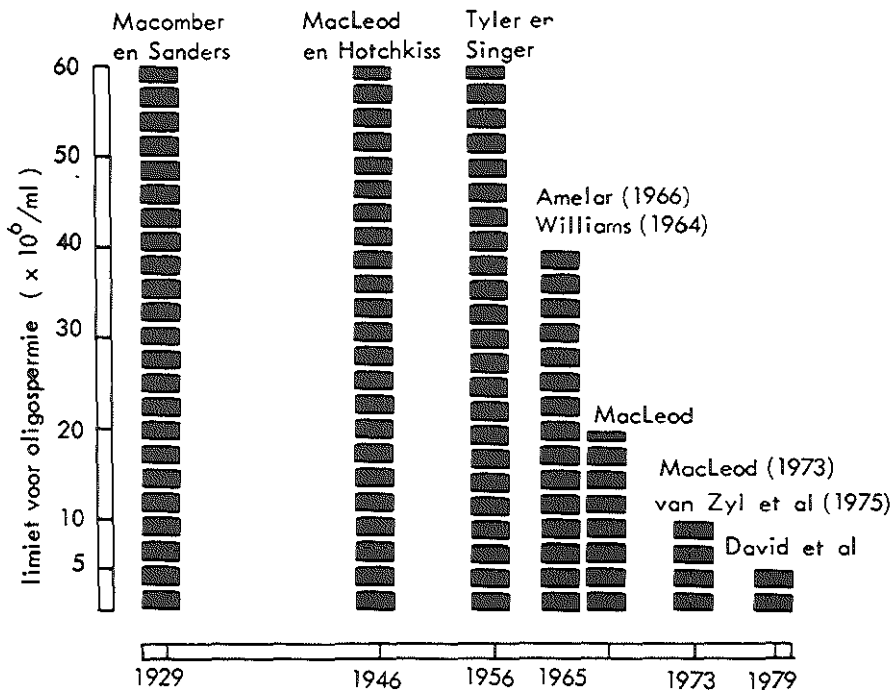
Er bestaat geen methode voor de evaluatie van de epididymis-functie (Eliasson, 1973; van Dop en Schoysman, 1981). Ook bepalingen van chemische componenten aanwezig in het spermaplasma geven geen uitsluitsel betreffende de vruchtbaarheid (hoofdstuk 7 en 8).

1.5 Standaardisering en normalisering van sperma-onderzoek

1.5.1 Zaadcelconcentratie

Alleen na een succesvolle kunstmatige inseminatie, kan van "vruchtbaar" sperma worden gesproken. Vaak wordt onterecht gemeend dat de aanwezigheid van grote hoeveelheden zaadcellen in het sperma een bewijs is van vruchtbaarheid.

Lode (1891) was de eerste die zaadceltellingen verrichtte. Hij deed dat voornamelijk met ejaculaten van honden, maar hij bestudeerde ook regelmatig het ejaculaat van één man. Daarbij nam hij grote verschillen waar tussen de ejaculaten van dezelfde proefpersoon. In 1929 werd voor het eerst de zaadcelconcentratie bij een grote groep mannen systematisch vastgesteld (Macomber en Sanders). Deze onderzoekers concludeerden, dat mannen met minder dan 60 miljoen zaadcellen per milliliter niet absoluut onvruchtbaar waren. Wel concludeerden zij dat de vruchtbaarheid in vergelijking tot mannen met hogere zaadcelconcentraties, lager was. Macomber en Sanders stelden daarom dat de zaadcelconcentratie een hulpmiddel was bij de diagnose en de prognose. Sindsdien is gebleken dat de definitie van oligospermie niet alleen kliniekgebonden maar ook tijdsgebonden is (figuur 1.1). In de vijftiger jaren werd bij 60 miljoen zaadcellen per milliliter al gesproken van een oligospermie. Tegenwoordig beschouwt de meerderheid van de klinici 20 miljoen zaadcellen per milliliter als limiet. Bij 5 miljoen zaadcellen per milliliter of minder,



Figuur 1.1 Oligospermie-criterium sinds 1929.

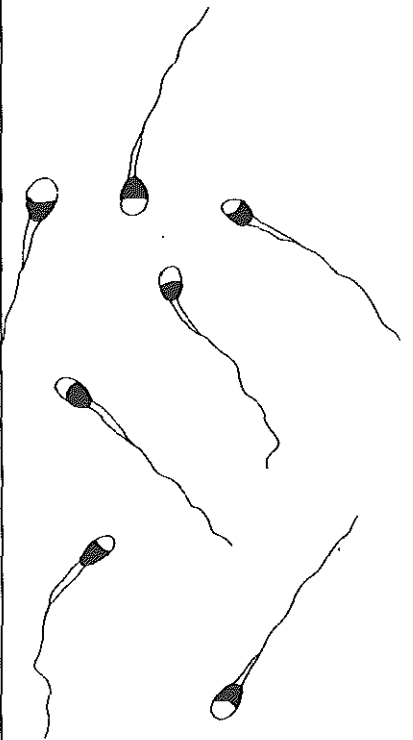
wordt van ernstige oligospermie gesproken.

De betekenis toegekend aan de zaadcelconcentratie is de laatste jaren verminderd. Statistieken hebben aangetoond dat er bij de grote groep patiënten met een zaadcelconcentratie tussen de 5 en 60 miljoen per milliliter geen samenhang bestaat tussen de concentratie en de vruchtbaarheid (Smith et al, 1977; Aafjes et al, 1978).

1.5.2 Zaadcelmorfologie

Hoewel er overeenstemming bestaat, omtrent de ideale vorm (figuur 1.2) van de normale menselijke zaadcel, is het moeilijk om het normaalbegrip te begrenzen en een systeem van abnormaliteiten te classificeren (Freund, 1968; Moench en Holt, 1931). Het is niet

Figuur 1.2 Morfologische classificatie van menselijke zaadcellen en criteria voor teratospermie.

<p>normale zaadcellen (Freund, 1966)</p>  <p>vergroting ± 2000 x</p>	<p>morfologische classificatie van abnormaliteiten (Eliasson, 1973; Zaneveld en Polakoski, 1977)</p> <p>zaadcelkop</p> <ul style="list-style-type: none"> ● macrocephaal ● microcephaal ● geen kop ● langwerpig (lepto) ● amorfe deformatie ● geen acrosoom ● beschadigd acrosoom <p>middenstuk</p> <ul style="list-style-type: none"> ● gebroken ● cytoplasmatische druppel <p>staart</p> <ul style="list-style-type: none"> ● dubbel ● gekruld ● hoekig ● gebroken ● afwezig <p>verder</p> <ul style="list-style-type: none"> ● ongedifferentieerde voorstadia (spermatiden) 	<p>criteria voor teratospermie (percentage abnormale vormen)</p> <p>Moench en Holt, 1931 20-30 %</p> <p>MacLeod en Hotchkiss, 1946 20 %</p> <p>Heller et al., 1950 60 %</p> <p>Research correlating committee for Fertility and Sterility, 1951 20 %</p> <p>Tyler, 1951 25 %</p> <p>Eliasson, 1973 40 %</p> <p>Zaneveld en Polakoski, 1977 50 %</p> <p>Dijkzigt, Rotterdam, 1981 70 %</p>
--	---	---

duidelijk, welke afwijkingen gevolgen hebben voor de vruchtbaarheid en in hoeverre een percentage abnormale zaadcellen in verminderde vruchtbaarheid resulteert (figuur 1.2). Morfologische abnormaliteiten worden bij iedere man aangetroffen.

Een correlatie tussen morfologische abnormaliteiten en onvruchtbaarheid wordt waargenomen in die zeldzame gevallen, welke gekenmerkt zijn door afwijkingen die in alle zaadcellen voorkomen. Voorbeelden hiervan zijn de afwezigheid van het acrosoom (Schirren et al, 1971; Pedersen en Rebbe, 1974; zie 2.1), bedekking van de zaadcelkop door cytoplasma (Renièri, 1974) en de afwezigheid van functionele staartstructuren, waardoor de zaadcel onbeweeglijk wordt (Pedersen et al, 1971; Ross et al, 1973). Meestal bevinden zich in sperma zaadcellen met verschillende abnormaliteiten.

1.5.3 Zaadcelbeweeglijkheid

De totale afwezigheid van beweeglijkheid van zaadcellen (necrospermie) in een ejaculaat is een relatief zeldzaam verschijnsel (Harvey en Johnson, 1945). De zaadcellen bewegen nooit allemaal en de bewegende verplaatsen zich niet op dezelfde wijze. Beweeglijkheid wordt meestal in twee kwantitatieve parameters uitgedrukt: het aantal bewegende zaadcellen (percentage beweeglijkheid) en de wijze van progressie (ook wel kwalitatieve beweeglijkheid genoemd). In verband met het vaststellen van normaalwaarden, is het van belang, dat de beweeglijkheid objectief en kwantitatief wordt bepaald (Amelar et al, 1980; Katz, 1981).

De beweeglijkheid verandert in de tijd na ejaculatie (Makler, 1979a; Makler en Zaidise et al, 1979) en wordt beïnvloed door de omgevingstemperatuur (Milligan et al, 1979). De zaadcellen kunnen in spermaplasma of in een medium met een constante samenstelling worden bestudeerd. Bij microscopische schatting van de kwantitatieve beweeglijkheid speelt de ervaring en de concentratie van de waarnemer een belangrijke rol. Uit objectieve meetmethoden blijkt dat microscopische schatting van beweeglijkheid zeer subjectief is (hoofdstuk 3). Daar aan de bepaling van de beweeglijkheid grote klinische waarde wordt toegeschreven, is het noodzakelijk de meetmethoden te objectiveren (1.8).

1.5.4 Indexering van het sperma-onderzoek; de zogenaamde vruchtbaarheidsindex

Het vastleggen van de resultaten van het sperma-onderzoek in één enkele maatgevende factor of index is gebaseerd op verschillende voorkeurprincipes. Door Eliasson (1971) werd bijvoorbeeld een score ontwikkeld, uit 4 belangrijke factoren, namelijk beweeglijkheid, concentratie, morfologie en aggregatie. Via een logaritmische schaal worden deze factoren gegradeerd en bij elkaar opgeteld. Elke factor weegt zodoende even "zwaar". Het is de vraag welke criteria gebruikt moeten worden om het "gewicht" van de verschillende factoren te bepalen.

Het is niet aangetoond dat dergelijke indexen klinisch meer van belang zijn dan een evaluatie van afzonderlijke factoren. Elke index is beperkt omdat niet met aparte oorzakelijke factoren rekening kan worden gehouden.

1.6 Doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek

Hoewel uit het voorafgaande is gebleken, dat het sperma-onderzoek voor de evaluatie van de vruchtbaarheid van de man onontbeerlijk is, kan er, behalve in speciale gevallen zoals bij azoöspermie, geen absolute uitspraak worden gedaan over de prognose van de kans op nakomelingschap, aan de hand van het sperma-onderzoek alleen. De meeste factoren die bij het sperma-onderzoek worden gemeten, gaan aan de werkelijke functie van de zaadcel voorbij. Het interne metabolisme van de zaadcel, de chromosomale samenstelling van de zaadcel en het bevruchtingsproces worden in het sperma-onderzoek niet betrokken.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek is er in de eerste plaats op gericht de interactie tussen eicel en zaadcel in laboratoriumomstandigheden (in vitro) te kwantificeren. Een toepassing van een dergelijke diagnostische test wordt belemmerd door een tekort aan menselijke eicellen. Om deze beperkende factor te vermijden, werd niet de menselijke eicel, maar de hamstereicel gebruikt. De interactie tussen speciaal voor dit doel geïsoleerde en gemanipuleerde hamstereicellen en humane zaadcellen wordt in paragraaf 1.7 en in hoofdstuk 2 besproken.

In de tweede plaats is dit onderzoek gedaan om relaties tussen het sperma-onderzoek en de in vitro bevruchting te bestuderen. Omdat sperma-onderzoek voor een deel berust op subjectieve criteria, werden de concentratie en de beweeglijkheid door middel van een semi-automatische

methode objectief bepaald. De beweeglijkheid werd fotografisch vastgelegd (met behulp van meervoudige belichtingsfotografie) en de afbeeldingen werden door middel van computertechnieken verwerkt (1.8 en hoofdstuk 3).

De vraagstellingen die behandeld worden betreffende de betekenis, de betrouwbaarheid en de toepasbaarheid van de hamstereiceltest, kunnen als volgt worden samengevat:

1. Klinische bruikbaarheid van de hamstereiceltest (hoofdstukken 2,4 en 5).
 - in hoeverre is de hamstereiceltest een diagnostisch hulpmiddel?
 - wat is de relatie tussen de uitslag van de test en de kans op een zwangerschap?
 - wat is de relatie tussen het in vitro bevruchtend vermogen en andere semen-factoren?
2. Experimentele bruikbaarheid van de hamstereiceltest en van de semi-automatische kwantificering van beweeglijkheid (hoofdstukken 3, 6, 7 en 8).
 - Wat is de invloed van verschillende invries- en ontdooi-technieken op het in vitro bevruchtend vermogen?
 - Bestaan er redenen om de hamstereiceltest in sperma-banken toe te passen?
 - Wat is het effect van "pathologisch" spermaplasma op zaadcellen van mannen met "normaal" spermaplasma en omgekeerd?
 - Wat is het effect van gefractioneerd opvangen van ejaculaat (split ejaculaat) op de eigenschappen van de zaadcellen en op het in vitro bevruchtend vermogen ervan?

1.7 In vitro bevruchting

1.7.1 Historische aspecten van de in vitro bevruchting bij zoogdieren

De geboorte van Louise Brown in juli 1978 in Engeland werd met grote belangstelling gevolgd, omdat zij de eerste baby was, die door middel van een in vitro bevruchting verwekt werd. Dat was gebeurd door de eicel van de moeder, buiten het lichaam (in vitro), in contact te brengen met de zaadcellen van de vader. Het in het laboratorium gekweekte embryo werd na enige dagen in de uterus teruggetransplanteerd, waar het zich ontwikkelde tot een normale foetus (Stephoe en Edwards, 1978). Hoewel dit voor de

experimentele embryologie een historisch hoogtepunt was, mag niet worden voorbijgegaan aan ander onderzoek, zonder welke de "in vitro bevruchting" van de menselijke eicel, niet mogelijk zou zijn. De huidige status van de experimentele embryologie is onder andere een gevolg van de vooruitgang, die door celbiologen is geboekt, met name op het gebied van de kweekcultuur. De eerste primitieve kweekmedia die voor konijn-eicellen werden gebruikt, bestonden uit een mengsel van kippe-embryo extract en bloedplasma (Pincus, 1931). Later werd aandacht besteed aan de buffering van het kweekstelsel, aan de toevoeging van energiebronnen en eiwitten, aan de pH en aan de O_2 -spanning.

Door Van Beneden werd bevruchting voor het eerst op cellulair niveau bestudeerd bij het konijn (volgens Thibault, 1969). Meer dan een eeuw geleden werd door de Weense embryoloog Schenk (Thibault, 1969; Seitz et al, 1973) de eerste in vitro bevruchting van een zoogdiereicel beschreven. Deze suspenderde eicellen van konijnen en cavia's in een mengsel van cervixslijm en baarmoederslijmvlies en bracht ze in contact met zaadcellen afkomstig van de epididymis. Hij beschreef de vorming van een poollichaampje en het optreden van klieving. Enige jaren later, in 1893, beschreef Onanoff in een brief een aantal experimenten met eicellen van konijnen en cavia's. Na de eicellen in vitro bevrucht te hebben, nam deze onderzoeker ontwikkeling tot het 8-cellige stadium waar. Na transplantatie in de buikholte zou zelfs een verdere ontwikkeling zijn waargenomen. De experimenten van Schenk en Onanoff konden door anderen niet bevestigd worden (Thibault, 1969). De eerste uitvoerig beschreven in vitro bevruchtingsexperimenten dateren uit de dertiger jaren (Pincus en Enzmann, 1934, 1935 en 1936). Men neemt aan dat ook bij deze experimenten (Thibault, 1969; Whittingham, 1979), geen werkelijke bevruchting heeft plaats gevonden, omdat niet aan de criteria van bevruchting werd voldaan (2.4).

Bevruchting is een proces, waarbij cytoplasmatische fusie en chromosomale vereniging van 2 cellen, een eicel en een zaadcel, plaats vindt (Austin, 1965). De eicel verandert daardoor op een karakteristieke wijze. Normale bevruchting kan alleen dan worden aangetoond, indien men de structurele veranderingen die na en tijdens bevruchting optreden, kan onderscheiden van abnormale bevruchting of eiceldegeneratie (2.4). Alleen een histologische controle van de eicel kan noodzakelijke informatie betreffende het wel of niet optreden van bevruchting geven. Een dergelijke controle werd voor het eerst voorgesteld door Smith in 1951. Het meest betrouwbare criterium voor een bevruchting is een nakomeling, die verkregen is door transplantatie van het embryo in het

preïmplantatie-stadium in de (gast)moeder. Het eerste zoogdier dat zodoende werd verkregen, was een konijn (Chang, 1959). Sindsdien is in vitro bevruchting tot stand gekomen bij meer dan 10 verschillende soorten, waaronder de rat, de muis, de hamster en de aap (Whittingham, 1975).

1.7.2 In vitro bevruchting van de menselijke eicel

De eerste pogingen om humane eicellen te bevruchten dateren uit 1944 (Rock en Menkin). De eicellen werden geïsoleerd uit de follikels van chirurgisch verkregen ovaria. Ongeveer 140 eicellen werden aan zaadcellen blootgesteld. Na een dag kweken bleken enige eicellen meercellig te zijn geworden. Van één van deze "embryo's" werden histologische coupes gemaakt (Menkin en Rock, 1948). Hoewel bevruchting niet kan worden uitgesloten, is het waarschijnlijker dat deze eicellen zich spontaan hadden ontwikkeld (parthenogenese) of gefragmenteerd waren (Thibault, 1969; Seitz et al, 1973; Blandau, 1980). Ook Shettles nam klieving waar (1953, 1955), maar onderzocht de eicellen niet histologisch. Hayashi toonde in 1963 aan, dat klieving of schijn-klieving (fragmentatie) ook zonder interactie met zaadcellen kan plaatsvinden (Seitz et al, 1973). Het aantal klievingen nam toe, indien er zaadcellen aan de geïncubeerde eicellen werden toegevoegd. Hoewel Edwards en medewerkers in 1966 en in 1969 de vorming van pronucleï beschreven, werd pas in 1971 voor het eerst histologisch bewijs van bevruchting van een menselijke eicel geleverd (Edwards, 1971). Het zou zeven jaar duren, alvorens de eerste "reageerbuisbaby" werd geboren. Sindsdien staat de in vitro bevruchting als een mogelijke vorm van therapie bij onvruchtbaarheid als gevolg van eileiderdefecten in het middelpunt van de belangstelling.

1.7.3 In vitro bevruchting en diagnostiek

Overstreet en Hembree (1976) gebruikten niet-gerijpte menselijke eicellen afkomstig van autopsie-materiaal om de eischilpenetratie van zaadcellen te bestuderen. Zij toonden aan, dat zaadcellen van vruchtbare mannen vaker de eischil penetreerden dan zaadcellen van onvruchtbare mannen. Degeneratie van het eicelcytoplasma bemoeilijkt echter de waarneembaarheid van de gepenetreerde zaadcel. Hoewel dit bezwaar wordt opgeheven door voorafgaande plaatsing van de eicellen in een hyperosmotische zoutoplossing, waardoor het cytoplasma krimpt, wordt

toepassing van deze methode op grote schaal niet mogelijk geacht (Yanagimachi et al, 1979; Overstreet et al, 1980).

1.7.4 Heterospecifieke bevruchting en diagnostiek

Bestudering van het in vitro bevruchtend vermogen van humane zaadcellen kan aanzienlijk worden vergemakkelijkt, indien de humane eicel zou worden vervangen door een andere (ei)cel. Zoogdiereicellen hebben het voordeel dat ze via hormonale stimulatie in aanzienlijke hoeveelheden verkregen kunnen worden. Eischillen van intacte zoogdiereicellen gesuspenderd in een oplossing van humane zaadcellen komen wel met de zaadcellen in aanraking, maar worden echter niet door de zaadcellen gepenetreerd (Yanagimachi et al, 1976).

Dit probleem kan met behulp van twee technieken worden opgelost. In de eerste plaats kan men menselijke zaadcellen fuseren met somatische cellen. Dit kan spontaan of met behulp van stoffen worden bewerkstelligd (Brackett et al, 1971; Bendich et al, 1974). Een dergelijke activatie van de zaadcel kan decondensatie van chromatine en synthese van nucleïnezuren opwekken (Elsevier en Ruddle, 1976). Het proces dat tot deze zaadcellfusie leidt is echter niet gelijkwaardig aan bevruchting. Het merendeel van de fusies komt namelijk niet via membraanfusie tot stand, maar via directe opname (fagocytose) van de zaadcel in de cel (Phillips et al, 1976). Eveneens is door electronenmicroscopisch onderzoek aangetoond, dat de incorporatie van de zaadcel, die wel via een membraanfusie tot stand komt, verschilt van het normale bevruchtingsproces (van Meel, 1980).

In de tweede plaats kan de menselijke zaadcel worden geactiveerd door middel van de interactie met eischilvrije hamstereicellen (Yanagimachi et al, 1976). Gezien de unieke combinatie van de gameten wordt deze test ook wel de "Hamster assay" genoemd (Binor et al, 1980). In tegenstelling tot de somatische cellfusie is dit een activatie van de zaadcel, die overeenkomsten vertoont met die welke tijdens normale bevruchting optreedt. De tijd die nodig is om de veranderingen in de menselijke zaadcellen te induceren na deze in contact te hebben gebracht met de hamstereicellen, is vergelijkbaar met de tijd die nodig is om menselijke eicellen te bevruchten. Niet alleen decondensatie van de zaadcel kan worden waargenomen, maar ook de vorming van de mannelijke pronucleus en in een incidenteel geval metafase-chromosomen. Tijdens deze "bevruchting" verdwijnen de celpartikels die zich onder de eicelmembraan bevinden (corticale granulae). Dit wordt ook bij normale eicelactivatie

waargenomen (Yanagimachi et al, 1976). Barros en medewerkers (1979) toonden tevens aan, dat de verdeling van het zaadcelchromatine en de vorming van mannelijke pronucleaire nucleoli, vergelijkbaar is met processen die plaatsvinden bij normale homologe bevruchting. Ook na microchirurgische injectie van de zaadcelkop kan decondensatie worden verkregen in dit systeem (Uehara en Yanagimachi, 1976).

De vorming van chromosomen binnen het cytoplasma van de hamstereicel biedt de geneticus de mogelijkheid de chromosomale samenstelling van de zaadcellen te onderzoeken (Rudak et al, 1978). Een probleem bij de uitvoerbaarheid hiervan is de verhoogde kans op bevruchting door meer zaadcellen (polyspermie), waardoor remming van chromosoomcondensatie optreedt (Rudak, 1981). Daarnaast is het van belang de relatie tussen uiterlijke manifestatie van eigenschappen en de potentieel aanwezige eigenschappen van zaadcellen nader te onderzoeken.

Heterospecifieke bevruchting is ook waargenomen na incubatie van cavia-, ratte-, varkens-, en muize-zaadcellen enerzijds en naakte hamstereicellen anderzijds (Yanagimachi en Nada, 1970; Hanada en Chang, 1972 en 1976). Vooralnog is niet aangetoond dat de hamstereicel door een eicel van een ander laboratoriumdier kan worden vervangen. Incubatie van menselijke zaadcellen met naakte ratte- en muize-eicellen, waarvan de eischil enzymatisch of mechanisch is verwijderd, resulteert niet in een binding.

1.8 Het kwantificeren van zaadcelbeweeglijkheid

Menselijke zaadcellen bewegen volgens bepaalde patronen. De normale voorwaartse progressie volgens een rechte lijn, wordt het roterende patroon genoemd (Jaszczak et al, 1976). Hierbij draait de gehele zaadcel rondom zijn lengte-as. Golfbewegingen met een kleine amplitude verplaatsen zich langs de zaadcelstaart. Rotatie vindt vrijwel niet plaats, indien de zaadcel asymmetrisch is of een cytoplasmatische druppel bezit. Onregelmatige progressie zonder rotatie wordt waargenomen, als de zaadcelstaart snel vibreert ("darting"). Men spreekt over niet-progressieve beweeglijkheid, indien de zaadcelstaart heen en weer trilt met een variabele frequentie en de kop onbeweeglijk is of indien de zaadcelstaart onbeweeglijk is en de kop vibreert. Een overzicht van de wijze en het mechanisme van voortbeweging wordt gegeven in een aantal publikaties (Mitchell et al, 1976; Katz en Overstreet, 1979; Amelar et al, 1980).

techniek	gemeten waarden en eigenschappen	voordelen	nadelen	referenties
directe microscopische waarneming	subjectieve indruk	<ul style="list-style-type: none"> ● snel ● goedkoop 	<ul style="list-style-type: none"> ● onbetrouwbaar ● controle achteraf onmogelijk 	Eliasson, 1973
idem en tijdopname	tijd die nodig is om vaste afstand af te leggen	meet snelheid	alleen snelheid van individuele zaadcellen	Mitchell et al., 1976
spectrofotometrie	zaadcellen doorkruisen optische straal	eenvoudig	<ul style="list-style-type: none"> ● geen beweeglijke patroon ● geen individuele cellen 	Nelson, 1972; Atherton, 1979
turbidimetrische spectrofotografie	meet spectrofotografisch verschil na opzwellen	meet beweeglijke zaadcellen	idem	Atherton, 1979
optisch doppler effect	registreert de spreiding van licht	snel	<ul style="list-style-type: none"> ● concentratie afhankelijk ● geen individuele cellen 	Jouannet et al., 1976 en 1979; Berge et al., 1967
ultraviolet absorptie			geen individuele cellen	Timourian en Watchmaker, 1970.
videomicrografie	beeld na beeld verwerking van zaadcellsporen	<ul style="list-style-type: none"> ● relatief goedkoop ● gemakkelijk 	<ul style="list-style-type: none"> ● onpraktische opslag gegevens ● wijze van progressie wordt niet objectief beoordeeld 	Katz en Overstreet, 1981
semi-automatische videomicrografie	computer gestuurde scanning	geheugen voor opslag van gegevens	<ul style="list-style-type: none"> ● duur ● overschat percentage beweeglijkheid ● geen directe koppeling tussen preparaat en computer 	Amann, 1977
cinematografie (hoge spoelsnelheid)	meet afgelegde afstand	meet golflengte en amplitude van de staart	<ul style="list-style-type: none"> ● duur ● tijdrovend 	Rikmenspoel et al., 1973; van Duyn et al., 1971
enkelvoudige belichtingsfotografie	<ul style="list-style-type: none"> ● meet afgelegde afstand ● meet wijze van progressie 	<ul style="list-style-type: none"> ● eenvoudige opslag van gegevens ● meet snelheid 	sporen moeilijk herkenbaar	Rotschild, 1953; Overstreet et al., 1979
meervoudige belichtingsfotografie	enkelvoudige stroboscopische opname (kralensnoeraporen)	<ul style="list-style-type: none"> ● idee ● overdund sperma ● duidelijke beeldvorming ● gemakkelijk 	<ul style="list-style-type: none"> ● tijdrovende berekeningen ● meet wijze van progressie niet 	Makler, 1978 en 1980a
meervoudige belichtingsfotografie en semi-automatische verwerking	<ul style="list-style-type: none"> ● idem ● XY-tablet slaat gegevens op in computergeheugen 	<ul style="list-style-type: none"> ● snel ● reproduceerbaar ● meet wijze van progressie ● geautomatiseerde opslag van gegevens 	<ul style="list-style-type: none"> ● afhankelijk van computer-systeem ● geen directe koppeling tussen preparaat en computer 	Makler, Thatcher et al., 1980; hoofdstuk 3

Tabel 1.1 Een overzicht van de technieken voor het vaststellen van beweeglijkheid van menselijke zaadcellen.

Het subjectief bepalen van beweeglijkheid resulteert vaak in onverklaarbare verschillen tussen sperma-onderzoeken. Dit kan bijvoorbeeld de evaluatie van het effect van therapie bemoeilijken. Amelar en anderen (1980) hebben dit als volgt beschreven; "The subjective nature of visual assessment of motility is a persistent problem for those engaged in the clinical evaluation of the infertile male." Daarom streeft menig klinicus naar een objectivering van beweeglijkheid. Dat betekent dat er geavanceerde optische en electronische instrumenten gebruikt moeten worden.

Beweeglijkheidskarakteristieken kunnen op verschillend niveau, met een toenemende detaillering worden vastgelegd. Zo kan bijvoorbeeld de zaadcelstaart-frequentie worden berekend. De meeste methoden werken echter op het niveau van zaadcelpopulaties, waarbij het percentage beweeglijkheid en de gemiddelde snelheid worden berekend. Voor de klinische evaluatie van de beweeglijkheid en voor de bestudering van effecten van farmacologische substanties, is dit niveau voldoende. In tabel 1.1 is een beknopt overzicht gegeven van de belangrijkste experimentele technieken. In hoofdstuk 3 wordt verder ingegaan op een aantal van deze technieken.

HOOFDSTUK 2

METHODOLOGISCHE EN CELBIOLOGISCHE ASPECTEN VAN DE HAMSTEREICELTEST

2.1 Capacitatie en acrosoom-reactie

Na ejaculatie ondergaan de gameten fysiologische, biochemische en morfologische veranderingen, die capacitatie en acrosoom-reactie worden genoemd (Austin, 1952; Austin en Bishop, 1958).

2.1.1 Capacitatie

Hoewel de moleculaire basis nog dient te worden onderzocht, neemt men aan dat capacitatie op de volgende wijze plaats vindt: het zaadceloppervlak is bedekt met substanties, die tijdens het verblijf in het vrouwelijk organisme of in een andere spermaplasma-vrije omgeving veranderen of verdwijnen. Dit zou tot gevolg hebben dat de zaadcelmembraan destabiliseert (Bedford, 1968; Oliphant en Brackett, 1973), ofwel dat specifieke receptoren vrij komen te liggen, die een interactie kunnen ondergaan met complementaire receptor-substanties van de eicel (Piko, 1967, 1969). De stoffen die aanwezig zijn op de zaadcelmembranen zouden afkomstig zijn uit de epididymis of andere secundaire geslachtsorganen (Yanagimachi, 1977). De capacitatietijd varieert per diersoort (Yanagimachi, 1977). Voor muize-zaadcellen is deze ongeveer 10 minuten (Hoppe en Pitts, 1973), terwijl menselijke zaadcellen, in contact gebracht met menselijke eicellen in vitro, pas na minimaal 2 uur kunnen bevruchten (McMaster et al, 1978). Deze tijdsduur kan worden verkort indien de zaadcellen met cervixslijm in contact worden gebracht (Overstreet et al, 1980b). De capacitatietijd wordt beïnvloed door de osmolariteit (Barros et al, 1978) en de energietoevoer (Rogers en Yanagimachi, 1975).

Bij konijnen is de capacitatie in vitro afhankelijk van een preïncubatie van de zaadcellen in de uterus en de eileider (Bedford, 1969a), maar bij andere diersoorten en ook bij de mens, kan de capacitatie in eenvoudige kweekmedia geïnitieerd worden (Toyoda et al, 1971; Yanagimachi 1972a; Miyamoto en Chang, 1973; Barros, 1974; Yanagimachi et al, 1976; Trounson et al, 1980). Gecapaciteerde menselijke zaadcellen zijn microscopisch niet te onderscheiden van niet-gecapaciteerde

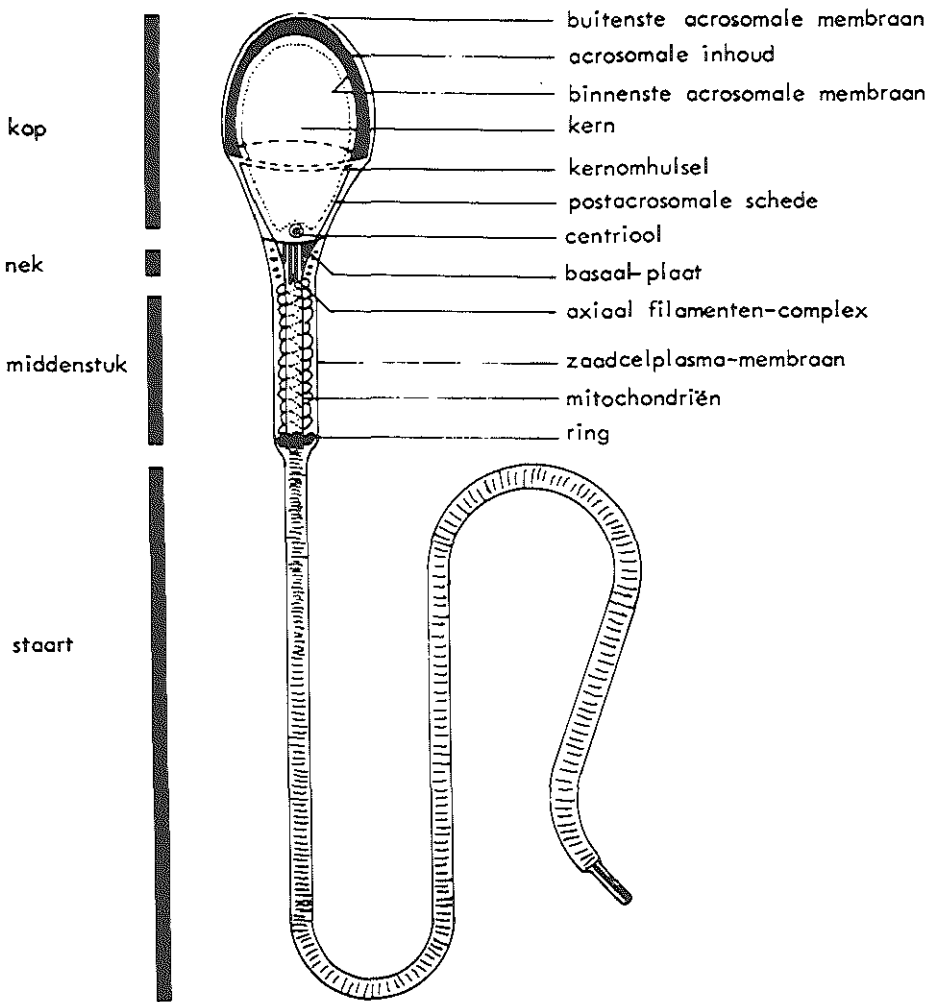
zaadcellen. Bij muizen, hamsters en cavia's daarentegen verandert het motiliteitspatroon van de zaadcellen na capacitatie (Yanagimachi, 1970, 1972; Fraser, 1972). Zowel de richting als de staartfrequentie kunnen veranderen. Wellicht kan ook bij andere diersoorten een bepaalde verandering van de beweeglijkheid na capacitatie worden waargenomen.

In 1957 werd door Chang bij konijnen aangetoond dat spermaplasma het bevruchtend vermogen van in vivo gecapaciteerde zaadcellen kan remmen. Dit proces bleek reversibel te zijn. Gebleken is dat deze decapacitatie wordt veroorzaakt door een factor met een peptide of eiwitachtige structuur, die afkomstig is uit de testikel en/of uit secundaire geslachtsorganen (Bedford en Chang, 1962; Williams et al, 1970). Mogelijk is capacitatie niets anders dan de gehele of gedeeltelijke inactivatie of verwijdering van een decapaciterende factor, aanwezig op het oppervlak van de zaadcel, na de ejaculatie (Weinman en Williams, 1974). Humaan spermaplasma decapaciteert konijn-zaadcellen en remt heteroloog het in vitro bevruchtend vermogen van deze zaadcellen (Pinsker en Williams, 1968). De decapaciterende factor is echter bij mensen nog niet aangetoond, daar het remmend effect van humaan spermaplasma op de in vitro bevruchting bij het konijn, in tegenstelling tot spermaplasma van konijnen en andere diersoorten, niet reversibel is (Kanwar et al, 1979).

2.1.2 De acrosoom-reactie

Het acrosoom is een apicale structuur op de zaadcelkop (figuur 2.1). De acrosoom-reactie is een proces waarbij tussen de buitenste acrosomale membraan en de zaadcelplasma-membraan daaromheen meervoudige fusies ontstaan, waardoor het acrosoom geperforeerd wordt (Yanagimachi, 1977). De acrosoom-reactie treedt op na de capacitatie, vermoedelijk in de nabijheid van de eicel (Austin, 1961). Uit het geperforeerde acrosoom komt een enzym vrij dat de hyaluronzuur-matrix tussen de cumuluscellen oplost (Austin 1960a, 1961), zodat de cumulus beter doordringbaar wordt. Dit enzym wordt in het laboratorium ook gebruikt om de cumulus kunstmatig te verwijderen (2.3). De binnenste acrosomale membraan heeft mogelijk een functie bij de cel-cel herkenning (Yanagimachi, 1977). Inmiddels zijn nog een tiental andere enzymen uit het acrosoom geïsoleerd (Stambough en Buckley, 1969 en 1970; Austin, 1975).

Het moleculaire mechanisme van de acrosoom-reactie is niet bekend. Volgens een hypothese van Lillie (1919) zou een dergelijke reactie geïnitieerd worden door een bepaalde stof afkomstig van de eicel, het



Figuur 2.1 Schematische voorstelling van een zaadcel, gebaseerd op gegevens van Rowley en Heller (1971) en Mann en Lutwak-Mann (1981).

zogenaamde "fertilizine". Bewijzen voor het bestaan van deze stof zijn er echter niet (Bedford, 1968 en 1972). Net zoals voor de capacitatie, geldt voor de acrosoom-reactie dat deze in vitro spontaan optreedt, onafhankelijk van de aanwezigheid van eicellen, zodat dus wellicht beide processen als een spontaan optredend ontwikkelingsproces kunnen worden beschouwd (Yanagimachi, 1978).

2.2 De opwerking van zaadcellen

Uit het voorgaande is duidelijk geworden, dat bij de inductie van bevruchting, spermaplasma niet in het incubatiemedium aanwezig mag zijn. Twee methodieken zijn gebruikt, voor de experimenten in dit proefschrift beschreven, om zaadcellen uit het ejaculaat te isoleren. Volgens de eerste methode wordt het sperma een aantal malen gecentrifugeerd, waarna de pellet, waarin de zaadcellen zich bevinden, wordt opgelost in kweekmedium. Bij de tweede methode wordt boven een laag sperma voorzichtig een laag medium gepipetteerd. De in de mediumlaag gemigreerde beweeglijke zaadcellen worden afgepipetteerd en gecentrifugeerd. Deze procedure heeft het voordeel dat verschillen in het percentage beweeglijkheid tussen zaadcellensuspensies, zoals tussen vers en ontdooid ejaculaat (hoofdstuk 6), worden verkleind.

Ejaculaat werd op de volgende wijze verkregen en verwerkt. Patiënten en donoren werden verzocht na 3 dagen van onthouding, te masturberen, waarbij het sperma werd opgevangen in bekertjes. Na vervloeiing van het sperma (liquefactie) bij 37 °C werd een deel overgeschonken in steriele centrifugebuizen en met kweekmedium aangevuld tot 15 ml. Als kweekmedium werd een aangepaste tyrode-oplossing gebruikt, waaraan pyruvaat en 0.3% bovine serum albumine was toegevoegd (Barros et al, 1978). Dit zogenaamde TMPA-medium heeft een verhoogde osmolariteit (380 milliosmol), hetgeen de capacitatie versnelt (2.1). Bij kamertemperatuur werden de suspensies gedurende 5 minuten gecentrifugeerd (300-600g). De pellet werd gesuspenderd in medium en tweemaal opnieuw gecentrifugeerd. De uiteindelijke pellet werd in een kleine hoeveelheid medium (waaraan 3% bovine serum albumine was toegevoegd) opgelost. Deze hoge eiwitconcentratie gaat klontering van de eicellen tegen (2.3). Een kleine hoeveelheid (0.1-0.3 ml) van deze suspensie werd zodanig met medium verdund dat de concentratie altijd $1-3 \times 10^6$ bewegende zaadcellen/ml bedroeg, ongeacht de oorspronkelijke zaadcelconcentratie. De fysiologisch belangrijke (=bewegende) zaadcellen zijn dus altijd in dezelfde

hoeveelheid aanwezig (2.6). Alvorens de zaadcellen met de eicellen in contact werden gebracht, werden de zaadcellen onder olie (Squibb minerale olie) bij 37°C in een lucht incubator gedurende 4-5 uur of onder gelijke omstandigheden gedurende 15-16 uur (hoofdstuk 4 en 5) geïncubeerd (preïncubatie) om te capaciteren (2.1). Deze twee preïncubatietijden hebben een gelijke invloed op de in vitro bevruchting (2.5).

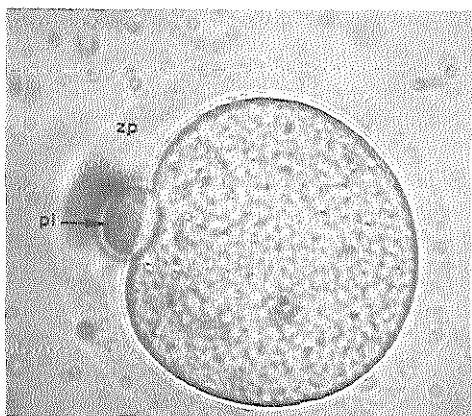
2.3 Het verkrijgen van eischilvrije hamstereicellen

Bij volwassen vrouwelijke goudhamsters (TNO Zeist, 2 tot 6 maanden oud) werd superovulatie geïnduceerd. In plaats van 12 kunnen dan ongeveer 20-30 eicellen verkregen worden. Op dag 1 van de cyclus, herkenbaar aan de vaginale post-oestrus afscheiding, werden de dieren intraperitoneaal ingespoten met 30 internationale eenheden PMS, gevolgd door een injectie met 20-25 internationale eenheden hCG op dag 3. Ovulatie begint 11-14 uur na de laatste injectie (Yanagimachi, 1969). Eicellen werden 16-17 uur na hCG uit het ampullaire deel van de eileiders geïsoleerd, nadat de dieren met ether waren verdoofd en door cervicale dislocatie waren gedood. De eileiders werden op horlogeglazen, gevuld met 0.1% hyaluronidase (uit rundertestikels, ICN) in TMPA, geplaatst en doorgeprikt, waardoor de cumulus (figuur 2.2) in de enzymoplossing terecht komt (2.1). Kale eicellen (figuur 2.3) kunnen na 10 minuten uit de enzymoplossing gepipetteerd worden. De eicellen zijn dan omgeven door de eischil of zona pellucida en het eerste poollichaampje (figuur 2.3) is duidelijk zichtbaar. Vervolgens worden de eicellen met medium 3 tot 4 keer gespoeld en gepipetteerd in een 0.1% trypsine-oplossing (uit runderpancreas, ICN) in medium. Dit enzym lost de eischil in 1 tot 2 minuten op. Nadat de eicellen 3 maal zijn gespoeld kunnen de zona-vrije eicellen (figuur 2.4) worden geïncubeerd. De hier beschreven eicelisolatie vindt plaats bij kamertemperatuur. Blootstelling van de eicellen aan zichtbaar licht wordt zoveel mogelijk vermeden, daar dit activatie van de metafaseplaat tot gevolg kan hebben, hetgeen het vaststellen van de bevruchting kan bemoeilijken (Hirao en Yanagimachi, 1978). De zona-vrije eicellen worden verdeeld over de zaadcellensuspensies (2.2). Elke suspensie wordt geïncubeerd met 25 of meer eicellen. De incubatieperiode duurt 140 minuten indien de zaadcellen meer dan 12 uur, 160 tot 190 minuten indien de zaadcellen slechts 4 tot 5 uur, zijn gepreïncubeerd.



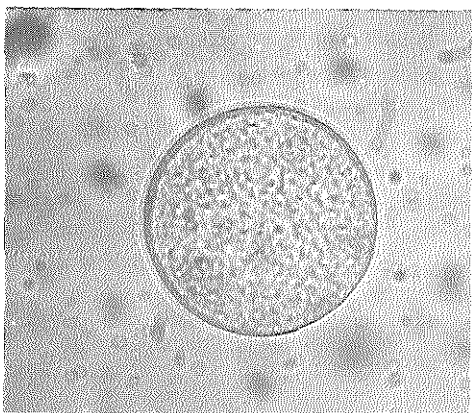
Figuur 2.2

*Hamstereicel met cumuluscellen, geïsoleerd uit het oviduct 15 uur na hCG-injectie (vergroting, 200x).
pl = eerste poollichaampje.
zp = zona pellucida
pvr = perivitelline ruimte.*



Figuur 2.3

*Cumulusvrije hamstereicel met zona pellucida (vergroting, 450x).
pl = eerste poollichaampje.
zp = zona pellucida.*



Figuur 2.4

Hamstereicel waarvan de zona pellucida is verwijderd (vergroting, 450x). Deze eicel kan een interactie met menselijke zaadcellen ondergaan. Door de manipulatie is het eerste poollichaampje losgeraakt.

2.4 Algemene criteria voor bevruchting en bevruchtungs-parameters

2.4.1 Criteria voor bevruchting

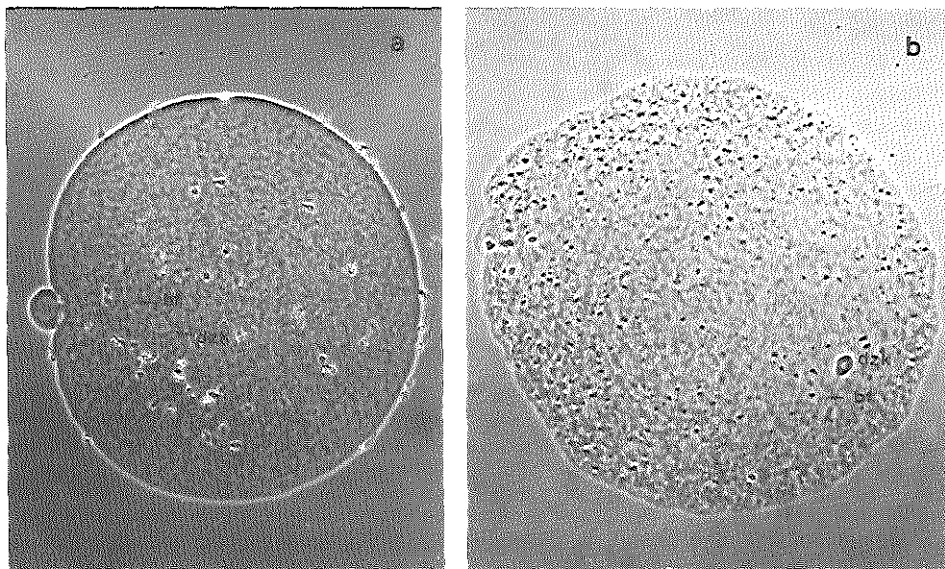
Nadat de zaadcel de eischil is gepasseerd maakt deze vrijwel onmiddellijk contact met het oppervlak van de vitellus ofwel het oöplasma. Hierbij verliest de zaadcel na enige minuten zijn motiliteit. Uit elektronenmicroscopisch onderzoek is gebleken dat het deze zaadcellen zijn, die gaan fuseren met de eicelmembraan (Austin, 1975). De zaadcel-eicel fusie leidt tot een mozaïeke membraan, in tegenstelling tot een fagocytotische fusie, waarbij het cytoplasma van de twee cellen gescheiden blijft (Szollosi en Ris, 1961). Onder de eicelmembraan bevinden zich de corticale granulae, waarvan de inhoud in de perivitelline ruimte vrijkomt, nadat de zaadcel de membraan heeft gepenetreerd. Waarschijnlijk heeft dat tot gevolg dat de eischil ondoordringbaar wordt voor andere zaadcellen (de zogenaamde zona-reactie), hetgeen polyspermie tegengaat (Braden et al, 1954). De corticale reactie zou bij sommige soorten tevens tot gevolg hebben dat de vitellus zelf ondoordringbaar wordt voor meer zaadcellen (Austin, 1975). Het laatste is aangetoond bij heterospecifieke bevruchting (hoofdstuk 1). Zoals reeds is gebleken vormt de eischilvrije hamstereicel hierop een uitzondering, daar deze in vitro penetreerbaar blijkt te zijn voor meer dan 1 zaadcel (Yanagimachi en Noda, 1970c en d).

De volgorde van gebeurtenissen tijdens de bevruchting is door Thibault (1969) in verschillende stadia geclassificeerd. In stadium 0 bereikt de zaadcel de eicel nadat deze de zona pellucida is gepenetreerd. In de stadia 1 en 2 penetreert de zaadcel de vitellus, zwelt de zaadcelkop en wordt tevens, als gevolg van de activering van de metafasespoel in de eicel, het tweede poollichaampje gevormd. Het zwellen van de zaadcelkop ontstaat door een reductie in de dichtheid van kernmateriaal, hetgeen decondensatie wordt genoemd. In stadium 3 worden de vrouwelijke en mannelijke pronuclei gevormd. Met uitzondering van de afsplitsing van het tweede poollichaampje wordt met de hamstereiceltest de stadia 1 en 2 van de bevruchting bestudeerd.

Bedford(1971) en Seitz et al(1973) hebben verschillende waarnemingscriteria voor het vaststellen van bevruchting beschreven. De eerste klievingsdeling is geen overtuigend bewijs voor bevruchting, daar bekend is dat eicellen in vitro en in vivo spontaan kunnen fragmenteren (cytoplasmatische splitsing) en delen (parthenogenese). Enige uren na het begin van de bevruchting kan het meest betrouwbare criterium worden

vastgesteld (Bedford, 1971). Zoals reeds eerder werd gesteld kunnen de eicellen door manipulatie het tweede poollichaampje afscheiden, doordat de eicel spontaan geactiveerd wordt, zonder interactie met een zaadcel. Daarom is het noodzakelijk dat bevruchting in een vroeger stadium wordt vastgesteld, zodat de betrouwbaarheid van de bepaling wordt vergroot. Dit is mogelijk doordat de decondenserende zaadcelkop microscopisch goed waarneembaar is (figuur 2.5a en 2.5b). Vaak kan de staart van de bevruchtende zaadcel (Bedford, 1971) binnen het cytoplasma zichtbaar worden gemaakt (figuur 2.5b). Deze is bij de hamstereiceltest goed te onderscheiden van staarten van zaadcellen, die niet gepenetreerd hebben. Hoewel de corticale reactie een criterium is voor bevruchting (Bedford, 1971), is deze niet altijd goed met het lichtmicroscop waarneembaar.

Figuur 2.5 Zona-vrije hamstereicel na incubatie met menselijke zaadcellen. De linker opname (a) is gemaakt vóór fixatie (fase-contrast: vergroting, 650 x). De andere opname (b) is gemaakt na fixatie en kleuring. bf = flagel van bevruchtende zaadcel. dzk = gedecondenseerde zaadcelkop.



2.4.2 Het bevruchtingspercentage

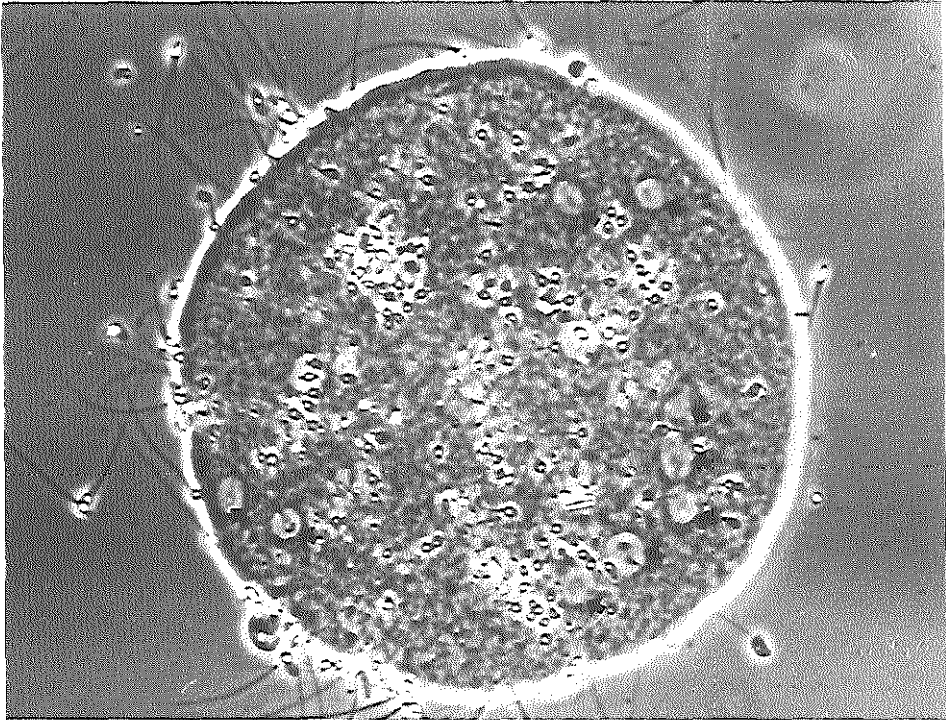
Twee methoden zijn beschreven om de uitslag van de hamstereiceltest te kwantificeren. Barros et al (1978) menen dat de waarneming van één enkele bevruchte eicel -dat wil zeggen een eicel waarin één of meer gedecondenseerde zaadcellen worden waargenomen- uit een groep van vele eicellen voldoende is om te spreken van een positieve test, waaraan klinische konsekventies mogen worden verbonden betreffende de vruchtbaarheid. Anderen daarentegen evalueren het in vitro bevruchtend vermogen aan de hand van een bevruchtingspercentage (Yanagimachi et al, 1976; Rogers et al 1979; Overstreet et al, 1980). Dit is het percentage van bevruchte eicellen ten opzichte van het totaal aantal eicellen. Aan deze methode van evaluatie kan de voorkeur worden gegeven, daar zowel uit de resultaten van Rogers et al (1979) als uit de resultaten van hoofdstuk 4 blijkt, dat het bevruchtingspercentage een reproduceerbare maat is voor het in vitro bevruchtend vermogen.

2.4.3 De bindings-score

Sommige zaadcellen blijven na herhaalde spoeling gehecht aan het eiceloppervlak (figuur 2.6). Het aantal gehechte zaadcellen wordt geteld en er wordt een bindings-score bepaald tussen 0 en 5. Score 0, geen zaadcellen zichtbaar op het oppervlak; score 2, 1-5 zaadcellen etc. Betreft het een hechting van meer dan 20 zaadcellen, dan is de score maximaal (=5). De bindings-score is het gemiddelde van alle met een bepaalde zaadcellsuspensie geïncubeerde eicellen.

2.4.4 Gemiddeld aantal gepenetreerde zaadcellen per eicel

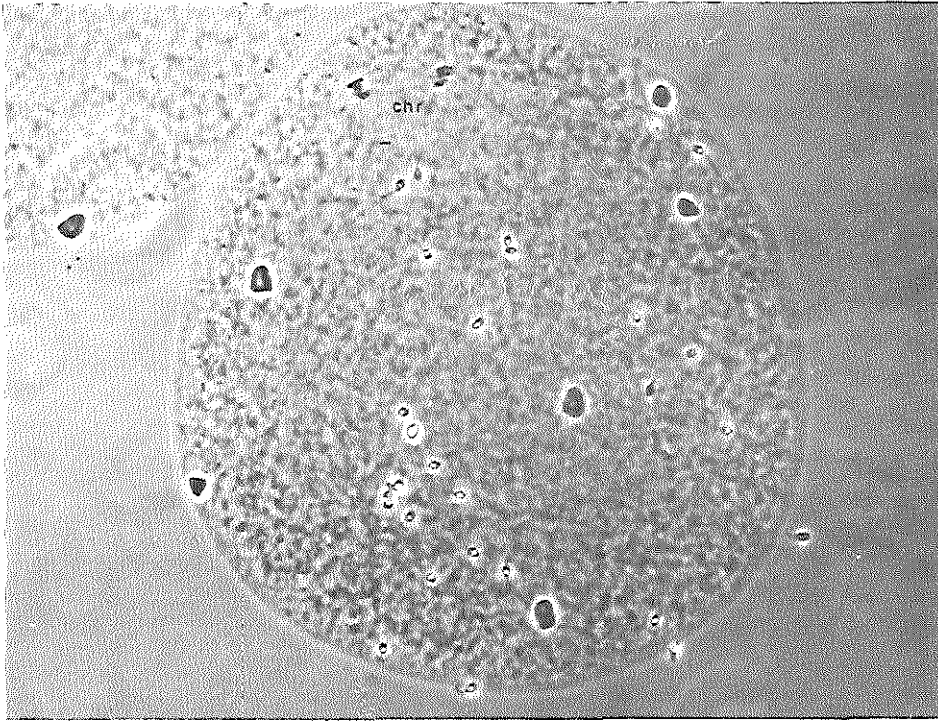
Het aantal gepenetreerde zaadcellen kan variëren (figuur 2.5.b, 2.6 en 2.7). Deze variatie wordt gekwantificeerd door het gemiddelde aantal gepenetreerde zaadcellen per eicel. Een score van 5 wordt als maximum beschouwd, zodat deze parameter, zoals de bindings-score, varieert tussen 0 en 5.



Figuur 2.6 Niet-gefixeerde zona-vrije hamstereicel. Meer dan 100 zaadcellen gehecht aan het oppervlak. Pijlen geven gedecondenseerde zaadcelkoppen aan (fase-contrast: vergroting, 850 x).

2.5 Kinetiek van de hamstereiceltest

Indien zona-vrije hamstereicellen gelijktijdig worden geïncubeerd met verse niet-gepreïncubeerde humane zaadcellen, dan blijkt dat de bevruchtingsreactie niet onmiddellijk plaats vindt (Yanagimachi et al, 1976). Het bevruchtingspercentage neemt gedurende een incubatie toe, tot er een maximum bereikt is. De tijd die nodig is om dit maximum te bereiken hangt af van het geteste individu of van de test-omstandigheden (Yanagimachi, 1979). Indien wordt getest met behulp van een medium met een normale osmolariteit (290 millosmol), dan duurt het 7 tot 10 uur

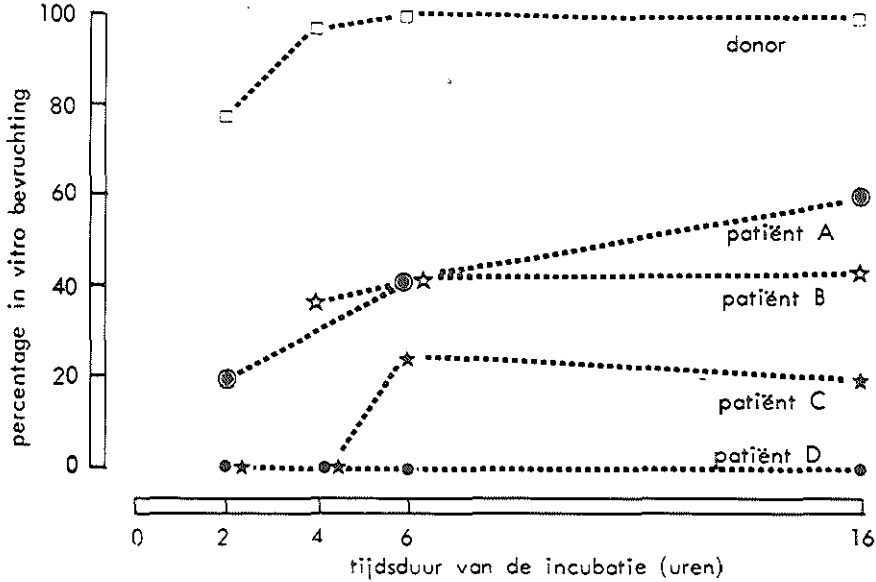


*Figuur 2.7 Gefixeerde en met karmijn gekleurde zona-vrije hamstereicel (fase-contrast: vergroting, 850 x). Zes gedecondenseerde zaadcelkoppen zijn zichtbaar.
chr = geactiveerde chromosomenspoel van de eicel.*

alvorens de zaadcellen gecapaciteerd zijn en het maximale bevruchtingspercentage bereikt wordt (Yanagimachi et al, 1976; Binor et al, 1980). Barros en medewerkers (1978) gebruikten een medium met een verhoogde osmolariteit. Dit zou de capacitatie en de duur van de test, verkorten.

Om te onderzoeken of het bevruchtingspercentage verandert na langdurige preïncubatie (hoofdstukken 4 en 5), werden zona-vrije hamstereicellen gedurende 140 minuten geïncubeerd met zaadcellen op verschillende tijdstippen na preïncubatie. Zoals blijkt uit de resultaten (figuur 2.8) heeft langdurige preïncubatie van de zaadcellen geen invloed

Figuur 2.8 Invloed van de duur van de preincubatie op de in vitro bevruchting van zona-vrije hamstereicellen door menselijke zaadcellen.



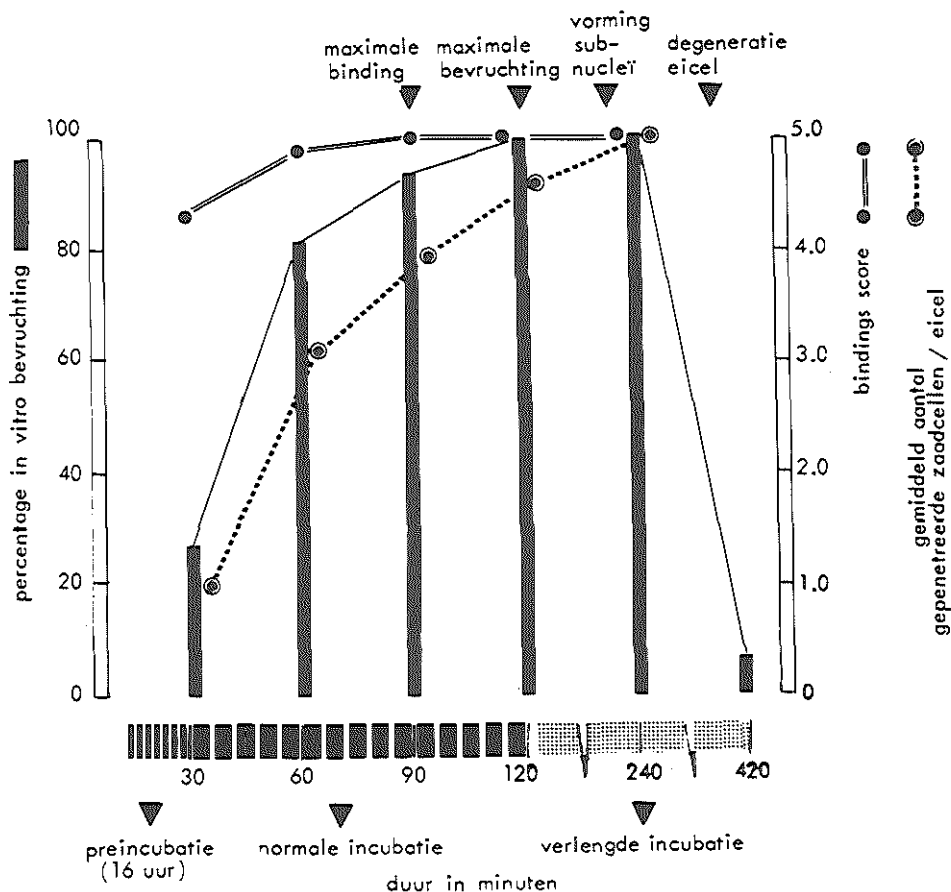
op het bevruchtingspercentage. De zaadcellen zijn na 6 uur gecapaciteerd (364 milliosmol).

Om te onderzoeken of een incubatieperiode van 140 minuten voldoende is werden zaadcellen van een donor 16 uur gepreincubeerd en 30 tot 240 minuten met eicellen geïncubeerd. Uit de resultaten (figuur 2.9) blijkt dat het bevruchtingspercentage reeds maximaal is 60 minuten na het begin van de incubatieperiode. Maximale hechting wordt na 90 minuten incubatie waargenomen. Indien de eicellen langer dan 240 minuten worden geïncubeerd, dan kan, in geval van goed bevruchtende zaadcellen, de eicel verzadigd raken met decondenserende zaadcelkoppen hetgeen degeneratie van de eicel tot gevolg heeft (figuur 2.10).

Zoals blijkt uit de resultaten van dit proefschrift en de gegevens van anderen (Rogers et al, 1979) is het bevruchtingspercentage individueel per zaaddonor verschillend. Het is merkwaardig dat zaadcellen bijvoorbeeld slechts 20% van de aanwezige eicellen bevruchten. Dit verschijnsel kan niet worden verklaard door een te geringe kans op een interactie tussen de zaadcellen en de eicellen, want een langere incubatie verhoogt het bevruchtingspercentage niet. Om te onderzoeken of er

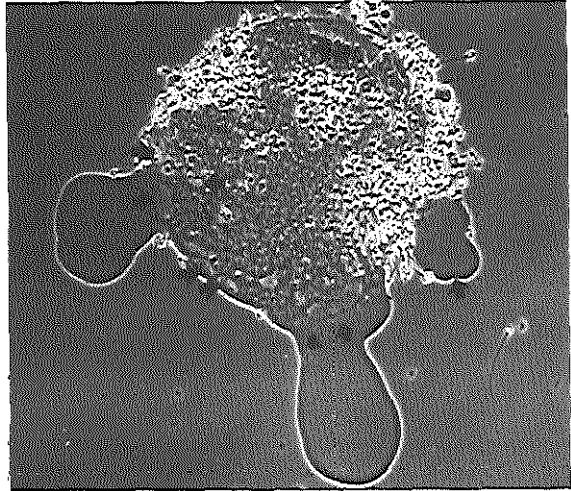
wellicht zaadcellen bestaan, die wel aan de eicel hechten maar andere, bevruchtende zaadcellen remmen, werd het volgende experiment gedaan. Zaadcellensuspensies van donoren met een hoog in vitro bevruchtend vermogen en suspensies van patiënten met een laag in vitro bevruchtend vermogen werden gepreïncubeerd gedurende 5 uur en daarna gedurende 2 uur met eicellen geïncubeerd. Daarna werden aan de slecht bevruchtende zaadcellen van de patiënten zaadcellen van de donoren toegevoegd. Zoals blijkt uit de gegevens van tabel 2.1, worden eicellen die eerst zijn blootgesteld aan zaadcellen met een laag in vitro bevruchtend vermogen, door zaadcellen

Figuur 2.9 Invloed van de tijdsduur van het contact tussen eicellen en zaadcellen tijdens de incubatie op de in vitro bevruchting.



Figuur 2.10

Zona-vrije hamstereicel (fase-contrast: vergroting 450 x). Bevrucht nadat humane zaadcellen gedurende 16 uur waren gepreïncubeerd en gedurende 4 uur met de eicellen hadden geïncubeerd. Door de hoge mate van polyspermie wordt het cytoplasma granulair en coaguleert. Resten van tientallen gedecondenseerde zaadcelkoppen zijn zichtbaar (zie pijlen).



Tabel 2.1 Effecten van zaadcellen met een hoog *in vitro* bevruchtend vermogen (donoren C en D) op eicellen die eerder geïncubeerd werden met zaadcellen met een laag *in vitro* bevruchtend vermogen (patiënten A en B).

		aantal bevruchte / totaal aantal eicellen (percentage bevruchting)		
		5 uur preïncubatie en 2 uur incubatie met zaadcellen *	een deel van de eicellen is 2 uur verder geïncubeerd met	
			homologe zaadcellen	homologe en heterologe zaadcellen
patiënt A		0/15 (0%)	0/22 (0%)	9/18 (50%)
donor C		12/25 (48%)	10/21 (48%)	
patiënt B		3/24 (13%)	6/36 (17%)	24/24 (100%)
donor D		21/21 (100%)	17/17 (100%)	

* een deel van de eicellen wordt uit de suspensie verwijderd en gefixeerd.

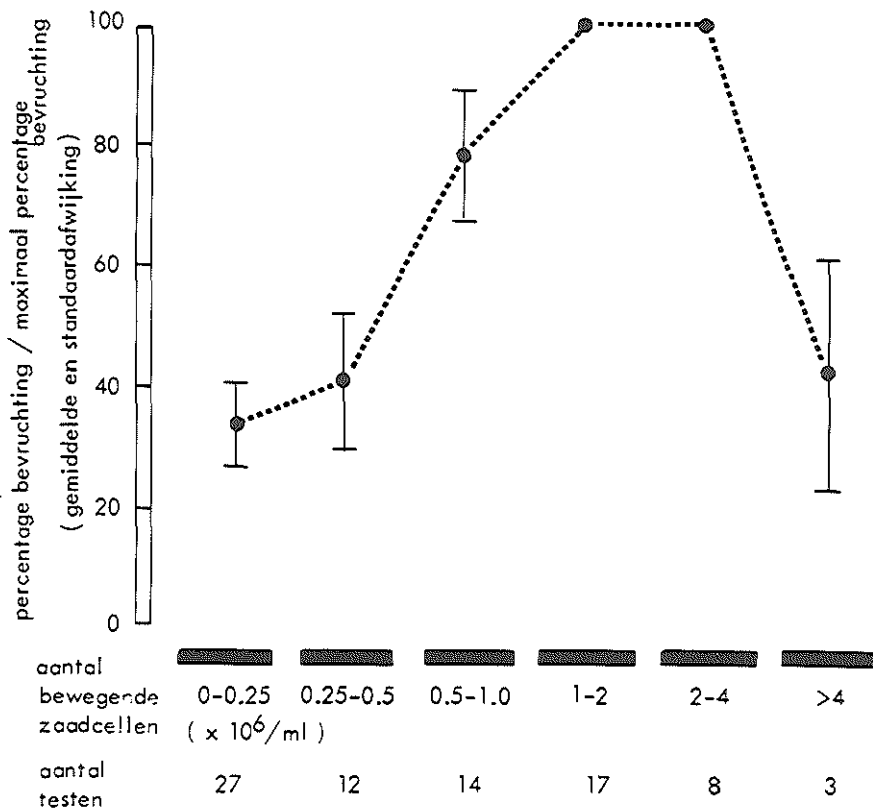
met een hoog in vitro bevruchtend vermogen, alsnog bevrucht. Op grond van deze gegevens kan men postuleren dat de verschillen in de bevruchtingspercentages niet veroorzaakt worden door een mogelijke remmende werking van sommige zaadcellen op andere zaadcellen, maar dat deze verschillen tot stand komen door individuele verschillen in penetreerbaarheid van de eicellen. Dat zou betekenen dat voor het induceren van bevruchting een zekere drempelwaarde nodig is, die door een bepaalde populatie zaadcellen gemakkelijker overschreden kan worden, dan door een andere, ertoe leidend dat, in zo'n geval, meer eicellen worden bevrucht. Zaadcellen met een bevruchtingspercentage dat niet 0 % en niet 100 % is, zouden daarom sommige eicellen wel en andere niet bevruchten.

2.6 Zaadcelconcentratie en in vitro bevruchtend vermogen

Binor et al (1980) hebben in een aantal experimenten gevonden dat de laagste concentratie bewegende zaadcellen waarmee in vitro nog bevruchting van hamstereicellen kon worden waargenomen, 6×10^5 /ml was. Uit gegevens van anderen (Overstreet et al, 1980) blijkt dat de kans op bevruchting vermindert, als de concentratie lager wordt dan 1×10^6 /ml. Hieruit blijkt dat de uitslag van de hamstereiceltest beïnvloedbaar is door de hoeveelheid bewegende zaadcellen, aanwezig rondom de eicellen. Zowel Barros et al (1978) als Rogers et al (1979) maken routine-matig gebruik van de hamstereiceltest. Zij volstaan met het incuberen van constante concentraties zaadcellen (respectievelijk 5-27 en 10×10^6 /ml). Hierdoor is de concentratie bewegende zaadcellen steeds verschillend. Binor en medewerkers menen daarom, ons inziens terecht, dat beide onderzoeksgroepen in die gevallen waar de beweeglijkheid lager is dan 10%, niet een reëel bevruchtingspercentage bepalen, maar het effect van de beweeglijkheid meemeten.

Om de optimale concentratie bewegende zaadcellen vast te stellen werden zaadcellensuspensies van 40 patiënten en donoren geïncubeerd in twee verschillende concentraties (hoger en lager dan 1×10^6 /ml). Uit de resultaten (figuur 2.11), blijkt dat een concentratie van 1 tot 4×10^6 /ml bewegende zaadcellen maximale bevruchting geeft. Bij zeer lage zaadcelconcentraties nemen de kansen op bevruchting af. Uit deze experimenten werd geconcludeerd dat het voor routine-matig gebruik noodzakelijk is, in de aanwezigheid van een constante concentratie bewegende zaadcellen te incuberen (2.2).

Figuur 2.11 Invloed van de concentratie van menselijke beweeglijke zaadcellen in vitro op het bevruchtingspercentage van hamstereicellen.



2.7 Morfologie van de zaadcel en in vitro bevruchtend vermogen

In de inleiding is ingegaan op de morfologische heterogeniteit van menselijke zaadcellen en de consequenties daarvan op de vruchtbaarheid van de man. Meestal bestaat sperma uit populaties van zowel normale als abnormale zaadcellen (1.4 en 1.5).

Sun en White (1978) concludeerden dat de progressie van abnormale zaadcellen vaak gestoord is. Zij veronderstelden dat dit een vorm is van natuurlijke beveiliging tegen het ontstaan van afwijkingen bij kinderen. Dit is een hypothetische voorstelling, daar ze berust op twee niet bewezen

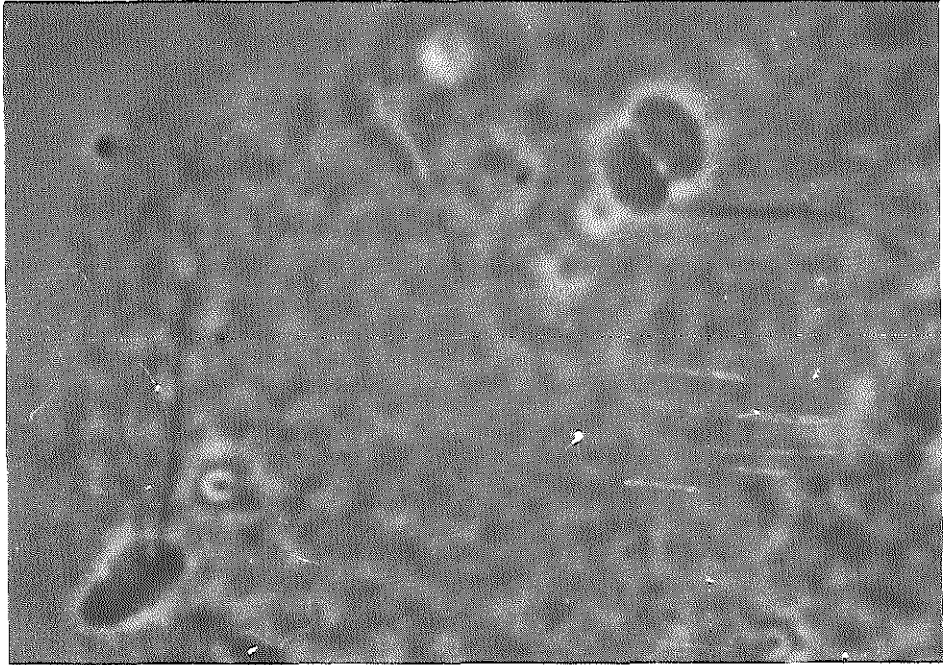
veronderstellingen. Volgens de eerste veronderstelling zouden abnormale menselijke zaadcellen kunnen bevruchten, hetgeen nooit is aangetoond. Slechts éénmaal is waargenomen dat muize-zaadcellen met abnormale staarten konden bevruchten (Smith et al, 1970). Gezien de normale nakomelingen, die hieruit voortkwamen, werd gesteld dat deze afwijking niet van genetische aard was. De tweede veronderstelling waarop het model van Sun en White berust is de mogelijke relatie tussen genetische afwijkingen en abnormale zaadcelmorfologie. Bewijzen voor een dergelijke relatie ontbreken echter. Men kan zich derhalve afvragen of abnormale menselijke zaadcellen tot bevruchting in staat zijn. Verschillende in vitro bevruchtingstechnieken kunnen gebruikt worden om deze vraag te beantwoorden. Het is daarbij noodzakelijk abnormale vormen van bevruchting, zoals polyspermie (Austin, 1961) te onderscheiden van bevruchting veroorzaakt door abnormale zaadcellen. De hamstereiceltest biedt de mogelijkheid de interactie tussen eicel en humane zaadcel nauwkeurig te bestuderen. Cinematografische technieken kunnen hierbij van belang zijn.

Al naar gelang het tijdstip van bevruchting zijn de gedecondenseerde zaadcelkoppes verschillend van grootte, hetgeen de waarneembaarheid van mogelijke abnormaliteiten bemoeilijkt. Afwijkingen van de ovale afgeronde decondensatie werden frequent waargenomen, maar deze kunnen mogelijk zijn veroorzaakt door een verschil in vacuolisatie van de zaadcelkoppes of verschillen in technische bewerking van de preparaten. In één preparaat echter werd een aantal eicellen gevonden waarin een binucleaire decondensatie had plaatsgevonden (figuur 2.12), hetgeen wijst op het bevruchtend vermogen van abnormale binucleaire of tweekoppige zaadcellen. Op het eiceloppervlak van de in figuur 2.12 afgebeelde eicel werden eveneens 3 tweekoppige, maar niet gepenetreerde, zaadcellen aangetroffen.

Uit de resultaten vermeld in tabel 2.2 blijkt, dat abnormale menselijke zaadcellen in dezelfde mate aan het oppervlak van de naakte hamstereicel hechten, als normale zaadcellen. Deze resultaten werden verkregen door de morfologie van wel en niet-gebonden zaadcellen aan 20 of meer eicellen bij 8 patiënten te onderzoeken (4.3). Een aantal van deze experimenten werd verricht door gebruik te maken van een bijzondere procedure (2.2), zodat de eicellen werden geïncubeerd met vrijwel 100% bewegende zaadcellen.

Uit tabel 2.2 blijkt, dat abnormale zaadcellen zich blijkbaar aan het eiceloppervlak kunnen hechten. De morfologie van de zaadcellen gehecht aan onbevruchte eicellen (n=16, gemiddeld 39% normale zaadcellen) was hetzelfde als de morfologie van zaadcellen gehecht aan bevruchte eicellen

*Figuur 2.12 Binucleaire gedecondenseerde zaadcel, met één flagel.
 Linksonder is een "normale" mononucleaire gedecondenseerde
 zaadcelkop zichtbaar (fase-contrast: vergroting, 1400 x).*



*Tabel 2.2 Een vergelijking van de morfologie van wel en niet aan het oppervlak
 van eischilvrije hamstereicellen gehechte zaadcellen. Gegevens zijn
 verkregen van incubaties van 8 patiënten.*

zaadcelmorfologie	gemiddelde percentages	
	niet gehechte zaadcellen	gehechte zaadcellen
normaal	26.9	26.9
terato vormen	64.1	66.8
ander afwijkingen	9.0	6.3

(n=9, gemiddeld 37% normale zaadcellen).

2.8 Het invriezen van hamstereicellen

In 1972 werd een voor de experimentele embryologie belangrijke ontdekking gedaan. Preimplantatiestadia van zoogdierembryo's bleken onder speciale condities bestand tegen extreem lage temperaturen, hetgeen het mogelijk maakte embryo's gedurende zeer lange tijd in bevroren toestand te bewaren met behoud van vitaliteit (Whittingham et al, 1972; Wilmut, 1972). In de daaropvolgende jaren werd aangetoond, dat met gebruikmaking van deze cryobiologische techniek, embryo's van muizen, ratten, konijnen, schapen, geiten en runderen, na ontdooien en transplantatie in pleegmoeders, tot normale ontwikkeling konden komen (Leibo en Mazur, 1978). Deze techniek biedt de zoogdierembryoloog vele toepassingen. Zo is het nu mogelijk om zeldzame stammen muizen en overbodige continue kweken op te slaan in een "embryo-bank". Genetisch kunnen geen veranderingen optreden. Daarnaast biedt deze techniek in combinatie met superovulatie, vele voordelen voor de veeteelt. De fysische achtergronden en de invriestechnieken zijn beschreven door Leibo (1977) en Leibo en Mazur (1978).

Ook niet bevruchte zoogdiercellen kunnen worden ingevroren en in vloeibare stikstof (-196°C) worden opgeslagen (Tsunoda et al, 1976; Parkening en Chang, 1977). Fleming en medewerkers (1979) hebben aangetoond dat naakte hamstereicellen na cryobiologische preservatie penetreerbaar blijven voor humane zaadcellen. Deze techniek heeft met name waarde voor onderzoekers, die in de hamstereiceltest geïnteresseerd zijn, maar die geen gebruik kunnen maken van proefdierfaciliteiten. In een dergelijk geval kunnen de eicellen in bevroren toestand van derden worden verkregen.

De door Fleming et al (1980) gevolgde methode is arbeidsintensief, daar de eicellen voor het invriezen moeten worden gelsoleerd en met enzymen moeten worden behandeld. Zeilmaker en Verhamme (1979) hebben een vereenvoudigde techniek beschreven, waarbij embryo's binnen het oviduct blijven en het hele orgaan, als "carrier", wordt ingevroren. Toepassing van deze techniek bij hamstereicellen heeft het voordeel, dat grote hoeveelheden eicellen zonder gecompliceerde manipulatie kunnen worden ingevroren.

Om te onderzoeken welke invriestechnieken de meeste overleving en de hoogste betrouwbaarheid geven werd een aantal experimenten gedaan, waarvan de resultaten zijn gegeven in tabel 2.3 en 2.4. De invriesprocedure was

Tabel 2.3 Overleving van hamstereicellen na cryopreservatie.

vriessnelheid (°C/min)	aantal overlevende / totaal aantal eicellen (%)		
	eileider ingevroren	ingevroren met cumulus	eischilvrije eicellen ingevroren
0.33	40/50 (80%)	14/30 (47%)	27/30 (90%)
0.33	59/70 (84%)	12/33 (36%)	38/42 (90%)
1.0	32/37 (86%)	-	11/20 (55%)
1.0	43/54 (80%)	-	49/53 (93%)

Tabel 2.4 In vitro bevruchtend vermogen van zaadcellen geïncubeerd met verse en ontdoode hamstereicellen.

vriessnelheid (°C/min)	donor	aantal bevruchte / totaal aantal eicellen (%)			
		verse eicellen	eileider ingevroren	ingevroren met cumulus	eischilvrije eicellen
0.33	A	4/30 (13%)	7/31 (23%)	1/12 (8%)	6/20 (30%)
0.33	B	13/26 (50%)	24/37 (65%)	0/12 (0%)	14/29 (48%)
1.0	A	5/28 (18%)	3/20 (15%)	-	6/27 (22%)
1.0	C	8/30 (27%)	12/27 (44%)	-	8/22 (36%)

vrijwel gelijk aan die van Zeilmaker en Verhamme (1979). In ampullen gevuld met een met fosfaat gebufferde zoutoplossing, waaraan 10% foetaal kalfs serum was toegevoegd, werden of naakte eicellen (50 per ampul) of eicellen met intacte cumulus of gehele oviducten gepipetteerd. Stapsgewijze werd DMSO-oplossing (dimethylsulfoxide is een stof die de cel tegen beschadiging tijdens het invriezen beschermt) aan de ampulinhoud toegevoegd tot een uiteindelijke molariteit van 1.5 M was bereikt. Ampullen met intacte oviducten werden gedurende 30 minuten geëquilibreerd bij 0°C. De ampullen werden met een temperatuurdaling van 0.3°C/ minuut of

1°C /minuut ingevroren tot -80°C en daarna gedurende twee weken bewaard in vloeibare stikstof (-196°C). Na het ontdooien werden de eileiders aangeprikt en de inhoud van de verschillende ampullen werd stapsgewijze bij kamertemperatuur verdund.

Uit de resultaten van tabel 2.3 blijkt dat de overleving van eischilvrije eicellen en eicellen binnen de eileider ingevroren hoog is. De penetreerbaarheid van eicellen ingevroren met intacte cumulus, was lager dan die van de eicellen ingevroren in het oviduct of zonder zona (tabel 2.4). De laatste twee groepen eicellen blijven na het ontdooien in dezelfde mate penetreerbaar als controle-eicellen. Verschillen in invriessnelheid (0.3 versus 1°C/minuut) bleken geen invloed te hebben op de resultaten.

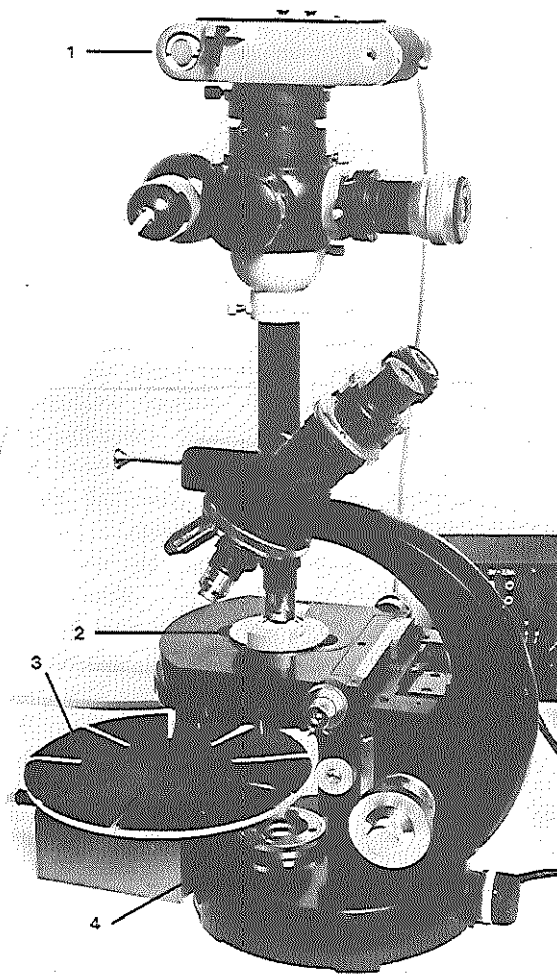
HOOFDSTUK 3

EEN SEMI-AUTOMATISCHE ANALYSE VAN DE BEWEEGLIJKHEID VAN ZAADCELLEN

3.1 Meervoudige belichtingsfotografie(MBF)

De beoordeling van de beweeglijkheid van zaadcellen is een probleem voor onderzoekers, die geïnteresseerd zijn in de evaluatie van mannelijke onvruchtbaarheid. Het is gebleken dat de beoordeling van beweeglijkheid en de vertaling daarvan in kwantitatieve gegevens zelfs door getrainde waarnemers, een subjectief element bevat. Beweeglijkheidsanalyses van ejaculaten van dezelfde patiënt of donor kunnen vaak zeer verschillend zijn. Waarnemers die de opdracht krijgen hetzelfde sperma te bestuderen, kwantificeren verschillend (Overstreet et al,1978; Amelar et al,1980). Het is daarom begrijpelijk dat vele onderzoekers van mening zijn, dat de beoordeling van het ejaculaat weinig nut heeft, zolang dit oordeel volledig afhankelijk is van menselijke interpretatie. Een overzicht van de verschillende technieken, die de objectivering van beweeglijkheid beogen, is weergegeven in hoofdstuk 1. Daar beweeglijkheid wordt beschouwd als een belangrijke parameter voor het bepalen van de kans op nakomelingschap, is het van belang de beweeglijkheid te evalueren naast en in relatie met het in vitro bevruchtend vermogen van menselijke zaadcellen. Bij de keuze van een objectieve methode ter bepaling van de beweeglijkheid werden een aantal factoren overwogen. De voorkeur werd gegeven aan een methode waarin de microscoop centraal staat, zodat de informatie fotografisch kan worden vastgelegd. Daarnaast werd het belangrijk geacht de mate van verplaatsing en de wijze van de beweeglijkheid te kwantificeren.

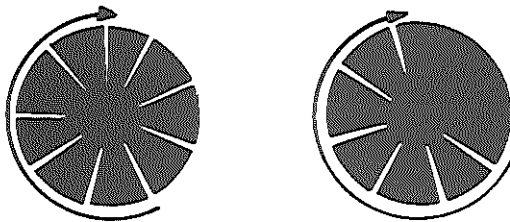
In 1978 is door Makler een stroboscopische techniek geïntroduceerd, die mogelijk op grote schaal klinisch toepasbaar is (Amelar et al, 1980). Bij kamertemperatuur worden goed gemengde zaadcellsuspensies met een pasteurpipet geplaatst tussen de bovenste en onderste schijf van de Makler-telkamer (El-Op, Israel). Dit is een kamer met een constante dikte van 10 μm , waarin de zaadcellen (die over het algemeen een kopdiameter van 1-3 μm hebben) zich vrijwel alleen in een horizontaal vlak kunnen verplaatsen. Nadat door frictie verschuivende niet-bewegende zaadcellen tot stilstand zijn gekomen, wordt er scherp gesteld op de bewegende zaadcellen. Tussen de condensor en de telkamer wordt een ronddraaiende



Figuur 3.1 (a)

*Opstelling voor het maken
van meervoudig belichte
fotografische opnamen (MBF).*

- 1. Registratie-camerahuis.*
- 2. Makler-telkamer*
- 3. Stroboscoopschijf.*
- 4. Lichtbron.*



Schijf A

Schijf B

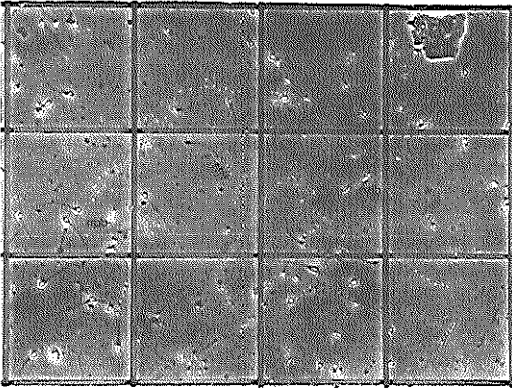
Figuur 3.1 (b)

*Twee gebruikte stroboscoop-
schijven.*

plaat (38 toeren/minuut) geplaatst (figuur 3.1 a). Daarop bevindt zich een zwarte schijf, waarin op regelmatige afstand radiaal divergerende openingen zijn gemaakt (stroboscoopschijf). Het systeem (figuur 3.1a) is zo afgesteld dat bij een sluitertijd van 1 seconde en bij gebruik van schijf A (figuur 3.1b), het negatief in de camera op de fase-contrast (Zeiss) microscoop, maximaal 6 of 7 keer wordt belicht. Gebruik van schijf type B (figuur 3.1b) verdient echter de voorkeur. Bij deze schijf wordt de sluiters ingedrukt op het moment dat het zwarte deel passeert en weer losgelaten als de 6 openingen voorbijgedraaid zijn. De totale belichtingstijd van de 6 lichtpulsjes is 1/30 seconde. In de plaat van de telkamer is een raster van 1 bij 1 mm gegraveerd. Dit raster is onderverdeeld in 100 hokken (100x100 μm). Indien een vergroting van 160 x wordt gebruikt, zijn er op het negatief 12 tot 15 hokken zichtbaar (figuur 3.2a). Er wordt gebruik gemaakt van kleinbeeld- camerahuizen (Nikon c35 en een Leica MD-2 registratie-camera) en Kodak Plus-X-pan zwart/wit (125 ASA) of Kodak Ektachrome diapositief film (160 ASA). Negatieven worden vergroot afgedrukt (190-220 mm bij 140-165 mm).

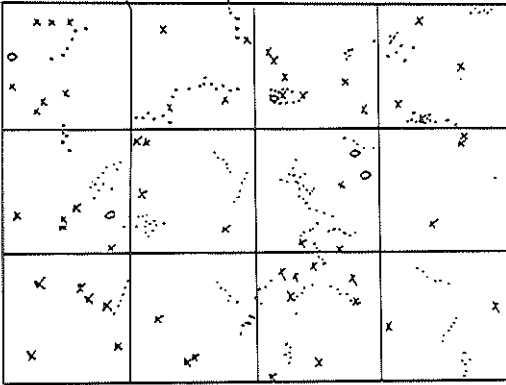
De sporen van progressief bewegende zaadcellen zijn op de film duidelijk zichtbaar als strengen van maximaal 6 of 7 "kralen". Elke kraal correspondeert met 1 belichtingspuls van de stroboscoop (figuur 3.2a). Niet-bewegende en niet progressief bewegende, (niet effectief verplaatsende) zaadcellen kunnen van elkaar onderscheiden worden, daar de laatste een vaag beeld geven op de opname (figuur 3.2a). De belichtingstijd van 1 seconde is noodzakelijk om een zo optimaal mogelijke indruk te krijgen van de gemiddelde snelheid. Een langere belichting van bijvoorbeeld 5 seconden draagt niet bij tot een verhoging van de nauwkeurigheid van de bepaling, noch tot een verbetering van de herkenbaarheid van de zaadcellensporen. Makler en Blumenfeld (1980) vonden slechts een afwijking van de zaadcellensnelheid van 4%, indien zaadcellensuspensies langer werden belicht. Het is duidelijk dat deze afwijking, die werd gevonden bij een studie van 15 beweeglijke zaadcellen, kleiner wordt naarmate er meer bewegende zaadcellen zijn gefotografeerd. Daarom wordt elke zaadcellensuspensie, afhankelijk van de concentratie bewegende zaadcellen, 2 tot 10 keer in verschillende delen van de telkamer gefotografeerd.

Het op deze wijze vastleggen van beweeglijkheid heeft een aantal voordelen. Het sperma hoeft niet te worden verdund, zodat de zaadcellen in hun natuurlijke omgeving in een constante ruimte kunnen worden bestudeerd. Op negatieven vastgelegde informatie heeft een voordeel ten opzichte van cinematografische technieken, daar deze het noodzakelijk



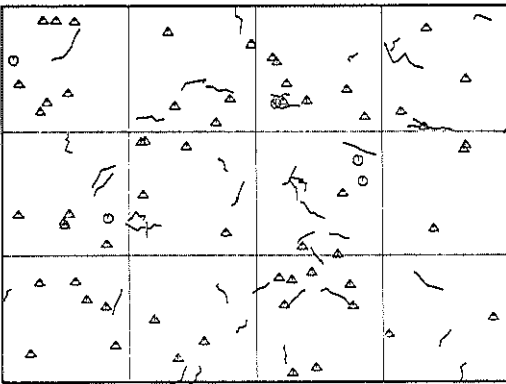
Figuur 3.2 (a)

Stroboscopische opname van sperma in het rasterdeel van de telkamer. Bewegende zaadcellen zijn als kralensnoeren (zie pijlen) zichtbaar.
 npb = niet-progressief bewegende zaadcel



Figuur 3.2 (b)

Stilliggende zaadcellen worden van de foto (a) overgenomen op een transparant, evenals de "kralen" van de bewegende zaadcellen.



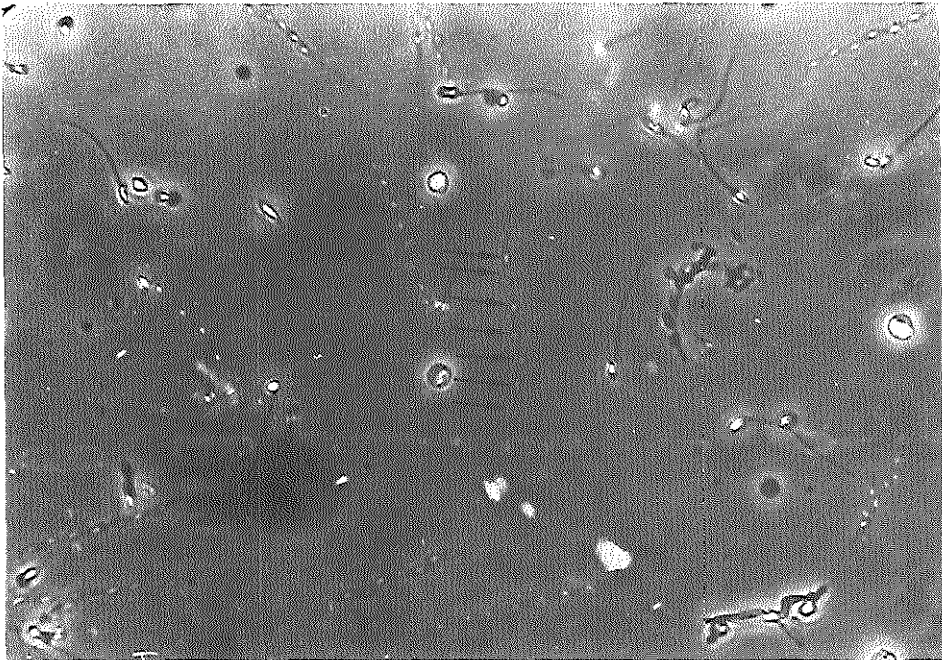
Figuur 3.2 (c)

De registratiepen van het XY-tablet wordt aangestipt op zaadcelprojecties van dia's, foto's (a) of tekeningen daarvan (b). Hier is een computeruitdraaiel zichtbaar, welke het resultaat is van de informatie aanwezig op foto a. Δ = stilliggende zaadcel
 \bigcirc = niet-progressieve beweging,
 \swarrow = zaadcelspoor.

maken meer opnamebeeldjes met elkaar te vergelijken, hetgeen zeer tijdrovend is. In plaats van continue belichting wordt stroboscopische belichting gebruikt. De eerste zou niet-bewegende zaadcellen, zelfs bij donker-veld belichting (objecten zijn verlicht zichtbaar op donkere achtergrond), overbelichten. Hierdoor zijn zaadcellsporen moeilijk te onderscheiden van stilliggende zaadcellen. Een verminderde lichtintensiteit bemoeilijkt de waarneembaarheid van bewegende zaadcellen. De fotografische techniek, die in dit proefschrift beschreven wordt, is vrijwel gelijk aan de methode ontwikkeld door Makler (1978 en 1980).

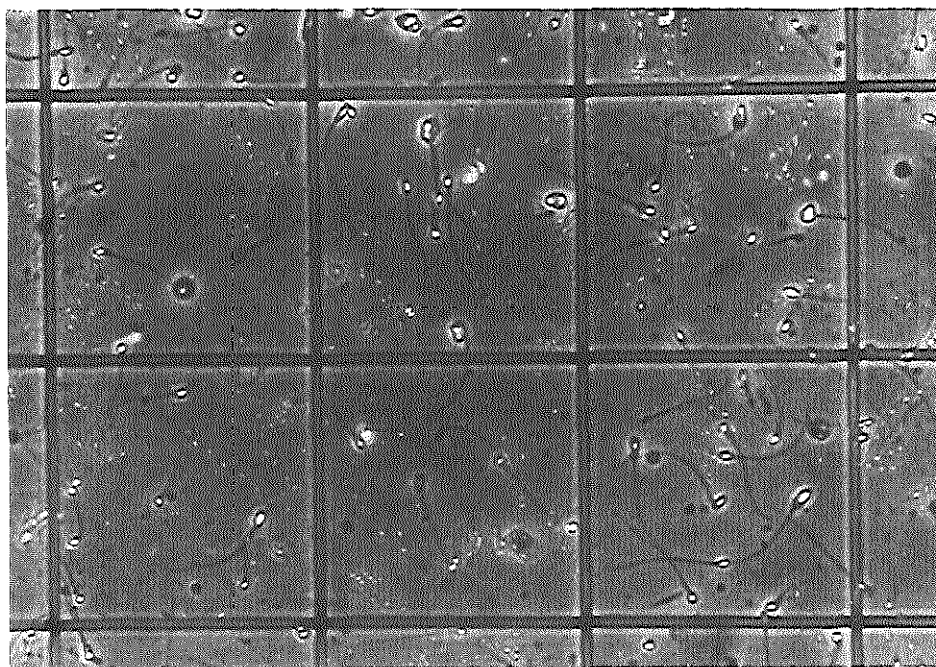
De tweede fase van deze methode bestaat uit de vertaling van de fotografische informatie in kwantitatieve gegevens. De methode die hier wordt beschreven wijkt op één essentieel punt af van de verschillende informatieverwerkende technieken die door Makler (1978, 1980 a en b) zijn

Figuur 3.3 Stroboscopische opname van een homogeen bewegende populatie zaadcellen (rechtlijnige voortbeweging). Pijlen geven de kralen van één zaadcelspoor aan.



beschreven. Deze berekent de zaadcellen snelheid door van de geprojecteerde opname de eerste en laatste afbeelding van de bewegende zaadcel met een rechte lijn te verbinden. De verkregen informatie bestaat uit een vel papier met rechte lijntjes (zaadcellen) en punten (niet-bewegende zaadcellen). De berekende snelheid is dan een maat voor de verplaatsing. Hoewel deze methode verreweg de eenvoudigste is, gaat zij van de veronderstelling uit dat humane zaadcellen zich volgens een rechte lijn verplaatsen. Makler verdedigt deze methode door te stellen dat de werkelijke verplaatsing maximaal 12% langer is. Sinds de originele beschrijving van de MBF in 1978, heeft Makler in een reeks van publikaties (Makler 1979b; Makler en Blumenfeld et al, 1979; Makler en Itzkovitz et al, 1979; Makler, 1980a; Makler en Blumenfeld, 1980; Makler en Tatcher et al, 1980) de "rechte lijnen methode" aangehouden, door gebruikmaking

Figuur 3.4 Stroboscopische opname van een heterogeen bewegende populatie zaadcellen. Het raster van de Makler-telkamer (één hok meet 0.1 x 0.1 mm) is zichtbaar.



van illustraties zoals figuur 3.3, waarop voornamelijk recht zwemmende zaadcellen zijn afgebeeld. De beweeglijkheid van zaadcellen van patiënten, maar ook van donoren is echter heterogener (figuur 3.4) dan door Makler wordt voorgesteld. Indien de verplaatsing wordt vergeleken met de werkelijk afgelegde weg, dan blijkt dat de laatste 50% groter kan zijn (Kouwenhoven, 1981). De hieronder beschreven informatieverwerkende methode maakt daarom gebruik van alle stroboscopische lichtpulsen. Dit objectiveert niet alleen de bepaling van de zaadcel snelheid, maar deze informatie kan eveneens worden gebruikt om de wijze van zaadcelprogressie te kwantificeren.

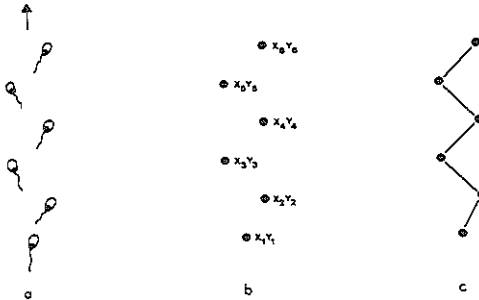
De lengte van de sporen kan worden gemeten met behulp van verschillende meetinstrumenten, die alle uitgaan van de lineaal als lengtemeter en soms met gebruikmaking van microcomputers (Makler, 1978; Makler, 1980b). Indien echter computer-faciliteiten of andere informatieverwerkende apparatuur tot de beschikking staat verdient gebruik daarvan, de voorkeur (Makler et al, 1980b).

3.2 Omzetting van de informatie in XY-coördinaten

Op transparante vellen papier wordt de op de foto's aanwezige informatie overgetrokken met een pen, zodanig dat iedere "kraal" van een zaadcelspoor apart wordt aangestipt. Stilliggende en niet-progressief bewegend zaadcellen worden apart aangegeven (figuur 3.2b). Met behulp van een vergroter worden dia's, met een constante vergroting, geprojecteerd op papier en de zaadcellen worden aangestipt. De vellen papier worden bevestigd op de coördinaten-plaat van een XY-tablet (Summagraphics, Bidpad One, V.S), die verbonden is met een Digital PDP 11/70 minicomputer. Een XY-tablet of elektronische coördinatenleestafel, is een meetinstrument dat bestaat uit een plaat, waaraan een registratiepen en een registratie-apparaat zijn verbonden. Wanneer de pen op een willekeurige plaats van de plaat wordt ingedrukt, wordt de bijbehorende XY-coördinaat door het registratie-apparaat aan de computer doorgegeven. Het oplossend vermogen van een dergelijk XY-tablet is groot. Een verschuiving van 1/20 mm is reeds voldoende om een ander coördinatenpaar te krijgen. De meeste zaadcelsporen zijn ongeveer 1 cm lang op de vellen papier, hetgeen voldoende is om een nauwkeurig beeld te krijgen van het ingevoerde zaadcelspoor. De registratie-pen wordt, in de volgorde van de belichting, over de geprojecteerde "kralensnoeren" bewogen. Bij elke "kraal" wordt een toets op de registratiepen ingedrukt.

Een zaadcelspoor wordt zodoende in de vorm van maximaal 6 of 7 XY-coördinatenparen in het geheugen opgeslagen (figuur 3.5). Andere zaadcellen worden als één enkel coördinatenpaar geregistreerd. Informatie betreffende de origine van de zaadcellsuspensie en het aantal gebruikte hokken van het telkamer-raster wordt via een beeldscherm-terminal in het geheugen geregistreerd.

Figuur 3.5 De kralen van een zaadcelspoor (a) worden in de volgorde van de beweging door de registratiepen van het XY-tablet, als een XY-coördinatenpaar in het geheugen opgeslagen. De snelheid wordt berekend door de punten (=coördinaten) van een spoor (b) met elkaar te verbinden (c).



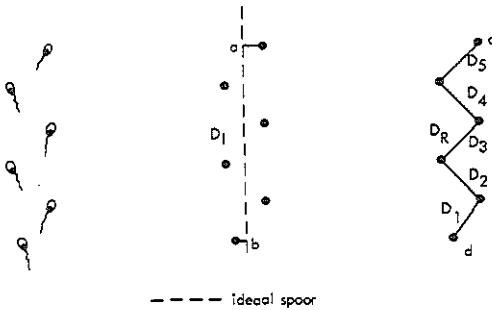
3.3 Definities en berekeningen van sperma-karakteristieken

De volgende parameters worden berekend en in het geheugen opgeslagen.

- De zaadcelconcentratie ($\times 10^6/\text{ml}$).
- Het percentage beweeglijkheid, gedefinieerd als de frequentie van de zich progressief verplaatsende en niet-progressief verplaatsende beweeglijke zaadcellen.
- Het percentage progressieve beweeglijkheid, gedefinieerd als de frequentie van zich progressief verplaatsende zaadcellen; de concentratie beweeglijke zaadcellen ($\times 10^6/\text{ml}$).
- De gemiddelde snelheid wordt berekend met behulp van de volgende formule;

$$\text{gemiddelde snelheid } (\mu\text{m/sec}) = \frac{D}{T} \times \frac{S}{P-1}$$

waarin D_T de som is van de lengten van alle zaadcelsporen D_R , uitgedrukt in micrometers. D_R wordt berekend door voor elk zaadcelspoor de coördinaatparen met elkaar te verbinden in de volgorde van de registratie (figuur 3.6). N =het aantal progressief beweeglijke zaadcellen, S =de lichtpulsfrequentie per seconde en P het maximale aantal "kralen" zichtbaar in het langste zaadcelspoor.



Figuur 3.6

Berekening van de gemiddelde benadering van de rechte lijn.

- De afwijking van de rechte lijnige voortbeweging wordt berekend door van elke coördinatenverzameling van een zaadcelspoor, met behulp van de kleinste kwadraten methode een ideaal zaadcelspoor te berekenen (Linfit routine programma, Bevington, 1969). De benadering van de rechte lijn wordt weergegeven door de formule D_L/D_R , waarin D_L de afstand is tussen de twee eindpunten van de berekende ideale rechte lijn en D_R de door de zaadcel afgelegde afstand is (figuur 3.6). Theoretisch kan de benadering van de rechte lijn variëren tussen 0 en 1. Indien de zaadcel zich via een rechte lijn voortbeweegt, is de benadering van de rechte lijn gelijk aan 1. De gemiddelde benadering van de rechte lijn wordt bepaald uit de populatie progressief beweeglijke zaadcellen.
- Om een indruk te verkrijgen omtrent de regelmatigheid van de verplaatsing, kan de snelheidsconstante worden berekend. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de volgende formule;

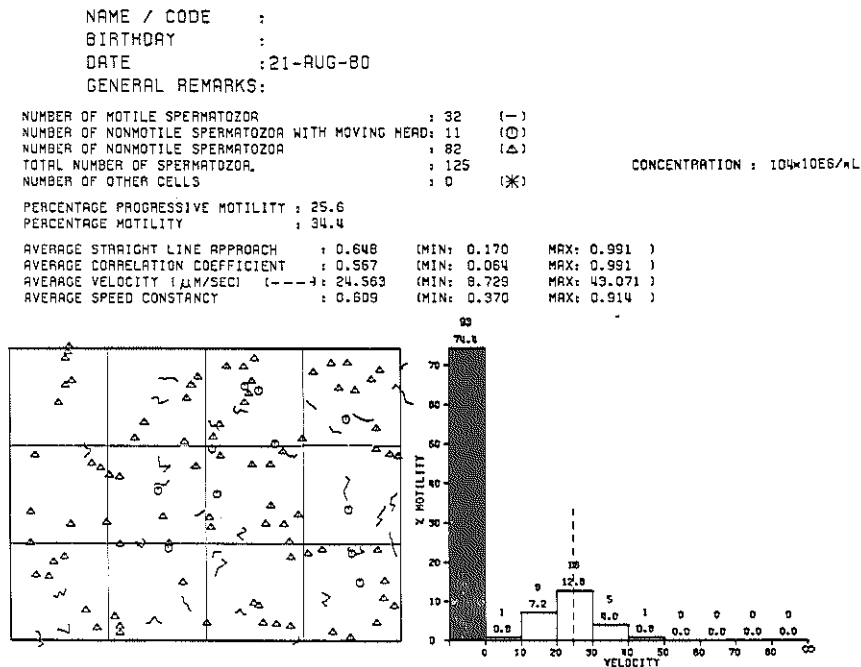
$$\text{snelheidsconstante} = 1 - \frac{\sum \left| \frac{D_R}{n} - D_i \right|}{D_R}$$

waarin n het aantal afstanden is tussen de "kralen" van een spoor (figuur 3.6) en D_R/n de afstand is tussen twee opéénvolgende afbeeldingen van een zaadcelspoor, indien de zaadcel zich met een constante snelheid zou voortbewegen. De berekende afstanden tussen de opéénvolgende zaadcelafbeeldingen wordt gegeven door D_1, D_2, \dots, D_L . De gemiddelde snelheidsconstante wordt bepaald voor de populatie progressief beweeglijke zaadcellen. Evenals de gemiddelde benadering van de rechte lijn varieert deze parameter tussen 0 (zaadcellen remmen of accelereren) en 1 (zaadcellen bewegen met constante snelheid).

3.4 Verwerking en presentatie van de gegevens

De gegevens van een analyse worden verzameld op een uitdraaivel (figuur 3.7). Hierop zijn het aantal ingevoerde zaadcellen, de

Figuur 3.7 Computer-uitdraaivel met resultaten van één sperma-onderzoek



zaadcelconcentratie en bovengenoemde beweeglijkheidsparameters aangegeven. De parameters die de kwaliteit van de beweeglijkheid omschrijven (snelheid, rechtlijnigheid en constantheid van snelheid) worden als gemiddelden met spreiding weergegeven. Tevens is op dit uitdraai-vel een grafische tekening gemaakt van de ingevoerde coördinaten. Coördinaten van een spoor zijn met elkaar verbonden. De op het uitdraai-vel weergegeven frequentieverdeling van de snelheid is in experimentele situaties van weinig belang, maar wordt gebruikt voor individuele bestudering van het betreffende zaadcelmonster. Bovenstaande gegevens werden, naast eventuele patiëntgegevens, zaadcelmorfologie-parameters en gegevens betreffende de in vitro bevruchting (hoofdstukken 4 en 5), in het geheugen opgeslagen.

3.5 Subjectieve bepaling van beweeglijkheid

Sperma en andere zaadcellsuspensies werden geobserveerd in een Bürker hemocytometer (hoofdstuk 4) of een Makler telkamer (hoofdstukken 5 tot en met 8). De zaadcelconcentratie en het percentage beweeglijkheid van het bestudeerde materiaal werd geschat door verschillende waarnemers. Gegevens van serie-experimenten werden echter verkregen door dezelfde waarnemer (hoofdstukken 5 tot en met 8). De Bürker telkamer heeft een 10 x grotere dikte dan de Makler telkamer, waardoor het te bestuderen sperma eerst met fysiologisch zout moet worden verdund. De progressiviteit of kwaliteit werd geschat door de waarnemer en gegradeerd volgens een schaalverdeling van 0 tot 4 (waarin 0 een slechte beweeglijkheid is en 4 een goede beweeglijkheid). Hoewel aan de waarde van een dergelijk subjectief oordeel kan worden getwijfeld, wordt deze gradering ook elders gebruikt (Eliasson, 1973).

3.6 Nauwkeurigheid van de meervoudige belichtingsfotografie

De waarde van een analytische techniek is moeilijk te beoordelen indien de nauwkeurigheid en de betrouwbaarheid van het systeem niet bekend zijn. Zoals reeds eerder vermeld, is de subjectieve beoordeling van sperma, zoals deze in de meeste klinische laboratoria wordt gebruikt, zeer variabel. Men vraagt zich hierbij af of dit probleem veroorzaakt wordt door de methodiek of dat ejaculaten van dezelfde patiënten of donoren aan grote veranderingen zijn blootgesteld (Eliasson, 1973; Amelar et al, 1980).

Tabel 3.1 Variaties tussen sperma-parameters van ejaculaten van dezelfde donoren.

donor	aantal bestudeerde ejaculaten	subjectieve beoordeling			meervoudige helichtingsfotografie			
		concentratie (x 10 ⁶ /ml)	percentage beweeglijkheid	gradering (van 0 tot 4)	concentratie (x 10 ⁶ /ml)	percentage beweeglijkheid	gemiddelde snelheid (µm/sec)	gemiddelde benadering van de rechte lijn
A	4	111	70	3	53	68	18	0.75
		101	65	3	59	34	19	0.70
		10	85	2	49	34	27	0.75
		61	50	2	100	38	28	0.43
B	3	137	50	4	80	56	24	0.64
		101	60	2	128	51	20	0.64
		133	55	2	162	45	24	0.38
C	4	120	70	4	60	54	23	0.79
		70	80	3	76	70	22	0.70
		47	55	3	83	79	21	0.72
		136	60	3	58	29	22	0.53
D	3	85	50	2	57	47	25	0.68
		33	80	2	153	55	22	0.75
		102	55	3	83	56	26	0.55

Makler (1978) meent dat de grote nauwkeurigheid van de meervoudige belichtingsfotografie de betrouwbaarheid van deze methode aantoont. Resultaten van sperma dat 3 of 12 maal werd gefotografeerd waren niet verschillend, zolang de hoeveelheid gefotografeerde zaadcellen maar voldoende was. Hoewel de methode die hier beschreven is, met name wat de uitwerking van de foto's betreft, afwijkt van die van Makler (1978 en 1980a), is gebleken dat resultaten van identieke foto's die door verschillende waarnemers zijn ingevoerd, onderling zeer weinig variatie vertonen. De afwijking van de ingevoerde concentraties, het percentage beweeglijkheid en de gemiddelde snelheid was kleiner dan 5%. Deze afwijking werd kleiner dan 2%, indien de foto's door dezelfde waarnemer werden ingevoerd. Men kan dus spreken van een reproduceerbare fotografische en informatieverwerkende techniek.

De bruikbaarheid van het systeem kan echter alleen worden geëvalueerd, wanneer resultaten van ejaculaten van dezelfde donoren of patiënten worden vergeleken. In tabel 3.1 zijn resultaten van 3 of 4 ejaculaten van 4 donoren gegeven. Er is niet alleen een grote variatie tussen de subjectief bepaalde parameters, maar ook tussen de objectief bepaalde. Dit wordt niet door de methode veroorzaakt, zoals anderen menen, (Overstreet et al, 1978; Makler, 1978; Amelar et al, 1980), maar door een fysiologisch mechanisme. Uit deze gegevens mag niet worden geconcludeerd dat een semi-automatisering van het spermioogram weinig waarde heeft. Wel is het noodzakelijk dat een individuele beoordeling van sperma van patiënten gebaseerd is op meer dan één ejaculaatstudie. Ook mag niet worden voorbijgegaan aan de extra gegevens, die deze methode verschaft.

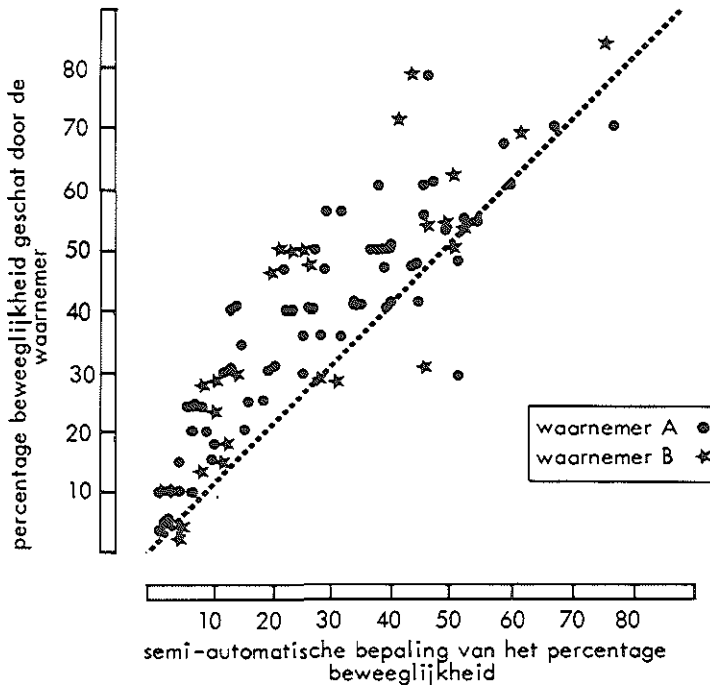
Het belang van de bepaling van de gemiddelde snelheid werd recent aangetoond door Milligan et al (1980). Zaadcellen van vruchtbare mannen bleken gemiddeld een hogere snelheid te hebben, dan zaadcellen van onvruchtbare mannen. Hoewel de techniek van Milligan en medewerkers afwijkt van de hierboven beschreven methode, tonen deze waarnemingen aan dat niet-routinematig bepaalde beweeglijkheidsparameters mogelijk van belang kunnen zijn voor de evaluatie van opzuiveringstechnieken, effecten van activerende en remmende stoffen op zaadcellen in vitro en diagnostiek in het algemeen. De relatie tussen deze parameters onderling en de invloed van beweeglijkheid op het in vitro bevruchtend vermogen, worden besproken in hoofdstuk 5. De klinische toepassing van deze methode kan, gezien de arbeidsintensiviteit en de kosten, slechts dan worden bewerkstelligd wanneer de prognostische waarde van de verschillende parameters is vastgesteld. Daarvoor is het noodzakelijk de vruchtbaarheid

en de prognose van de patiënt te toetsen aan de hand van populatievergelijkingen en conceptiepercentages. Ondanks de geavanceerde meetinstrumenten ontwikkeld door Makler (1978, 1980b en 1980c) mag niet aan deze noodzakelijke voorwaarden worden voorbijgegaan, daar nog niet voldoende omtrent de klinische waarde van deze technieken bekend is.

Twee belangrijke verschillen werden aangetoond tussen de semi-automatische sperma-analyse en het routine ejaculaatonderzoek. Het eerste verschil betreft de gradering van de kwaliteit van de beweging. Het blijkt dat deze parameter wordt beïnvloed door de hoeveelheid (bewegende) zaadcellen aanwezig in de telkamer, waardoor de waarnemer geen objectief beeld kan geven. Dit verschijnsel wordt besproken in hoofdstuk 8.

Het tweede verschil tussen de objectieve en subjectieve methoden

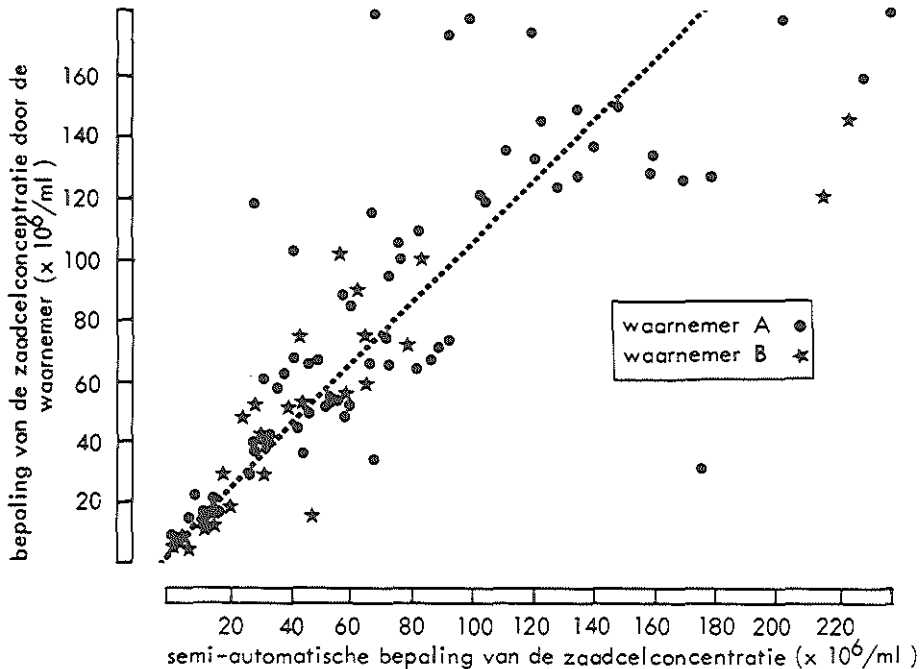
Figuur 3.8 Vergelijking van percentages beweeglijkheid geschat door de waarnemer en eveneens bepaald door middel van de semi-automatische methode.



wordt geïllustreerd in figuur 3.8. Het percentage beweeglijkheid, geschat door twee waarnemers A en B, van een groot aantal ejaculaten is uitgezet (horizontale as) tegen het percentage beweeglijkheid zoals dat is verkregen met behulp van MBF (verticale as). Uit figuur 3.8 blijkt dat het percentage beweeglijkheid door de waarnemers gemiddeld 20% wordt overschat, zodat men kan spreken van een systematische fout. De concentratie zaadcellen daarentegen wordt geschat met niet-systematische onnauwkeurigheid (figuur 3.9).

In een onderzoek bij 100 vruchtbare mannen in 1979 (Makler en Itzkovitz et al, 1979) werd met behulp van MBF aangetoond dat het gemiddelde percentage beweeglijkheid 45% was. Dit is beduidend lager, dan het gemiddelde percentage van ander studies, welke varieerde tussen de 58

Figuur 3.9 De zaadcelconcentratie zoals die geschat wordt door de waarnemer, vergeleken met de zaadcelconcentratie bepaald door middel van de semi-automatische methode.



en 77% (Sobrero, 1975; Rehan, 1975; Nelson, 1974). Makler en Itzkovitz et al (1979) veronderstellen dat hieraan een methodologische oorzaak ten grondslag ligt. Vergelijking van routine sperma-analysen en internationale normalisering is echter gecompliceerder, daar aspecten van verschillende aard een rol kunnen spelen. Er dient rekening te worden gehouden met sociale en etnische verschillen. Zo blijkt dat de door Nelson en Bunge (1974) en Rehan et al (1975) bestudeerde vruchtbare mannen, prévasectomie patiënten waren, terwijl Sobrero en Rehan (1975) mannen onderzochten die zeer recentelijk nageslacht hadden verwekt. De vruchtbare mannen bestudeerd door Makler et al (1979) daarentegen waren "voorgeselecteerd", daar alleen mannen met normospermie aan het onderzoek meededen. Onderlinge vergelijking van deze studies wordt verder bemoeilijkt door lokale verschillen en door verschuivingen in de tijd (1.5).

HOOFDSTUK 4

BETEKENIS VAN DE HAMSTERICELTEST VOOR DE PROGNOSE VAN DE MOGELIJKHEID OP EEN CONCEPTIE. EEN VERGELIJKENDE STUDIE VAN VRUCHTBARE DONOREN EN ONVRUCHTBARE OF VERMINDERD VRUCHTBARE PATIENTEN.

4.1 Inleiding

In hoofdstuk 1 werden de parameters, die worden gebruikt in het andrologie-laboratorium geëvalueerd. Uit de dagelijkse praktijk is gebleken dat er behoefte bestaat aan diagnostische methoden die informatie verschaffen over het bevruchtend vermogen van de patiënt of van de sperma-donor. De laatste 10 jaar zijn om deze reden vele nieuwe potentiële vruchtbaarheidstesten ontwikkeld. Het merendeel van deze testen is gebaseerd op chemische bepalingen van in het spermaplasma aanwezige substanties, zoals cyclische nucleotiden, polyaminen, fumarase en diamine-oxidase activiteit, fructose, kationen en zinkconcentraties (Fair et al, 1972; Phadke et al, 1973; Marmar et al, 1975; Beck et al, 1976; Crabbe, 1977; Hommonnai et al, 1978). Het is gebruikelijk de uitslagen van dergelijke testen te correleren met de zaadcelconcentratie. Men neemt veelal aan, dat de zaadcelconcentratie een maat is voor de vruchtbaarheid. Uit recent onderzoek echter is gebleken, dat bij zaadcelconcentraties hoger dan $5-10 \times 10^6/\text{ml}$, de zaadcelconcentratie vrijwel geen betekenis heeft voor de prognose van de kans op nakomelingschap (Smith et al, 1977; Zukerman et al, 1977). Het is te betreuren, dat de meeste potentiële vruchtbaarheidstesten niet geëvalueerd worden in relatie tot klinische onvruchtbaarheid.

De samenhang tussen de uitslagen van de hamstereiceltest en de mannelijke vruchtbaarheid is bestudeerd door een aantal onderzoek-groepen (Barros et al, 1978 en 1979; Rogers et al, 1979; Overstreet et al, 1980; Hall, 1981) en is eveneens geëvalueerd op verschillende congressen (Templeton et al, 1980; Zausner Guelman, 1981). De diagnostische waarde van deze test is tot op heden bestudeerd volgens de zogenaamde indirecte methode. Hierbij worden patiënten als verminderd vruchtbaar of onvruchtbaar gediagnosticeerd en worden donoren met bewezen vruchtbaarheid geselecteerd. De test wordt na de selectie bij alle deelnemers toegepast en de uitslag ervan vergeleken, door het aantal positieve en negatieve testen te bestuderen (Barros et al, 1978). Indien er sprake is van een bevruchtingspercentage kunnen ook frequentieverdelingen van populaties

vergeleken worden (Rogers et al, 1979). In de praktijk zijn dergelijke vergelijkingen minder belangrijk dan wordt aangenomen (Wulff, 1980). De resultaten van de controle-groepen zijn immers representatief voor slechts een klein deel van de vruchtbare populatie en zijn niet van bijzonder belang voor de prognose van de vruchtbaarheid van de verminderd vruchtbare of onvruchtbare man. Het aantal studies waarbij vruchtbaarheidstesten zijn bestudeerd in relatie tot de conceptiekans, is helaas beperkt (Smith et al, 1977; Aafjes et al, 1978a en b; Eliasson, 1971).

Het onderzoek in dit hoofdstuk beschreven had de volgende doelstellingen. Ten eerste; bestaan er verschillen in het in vitro bevruchtend vermogen van vruchtbare donoren en verminderd vruchtbare of onvruchtbare patiënten? En ten tweede; is de uitslag van de test een maat voor de prognose van de vruchtbaarheid? Deze laatste vraagstelling is bestudeerd door gegevens te verzamelen betreffende de duur van de onvruchtbaarheid en het ontstaan van spontane zwangerschappen in de geteste patiëntpopulaties.

4.2 Bestudeerde patiënten en donoren.

Het in vitro bevruchtend vermogen werd bestudeerd van 122 verminderd vruchtbare of onvruchtbare mannen van echtparen met een onvervulde kinderwens, welke langer duurde dan 1 jaar. Voorafgaande aan de in vitro bepaling, werden beide partners uitvoerig onderzocht (klinische ziektegeschiedenis en lichamelijk onderzoek), zoals elders is beschreven (Aafjes et al, 1977). Het in vitro bevruchtend vermogen werd, met een tussenperiode van 14 dagen, twee maal getest bij 98 patiënten. De patiëntenpopulatie werd in twee groepen verdeeld; groep A; zonder een aantoonbare afwijking van het voortplantingssysteem van de vrouwelijke partner (n=79). groep B; met een meer of minder ernstige afwijking van het voortplantingssysteem van de vrouwelijke partner (n=43). De meerderheid van deze afwijkingen werd veroorzaakt door een éénzijdige of tweezijdige gedeeltelijke of gehele ondoorlaatbaarheid van de tubae (n=27). Bij elf patiënten werden ovulatie- of menstruatiestoornissen geconstateerd en bij 5 patiënten een insufficiëntie van de luteale fase.

Een klein aantal patiënten van beide groepen (12%) had voorheen wel een nakomeling verwekt bij dezelfde partner, maar had ten tijde van het onderzoek gedurende minstens 1 jaar een onvervulde kinderwens (secundair onvruchtbaar). De gemiddelde duur van de onvruchtbaarheid van groep A was

4.1 jaar (spreiding 1 tot 10 jaar) en van groep B, 4.4 jaar (spreiding 1 tot 10 jaar). De patiënten van groep A werden verder ingedeeld volgens verschillende afwijkingen, die gevonden werden na minstens 2 routine sperma-onderzoeken (tabel 4.1).

Het sperma van 27 van de 43 patiënten van groep B werd beschouwd als normaal (meer dan 40% bewegende zaadcellen, meer dan 40% normale morfologische zaadcellen en meer dan 20×10^6 zaadcellen/ml sperma). Sperma van vruchtbare donoren (1 of meer kinderen verwekt zonder een vruchtbaarheidsprobleem, n=26, groep C) werd minimaal 1 maal getest. De

Tabel 4.1 Klinische gegevens van mannen met verminderde vruchtbaarheid, waarvan bij de vrouwelijke partner geen afwijking van het reproductie-systeem kon worden aangetoond (groep A).

diagnose	aantal patiënten	gemiddeld percentage (spreiding) in vitro bevruchting	aantal patiënten waarvan de zaadcellen meer dan 10% van de eicellen bevruchtten (% van het totaal)
spermaplasma met hoge viscositeit	20	9 (0-28)	6 (30)
aggregatie van zaadcellen	15	4 (0-46)	3 (20)
oligospermie*	30	11 (0-89)	5 (17)
teratospermie**	36	9 (0-89)	16 (44)
asthenospermie⊗	42	4 (0-64)	3 (7)
terato-en asthenospermie	25	6 (0-89)	3 (12)
totale groep	79	9 (0-89)	19 (24)
secundaire onvruchtbaarheid	6	10 (0-46)	1 (17)

* $< 20 \times 10^6$ /ml en $> 2 \times 10^6$ /ml

** $> 60\%$ abnormale zaadcellen

⊗ $< 40\%$ beweeglijke zaadcellen

donoren werden ondervraagd betreffende leeftijd, ziektegeschiedenis en duur van de periode tussen kinderwens en conceptie.

Ejaculaten werden verzameld onder gelijke omstandigheden tussen 16.00 en 18.00 namiddag. Nadat het sperma microscopisch was geobserveerd en een deel van het ejaculaat was ingevroren (5.6) werd het gewassen en gepreïncubeerd gedurende de nacht, zoals beschreven in hoofdstuk 2. Tussen 9.00 en 10.00 uur 's ochtends werden de zaadcellsuspensies geïncubeerd gedurende 140 minuten met naakte hamstereicellen. Na beëindiging van de incubatie werd het percentage beweeglijkheid bepaald (5.2).

Het tijdsschema van deze test heeft de volgende voordelen. Het ejaculaat kan buiten de werkuren van de proefpersoon worden verkregen. Individuele verschillen in capacitatieduur spelen geen rol van betekenis, door de langdurige preïncubatie van de zaadcellen. Tenslotte heeft de overnachtingstest nog het voordeel dat de Pregnyl-injectie niet 's avonds, maar 's middags aan de hamsters kan worden gegeven (2.3).

4.3 Morfologie-bepalingen van de zaadcellen

Sperma-uitstrijkjes werden gefixeerd in ether-alcohol en gekleurd volgens Shorr (1941). De morfologie van minstens 100 zaadcellen werd geclassificeerd als terato (amorfe vorm), lepto (spitse vorm), macro/micro-kop, dubbelkop, dubbelstaart, abnormaal middenstuk of afwijkende staart. De terato-vorm is de meest frequente afwijking. Elke zaadcelkop die afwijkt van de standaard ovaal ronde vorm wordt terato genoemd (1.5). Dit kan bijvoorbeeld veroorzaakt worden door een abnormaal acrosoom of door een asymmetrische verdeling van het chromatine (Freund, 1966). Alleen uitstrijkjes waarop voldoende objectief te beoordelen zaadcellen zichtbaar waren, werden bestudeerd. De waarnemer die de morfologische analyses uitvoerde was niet op de hoogte van de oorsprong van de preparaten en van het doel van de experimenten.

4.4 Frequentieverdelingen van het in vitro bevruchtend vermogen van patiënten en donoren

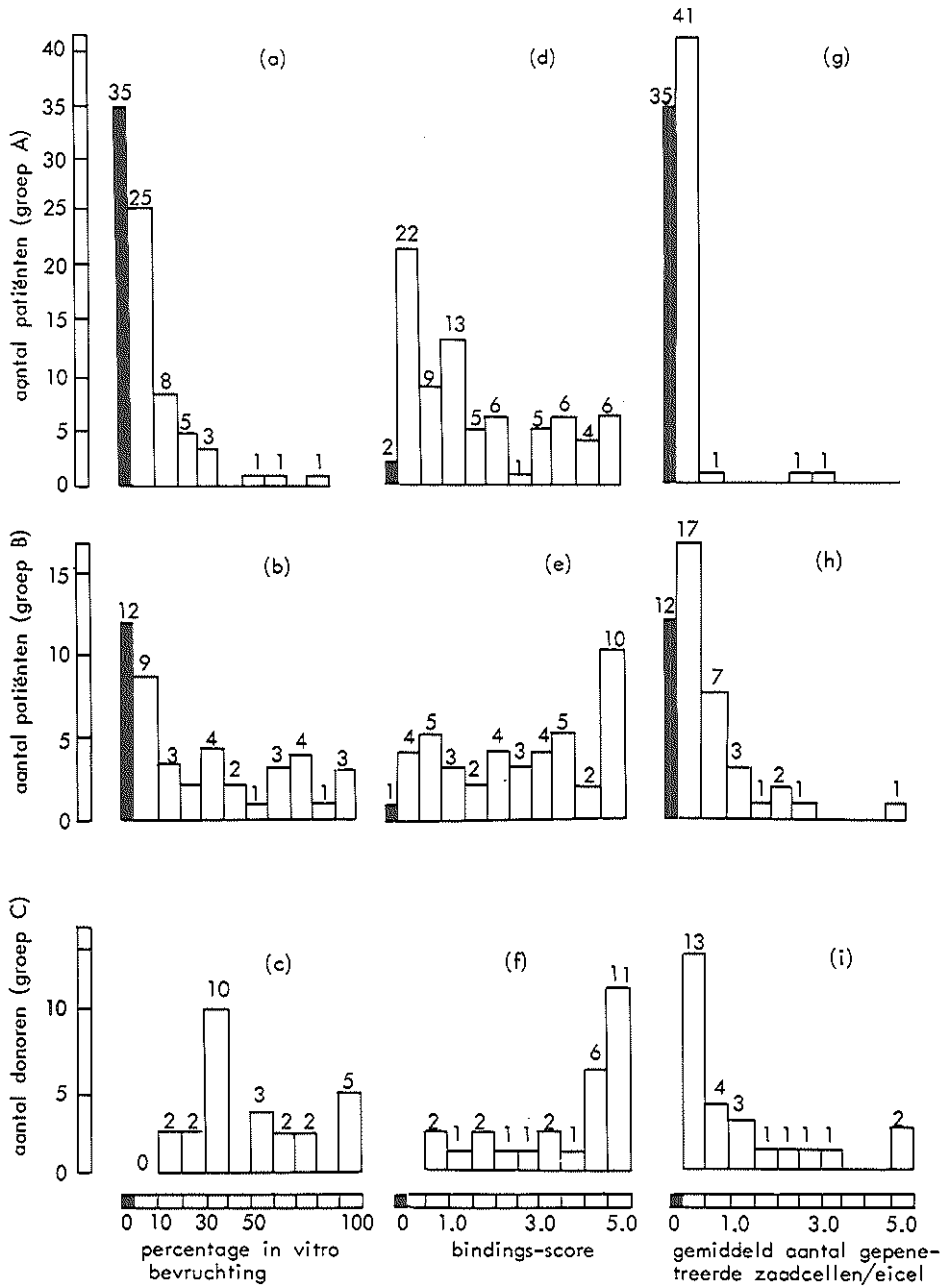
Zaadcelkarakteristieken van groepen A, B en C werden vergeleken door middel van routine sperma-onderzoeken en het in vitro bevruchtend vermogen (tabel 4.2). Het gemiddelde percentage bevruchting van patiënten van

Tabel 4.2 Parameters van *in vitro* bevruchttings -en sperma-onderzoek bij subfertiele en fertiele mannen (gemiddelde en spreiding).

	groep A (mannelijke factor)	groep B (vrouwelijke factor, mogelijk ook mannelijke factor)	groep C (vruchtbaar)
aantal	79	43	26
percentage in vitro bevruchting	9 (0-87)	30 (0-100)	54 (11-100)
bindings score	1.7 (0-5)	2.9 (0-5)	3.8 (0.5-5)
gemiddeld aantal gepenetreerde zaadcellen per eicel	0.2 (0-0.3)	0.6 (0-4.8)	1.1 (0.1-5)
zaadcelconcentratie (x 10 ⁶ /ml)	31 (2-113)	56 (5-270)	62 (10-140)
percentage beweeg- lijkheid	27 (5-80)	34 (1-74)	44 (15-70)
concentratie beweeg- lijke zaadcellen (x 10 ⁶ /ml)	9 (0.2-41)	19 (1-110)	28 (2-70)

groep A was 9% (spreiding 0-87%). De frequentieverdeling van deze groep patiënten (figuur 4.1a) verschilt aanzienlijk van de frequentieverdeling van de vruchtbare donoren (figuur 4.1c). Het gemiddelde percentage bevruchting van de laatste groep was 54% (spreiding 11-100%). Het laagste bevruchttingspercentage dat in deze groep werd waargenomen was 11%. Indien

Figuur 4.1 Frequentieverdelingen van *in vitro* bevruchttingsbepalingen van (blz. 59) zaadcellen van verminderd vruchtbare of onvruchtbare patiënten en vruchtbare donoren.



testen met een bevruchtingspercentage hoger dan 10% arbitrair worden beschouwd als zijnde positief, dan heeft 75% van de mannen met een vruchtbaarheidsprobleem (groep A) een negatieve uitslag. Er moet met nadruk op gewezen worden dat slechts 19 van de 79 patiënten van deze groep een in vitro bevruchtend vermogen hadden dat vergelijkbaar was met dat van vruchtbare donoren (figuur 4.1c).

De frequentieverdeling van patiënten, bij wie de vrouwelijke partner een afwijking van het reproductie-systeem had, is intermediair tussen bovenstaande frequentieverdelingen (figuur 4.1b). Van 43 patiënten hadden er 23 (54%) een positieve test. Van een totaal van 122 patiënten (groep A en B) hadden 46 (38%) een bevruchtingspercentage van 0%.

Bovenstaande resultaten komen in grote lijnen overeen met waarnemingen gedaan door Rogers et al (1979) bij een groep van 40 patiënten en 21 donoren. Het gemiddelde percentage bevruchting van de vruchtbare groep die door deze onderzoekers werd bestudeerd, was 56% (spreiding 14-100%). De overeenkomsten met de hier gepresenteerde resultaten zijn opvallend. Op 1 belangrijk punt echter wijken de resultaten van Rogers et al af van het hier gepresenteerde onderzoek. In een groep van 18 patiënten, waarin de onvruchtbaarheid vermoedelijk alleen veroorzaakt werd door de mannelijke partner (overeenkomend met groep A), was het bevruchtingspercentage altijd lager dan het laagste percentage van de vruchtbare controle-groep. Het is uitermate moeilijk om in een marge van 0-10% bevruchting te voorspellen welke patiënten wel en welke geen kans op nakomelingsschap hebben.

Hall (1981) bestudeerde het in vitro bevruchtend vermogen bij 22 vruchtbare donoren en 43 minder vruchtbare patiënten. Het laagste bevruchtingspercentage van de donorgroep was 20%. De meerderheid van de patiënten (56%) bevruchtten de eicellen in dezelfde mate, als de vruchtbare donoren. Vergelijking tussen de hier gepresenteerde gegevens en de gegevens van Hall zijn niet mogelijk, omdat deze de klinische gegevens van beide partners niet vermeldt.

Barros et al (1978, 1979) interpreteren de interactie tussen hamstereicel en humane zaadcel op een andere manier. Zij evalueren de test niet op basis van een bevruchtingspercentage, zodat vergelijking van bovenstaande gegevens met deze resultaten vrijwel onmogelijk is (2.4). Bovendien worden de zaadcelconcentraties in vitro en de incubatietijden door deze onderzoekers gevarieerd, hetgeen vergelijking van resultaten extra bemoeilijkt.

Overstreet en medewerkers (1980) evalueerden in twee test-situaties, de interactie tussen de zaadcel en de eicel met behulp van dezelfde

ejaculaten, namelijk penetratie van de menselijke eischil (eicellen opgeslagen in hoge zoutconcentraties) en interactie met de zona-vrije hamstereicel. De zaadcellen van 1 van de 8 vruchtbare donoren waren wel in staat de humane eischil te penetreren, maar slechts 1 van de 44 hamstereicellen. De zaadcellen van de andere 7 donoren penetreerden de hamstereicellen wel in hoge mate. Uit deze gegevens blijkt dat het relatief hoge in vitro bevruchtende vermogen van vruchtbare mannen, zoals dat tot op heden (Rogers et al, 1979; dit onderzoek) is gevonden, een beperkte waarde heeft zolang niet meer vruchtbare donoren worden getest.

Uit de gegevens van Overstreet et al (1980) blijkt in overeenstemming met de hierboven beschreven resultaten, dat het mogelijk is dat mannen met een verminderde vruchtbaarheid een positieve hamstereiceltest hebben. Deze auteurs menen echter, ons inziens onterecht, dat dit vals-positieve testuitslagen zijn. Het is immers heel goed denkbaar, dat de geteste patiënten in de toekomst nog spontaan nakomelingschap kunnen verkrijgen. Proefondervindelijk is aangetoond dat, afhankelijk van de duur van de kinderwens, tussen de 3 en 25% van de mannen met verminderde vruchtbaarheid, die de polikliniek in het Dijkzigt ziekenhuis bezochten, zonder verdere behandeling een zwangerschap induceren (Aafjes et al, 1978). Bij deze gegevens werd mede rekening gehouden met azoösperme en extreem oligosperme patiënten. Deze laatste groepen kunnen niet met de hamstereiceltest onderzocht worden, zodat voor de in het onderhavige onderzoek bestudeerde populaties (groepen A en B) een zwangerschapspercentage tussen de 10-40% verwacht kan worden.

Frequentieverdelingen van de bindings-scores en van het gemiddelde aantal gepenetreerde zaadcellen per eicel voor patiënten en donoren zijn gegeven in figuur 4.1 d t/m i. In tegenstelling tot de bevruchttingspercentages is het duidelijk dat de mate van binding van de zaadcellen aan het eiceloppervlak geen betekenis heeft voor de diagnostiek, daar de overeenkomsten tussen de drie bestudeerde populaties te groot zijn.

4.5 Relatie tussen abnormaal semen, onbegrepen onvruchtbaarheid en de hamstereiceltest

Het gemiddeld percentage in vitro bevruchting van 30 oligosperme patiënten (groep A) was 11%, hetgeen niet verschilt van het gemiddelde percentage in vitro bevruchting (9%) van de oligosperme en normosperme patiënten samen (tabel 4.1). Dit is in overeenstemming met de eerder

getrokken conclusie, dat oligospermie op zich niet een belangrijke oorzaak van verminderde vruchtbaarheid is (Eliasson, 1971; Smith et al, 1977; Zukerman, 1977; MacLeod, 1971; MacLeod en Wang, 1979).

Het merendeel van de patiënten van groep A had asthenospermie en/of teratospermie. Hoewel een duidelijke scheiding van beide afwijkingen in twee afzonderlijke groepen moeilijk is, werd wel gevonden dat patiënten, waarbij onder andere teratospermie werd gevonden een hogere kans hebben op een positieve test, dan patiënten waarbij onder andere asthenospermie werd gevonden (respectievelijk 16 van de 32 en 3 van de 42, tabel 4.1). De klinische relevantie van deze verschillen is niet duidelijk. Zaadcellen van mannen met secundaire onvruchtbaarheid hadden een in vitro bevruchtend vermogen, dat vergelijkbaar was met dat van mannen met primaire infertiliteit (tabel 4.1).

Zaadcelkarakteristieken, zoals motiliteit, morfologie en concentratie, werden als normaal beschouwd bij 26 van de 43 patiënten van groep B (waarin overwegend vrouwelijke factoren de verminderde vruchtbaarheid bepalen). Volgens criteria die ook werden gehanteerd voor groep A, hadden de overige patiënten van deze groep abnormaal sperma. Uit tabel 4.3 blijkt dat zaadcellen van patiënten met normale sperma-parameters significant meer eicellen bevruchten dan die van patiënten met abnormaal sperma. Van 26 patiënten met "normaal" sperma

Tabel 4.3 Klinische gegevens van mannelijke patiënten, waarvan bij de vrouwelijke partner een afwijking van het reproductie-systeem kon worden aangetoond (groep B).

	aantal patiënten	gemiddeld percentage (spreiding) in vitro bevruchting	aantal testen hoger dan 10% (% van het to- taal)
abnormaal sperma **	17	18 (0-81) *	7 (41%)
normaal sperma	26	41 (0-100)	16 (62%)
totaal	43	30 (0-100)	23 (54%)

* variantie-analyse; $F=4.95$, df 1 en 39, $p<0.05$.

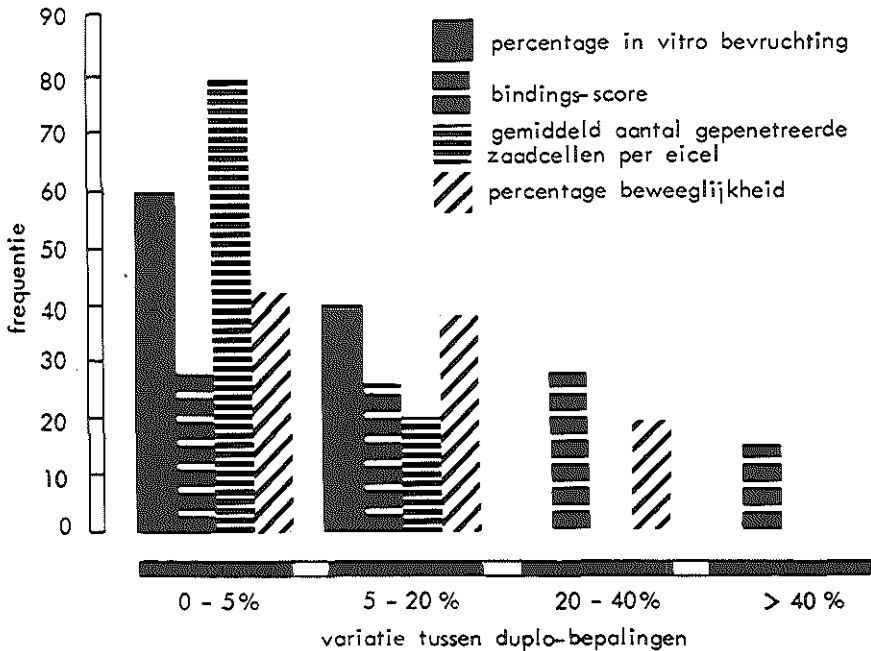
** zie criteria tabel 4.1

hadden 10 patiënten echter een negatieve test. Dat betekent dat de verminderde vruchtbaarheid op het niveau van de bevruchting kan worden gelokaliseerd. Dit is in overeenstemming met resultaten van Overstreet et al (1980), die aantoonde dat bij 3 van de 8 patiënten met normale sperma-parameters, de zaadcellen toch een verminderd in vitro bevruchtend vermogen hadden. De hamstereiceltest kan dus worden gebruikt als hulpmiddel bij de diagnose van idiopatische of onbegrepen onvruchtbaarheid.

4.6 Reproduceerbaarheid van de hamstereiceltest

De reproduceerbaarheid van het testsysteem werd onderzocht door het in vitro bevruchtend vermogen van minstens twee ejaculaten van 98

Figuur 4.2 Reproduceerbaarheid van verschillende in vitro bevruchtungsparameters en het percentage beweeglijkheid bepaald voor een groep van 98 patiënten.



Tabel 4.4 *Klinische en experimentele gegevens van patiënten met verminderde vruchtbaarheid (groepen A en B), die een zwangerschap veroorzaakten, nadat de hamstereiceltest was uitgevoerd.*

groep	patiënt nummer	opmerkingen	sperma-onderzoek			infertili- teitsduur (jaren)	periode tus- sen test en zwangerschap (maanden)	percentage in vitro bevruchting **
			zaadcel- concentratie (x10 ⁶ /ml)	percentage beweeglijkheid	percentage normale zaadcellen			
A	8	asthenospermie teratospermie	22	30	38	2	5	0 % (0/35) 0 % (0/25)
A	24	teratospermie polyspermie	45	20	13	2	3	9 % (3/32) 23 % (9/39)
A	43	asthenospermie	31	35	onbekend	10	8	3 % (1/40)
A	47*	oligo/astheno hoge viscositeit	7	15	15	3	7	0 % (0/31) 0 % (0/29)
A	103	hypogonadisme	26	50	42	2	2	20 % (9/45) 4 % (1/27)
A	108	astheno/lepto/ terato/oligo	8	5	1	2	4	0 % (0/33)
B	10	occlusie linker túba - terato	65	40	20	3	7	38 % (8/24)
B	11	oligomenorrhoea - astheno/terato	23	10	11	4	1	11 % (3/27)
B	14*	oligomenorrhoea astheno/terato	80	15	14	10	5	4 % (2/44)
B	19	oligomenorrhoea linker varicocèle	15	35	13	5	6	10 % (3/39)
B	33	primaire amenorrhoea oligo/astheno/terato	12	35	10	3	1	33 % (12/36)

*secundaire onvruchtbaarheid.

** aantal bevruchte eicellen / totaal aantal eicellen

patiënten te bestuderen. De resultaten van deze studies zijn weergegeven in figuur 4.2. Bij 60% van de patiënten kon het bevruchtingspercentage uitermate nauwkeurig vastgesteld worden (verschillen kleiner dan 5%). De variatie van het bevruchtingspercentage van deze patiënten was nooit groter dan 20%. Een vergelijkbare reproduceerbaarheid, werd ook gevonden voor het gemiddelde aantal bevruchtende zaadcellen per eicel. Beide parameters zijn daarom goed bruikbaar voor de evaluatie van het in vitro bevruchtend vermogen. Ter vergelijking is in figuur 4.2 de lagere reproduceerbaarheid van de bindings-score en van het percentage beweeglijkheid uitgezet.

4.7 De diagnostische waarde van de hamstereiceltest in een prognostische studie

De periode waarin het in vitro bevruchtend vermogen van de patiënten werd bestudeerd duurde 15 maanden. Twee maanden nadat de laatste patiënt was onderzocht werd nagegaan welke patiënten een zwangerschap hadden geïnduceerd. Elf graviditeiten kwamen voor in de totale patiëntpopulatie. Zes zwangerschappen werden gerapporteerd door patiënten van groep A. Het zwangerschapspercentage is relatief laag (9%) ten opzichte van het verwachte uiteindelijke percentage (10-44%, zie 4.4). Daarom moet er met nadruk op worden gewezen dat de resultaten hieronder beschreven, een voorlopig karakter hebben.

Klinische gegevens en factoren betreffende de in vitro bevruchting van de alsnog vruchtbaar gebleken patiënten zijn gegeven in tabel 4.4. Sommige van deze patiënten hadden een positieve hamstereiceltest, maar 4 patiënten van groep A hadden, ondanks de later optredende in vivo bevruchting, een negatieve hamstereiceltest. Drie van de 4 patiënten hadden een bevruchtingspercentage van 0%. Het is opmerkelijk dat deze vals-negatieve uitslagen alleen voorkwamen bij patiënten met asthenospermie. Uit deze gegevens is duidelijk dat een negatieve hamstereiceltest geen absolute indicatie hoeft te zijn voor onvruchtbaarheid. Wel bevestigt de negatieve test de aanwezigheid van een defect. Het laatste kan echter eenvoudiger door middel van een routine sperma-onderzoek worden vastgesteld. De mogelijkheid van een buitenechtelijke oorzaak van een zwangerschap met een vals-negatieve hamstereiceltest, is gering. Van een vergelijkbare groep van 933 patiënten, die in een periode van 6 jaar de polikliniek in het Dijkzigt ziekenhuis bezochten, hadden 157 patiënten azoospermie (Aafjes et al,

4.8 De duur van de onvruchtbaarheid en de prognostische waarde van de hamstereiceltest.

De duur van de kinderwens is een belangrijk gegeven voor de evaluatie van de prognose van de patiënt (Southam, 1960; Aafjes et al, 1978). Door Aafjes en medewerkers (1978) werd aangetoond dat patiënten met een kortdurende onvruchtbaarheid (korter dan 2 jaar) nog 23% kans op een nakomelingschap hebben. Dit verschilde significant van patiënten met een infertiliteitsduur van 6 jaar of langer (kans op nakomelingschap 2%). Om deze reden werden in vitro bevruchtingsparameters en verschillende factoren van het routine sperma-onderzoek, zoals concentratie, beweeglijkheid, percentage normale zaadcellen etc. gecorreleerd met de duur van de kinderwens. Het in vitro bevruchtingspercentage van patiënten was in tegenstelling tot de andere parameters significant negatief gecorreleerd met de duur van de kinderwens (figuur 4.3, $r=-0.2$, $p<0.05$). Van de 104 patiënten hadden er 16 een kinderwens, die langer dan 6 jaar duurde. Positieve testen werden bij deze patiënten niet gevonden.

Uit deze gegevens kan worden geconcludeerd dat een positieve hamstereiceltest gecorreleerd is met een nog slechts kort durende kinderwens, hetgeen van waarde kan zijn bij de evaluatie van de patiënt met verminderde vruchtbaarheid.

HOOFDSTUK 5

DE HAMSTEREICELTEST EN ANDERE SEMENFACTOREN

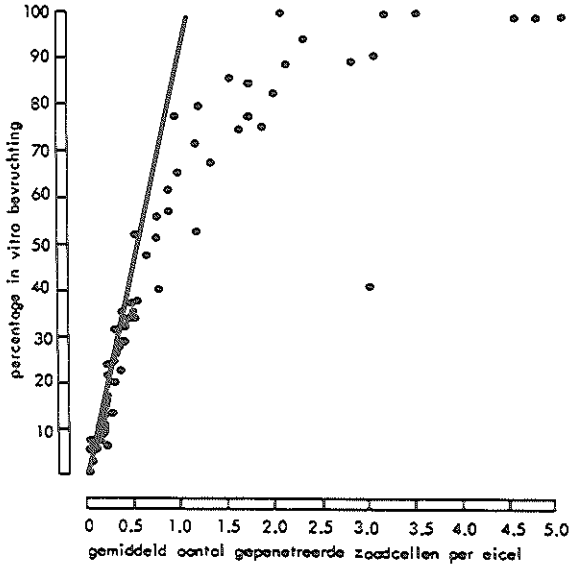
5.1 Onderlinge relaties tussen bevruchtingsparameters

Binor en medewerkers (1980) hebben aangetoond, dat het gemiddelde aantal gepenetreerde zaadcellen per eicel (2.4), positief gecorreleerd is met de geïncubeerde concentratie bewegende zaadcellen. Het aantal bewegende zaadcellen dat werd geïncubeerd in de hier beschreven experimenten werd echter constant gehouden (2.6). De mate van polyspermie is in deze situatie onafhankelijk van de concentratie van de bewegende zaadcellen. In figuur 5.1 is het gemiddelde aantal gepenetreerde zaadcellen per eicel van 144 verschillende ejaculaten, uitgezet tegen het bevruchtingspercentage. Er werd een hoge positieve correlatie gevonden ($r=0.99$, $p < 0.0001$). De in figuur 5.1 getrokken lijn verbindt data van zaadcellsuspensies, waarvan het gemiddelde aantal gepenetreerde zaadcellen per eicel gelijk is aan 1 (monospermie). Polyspermie wordt dus vrijwel alleen waargenomen bij hoge bevruchtingspercentages. Uit deze en uit waarnemingen van Binor en medewerkers kan worden geconcludeerd, dat de mate van polyspermie afhankelijk is van de concentratie bewegende zaadcellen in vitro en van het bevruchtingspercentage.

De mate van binding is eveneens positief gecorreleerd met het bevruchtingspercentage ($r=0.72$, $n=148$, figuur 5.2). Over het algemeen is de mate van hechting van de zaadcellen aan de eicellen bepalend voor het later geconstateerde bevruchtingspercentage. Toch werd er een grote variatie (figuur 5.2) gevonden tussen zaadcellsuspensies, met betrekking tot het aantal gehechte zaadcellen bij vergelijkbare bevruchtingspercentages.

5.2 De duur van de beweeglijkheid in vitro en de in vitro bevruchting

Van 46 zaadcellsuspensies van patiënten werd het percentage in vitro overleving bepaald door dit te betrekken op de concentratie van bewegende zaadcellen aan het begin van de incubatie. Een lage significante correlatie tussen de in vitro overleving en de in vitro bevruchting kon worden aangetoond ($r=0.20$, $p < 0.05$). In 3 van de 84 bestudeerde zaadcellsuspensies werden geen progressief beweeglijke zaadcellen meer



Figuur 5.1

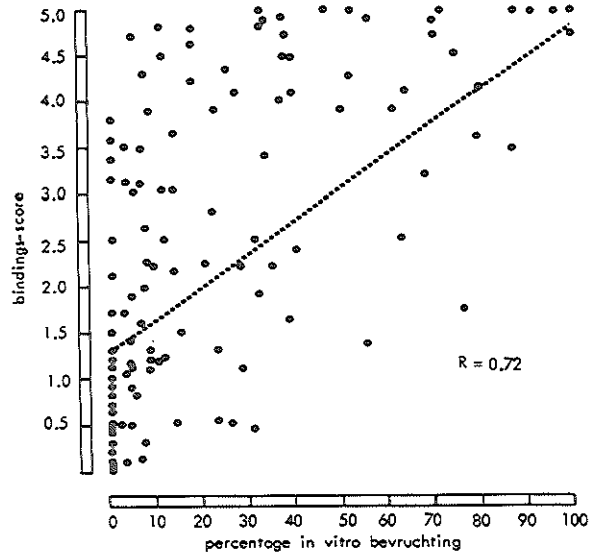
Relatie tussen het percentage in vitro bevruchting en de hoeveelheid gepenetreerde zaadcellen.

De rechte lijn verbindt data van zaadcellsuspensies waarvan de eicellen gemiddeld éénmaal bevrucht zijn.

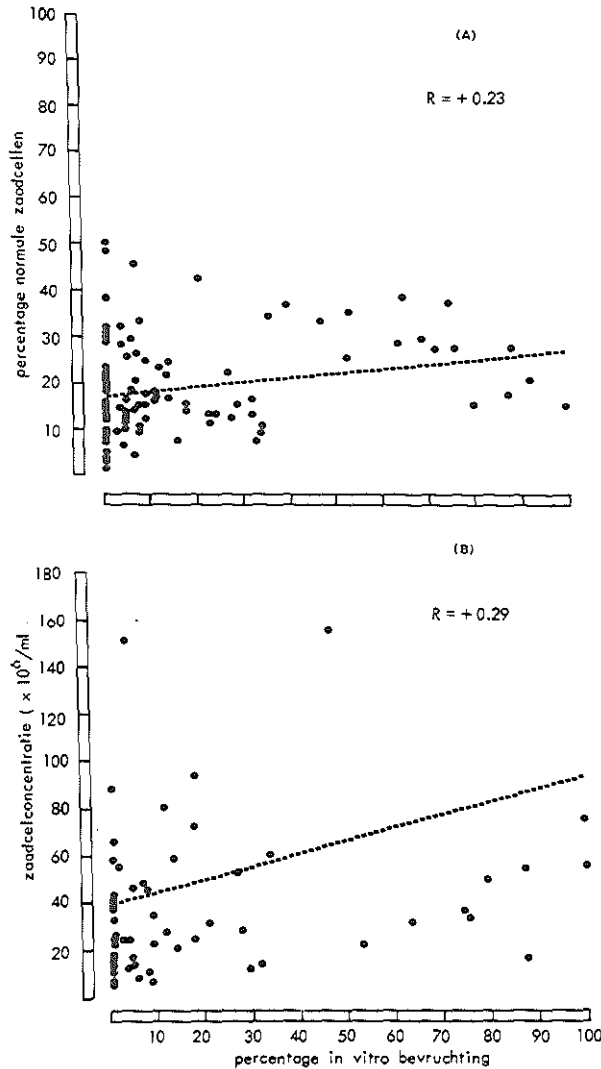
Figuur 5.2

Relatie tussen de mate van zaadcelbinding en het percentage in vitro bevruchting.

De stippellijn is de best passende rechte bij deze verzameling punten (zie ook figuren 5.3 en 5.4).



Figuur 5.3 (a) Relatie tussen het percentage in vitro bevruchting en het percentage normale zaadcellen in de ejaculaten van patiënten.
 (b) Relatie tussen het percentage in vitro bevruchting en de zaadcelconcentratie (MBF) in de ejaculaten van patiënten.



waargenomen aan het begin van de incubatie met de eicellen. Toch kon bij twee van deze zaadcelluspensies bevruchting worden geconstateerd (9 en 33% bevruchting, respectievelijk 15 en 20% eosine-positief). Uit deze gegevens kan worden geconcludeerd dat de duur van de motiliteit in vitro van zaadcellen en het in vitro bevruchtend vermogen twee verschillende eigenschappen van de zaadcellen kwantificeren.

5.3 Meervoudige belichtingsfotografie, zaadcelmorfologie en in vitro bevruchting

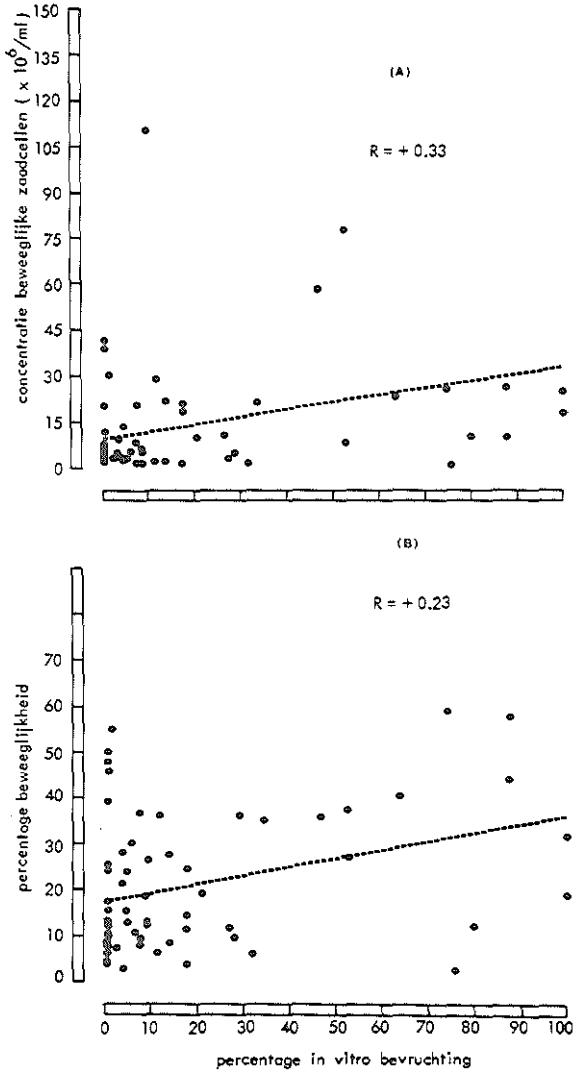
Een weliswaar lage maar positief significante correlatie kon worden aangetoond tussen het percentage morfologisch normale zaadcellen in het ejaculaat en het percentage in vitro bevruchte eicellen ($r=0.23$, $p=0.02$, $n=109$, figuur 5.3a). Dergelijke lage maar significante correlaties werden ook gevonden tussen het percentage normale zaadcellen enerzijds en de bindings-score ($r=0.25$, $p < 0.009$, $n=106$), respectievelijk het gemiddelde aantal gepenetreerde zaadcellen per eicel anderzijds ($r=0.22$, $p=0.03$, $n=107$). Het percentage normale zaadcellen was ook significant gecorreleerd met het percentage beweeglijkheid ($r=0.23$, $p=0.01$, $n=109$) en de concentratie van beweeglijke zaadcellen ($r=0.26$, $p=0.006$, $n=109$). Dergelijke relaties zijn ook door anderen beschreven (Crabbe, 1977; Makler en Itzkovitz et al, 1979).

Zaadcellen van ejaculaten van 63 patiënten werden zowel bestudeerd door middel van de hamstereiceltest als door middel van MBF. Een lage significante correlatie werd gevonden tussen het bevruchtingspercentage en de zaadcelconcentratie in het ejaculaat ($r=0.29$, $p < 0.02$, figuur 5.3b). Een middelmatige significante correlatie werd aangetoond tussen het bevruchtingspercentage en de concentratie beweeglijke zaadcellen ($r=0.33$, $p < 0.009$, figuur 5.4a). Het percentage beweeglijkheid was niet significant gecorreleerd met het percentage bevruchting ($r=0.22$, $p < 0.08$, figuur 5.4b).

Deze resultaten zijn niet in overeenstemming met gegevens van andere onderzoekers, die geen significante correlaties tussen semen factoren en het bevruchtingspercentage hadden gevonden (Rogers et al, 1979; Zausner Guelman, 1981). Hall (1981) daarentegen toonde wel significante correlaties aan tussen de zaadcelconcentratie en het percentage beweeglijkheid enerzijds en het bevruchtingspercentage anderzijds.

Er moet nogmaals met nadruk op worden gewezen, dat de concentratie van bewegende zaadcellen in de incubatievloeistof rond de hamstereicellen in onze proefopstelling constant is. De hier aangetoonde correlatie

Figuur 5.4 (a) Relatie tussen de concentratie beweeglijke zaadcellen (MBF) in de ejaculaten van patiënten en de in vitro bevruchting.
 (b) Relatie tussen het percentage beweeglijkheid (MBF) in de ejaculaten van patiënten en de in vitro bevruchting.

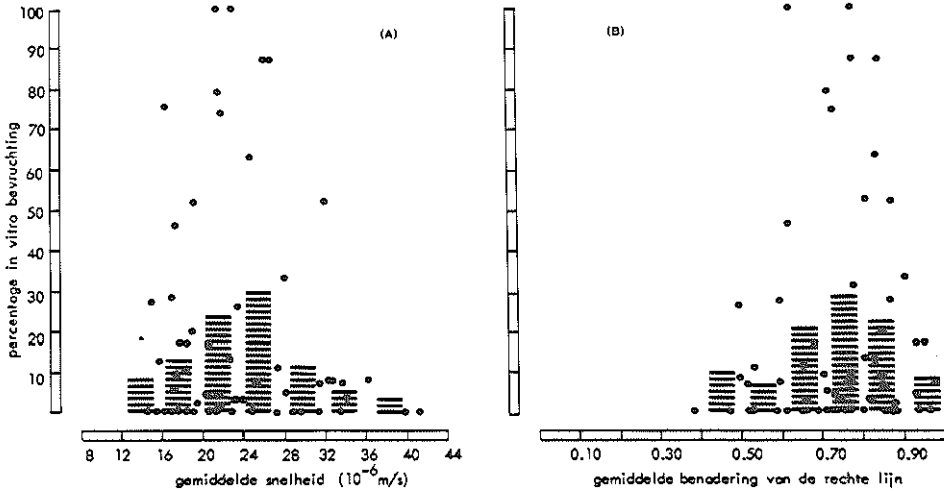


tussen de concentratie van bewegende zaadcellen in het niet gewassen ejaculaat en het in vitro bevruchtend vermogen geeft wellicht aan dat in dergelijke ejaculaten, de kans op bevruchting van de eicel hoger is. Door anderen werd reeds aangetoond dat de concentratie van bewegende zaadcellen in het ejaculaat een belangrijke factor is (in vergelijking met andere semen parameters) voor de evaluatie van de vruchtbaarheid (Smith et al, 1977; Marmar et al, 1979).

De gemiddelde snelheid en de gemiddelde benadering van een rechte lijn bij de voortbeweging (3.3) zijn niet significant gecorreleerd met het in vitro bevruchttingspercentage. Uit de figuren 5.5a en b blijkt dat

Figuur 5.5 (a) Relatie tussen de gemiddelde snelheid van zaadcellen (MBF) in de ejaculaten van patiënten en de in vitro bevruchting. Individuele data en gemiddelden zijn aangegeven.

(b) Relatie tussen de gemiddelde benadering van de rechte lijn (MBF) van de zaadcellen en de in vitro bevruchting.



zaadcellen met een middelmatig hoge gemiddelde snelheid, gemiddeld een hoger in vitro bevruchtend vermogen hebben dan zaadcellen met gemiddeld extreem lage dan wel hoge snelheid. Dit is merkwaardig daar men (Harvey, 1960; Makler et al, 1979; Milligan et al, 1980) geneigd is om aan te nemen dat een hoge snelheid een grotere kans op bevruchting geeft. Over de oorzaak van bovengenoemd fenomeen kan slechts gespeculeerd worden. Men

zou kunnen veronderstellen dat zaadcellen die zich met een hoge snelheid voortbewegen eerder hun beweeglijkheid verliezen, dan zaadcellen die zich met een matige snelheid voortbewegen. Uit andere kortdurende experimenten bleek echter dat een vergelijkbare relatie tussen snelheid en in vitro bevruchting ook kan worden waargenomen, indien de zaadcellen slechts korte tijd werden geïncubeerd (Weeda et al, 1981). Het bevruchtingspercentage van de zaadcellen met gemiddeld hoge snelheid was weliswaar laag, maar de hechting van de zaadcellen aan de eicel "normaal". Het is noodzakelijk dit fenomeen nader te bestuderen, omdat uit de praktijk niet duidelijk is welke snelheid geassocieerd is met verminderde vruchtbaarheid.

De gemiddelde snelheid van de zaadcellen van de hier bestudeerde groep patiënten is vrijwel onafhankelijk van het percentage beweeglijkheid ($r=0.16$, $p<0.22$), de zaadcelconcentratie ($r=-0.06$) en de concentratie van de bewegende zaadcellen in het ejaculaat ($r=0.04$). Dit toont aan dat de gemiddelde snelheid van zaadcellen een onafhankelijke beweeglijkheidsvariabele is, hetgeen in overeenstemming is met eerder gedane uitspraken (Makler en Itzkovitz et al, 1979; Milligan et al, 1980).

Daar parameters van de MBF vrijwel niet gecorreleerd zijn met de in vitro bevruchting, kan gesteld worden dat de vruchtbaarheidspotentie routine-matig door gebruikmaking van beide technieken naast elkaar, bestudeerd kan worden.

5.4 Effecten van homolog spermplasma op de in vitro bevruchting

Spermplasma is een gecompliceerde transportvloeistof, die, mede doordat zij is samengesteld uit vloeistoffen afkomstig van verschillende organen, een wisselende fysische en chemische samenstelling heeft (hoofdstuk 7). De gevolgen van een deficiëntie van het spermplasma op de zaadcellen en de effecten daarvan op de vruchtbaarheid, zijn niet duidelijk. De effecten van vervanging van "afwijkend" spermplasma van patiënten door spermplasma van vruchtbare donoren op de beweeglijkheid en het in vitro bevruchtend vermogen, worden besproken in hoofdstuk 7.

Het is gebruikelijk om het ejaculaat voordat het in vitro wordt geïncubeerd, spontaan te laten vervloeien (2.2). Dit wordt bewerkstelligd door het sperma, gedurende 20 tot 60 minuten bij 37°C of bij kamertemperatuur te plaatsen. Ook bij de in vitro bevruchting van

Tabel 5.1 Effecten van het opvangen van ejaculaat in medium op het in vitro bevruchtend vermogen van de zaadcellen van patiënten met abnormaal spermiasma.

aantal patiënten	belangrijkste abnormaliteit	gemiddeld percentage in vitro bevruchting			aantal tweede testen dat 20% hoger was dan de eerste test	gemiddeld percentage beweeglijkheid	
		eerste standaard test	tweede standaard test	tweede test; ejaculaat in medium opgevangen		eerste test	tweede test
16	teratospermie en/of asthenspermie	9	9		0/16	23	21
10		7		9	0/10	20	17
13	coagulaat, vertraagde liquefactie, hyperspermie	23	23		0/13	34	35
10		11		23*	1/10	32	23
11	aggregatie	8	7		0/11	27	25
8		11		19*	2/8	25	26
6	hoog visceus spermiasma	18	16		0/6	18	15
12		13		36*	5/12	16	30

* student t-test: $0.025 < p < 0.05$

⊙ student t-test: $0.0005 < p < 0.001$

menselijke eicellen wordt deze procedure toegepast (Stephoe en Edwards, 1978; Lopata et al, 1978; Trounson et al, 1980). De situatie die dan ontstaat vertoont weinig of geen overeenkomsten met de in vivo processen. Het vaginale milieu heeft een schadelijke invloed op de zaadcellen. Immobilisatie van zaadcellen in de vagina vindt reeds na 1 of 2 uur plaats (Hafez, 1980). Het is dus belangrijk dat zaadcellen vanuit het in de vagina gedeponeerde spermplasma, zo snel mogelijk in een gunstiger omgeving terecht komen. Na inseminatie kunnen zaadcellen al na enige minuten in de cervix worden waargenomen (Sobrero en MacLeod, 1962; Hafez, 1980). In het kader van deze gegevens en gezien de heterogene samenstelling van spermplasma werd onderstaand experiment uitgevoerd bij 40 proef-patiënten en 46 controle-patiënten.

Het in vitro bevruchtend vermogen van de controle-patiënten werd aan de hand van twee ejaculaten vastgesteld. Vers sperma werd bewerkt zoals voorheen beschreven (2.2), met dien verstande dat er nauwkeurig op werd toegezien dat het sperma gedurende 1 uur in een omgeving van 37°C werd geplaatst, alvorens het werd gewassen en verder bewerkt. Het eerste ejaculaat van de proef-patiënten werd overeenkomstig deze procedure bestudeerd. Het tweede ejaculaat daarentegen werd onder andere omstandigheden verkregen. De patiënten werden geïnstrueerd om het sperma op te vangen in een steriele plastic beker, gevuld met 50 ml TMPA-medium. Dit werd gedaan om na ejaculatie blootstelling van zaadcellen aan spermplasma te minimaliseren. De medium-sperma mengsels werden zo snel mogelijk na de ejaculatie gefiltreerd door een laag laboratorium-tissues (Kleenex) en gedurende 5 minuten bij 300g gecentrifugeerd. De pellets werden in medium opgelost en wederom gecentrifugeerd. De zaadcellen werden in vers medium (2.2) opgelost en op dezelfde wijze geïncubeerd als de bovenbeschreven zaadcellsuspensies.

De resultaten van dit experiment zijn beschreven in tabel 5.1. Verschillen tussen de standaard testen van de controle-patiënten werden vergeleken met verschillen tussen de standaard test en de test waarbij ejaculaat in medium werd opgevangen bij de proef-patiënten. Het in vitro bevruchtend vermogen van de zaadcellen van de controle-patiënten varieerde nooit meer dan 20%. Dit komt overeen met eerder vermelde resultaten (4.6). Bij 8 van de 40 proef-patiënten nam het bevruchtingspercentage daarentegen meer dan 20% toe onder invloed van de onmiddellijke verdunning van het sperma met medium. In tabel 5.1 zijn de patiënten ingedeeld volgens wel of niet voorkomende afwijkingen van het spermplasma. Het sperma van de 8 patiënten, waarbij een remmende werking van het homologe spermplasma kon worden aangetoond, had normale zaadcelkarakteristieken.

Met name kon er een remmend effect op de in vitro bevruchting worden aangetoond bij sperma met een hoge viscositeit. In deze groep nam het in vitro bevruchtend vermogen na ejaculatie in medium in 5 van de 12 gevallen toe (tabel 5.1). Het gemiddelde percentage beweeglijkheid van deze groep nam weliswaar toe van gemiddeld 16% tot gemiddeld 30%, maar dit was geen significant verschil.

Ook bij 3 andere patiënten kon worden waargenomen, dat langdurige blootstelling aan spermaplasma een remmende invloed had op het in vitro bevruchtend vermogen. Bij deze patiënten werd een vertraagde liquefactie van het spermaplasma of aggregatie van zaadcellen waargenomen. De aggregatie van zaadcellen werd mogelijk veroorzaakt door factoren aanwezig in het spermaplasma. Shulman en medewerkers (1978) vonden dat zaadcellen van enkele patiënten, die enige malen met een medium werden gewassen, na inseminatie konden bevruchten. De reden waarom men tot deze therapie besloot was de vaststelling van immunologische onvruchtbaarheid bij deze patiënten. Bekend is dat zogenaamde immunoglobulinen of autoagglutininen aanwezig op de zaadcellen agglutinatie of immobilisatie van de zaadcellen kunnen veroorzaken (5.5). Verschillende methoden zijn ontwikkeld om de immunologisch veroorzaakte agglutinatie van donor-zaadcellen onder invloed van patiënten-serum of-spermaplasma vast te stellen (Menge, 1977; Hellema, 1978).

Gezien de veronderstelde mogelijkheid van een immunologisch effect van in spermaplasma aanwezige stoffen, is het noodzakelijk om enige kanttekeningen te plaatsen bij bovenstaande experimenten. Noch door het eigen onderzoek, noch door het onderzoek van Shulman en medewerkers (1978) kon worden aangetoond dat, door te wassen met medium, eventuele antilichamen aanwezig op de zaadcellen verwijderd of veranderd worden. Een ander fenomeen speelt daarbij ook nog een mogelijke rol. Niet-immunologische aggregatie van zaadcellen kan ook vaak worden waargenomen bij ontstekingen van de accessoire geslachtsorganen, waarbij de zaadcellen spontaan hechten aan allerlei cellen en substanties, zoals in het spermaplasma aanwezige mycoplasma (Taylor-Robinson en Manchee, 1967; Eliasson, 1973). Dit proces wordt pseudo-agglutinatie genoemd.

Bovenstaande experimenten laten de mogelijkheid van een aggregatie veroorzaakt door blootstelling van de zaadcellen aan spermaplasma, open. Een en ander zou kunnen worden opgehelderd door serum of spermaplasma van de hier geteste patiënten verder te onderzoeken op het al of niet voorkomen van autoagglutininen daarin. Ten tijde van het hier beschreven onderzoek werden dergelijke testen echter niet in dit laboratorium uitgevoerd.

5.5 Immunoglobulinen en het in vitro bevruchtend vermogen

Het percentage echtparen, waarbij antilichamen tegen zaadcellen kunnen worden aangetoond in serum of in de reproductie-organen van de man of de vrouw, varieert tussen 10 en 20% (Menge, 1979). Bij dergelijke patiënten kan een slechte doordringbaarheid van het cervixslijm worden gevonden (Fjallbrant, 1968; Manning-Pagon en Behrman, 1971). Uit studies bij konijnen is gebleken dat er een immunologisch mechanisme bestaat dat een rol speelt op het niveau van de interactie tussen zaadcel en eicel (Menge, 1971; Russo en Metz, 1974). Menge en Black (1979) hebben in een recent onderzoek aangetoond dat de eischilvrije hamstereicel een geschikt test-systeem vormt om de immunologische interactie met de menselijke zaadcel te bestuderen. Zij toonden aan dat konijn-antiserum, opgewekt tegen bijvoorbeeld sperma-extracten en testikels en toegevoegd aan de zaadcel/eicel suspensies een remming van de bevruchting teweeg kan brengen. Uit de gegevens van deze onderzoekers blijkt echter dat, als gevolg van immobilisatie en agglutinatie van de zaadcellen door de antisera, zich slechts $1-3 \times 10^5$ vrij bewegende zaadcellen/ml rondom de eicellen bevinden. In de controle-experimenten daarentegen was het aantal bewegende zaadcellen hoger. Veronderstellingen van Menge en Black gebaseerd op deze experimenten, berusten daardoor mede op niet geoorloofde vergelijkingen tussen zaadcelincubaties (2.6).

Zaadcelagglutinatie veroorzaakt een vermindering van de hoeveelheid vrij bewegende zaadcellen. Dit kan indirect leiden tot oligospermie. Het is onwaarschijnlijk dat de oligospermie de primaire reden is voor de onvruchtbaarheid. Mogelijk zijn ook de niet-geagglutineerde zaadcellen "bedekt" met immunoglobulinen. Om deze laatste veronderstelling te toetsen werden zaadcellen geïncubeerd met serum van patiënten met bekende antilichaam-titers. Deze zaadcellsuspensies werden naderhand toegevoegd aan hamstereicellen, waarbij er nauwkeurig op gelet werd, dat er zich een gelijk aantal bewegende zaadcellen rondom de eicellen bevonden.

Een aantal van dergelijke experimenten is weergegeven in tabel 5.2. Er werden twee incubatie-schema's voor deze experimenten gebruikt. Het sperma werd aan een bekende hoeveelheid agglutinatie-positief of-negatief serum toegevoegd (schema 1) of het sperma werd eerst opgezuiverd door gebruikmaking van de opzweem-techniek (schema 2). In het laatste geval werd serum aan de spermaplasmavrije-zaadceloplossing toegevoegd. Uit de gegevens van tabel 5.2 kan geconcludeerd worden dat de bevruchtingscapaciteit van vrij-bewegende zaadcellen blootgesteld aan agglutinatie-positief serum, geremd wordt. Zelfs bij een zeer grote

Tabel 5.2 Effecten van preïncubatie van zaadcellen in medium waaraan immunoglobulinen werden toegevoegd, op de in vitro bevruchting.

donor	gebruikt serum preparaat	tijdsduur (minuten) preïncubatie van ● ongewassen sperma en serum(1) ● opgezwommen zaadcellen en serum (2)	tijdsduur(uren en minuten) preïncubatie en incubatie van de zaadcellsuspensie	in vitro serum verdun- ning	aantal be- vruchte/to- taal aantal eicellen(%)	aantal niet- geagglutineer- de bewegende zaadcellen in vitro($\times 10^6$ /ml)
A	standaard preparaat**	60 (1)	7 uur	1/800	2/22 (9%)	1.3
				1/2000	12/32 (38%)	1.1
				controle*	5/13 (39%)	1.4
B	idem	65 (1)	7 uur 15	1/800	13/13 (100%)	2.1
				1/2000	17/17 (100%)	2.4
				controle*	9/11 (82%)	1.9
C	idem	90 (2)	5 uur 50	1/200	0/25 (0%)	0.8
				1/400	2/14 (14%)	2.0
				controle*	9/23 (39%)	2.5
D	idem	90 (2)	6 uur 10	1/200	1/18 (6%)	3.0
				1/400	3/11 (27%)	3.9
				controle*	4/21 (19%)	2.5
E + F	patiënt A (titer 1:1024)	35 (2)	8 uur 10	1/100	8/18 (44%)	3.5
idem	patiënt B (titer 1:256)	35 (2)	8 uur 30	1/100	19/20 (95%)	4.0
				controle*	22/24 (92%)	4.0

* bevat negatief serum

** agglutinatie-positief vriesdroog preparaat 69/65

verdunding van serum (1/800) kan remming van de interactie tussen zaadcel en eicel worden waargenomen. De mate van het effect is afhankelijk van het geteste serum en van de kwaliteit van het donor-sperma.

Deze waarnemingen komen overeen met recente resultaten van Wolf en medewerkers (1981) en Dor et al (1981), maar zijn niet in overeenstemming met gegevens van anderen (Bronson et al, 1981). Dor et al (1981) konden geen remming van de bevruchting bij serumverdundingen groter dan 1:160 waarnemen. Mogelijk wordt dit veroorzaakt door een te lage concentratie bewegende zaadcellen in vitro.

De remming van het in vitro bevruchtend vermogen onder invloed van antilichamen vormt een geschikt testmodel voor de bestudering van invloeden, die deze remming mogelijk kunnen opheffen.

5.6 Fumarase-activiteit in relatie tot beweeglijkheid en in vitro bevruchting

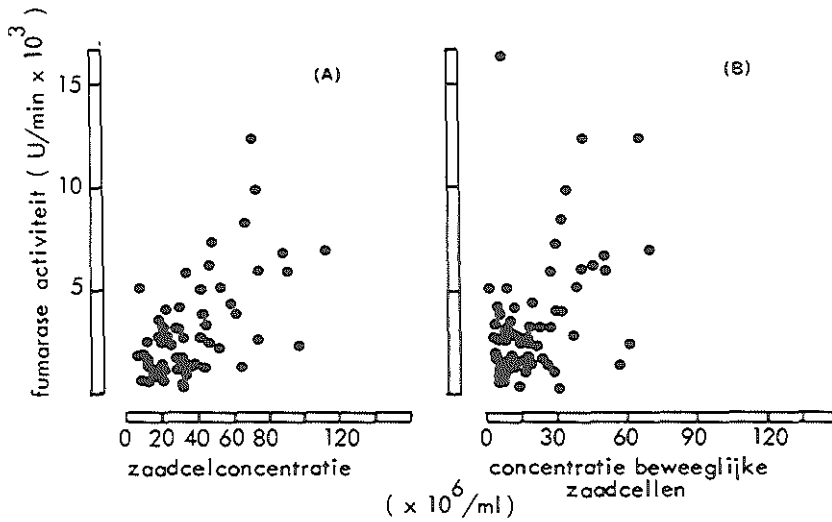
Crabbe (1976,1977) veronderstelde dat het in menselijke ejaculaten aanwezige fumarase en diamine oxidase informatie zouden kunnen geven betreffende de vruchtbaarheid van de donor. Deze veronderstelling werd gebaseerd op hoge correlaties tussen de enzymactiviteiten enerzijds en de zaadcelconcentratie en het percentage beweeglijkheid anderzijds. Daarentegen werd door Neufeld en anderen (1979) aangetoond dat diamine oxidase niet met de beweeglijkheid en de concentratie gecorreleerd was.

Ejaculaten van 69 patiënten werden verdeeld in drie delen. Een deel werd gedurende 30 minuten bij 1600g gecentrifugeerd en het supernatant ingevroren, opdat op een later tijdstip de fumarase activiteit kon worden bepaald. Een tweede deel werd met MBF gefotografeerd. Het derde deel werd gewassen en geïncubeerd ter bestudering van het in vitro bevruchtend vermogen. De fumarase-activiteit in het spermplasma aanwezig werd in duplo met behulp van een Beckman spectrofotometer bepaald, volgens de methode beschreven door Crabbe (1976).

De verschillende parameters van de beweeglijkeheids-analyses waren niet significant gecorreleerd met de fumarase-activiteit. Ook werd geen significante correlatie tussen de verschillende parameters van de bevruchting en de fumarase-activiteit gevonden. Wel bleek de fumarase-activiteit significant positief gecorreleerd te zijn met de zaadcelconcentratie (figuur 5.6a, $r=0.52$, $p<0.001$) en met de concentratie beweeglijke zaadcellen (figuur 5.6b, $r=0.40$, $p<0.001$). Daar de zaadcelconcentratie een minder belangrijke parameter is bij het

sperma-onderzoek, kan geconcludeerd worden, dat het meten van fumarase in spermplasma niet van belang is voor de evaluatie van de vruchtbaarheid van de man. Het is zeer waarschijnlijk dat het fumarase afkomstig is van de zaadcellen zelf, daar werd waargenomen dat in fracties van split-ejaculaten zonder zaadcellen geen of weinig fumarase aanwezig was.

Figuur 5.6 Relatie tussen de zaadcelconcentratie (a) en de concentratie beweeglijke zaadcellen (b) in ejaculaat van patiënten enerzijds en de fumarase activiteit anderzijds.



HOOFDSTUK 6

EFFECTEN VAN CRYOPRESERVATIE VAN SPERMA OP HET IN VITRO BEVUCHTEND VERMOGEN VAN ZAADCELLEN

6.1 Historische aspecten van kunstmatige inseminatie

Reeds in de derde eeuw werd de mogelijkheid van kunstmatige inseminatie verondersteld in de Talmud. Hierin werd gediscussieerd over de vraag of een zwangere vrouw een hoge priester mag huwen. De schriftgeleerden meenden dat deze vraag alleen bevestigend kon worden beantwoord, indien er sprake was van een maagdelijke zwangerschap, welke was veroorzaakt doordat de vrouw in met sperma "verontreinigd" water had gebaad.

Arabische paardenfokkers hebben de kunstmatige inseminatie in de 14^e en 15^e eeuw voor het eerst in praktijk gebracht (Gautier, 1881; Guttmacher, 1943). Hoewel Bartolomeus Eustachius omstreeks het jaar 1550 het toepassen van "geassisteerde inseminatie" reeds voorspelde bij mensen (Gueneau de Mussy, 1875; Rohleder, 1934), zou het langer dan 200 jaar duren alvorens John Hunter (Home, 1799) de eerste kunstmatige inseminatie zou beschrijven. Het handelde daarbij om een inseminatie met het sperma van de echtgenoot van een vrouw (in het engels wordt dat AIH genoemd; artificial insemination with husband's semen).

Tussen 1846 en 1865 werd in Frankrijk kunstmatige inseminatie vrij regelmatig toegepast (Schellen, 1957). Hoewel het idee van de kunstmatige inseminatie in het Midden-Oosten werd ontwikkeld en in Europa in praktijk werd gebracht, was het de Amerikaan Pancoast, die aan het einde van de vorige eeuw een kunstmatige inseminatie met sperma van niet-echtelijke origine uitvoerde (Hard, 1909; Gregoire en Mayer, 1965). Hoewel exacte gegevens over de mate van toepassing van donorinseminatie ontbreken, werd in 1970 het aantal kinderen dat op deze wijze was verkregen geschat op 350.000 (Smith, 1970).

6.2 Historische aspecten van cryopreservatie van sperma

Spallanzani was de eerste die het effect van lage temperaturen op de zaadcellen bestudeerde (1776). Hij observeerde dat zaadcellen die met de koude van sneeuw in aanraking kwamen, ophielden te bewegen. Na opwarmen

"herstelden" sommige zaadcellen zich. In 1866 stelde Mantegazza voor, sperma van dieren voor veterinaire toepassingen in te vriezen. Hij kwam tot deze conclusie omdat zaadcellen een temperatuur van -15°C konden overleven. Dat betekende ook -althans volgens Mantegazza- dat zaadcellen afgetapt van slagveld-slachtoffers, alsnog een legale erfgenaam konden voortbrengen. Hij stelde voor het sperma in te vriezen en dan naar huis te sturen. Het zou nog meer dan een eeuw duren alvorens de legale implicaties van een dergelijke inseminatie werden beschreven (Cusine, 1977). In 1938 nam Jahnel waar dat sommige zaadcellen een temperatuur van -269.5°C kunnen overleven. Shettles (1940) stelde vast dat de mate van overleving van de zaadcellen varieerde per donor en dat de reversibiliteit bij opwarming minder werd naarmate de zaadcellen langer werden geconserveerd. In 1942 werd door Hoagland en Pincus een ultra-snelle koelmethode ontwikkeld, waarbij gebruik werd gemaakt van vloeibare stikstof.

De routine-matige conservering van ingevroren menselijk sperma, is mogelijk geworden als gevolg van twee belangrijke ontwikkelingen. In 1949 beschreven Polge, Smith en Parker de beschermende werking van glycerol op het koelproces (cryoprotectie). Enige jaren later werd door Sherman (1954) aangetoond dat de beschermende werking van glycerol pas effectief werd, indien het sperma met een bepaalde snelheid werd ingevroren. Deze informatie leidde in 1954 tot de eerste geslaagde inseminatie met ontdooid sperma (Bunge, Kettel en Sherman), dat geconserveerd was geweest in droogijs (-79°C). Sinds 1964 wordt het sperma meestal bij -196°C in -vloeibare stikstof- bewaard (Perloff, Steinberger en Sherman, 1964).

AID (inseminatie met donorsperma) wordt overwogen als er sprake is van irreversibele mannelijke steriliteit of indien, als gevolg van een duidelijke afwijking van de zaadcellen, de kans op zwangerschap zeer klein is (Richardson, 1980). Het gebruik van "diepvries-sperma" voor kunstmatige inseminatie heeft een aantal voordelen. Het sperma kan op ieder gewenst moment worden ontdooid. Daarnaast kan gedurende dezelfde cyclus meer malen met hetzelfde donor-sperma worden geïnsemineerd. Er zijn echter ook nadelen verbonden aan een sperma-bank. In de praktijk is gebleken, dat de vriesprocedure hogere eisen stelt aan het donor-sperma. Tevens is aangetoond dat ontdooid sperma 15 tot 20% minder vruchtbaar is dan vers sperma (Sawada en Ackerman, 1967; Behrman en Ackerman, 1969; Sherman, 1973; Ansbacher, 1978; Richardson, 1980).

Het aantal kinderen dat via ontdooid donor-sperma is verwekt (in 1973 waren dat er volgens Sherman 571) is vele malen kleiner dan het aantal kinderen verkregen door inseminatie met vers sperma. Wellicht geeft menig

onderzoeker de voorkeur aan vers sperma bij donor-inseminatie. Mogelijkerwijze is dit mede bepaald door een publikatie van Pedersen en Lebeder (1971), waarin werd aangetoond, dat zaadcellen door het invriezen ultrastructureel beschadigd kunnen worden.

6.3 Factoren die de overleving van zaadcellen na cryopreservatie beïnvloeden

Zowel de cryobeschermende werking van verschillende substanties als de noodzakelijkheid van een gecontroleerde koelsnelheid zijn cryobiologische principes die ontdekt werden bij zaadcellen (Polge et al, 1949; Luyet en Keane, 1955). Bij het invriezen van zaadcellen moet met de volgende verschijnselen rekening worden gehouden.

6.3.1 Koude-shock

Zoals bij andere celtypen ook het geval is, kunnen zaadcellen bij afkoeling boven de stollingstemperatuur beschadigd worden (Polge en Lovelock, 1952). Humane zaadcellen schijnen hierop een uitzondering te zijn (Farrant, 1980). Koude-shock kan worden tegengegaan door een langzame daling van de omgevingstemperatuur.

6.3.2 Het vriesproces

Gedurende het vriezen ontstaat er ijs rondom de cel. Hierdoor wordt water uit de omgeving weggetrokken. Daardoor ontstaat er een verhoogde osmotische gradiënt rondom de cel (Lovelock, 1953), waardoor deze zal gaan krimpen. De gebruikte invriesmethode moet ten doel hebben deze celverandering te laten plaatsvinden zonder dat er intracellulair ijsvorming ontstaat. Daardoor zal bij zeer lage temperatuur de cel vrijwel geen ijs bevatten (Farrant et al, 1977). Indien de koeling te langzaam verloopt kan de cel ook beschadigd worden als gevolg van een te grote krimp of een te langdurige blootstelling aan de verhoogde osmolariteit (Lovelock, 1953; Meryman, 1968).

Indien het medium waarin de zaadcellen zich bevinden gekoeld wordt, dan zal er een punt bereikt worden, waarop de zaadcellen plotseling worden blootgesteld aan een temperatuurverhoging. Deze wordt veroorzaakt door

kristallisatie van het medium. Beschadiging hierdoor veroorzaakt, kan worden voorkomen door sneller in te vriezen (Sawada en Ackerman, 1968).

6.3.3 Cryo-beschermende stoffen

Indien onbehandeld humaan sperma wordt ingevroren en ontdooid, dan toont slechts 0.1% van de zaadcellen enige mate van beweeglijkheid. Toevoeging van een zogenaamde cryo-beschermende stof, welke de zaadcel tegen beschadiging beschermt, verbetert de overleving radicaal (Richardson, 1980).

Cryo-beschermende stoffen moeten niet toxisch zijn voor de cel en goed oplosbaar zijn in water. Dit laatste betekent dat ze tijdens de ijsvorming in oplossing blijven. Tegen een te snelle koeling bieden deze stoffen geen bescherming. Daarentegen zijn ze actief bij te langzame koeling doordat ze kristalvorming tegengaan waardoor het ontstaan van een te hoge zoutconcentratie wordt voorkomen (Lovelock, 1953; Mazur et al, 1970).

Voor het invriezen van humaan sperma wordt glycerol het meest toegepast. Dimethylsulfoxide dat gebruikt wordt voor het invriezen van eicellen en embryo's (2.8) geeft slechte resultaten met zaadcellen (Sherman, 1964; Schnieden, 1980). Ook eigeel bezit een beschermende functie, veroorzaakt door het daarin aanwezige lecithine. Eigeel en glycerol kunnen ook worden samengevoegd in een medium dat tevens citraat, glucose, fructose, glycerol en antibiotica bevat (het zogenaamde G.E.C.-medium; Behrman en Sawada, 1966; Matheson et al, 1969; Richardson, 1976).

6.4 Doel van het onderzoek

Het is moeilijk om aan de hand van eigenschappen van het verse ejaculaat, de levensvatbaarheid van de zaadcellen na ontdooiden te voorspellen. De parameter die het meest gebruikt wordt is het percentage beweeglijkheid. Dit blijkt echter een controversiële parameter te zijn, daar is aangetoond dat de gemeten beweeglijkheid voor het invriezen geen voorspellende waarde heeft voor de mate van overleving (Behrman en Sawada, 1966; Amelar en Dubin, 1980). Desondanks bestaat er wel een hoge correlatie tussen de beweeglijkheid vóór en na het invriezen (Keel en Karow, 1980). Andere gebruikte testen zijn eigenlijk modificaties van de

beweeglijkheidsbepaling; zoals de penetratie van cervixslijm in vitro (Fjallbrant en Ackerman, 1969), een rundercervixslijmtest (Zavos en Cohen, 1980), de overleving van zaadcellen in cervixslijm (Friberg en Gemzell, 1973) en de verandering van de beweeglijkheid na de ejaculatie (Keel en Karow, 1980). Het opnieuw invriezen en ontdooien van sperma kan ook als een test-systeem worden gebruikt (Ansari, 1976). De evaluatie van verschillende cryobiologische technieken is helaas afhankelijk van deze test-systemen (Friberg en Gemzell, 1973; Harrison en Sheppard, 1980).

Het doel van het hieronder beschreven onderzoek was de verschillende technieken, die door sperma-banken worden gebruikt met elkaar te vergelijken met behulp van de hamstereiceltest. De studie van het in vitro bevruchtend vermogen biedt namelijk het voordeel, dat verschillende methodieken aan de hand van dezelfde ejaculaten kunnen worden vergeleken.

6.5 Materiaal en methoden

6.5.1 Gebruikte cryobiologische media

Glycerol werd in 5 delen in de loop van 5 minuten aan het sperma toegevoegd totdat er een 10% volume-concentratie was bereikt.

G.E.C.-medium (glycerol, eigeel en citraat) werd vers voor de aanvang van de experimenten bereid. Dit medium werd samengesteld uit kippe-eigeel, glycerol, glucose, natrium-citraat, glycine en erythromycine (Matheson et al, 1969). Het medium werd stapsgewijze aan het sperma toegevoegd tot er een ratio van 1:1 was verkregen.

6.5.2 Invriezen, conserveren en ontdooien

De sperma-medium mengsels werden in 2 ml glazen ampullen gepipetteerd en gedurende 10 minuten in ijswater gezet. De open ampullen werden in een ruimte geplaatst waarin vloeibare stikstof werd geblazen. De koelsnelheid werd gecontroleerd door een Cryoson-controle apparaat (Tram-122) en de ampullen werden ingevroren volgens één van de volgende twee trajecten. Met koelprocedure A werd binnen 15 minuten een temperatuur van -100°C bereikt (matig tot snelle koeling). Via procedure B werd dezelfde temperatuur pas bereikt na 57 minuten (langzame koeling). Ampullen die met behulp van traject A werden ingevroren, werden met $1^{\circ}\text{C}/\text{minuut}$ gekoeld tot -2.5°C en verder met $7^{\circ}\text{C}/\text{minuut}$ tot -20°C . Ampullen die via traject B

werden ingevroren werden eerst gekoeld tot -5°C met een snelheid van $0.2^{\circ}\text{C}/\text{minuut}$ en daarna met een toenemende snelheid van maximaal $0.6^{\circ}\text{C}/\text{minuut}$ tot -42°C ingevroren. De ampullen werden gedurende 2 dagen bewaard in vloeibare stikstof en ontdooid in een waterbad van 37°C gedurende 5 minuten (experimenten 1 en 2).

6.5.3 Opwerking van zaadcellen

Indien vers sperma wordt vergeleken met ontdooid sperma, dan blijkt dat in het laatste geval het aantal niet bewegende zaadcellen altijd groter is. Dit verschil is ook zichtbaar in de opgewerkte zaadcellsuspensies. Dit zou tot gevolg hebben dat suspensies met veel dode zaadcellen van de ene experimentele groep (ontdooid sperma) zouden worden vergeleken met suspensies met zeer weinig dode zaadcellen van de andere experimentele groep (vers sperma). Om dit te voorkomen werd de volgende procedure gebruikt. Zowel van de verse als van de ontdooidde ejaculaten werden volumina van 0.5 ml in plastic buizen gepipetteerd, waarop voorzichtig twee ml kweekmedium werd gebracht. Hierdoor ontstaat een twee-lagig opzuiveringssysteem, waarin actief bewegende zaadcellen, vanuit de sperma-laag in de bovenstaande medium-laag migreren (Lopata et al, 1976; Hellema en Rümke, 1978). De buizen werden gedurende een uur bij 37°C geplaatst. Van de bovenste medium-laag werd ongeveer 1.5 ml afgepipetteerd en verder bewerkt (2.2). De zo verkregen zaadcellsuspensies bevatten een hoog percentage bewegende zaadcellen (50-100%), in tegenstelling tot zaadcellsuspensies afkomstig van de onderste laag (minder dan 5% beweeglijkheid). Het in vitro bevruchtend vermogen van zaadcellen uit de onderste laag is ook enige malen bestudeerd (6.6).

6.5.4 Statistische bewerkingen

De gegevens werden getoetst met behulp van variantie-analyse. Indien een significant verschil was aangetoond werden individuele groepen vergeleken met de LSD-test. De gegevens van experiment 2 (6.8) werden bestudeerd door middel van een variantie-analyse volgens het twee-factoren blokmodel.

6.6 Effecten van het opzwellen van zaadcellen in een laag medium op het in vitro bevruchtend vermogen

In vitro bevruchtingspercentages van zaadcellen die in de boven het sperma gepipetteerde mediumlaag (6.5.3) migreerden zijn in tabel 6.1 vergeleken met bevruchtingspercentages van zaadcellen die niet in de medium-laag migreerden. Alleen zaadcellsuspensies afkomstig van de onderste laag met voldoende bewegende zaadcellen werden met eicellen geïncubeerd (2.6). Zoals uit de resultaten blijkt, bevruchten gemigreerde zaadcellen beter dan niet-gemigreerde zaadcellen. Blijkbaar hebben deze zaadcellen een hogere bevruchtingscapaciteit dan minder actieve (weliswaar beweeglijke) zaadcellen.

In een aantal andere experimenten met 9 donor-ejaculaten werd 1/6 deel van het ejaculaat steeds apart gehouden en de 5 andere delen werden onderworpen aan verschillende procedures, die ten doel hadden de beweeglijkheid van het ejaculaat te verbeteren. Op deze wijze kon worden

Tabel 6.1 In vitro bevruchting van zaadcellen afkomstig van de bovenstaande mediumlaag (opgezwoomen zaadcellen) en de onderstaande spermaplasmalaag (achtergebleven zaadcellen) van een eenvoudig opzuiveringssysteem.

donor in vitro bevruchting - aantal bevruchte/totaal aantal eicellen (%)						
verse zaadcellen			ontdooide zaadcellen			
			glycerol		complex invriesmedium	
boven	onder		boven	onder	boven	onder
2	24/24 (100)	8/14 (54)			4/21 (19)	0/22 (0)
3	22/22 (100)	19/24 (75)				
4	29/29 (100)	27/28 (97)			25/26 (96)	12/15 (80)
5	32/32 (100)	19/24 (80)	19/22 (86)	9/16 (56)	13/23 (56)	6/13 (56)
6	32/33 (97)	17/26 (65)				
7	27/33 (82)	8/23 (35)				
8	21/33 (64)	11/30 (37)				

Tabel 6.2 Invloed van opzuivering van sperma of stimulatie van zaadcellen op de in vitro bevruchting (percentages en standaardafwijkingen).

gebruikte methode	gemiddelde percentage in vitro bevruchting
bovine serum albumine kolom	20.0 \pm 9.7
cafeïne (7mM.)	29.3 \pm 9.5
opgezwommen zaadcellen	25.9 \pm 10.0
sephadex-kolom	22.3 \pm 5.3
onbehandeld sperma	29.0 \pm 9.7

aangetoond, dat het in vitro bevruchtend vermogen van opgezwommen zaadcellen vergelijkbaar is met dat van onbehandelde zaadcellen (tabel 6.2).

De experimenten vermeld in tabel 6.1 en 6.2 zijn verkregen door zaadcellen van verschillende donorgroepen te bestuderen. Bevruchtingspercentages van deze groepen mogen, gezien het geringe aantal donoren, niet vergeleken worden.

Ook opzuivering van zaadcellen door middel van Sephadex of bovine serum albumine kolommen of stimulering van de zaadcellen door middel van cafeïne, verbeterde de bevruchting niet. Over het algemeen wordt aangenomen, dat deze technieken de beweeglijkheid bevorderen, hoewel met name over de effecten van cafeïne tegenstrijdige

berichten zijn gepubliceerd (Chulavetnatal, 1973; Schoenfeld et al, 1973; Ericsson, 1973 en 1977; Johnson et al, 1974; Steeno et al, 1975; Dougherty et al, 1976; Homonnai et al, 1976; Harrison et al, 1980; Schilling et al, 1977).

De resultaten die in tabel 6.2 zijn vermeld komen in principe overeen met het feit dat een positief effect op de conceptie-kans van behandelings-procedures van sperma, voorafgaande aan de kunstmatige inseminatie, nooit is aangetoond (Broer en Dauber, 1978; Harrison et al, 1978; Koper et al, 1979).

Tabel 6.3 Effecten van cryoprotectieve media op het behoud van het *in vitro* bevruchtend vermogen en de beweeglijkheid van ontdoode zaadcellen. Gebruikte media: (A) complex invrie-medium (zie tekst) en (B) 10% glycerol.

donor	cryoprotectief medium	aantal bevruchte / totaal		percentage beweeglijkheid		"recovery rate (%)"	
		aantal eicellen (%)				in vitro bevruchting	percentage beweeglijkheid
		vers *	ontdood	vers **	ontdood		
1	A		11/25 (44)		30	100	43
	B	19/65 (44)	1/15 (7)	70	30	16	43
2	A		4/21 (19)		10	19	17
	B	24/24 (100)	8/21 (38)	60	25	38	42
3	A		2/32 (6)		20	6	31
	B	22/22 (100)	3/15 (20)	65	25	20	39
4	A		25/26 (96)		30	96	43
	B	29/29 (100)	21/23 (86)	70	25	86	36
5	A		13/23 (56)		-	56	-
	B	32/32 (100)	19/22 (86)	-	-	86	-
6	A		2/17 (12)		10	12	33
	B	32/33 (97)	3/23 (13)	30	5	14	17
7	A		3/14 (22)		40	27	80
	B	27/33 (82)	1/18 (6)	50	20	7	40
8	A		2/15 (15)		25	24	39
	B	21/33 (64)	0/20 (0)	65	10	0	15
9	A		3/27 (11)		20	16	40
	B	36/51 (71)	4/28 (14)	50	10	20	20

* F=14.6, df 2 en 16, p < 0.01

** F=55.4, df 2 en 14, p < 0.01

6.7 Experiment 1: vergelijking van cryo-beschermende media

Sperma van 9 donoren werd in drie porties verdeeld. Een deel werd bewerkt om het in vitro bevruchtend vermogen van de verse zaadcellen te bestuderen (controle) en de andere twee delen werden of verdund met glycerol of met G.E.C.-medium. Beide sperma-verdunningen werden met traject B tegelijkertijd ingevroren en tegelijkertijd ontdooid.

De in vitro bevruchtingspercentages en de beweeglijkheids percentages van dit experiment zijn weergegeven in tabel 6.3. Per zaadcellsuspensie werden gemiddeld 26 eicellen gebruikt. Het bevruchtingspercentage van de verse zaadcellen varieerde van 29 tot 100% (gemiddeld 83%). Cryopreservatie had een significante daling van de bevruchting en van de beweeglijkheid tot gevolg. Behandeling met de verschillende media had geen invloed op beide parameters. In twee gevallen had de cryopreservatie geen invloed op de in vitro bevruchting.

Vele onderzoekers geven de voorkeur aan glycerol als beschermende stof (Keetel et al, 1956; Tyler, 1973), anderen menen echter dat eigeel-glycerol-citraat medium effectiever zou zijn (Behrman en Sawada, 1966; Behrman en Ackerman, 1969; Matheson et al, 1969). De conceptie-percentages in deze studies varieerden tussen de 30 en 50%.

In een onderzoek bij 83 patiënten (Friberg en Gemzell, 1973) werden beide cryo-beschermende media vergeleken. Van de 26 zwangerschappen werden er 16 veroorzaakt door sperma dat met het complexe medium was behandeld en 10 door sperma dat met glycerol was verdund. Aangezien dit geen significant verschil is concludeerden deze onderzoekers, dat beide media even effectief zijn. Dit komt overeen met de conclusie die uit het huidige onderzoek kan worden getrokken. Daarentegen toonden Harrison en Sheppard (1980) recent aan dat het complexe medium de zaadcellen beter zou beschermen dan glycerol.

6.8 Experiment 2: effect van koelsnelheid

Vijf donoren werd verzocht tweemaal te doneren. De ejaculaten werden in twee delen gesplitst. Een deel werd als controle gebruikt en het andere deel werd via traject A (eerste ejaculaat) of via traject B (tweede ejaculaat) ingevroren.

De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in tabel 6.4. Het bevruchtend vermogen van de zaadcellen gekoeld volgens de twee snelheden is niet verschillend. Deze resultaten komen overeen met

gegevens van Friberg en Gemzell (1977) die in dit opzicht geen systematische, maar wel individuele variatie waarnamen. Beide trajecten worden door verscheidene sperma-banken gebruikt. Het hier genoemde traject A is vergelijkbaar met dat van Behrman en Sawada (1966). Traject B is vergelijkbaar met de droogijs-koelmethode.

Tabel 6.4 *In vitro* bevruchtend vermogen (percentages en standaardafwijkingen) van 10 zaadmonsters van 5 donoren (experiment 2). De gegevens werden getoetst door middel van een 2-factoren variantie-analyse.

	verse zaadcellen	ontdooide zaadcellen
langzame koelsnelheid	140/142 [⊙] (99 ± 8)**	44/160 (37 ± 18)
☆		*
matige koelsnelheid	106/129 (93 ± 7)**	35/92 (35 ± 12)

* F=0.33, geen interactie tussen de twee invriesprocedures, df 1 en 4.

**F=34.81, significant verschil tussen de gegevens van verse en ontdooide zaadcellen ($p < 0.01$, df 1 en 4).

☆ zie tekst.

⊙ aantal bevruchte/totaal aantal eicellen.

6.9 Experiment 3: vergelijking van ontdooi-procedures

Vers ejaculaat van 19 donoren werd voor een deel bewerkt voor de studie van het *in vitro* bevruchtend vermogen (controle) en voor een deel verdund met het complexe invriesmedium. Het verse en het verdunde ejaculaat werd gefotografeerd (MBF). Het sperma-invriesmedium mengsel werd in 3 ampullen gepipetteerd en volgens traject B ingevroren. De ampullen werden op een van de volgende drie manieren opgewarmd; in een waterbad van 37°C gedurende 5 minuten, in lucht bij kamertemperatuur (22°C) gedurende 15 minuten, in alcohol van 5°C gedurende 15 minuten. Alvorens de sperma-monsters werden verdund met kweekmedium werd een deel gefotografeerd (MBF).

De beweeglijkheid van zaadcellen in vers sperma verschilde niet met

Tabel 6.5 Effecten van verdunning van sperma met cryoprotectief medium op de beweeglijkheid (meervoudige belichtingsfotografie) van zaadcellen van 14 donoren.

	vers sperma	vers sperma verdund met cryoprotectief	F	vrijheids- graden
percentage beweeglijkheid	38 ± 6	34 ± 5	0.54 n.s.*	1 en 13
gemiddelde snel- heid (µm/sec)	29 ± 2	29 ± 1	0.03 n.s.*	1 en 13

* niet significant

die van zaadcellen in het met invriesmedium verdunde sperma (tabel 6.5). Bij 15 donoren werd het effect van de verschillende ontdooi-procedures op de in vitro bevruchting bestudeerd (tabel 6.6). Wederom werd aangetoond dat verse zaadcellen over het algemeen beter eicellen bevruchten dan ontdooide zaadcellen (6.6). Bij 7 van de 45 suspensies had de cryopreservatie geen invloed op het bevruchtingspercentage. Daarentegen verminderde de beweeglijkheid altijd door cryopreservatie.

De gemiddelde snelheid van de zaadcellen veranderde niet door het invriezen (tabel 6.5). Ook het aantal aan de eicellen gehechte zaadcellen veranderde niet door de cryopreservatie (tabel 6.6). Zaadcellen die echter ontdooid zijn bij een temperatuur van 4°C bevruchten significant minder eicellen dan zaadcellen die bij een hogere temperatuur zijn ontdooid.

Sawada en medewerkers (1966) hebben 4 verschillende ontdooi-methoden vergeleken. Drie daarvan werden hier bestudeerd. In principe verschillen de temperatuurcurves van deze methoden alleen in het gebied onder 0°C. Matheson et al (1969) namen waar dat de zogenaamde beweeglijkheids "recovery rate" van bij kamertemperatuur ontdooide zaadcellen hoger was dan die van zaadcellen die ontdooid waren door plaatsing in een omgeving van 4 of 37°C. De "recovery rate" is een maat voor de overleving van de zaadcellen en wordt als volgt berekend;

Tabel 6.6 Effecten van verschillende ontdooi-procedures op de beweeglijkheid en het in vitro bevruchtend vermogen van zaadcellen.

parameter	vers	ontdooid sperma			F	significantie	n	vrijheids- graden
		ontdooien bij						
		4°C	22°C	37°C				
percentage beweeglijkheid	34 ± 4*	12 ± 2	11 ± 2	10 ± 2	41.8	p < 0.01	19	3 en 54
gemiddelde snelheid (µm/sec)	29 ± 2	26 ± 1	26 ± 2	26 ± 2	1.0	niet significant	19	3 en 54
in vitro bevruchting (%)	75 ± 8*	37 ± 7 [⊗]	51 ± 8	52 ± 7	20.96	p < 0.01	15	3 en 42
bindings-score	3.4 ± 0.5	3.8 ± 0.4	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.3	2.25	niet significant	12	3 en 33

* gegevens van de verse zaadcellen zijn significant hoger dan de gegevens van de ontdooidde zaadcellen, p < 0.01.

⊗ significant verschil tussen 4°C enerzijds en 22 en 37°C anderzijds, p < 0.01.

percentage beweeglijkheid (of percentage in vitro bevruchting) van ontdooidde zaadcellen x 100% / percentage beweeglijkheid (of percentage in vitro bevruchting) van verse zaadcellen.

De hier berekende beweeglijkheid is berekend aan de hand van een objectieve methode, zodat aan de resultaten van Matheson et al getwijfeld dient te worden.

6.10 Donor-selectie en hamstereiceltest

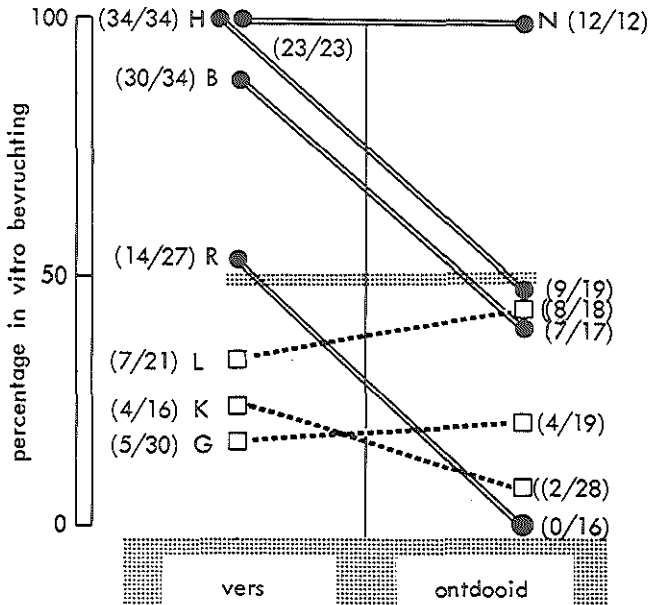
De meeste sperma-banken hanteren de recovery rate van de beweeglijkheidspercentages als standaard voor donor-selectie. Uit de gegevens van tabel 6.3 blijkt dat het percentage bevruchting onder invloed van cryopreservatie niet altijd op dezelfde wijze verandert als het percentage beweeglijkheid (tabel 6.3, zie donor 7 sperma ingevroren met complex medium). Zaadcellen met een matige beweeglijkheid na ontdooien (ongeveer 20-30%) kunnen toch nog tot een hoog bevruchtingspercentage aanleiding geven (donoren 1 en 4, G.E.C.-medium; donor 4, glycerol). Daarentegen had sperma met een goede beweeglijkheid (40%) na ontdooiing

soms een lage bevruchtingscapaciteit (donor 7, G.E.C-medium).

Zoals dat ook het geval is bij het in vivo bevruchtend vermogen vermindert ook het in vitro bevruchtend vermogen na cryopreservatie. Dit in tegenstelling tot de gemiddelde snelheid en de affiniteit van de zaadcellen voor de eicel, die door cryopreservatie niet veranderen. In een aantal gevallen bleef het in vitro bevruchtend vermogen stabiel, hetgeen niet in overeenstemming is met resultaten van Binor et al (1980). Deze onderzoekers vonden na cryopreservatie altijd een afname van de in vitro bevruchtingsfrequentie.

De effecten van invriezen op de in vitro bevruchtingspercentages van 7 donoren zijn vergeleken in figuur 6.1. Bij 3 donoren met een goede

Figuur 6.1 Invloed van cryopreservatie van sperma op de in vitro bevruchting bij 7 donoren met relatief hoge (●—●) en relatief lage (□·····□) in vitro bevruchtingspercentages van de verse zaadcellen. Het aantal gepenetreerde zaadcellen op het totaal aantal zaadcellen is vermeld.



hamstereiceltest (groter dan 50%) daalde het in vitro bevruchtend vermogen aanzienlijk als gevolg van de cryopreservatie, terwijl bij een andere donor met een matige hamstereiceltest (donor L) het bevruchtingspercentage niet verminderde. Hiermee wordt aangetoond dat een hoge in vitro bevruchting door verse zaadcellen geen garantie biedt voor een hoge in vitro bevruchting na cryopreservatie. Daarentegen kan donor-sperma met een matig in vitro bevruchtend vermogen een hogere weerstand hebben tegen cryopreservatie dan op grond van het verse sperma zou worden verwacht. Een eventuele toepassing van de hamstereiceltest in sperma-banken, zou daarom kunnen leiden tot een veranderde donor-selectie.

HOOFDSTUK 7

HETEROLOGE INCUBATIE VAN ZAADCELLEN VAN VRUCHTBARE MANNEN IN SPERMAPLASMA VAN ONVRUCHTBARE MANNEN EN VICE VERSA

7.1 Mannelijke accessoire geslachtsorganen en zaadceltransport

Zaadcellen die de testikel hebben verlaten bereiken via de kop en het lichaam van de epididymis de staart van dit orgaan en het vas deferens. De passage door de epididymis is een androgeen afhankelijk proces (Orgebin-Christ en Jahad, 1978). In de epididymis rijpen de zaadcellen door complexe morfologische en biochemische veranderingen (Hafez en Cunningham, 1980). Menselijke zaadcellen uit de kop van de epididymis bewegen zich niet of doen dit ongecoördineerd. Het vermogen zich voort te bewegen neemt toe naarmate de zaadcellen uit een meer naar het vas deferens gelegen deel van de epididymis worden geïsoleerd (Belonoschkin, 1942; Mooney et al, 1972; Bedford, Calvin en Cooper, 1973). Bij zaadcellen van de cavia, de rat, het konijn, de hamster, de ram, het rund en het varken is aangetoond, dat het bevruchtend vermogen toeneemt, naarmate de zaadcellen langer in de epididymis vertoeven (Igboeli en Foote, 1968; Bedford, 1975; Holtz en Schmidt, 1976).

Recent is beschreven, dat humane epididymale zaadcellen operatief verwijderd uit de staart van de epididymis, eischilvrije hamstereicellen kunnen bevruchten (Hinrichsen en Blaquier, 1980). Ook werd in deze publikatie beschreven dat zaadcellen uit de kop van de epididymis niet aan de eicellen binden, maar dat de affiniteit voor de eicellen pas toeneemt, naarmate de zaadcellen uit een dichter bij het vas deferens gelegen deel worden geïsoleerd. De onderzoekers hebben echter niet aan de voorwaarde van een minimale hoeveelheid bewegende zaadcellen per zaadcellsuspensie voldaan (2.6), zodat uit deze laatste vondst mogelijk geen conclusies kunnen worden getrokken.

Zaadcellen afkomstig uit het distale deel van de staart van de epididymis en uit het vas deferens worden tijdens de ejaculatie gemengd met het sereet van de ampullaire klieren, de zaadblazen, de prostaat, de urethrale klieren en de klieren van Cowper. De afvoergangen van deze organen komen uit in het vas deferens of in de urethra. Tezamen vormen deze secreties de vloeibare component van het sperma, spermaplasma genoemd. De verschillende secreties worden tijdens de ejaculatie in een bepaalde volgorde uitgestoten (Amelar en Hotchkiss, 1964; Eliasson,

1976). Dit betekent dat zaadcellen uit verschillende ejaculatie-contracties in spermplasma met een verschillende samenstelling terecht komen. Dit kan gevolgen hebben voor de zaadcellen (hoofdstuk 8).

7.2 Functie van het spermplasma

De belangrijkste functie van het spermplasma is de rol die het speelt bij het transport van de zaadcellen vanuit de mannelijke organen naar de vagina. Na 90 seconden kunnen de eerste zaadcellen reeds in het cervixslijm worden aangetroffen (Sobrero en MacLeod, 1962; Hafez, 1980). De zaadcellen zijn dan slechts gedurende zeer korte tijd met het spermplasma in aanraking geweest. Deze eerste snelle migratie wordt mogelijk veroorzaakt door contracties van de vagina en de uterus (Fox et al, 1970). De tweede migratiegolf van zaadcellen is kwantitatief veel groter en komt vrijwel alleen tot stand, door beweeglijkheid van de zaadcellen zelf. Deze migratie bereikt zijn maximum ongeveer 15 tot 20 minuten na de ejaculatie (Tredway et al, 1975 en 1978).

Een andere functie van het spermplasma heeft een meer mechanische betekenis. Sperma wordt in vloeibare vorm geëjaculeerd, waarna het vrijwel onmiddellijk coaguleert. Na ongeveer 20 minuten neemt de viscositeit af, hetgeen liquefactie wordt genoemd (2.2). Het niet-geliqueficeerde ejaculaat is een dikke visceuze substantie, die de zaadcellen vrijwel volledig immobiliseert (Wilson en Bunge, 1975; Makler en Zaidise et al, 1979). Bij verscheidene diersoorten is het coagulaat een vaste substantie, die naar men aanneemt ertoe bijdraagt dat de zaadcellen niet het vrouwelijk lichaam uitstromen of die het effect van de volgende copulatie door andere mannelijke dieren teniet doen (Hafez, 1973).

Uitgestelde liquefactie kan leiden tot verminderde vruchtbaarheid, doordat de zaadcellen te lang geïmmobiliseerd zijn (Bunge en Sherman, 1954; Bunge, 1970). Bij toeval werd ontdekt dat humaan speeksel en met name het daarin aanwezige alpha-amylase sperma kan doen vervloeien (Bunge en Sherman, 1954). Hieruit blijkt dat de vervloeiing een enzymatisch-gekatalyseerd proces is. Uit spermplasma werd in 1975 een factor geïsoleerd, die abnormaal spermplasma kon doen vervloeien (Syner et al, 1975). Deze factor werd gekarakteriseerd als een proteolytisch enzym met chymotrypsine-achtige eigenschappen. Mogelijk is dit dezelfde substantie, die eerder werd beschreven en die seminine werd genoemd (Lundquist et al, 1955; Spring-Mills, 1980b).

Kurzrok en Miller (1928) hebben aangetoond dat humaan spermplasma een proteinase factor bevat, dat, net zoals trypsine en chymotrypsine cervixslijm kan hydrolyseren. Mogelijk speelt deze factor een rol bij de in vivo penetratie van cervixslijm door zaadcellen die actief in de cervix migreren (Moghissi et al, 1964). De hydrolytische activiteit van het spermplasma op het cervixslijm in vitro is door sommige onderzoekers aangetoond, maar wordt door anderen weer tegengesproken (Pommerenke en Vierguer, 1947; Moghissi en Syner, 1970; GaddumRosse et al, 1980; Overstreet et al, 1980). Prostaglandinen zijn andere spermplasma-factoren die mogelijk de cervixslijmpenetratie beïnvloeden (Zaneveld en Polakoski, 1977).

Uit het spermplasma zijn verschillende zogenaamde antifertiliteits-factoren geïsoleerd. Hiervan is de decapaciterende factor reeds besproken (2.1.1).

Uit talrijke in vitro bevruchtingsexperimenten met epididymale zaadcellen (Whittingham, 1979; Hinrichsen en Blaquier, 1980) blijkt, dat het contact met spermplasma in principe niet noodzakelijk is. Dit mag overigens niet gebruikt worden als argument om te veronderstellen, dat spermplasma naast zijn transportfunctie geen andere functies heeft.

7.3 De relatie tussen de chemische samenstelling van het spermplasma en de vruchtbaarheid

De energievoorziening van zaadcellen is vrijwel geheel afhankelijk van extracellulair substraat. Daarvoor is in spermplasma fructose aanwezig. Mogelijk speelt dit ook een rol bij de initiatie van de beweeglijkheid (Mann, 1946). Fructose wordt vrijwel alleen in de zaadblazen gesynthetiseerd (Spring-Mills, 1980a). Ongeveer 70% van het spermplasma is afkomstig uit de zaadblazen. Dit orgaan produceert onder meer citraat, inositol, 13 verschillende prostaglandinen, ascorbinezuur en anorganisch fosfor. Welke betekenis de zaadblazen hebben voor de vruchtbaarheid, is niet bekend (Spring-Mills, 1980a).

Zaadcellen geïsoleerd uit de staart van de epididymis en gesuspenderd in een buffer met 8% spermplasma gaan zich actiever bewegen. De aanwezigheid van zaadblaasvloeistof zou de beweeglijkheid reduceren, maar prostaatvloeistof daarentegen zou de activiteit vergroten. Verhoogde beweeglijkheid werd ook waargenomen, na toevoeging van een oplossing van 4% albumine aan epididymis-zaadcellen (Lindholmer, 1973). De prostaat produceert ongeveer 15 tot 30% van het spermplasma-volume.

De samenstelling van de prostaatvloeistof is uitermate gecompliceerd (Polakoski en Zaneveld, 1977; Spring-Mills, 1980b) en bestaat onder andere uit zure fosfatase, citroenzuur, zink, inositol en spermine. Spermine is een polyamine dat de coagulatie reguleert en ook een bacteriostatische werking heeft (Spring-Mills, 1980b).

Hoewel sperma met abnormale zaadceleigenschappen vaker afwijkend spermoplasma heeft, dan sperma met normale zaadcelkarakteristieken (Eliasson, 1970), bestaat er geen absoluut spermoplasma-criterium als maat voor de vruchtbaarheid. Verminderde zaadcelbeweeglijkheid en of abnormale zaadcelmorfologie wordt vaak waargenomen bij patiënten met prostatovesiculitis (Schirren, 1961; Hellinga, 1966). De bepaling van allerlei chemische stoffen in het spermoplasma geeft een indruk van de bijdrage van de verschillende accessoire geslachtsorganen. Zodoende wordt noodzakelijke informatie omtrent de gezondheidstoestand verkregen. Zo kan bij een verminderde hoeveelheid zure fosfatase een verminderde prostaatfunctie worden aangetoond.

7.4 Doel van het onderzoek

Bij de mens zijn er aanwijzingen dat spermoplasma de beweeglijkheid van de zaadcellen kan beïnvloeden (Mann, 1964; Singh et al, 1969; Lindholmer, 1974; Lindholmer en Eliasson, 1974; Velazquez, 1977). In publikaties over spermoplasma (Polakoski en Zaneveld, 1977; Eliasson et al 1978) wordt vaak het belang van het onderzoek gemotiveerd door te verwijzen naar een aantal experimenten uitgevoerd door Rozin aan het einde van de vijftiger jaren (Rozin, 1958 en 1961). Deze bestudeerde het effect van suspensie van zaadcellen van oligosperme patiënten in spermoplasma van vruchtbare mannen. Het "gezonde" spermoplasma verhoogde de beweeglijkheid bij 14 van de 17 gevallen. Bij 17 uit een groep van 21 vruchtbare mannen, waarvan de zaadcellen werden gesuspenderd in spermoplasma van oligosperme patiënten, werd aangetoond dat de beweeglijkheid verminderde. Anderen hebben deze resultaten bevestigd zonder hierover echter gegevens te verstrekken (Polakoski et al, 1976; Polakoski en Zaneveld, 1977; Eliasson et al, 1978). Rozin stelde vast dat de methode van donor-spermoplasma kan worden gebruikt voor kunstmatige inseminatie. Dit is een riskante therapie daar nooit met zekerheid te zeggen is of het gebruikte donor-spermoplasma wel geheel vrij is van donor-zaadcellen.

In een andere studie werd bij 4 donoren aangetoond dat heteroloog spermoplasma de beweeglijkheid niet veranderde (Freund, 1962). De

vruchtbaarheid van deze donoren was echter niet bekend, zodat vergelijking met het werk van Rozin moeilijk is.

Spermaplasma van mannen met verminderde vruchtbaarheid heeft soms een ongewone fysische samenstelling, zoals bijvoorbeeld een te hoge of een te lage viscositeit. Het is de vraag of zo'n ongewoon spermaplasma mogelijke gevolgen heeft voor de zaadcellen. Voor het experiment dat in dit hoofdstuk is beschreven werden een aantal onvruchtbare patiënten bestudeerd. Bij controle-onderzoek werd herhaaldelijk aangetoond dat het spermaplasma van deze patiënten een te hoge viscositeit of een te groot volume of een coagulaat had. Het effect van een incubatie van deze zaadcellen in "normaal" spermaplasma van vruchtbare donoren en vice versa werd bestudeerd met behulp van de hamstereiceltest en meervoudige belichtingsfotografie. Tegelijkertijd werd de invloed van kweekmedium op de beweeglijkheid bestudeerd.

7.5 Methoden

Acht patiënten met een infertiliteitsduur van 3 tot 8 jaar en met normale aantallen zaadcellen ($22-61 \times 10^6/\text{ml}$) en een lage beweeglijkheid (10-20%) werden bestudeerd. Het spermaplasma van deze patiënten was steeds afwijkend (tabel 7.1). Als controle werden ejaculaten van 5 vruchtbare donoren gebruikt. Deze hadden normale aantallen zaadcellen ($53-116 \times 10^6/\text{ml}$), een normale beweeglijkheid (45-75%) en geen waarneembare afwijking van het spermaplasma.

Nadat het sperma was vervloeid werd het bij 1500g gedurende 30 minuten gecentrifugeerd. Het supernatant spermaplasma werd voorzichtig verwijderd en gecontroleerd op de aanwezigheid van zaadcellen. Eventueel werd de centrifugering herhaald. Het spermaplasma werd ingevroren en bewaard bij -20°C .

Het ingevroren spermaplasma werd enige weken later ontdooid en het tweede ejaculaat werd verzameld in 50 ml medium (5.4) om het contact van de zaadcellen met homolog spermaplasma te minimaliseren. De suspensies werden gefiltreerd en gecentrifugeerd. De pellets werden opgelost in ontdooid zaadcelvrij homolog spermaplasma of heteroloog spermaplasma of medium waaraan 5% polyvinylpyrrolidon was toegevoegd. Experimenten met ejaculaat van de 8 patiënten werden gekoppeld aan experimenten met zaadcellen van 5 donoren, waardoor 29 spermaplasma-suspensies werden verkregen (tabel 7.1) en 13 medium-suspensies. De concentratie werd gesteld op $50-90 \times 10^6$ zaadcellen/ml. De suspensies werden gedurende 7

Tabel 7.1 Bevruchting van eischilvrije hameterioellen door zaadcellen afkomstig van 5 vruchtbare mannen (A tot en met E) en 8 mannen met verminderde vruchtbaarheid (L tot en met S). De zaadcellen zijn gepreïncubeerd in homogloog of heterogloog spermoplasma.

Reden van het onderzoek (code)	zaadcellen van mannen met verminderde vrucht- baarheid gepreïncubeerd in		code	zaadcellen van vruchtbare mannen gepreïncubeerd in	
	homogloog	heterogloog		homogloog	heterogloog
	spermoplasma	spermoplasma (code)		spermoplasma	spermoplasma
coagulaat (L)	9/48 (19%)	11/48 (22%) (A)	A	22/46 (47%)	16/38 (42%) (L)
hoge viscositeit (M)	0/57 (0%)	0/31 (0%) (A)			19/38 (58%) (M)
coagulaat (N)	4/46 (9%)	0/39 (0%) (B)	B	50/54 (93%)	24/28 (86%) (N)
hoge viscositeit en coagulaat (O)	2/50 (4%)	0/32 (0%) (B)			34/48 (71%) (O)
hyperspermie (P)	0/45 (0%)	1/33 (3%) (B)			45/48 (94%) (P)
coagulaat (Q)	1/51 (2%)	2/47 (4%) (C)	C	7/35 (20%)	14/46 (30%) (Q)
hyperspermie (R)	0/32 (0%)	0/40 (0%) (D)	D	24/32 (75%)	32/44 (73%) (R)
hoge viscositeit (S)	0/29 (0%)	0/39 (0%) (E)	E	12/36 (33%)	4/44 (10%) (S)
gemiddelde (stan- daardafwijkingen)					
bevruchtingspercen- tages	4.3 ± 2.4	3.6 ± 2.7		53.6 ± 13.4	58.0 ± 10.2

uur bij 37°C geïncubeerd. Na 1, 3, 5 en 7 uur werden de suspensies gefotografeerd door middel van meervoudige belichtingsfotografie.

Een deel van de 29 homologe en heterologe suspensies werd na 2 uur incubatie in steriele buizen gepipetteerd. Na een aantal malen te zijn gecentrifugeerd werden de suspensies verder bewerkt ter bestudering van het in vitro bevruchtend vermogen.

7.6 Effecten van spermplasma en kweekmedium op de beweeglijkheid

De resultaten verkregen door meervoudige belichtingsfotografie van de suspensies na 1 uur incubatie waren hetzelfde als die verkregen na langere incubatie. Daar de kortste incubatie, fysiologisch het meest belangrijk is, worden alleen de resultaten daarvan in tabel 7.2 vermeld. Het gemiddelde percentage beweeglijkheid van de zaadcellen van de vruchtbare mannen was 45%. Er kon geen significante verandering worden aangetoond na incubatie van deze zaadcellen in spermplasma van patiënten (percentage beweeglijkheid gemiddeld 42%). Ook kon geen significante verandering worden geconstateerd, na incubatie van zaadcellen van patiënten in het spermplasma van donoren (gemiddeld 22 versus 16% beweeglijkheid).

Wel kon worden aangetoond dat de constantheid van snelheid van de zaadcellen van de onvruchtbare mannen verbeterde na incubatie in donor-spermplasma (tabel 7.2).

Deze resultaten zijn niet in volledige overeenstemming met de theorie van Rozin. De invloed van het spermplasma die hier kon worden aangetoond, was immers nihil. Verschillen tussen de beide studies zijn mogelijk beïnvloed door twee factoren. Allereerst werden de zaadcellen in het hier beschreven experiment, alvorens ze aan heteroloog spermplasma werden toegevoegd vrijwel niet aan homolog spermplasma blootgesteld. Bij de experimenten van Rozin (1958) en Freund (1962) daarentegen werden de zaadcellen gedurende vrij lange tijd in pellet-vorm bewaard. Een tweede belangrijk verschil tussen de beide studies en het hier beschreven experiment is de wijze van beweeglijkheids-kwantificatie.

Bij bovenstaand statistisch onderzoek wordt geen rekening gehouden met eventuele individuele verschillen. Zo kon worden aangetoond dat bij 3 van de 8 patiënten de beweeglijkheidsparameters 5-20% verbeterde onder invloed van donor-spermplasma. Dit kan worden verklaard doordat bij twee van deze patiënten de viscositeit van het homologe plasma was verhoogd.

Hoewel de hier bestudeerde donoren-en patiënten-populaties klein zijn, blijkt dat de kwaliteit van de beweeglijkheid -berekend door middel

Tabel 7.2 Invloed van homolog en heteroloog spermplasma en kweekmedium op de beweeglijkheid van zaadcellen na 1 uur incubatie bij 37°C (gemiddelden en standaardafwijkingen).

parameter	zaadcellen van	gesuspenseerd in spermplasma van		in medium
		vruchtbare man	onvruchtbare man	
percentage	vruchtbare man	45 ± 7	42 ± 9	61 ± 6*
beweeglijkheid	onvruchtbaar	16 ± 2	22 ± 3	23 ± 4
percentage	vruchtbaar	43 ± 8	40 ± 7	53 ± 8*
progressieve beweeglijkheid	onvruchtbaar	16 ± 3	19 ± 4	20 ± 3
gemiddelde benadering van de rechte lijn	vruchtbaar	0.64 ± 0.05	0.64 ± 0.08	0.76 ± 0.04*
	onvruchtbaar	0.76 ± 0.10	0.53 ± 0.03	0.75 ± 0.07*
gemiddelde snelheid	vruchtbaar	25 ± 1	32 ± 3	36 ± 5*
	onvruchtbaar	27 ± 3	23 ± 8	35 ± 2
gemiddelde snelheidsconstante	vruchtbaar	0.74 ± 0.03	0.67 ± 0.02*	0.72 ± 0.01
	onvruchtbaar	0.65 ± 0.03*	0.58 ± 0.06	0.73 ± 0.02*

* significant verschil tussen deze suspensies en de homologe zaadcellsuspensies, voor $p < 0.05$, afhankelijke student t-test.

van meervoudige belichtingsfotografie- tussen die populaties verschilt.

Kweekmedium heeft een gunstig effect op de beweeglijkheid van donorzaadcellen (tabel 7.2). Dit werd reeds door anderen waargenomen (Pauldon en Polakoski, 1977; Makler en Blumenfeld et al, 1979). Mogelijk wordt dit effect veroorzaakt door verlaging van de viscositeit. Bij de patiënten in dit onderzoek kon alleen een verbetering van slechts een aantal beweeglijkheidsparameters (gemiddelde benadering van de rechte lijn en de gemiddelde constantheid van snelheid) worden geconstateerd.

7.7 Effecten van spermplasma op de in vitro bevruchting

In tabel 7.1 worden de resultaten van de bevruchtingsexperimenten gegeven. Het gemiddelde bevruchtigingspercentage van de patiënten was 8% (spreiding 0-19%) en van de donoren 54% (spreiding 20-93%). Geen significante verandering kon worden aangetoond na incubatie in heteroloog spermplasma. Bij twee donor-suspensies verminderde de bevruchting meer dan 20% na incubatie in spermplasma van patiënten (O en S). Eerder werd aangetoond, dat een verschil van het percentage bevruchting van ejaculaten van dezelfde proefpersoon, dat groter is dan 20%, niet kan worden verklaard door experimentele variatie (4.6). Beide patiënten hadden een verhoogde viscositeit. Bij patiënt S werd zowel een effect op de beweeglijkheid als op de bevruchting aangetoond.

7.8 Conclusies

Verminderde vruchtbaarheid bij de man kan door vele factoren worden veroorzaakt. Uit Rozin's werk (1958, 1961) zou men kunnen concluderen, dat de aanwezigheid van abnormaal spermplasma een frequente oorzaak is van mannelijke onvruchtbaarheid. Uit bovenstaand onderzoek en uit een vorig experiment (5.4) blijkt echter, dat er alleen na een selectie van patiënten met waarneembare afwijkingen van het spermplasma, een effect op de in vitro bevruchting of wel op de beweeglijkheid -in individuele gevallen- kan worden aangetoond.

HOOFDSTUK 8

SPLIT-EJACULATIE EN ZAADCELPARAMETERS

8.1 Inleiding

Het ejaculatie-proces kan worden onderverdeeld in drie karakteristieke fasen. De ejaculatie begint, wanneer door de klieren van Cowper een geringe hoeveelheid vocht wordt afgescheiden. De tweede fase bestaat uit het vrijkomen van prostaatvocht en de inhoud van de vasa deferentia. Tegelijkertijd komen daarbij de produkten van de epididymides en testikels vrij. De derde fase wordt gekarakteriseerd door de afgifte van zaadblaasvocht. De totale ejaculatie bestaat uit een serie van ongeveer 7 tot 8 uitstotingen van sperma.

Door de pulsgewijze uitstoting van sperma en het gedeeltelijk samenvallen van de drie boven beschreven fasen, kunnen zaadcellen in vrijwel elke, met een bepaalde contractie corresponderende fractie worden teruggevonden. De verdeling van zaadcellen in het ejaculaat is daardoor echter niet homogeen (Broesike, 1911; Cary, 1930). Hoewel deze verdeling individueel verschilt, bevat in 80% van de gevallen de eerste helft van het totale ejaculaat-volume, de hoogste zaadcelconcentratie.

Zure fosfatase wordt voornamelijk in het eerste deel van het ejaculaat gevonden. Dit toont aan dat dit deel van het ejaculaat voornamelijk afkomstig is van de prostaat (Gutman en Gutman, 1941). In het tweede deel van het ejaculaat zijn grote hoeveelheden fructose aanwezig, hetgeen duidt op een bijdrage van de zaadblazen (Eliasson, 1976; Cohen et al, 1980).

In 1942 namen MacLeod en Hotchkiss waar, dat het eerste deel van het ejaculaat ongeveer 75% van de zaadcellen bevat. Dit is later door andere onderzoekers bevestigd (Farris en Murphy, 1960; Amelar en Hotchkiss, 1965; Eliasson en Lindholmer, 1972; Tauber et al, 1975; Delafontaine et al, 1976; Marmar et al, 1979). De heterogene verdeling van de zaadcellen werd door Amelar en Hotchkiss (1965) bij 86 patiënten onderzocht. Deze patiënten werden verzocht ejaculaat in twee gescheiden delen op te vangen. Bij 88% van de patiënten bleken er meer zaadcellen aanwezig te zijn in het eerste deel van het ejaculaat. Bij 6 % waren er meer zaadcellen aanwezig in het tweede deel. Bij 35 % had één van de delen een verhoogde viscositeit. Het bleek dat dit steeds de tweede fractie was. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door het ontbreken van proteolytische

enzymen in zaadblaasvocht.

In het eerste deel van het ejaculaat is het percentage beweeglijke zaadcellen vaak hoger dan in het tweede deel. Doordat zaadcellen gedurende het hele ejaculatie-proces vrijkomen, bevinden ze zich in verschillende milieu's. Volgens Lindholmer en Eliasson oefenen de verschillende chemische bestanddelen van deze milieu's een verschillende invloed uit op de zaadcellen. Dit zou tot gevolg hebben, dat er verschillen in beweeglijkheid en overleving ontstaan (Eliasson en Lindholmer, 1972; Lindholmer, 1974; Lindholmer en Eliasson, 1974). De verschillen in beweeglijkheid zouden volgens Lindholmer en Eliasson (1974) duidelijker worden naarmate de zaadcellen langer aan de verschillende spermaplasma's worden blootgesteld.

Het is herhaaldelijk waargenomen dat de subjectief bepaalde gradering van de beweeglijkheid, het hoogst is in het eerste deel van het ejaculaat (MacLeod en Hotchkiss, 1942; Farris en Murphy, 1960; Amelar en Hotchkiss, 1965; Lindholmer en Eliasson, 1974). Amelar en Hotchkiss vonden dat bij een groot deel van de split-ejaculaten van patiënten de eerste delen van de ejaculaten meer morfologisch normale zaadcellen bevatten, dan de laatste delen. Dergelijke verschillen konden in een ander onderzoek niet worden aangetoond (Eliasson en Lindholmer, 1972).

8.2 Klinische relevantie van split-ejaculatie

Uit het bovenstaande blijkt dat een verbetering van semen parameters op eenvoudige wijze met behulp van split-ejaculatie bereikt kan worden. Bij verminderde vruchtbaarheid kan men dit verschijnsel voor therapeutische doeleinden gebruiken. Split-ejaculatie kan in de volgende gevallen overwogen worden (overzicht volgens Cohen et al, 1980);

- bij oligospermie in combinatie met een slechte cervixslijm-penetratie.
- bij hyperspermie.
- bij een te hoge viscositeit van het spermaplasma.
- bij polyspermie; split-ejaculatie leidt dan tot vermindering van de hoeveelheid zaadcellen.
- eventueel bij een te lage beweeglijkheid.

Twee vormen van therapie worden toegepast. Allereerst kan de mannelijke partner geadviseerd worden om te zorgen dat alleen het eerste deel van het ejaculaat in de vagina terecht komt (Amelar en Hotchkiss, 1965). In de tweede plaats kan overwogen worden om kunstmatige inseminatie met de "beste" fractie toe te passen. Doordat er geen internationale criteria

zijn voor de evaluatie van kunstmatige inseminatie, is het moeilijk om het succes van deze therapie te bestuderen. Het percentage zwangerschappen dat door middel van deze therapie kan worden verkregen varieert tussen de 10 en de 60% (Amelar en Hotchkiss, 1965; Steinman en Taymor, 1977; Cohen et al, 1980).

8.3 Doel van het onderzoek

De beweeglijkheid van zaadcellen werd onderzocht in fracties van split-ejaculaten, met behulp van meervoudige belichtingsfotografie. Om de rol van het spermaplasma te onderzoeken werd de beweeglijkheid bestudeerd door de zaadcellen onmiddellijk na ejaculatie in een spermaplasma-vrije oplossing op te vangen. Om ook andere facetten van de ejaculatie-fysiologie te bestuderen werd aandacht besteed aan de zaadcelmorfologie en het in vitro bevruchtend vermogen van de zaadcellen in verschillende delen van het ejaculaat.

8.4 Statistische bewerking van de resultaten

De gegevens werden bewerkt met behulp van de tweezijdige variantie-analyse van Friedman. Indien een significantie werd aangetoond, dan werden de individuele groepen vergeleken met behulp van de Sign test.

Gegevens van experiment 1 werden vergeleken met gegevens van experiment 2 door variantie-analyse volgens een "split plot PQ-model". Gegevens van 3 donoren die aan beide experimenten hadden meegewerkt werden niet voor deze bewerking gebruikt. De gegevens van experiment 3 werden bewerkt met behulp van tweezijdige variantie-analyse.

8.5 Experiment 1: beweeglijkheid en morfologie van zaadcellen in split-ejaculaten

Van 19 donoren werden split-ejaculaten verkregen. Deze kregen instructies hun ejaculaat op te vangen in drie fracties, op de wijze die door Tauber en medewerkers (1975) werd beschreven. Dit houdt in dat het sperma van de eerste twee ejaculatoire contracties wordt opgevangen in de eerste beker (fractie 1) van een speciaal voor dit doel ontworpen driedelige opvangcontainer (Zaneveld en Polakoski, 1977). De volgende

twee contracties worden in de tweede beker opgevangen (fractie 2) en de overige contracties worden verzameld in de derde beker (fractie 3). Na vervloeiing van de fracties werden de volumina gemeten en de beweeglijkheid werd zowel subjectief als objectief bepaald.

Sperma-uitstrijkjes van de fracties werden gefixeerd en bestudeerd (4.3). De waarnemer werd niet op de hoogte gebracht van de oorsprong van het materiaal.

De beweeglijkheidsfactoren van de zaadcellen in de fracties zijn weergegeven in tabel 8.1. De hoogste zaadcelconcentratie en het hoogste percentage beweeglijke zaadcellen was aanwezig in het eerste deel van de ejaculaten, hetgeen in overeenstemming is met resultaten van anderen

Tabel 8.1 Gemiddelden en standaardafwijkingen van beweeglijkheidsparameters bepaald met behulp van meervoudige belichtingsfotografie (behalve de graderings score) van 3 fracties van split ejaculaten van 14 donoren.

parameter	split fractie nummer		
	1	2	3
zaadcelconcentratie (x 10 ⁶ /ml)	108 ± 17	47 ± 18	25 ± 7 *
percentage beweeglijkheid	44 ± 7	28 ± 6	19 ± 5 *
gemiddelde benadering van de rechte lijn	0.73 ± 0.03	0.75 ± 0.03	0.76 ± 0.05
gemiddelde snelheids- constante	0.67 ± 0.05	0.68 ± 0.08	0.64 ± 0.16
gemiddelde snelheid (µm/sec)	20 ± 2	21 ± 1	21 ± 2
graderings score (door de waarnemer)	2.7 ± 0.2	2.1 ± 0.3	1.5 ± 0.3 *

* significant verschil volgens "Friedman overall analyse", 0.01 < p < 0.001.

Tabel 8.2 Gemiddelden en standaardafwijkingen van beweeglijkheidsparameters bepaald met behulp van meervoudige belichtingsfotografie van 3 fracties van split ejaculaten opgevangen in kweekmedium (n=14).

parameter	split fractie nummer		
	1	2	3
percentage beweeglijkheid	42 ± 4	33 ± 3	27 ± 5 *
gemiddelde benadering van de rechte lijn	0.61 ± 0.05	0.58 ± 0.04	0.60 ± 0.05
gemiddelde snelheidsconstante	0.62 ± 0.06	0.64 ± 0.08	0.60 ± 0.07
gemiddelde snelheid (µm/sec)	31 ± 2	30 ± 2	32 ± 2

* significant verschil volgens "Friedman overall analyse", $0.01 < p < 0.001$

(8.1). De zaadcelconcentratie van fractie 1 was significant hoger dan die van fractie 3 ($p=0.001$). Het percentage beweeglijke zaadcellen van fractie 1 verschilde niet met die van fractie 2. Wel werden significante verschillen aangetoond tussen fracties 1 en 3 ($p=0.006$) en fracties 2 en 3 ($p=0.006$).

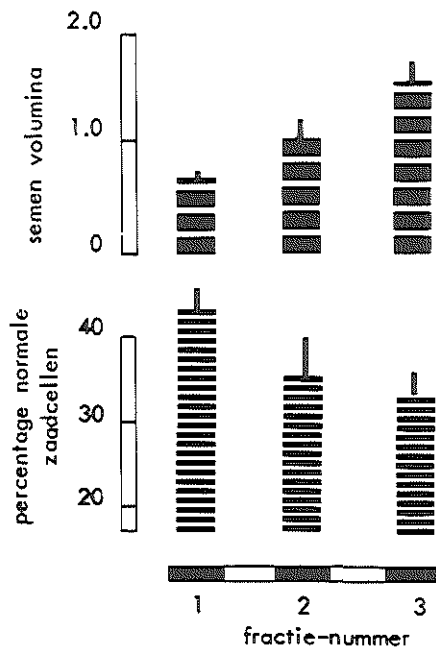
Het gemiddelde percentage beweeglijkheid van de verschillende fracties is 20-30% lager dan de waarden, die in de literatuur worden vermeld (MacLeod en Hotchkiss, 1942; Eliasson en Lindholmer, 1972). Dergelijke verschillen komen overeen met verschillen tussen subjectief en objectief bepaalde beweeglijkheidspercentages bij totale ejaculaten (3.6).

De gemiddelde snelheid, de gemiddelde constantheid van snelheid en de gemiddelde benadering van de rechte lijn verschillen niet significant tussen de fracties (tabel 8.1). Significante verschillen werden wel gevonden bij de subjectieve beoordeling. De beweeglijkheid van de zaadcellen uit de eerste fractie werd significant hoger geschat dan die van de laatste fractie ($p=0.001$). Dit is ook door anderen gevonden (8.1). Waarschijnlijk wordt de subjectieve schatting van de kwaliteit van de beweeglijkheid beïnvloed door het aantal bewegende deeltjes, dat door de

waarnemer wordt gezien. Deze overschat daardoor de beweeglijkheid van de zaadcellen in de eerste fractie.

Het is opmerkelijk dat er significant meer normale zaadcellen aanwezig waren in het eerste deel van de ejaculaten, in vergelijking met het laatste deel ($p=0.001$). Bij 15 van de 19 donoren konden verschillen in morfologie tussen de fracties worden geconstateerd (figuur 8.1). Een dergelijk verschil werd ook gevonden door Amelar en Hotchkiss (1965) bij 26 van 57 patiënten. Bij 29 overige patiënten was er geen verschil, terwijl bij 2 patiënten er meer normale zaadcellen in de laatste fractie aanwezig waren. Er is geen fysiologisch mechanisme bekend, dat deze verschillen verklaart.

Figuur 8.1 Semen volumina en percentages normale zaadcellen van fracties van split ejaculaten van 19 donoren. Friedman analyse voor beide parameters: $0.01 < p < 0.001$.



8.6 experiment 2: beweeglijkheid van zaadcellen in split-ejaculaten opgevangen in medium

Dit experiment werd met 14 donoren gedaan. Deze werden zoals voorheen beschreven, geïnstrueerd (8.5). De bekertjes van de opvangcontainer werden echter tevoren gevuld met 25 ml medium. De medium-sperma mengsels werden gefiltreerd en met medium aangevuld tot 30 ml. De mengsels werden daarna tweemaal bij kamertemperatuur, gedurende 5 minuten (600 g) gecentrifugeerd. De spermaplasmavrije pellet werd in 0.1-3.0 ml medium opgelost, op zodanige wijze dat de zaadcelconcentraties vergelijkbaar werden ($30-50 \times 10^6/\text{ml}$). De uiteindelijke verdunningen werden gefotografeerd.

De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in tabel 8.2. Ondanks het geringe contact tussen het spermaplasma en de zaadcellen werd wederom aangetoond, dat het percentage beweeglijkheid van de eerste fractie significant hoger is dan dat van de tweede en derde fractie (respectievelijk $p=0.01$ en 0.05). Het percentage beweeglijkheid van fractie 2 was eveneens hoger dan dat van fractie 3 ($p=0.01$). Andere beweeglijkheidsfactoren waren niet verschillend (tabel 8.2). Deze resultaten zijn niet in overeenstemming met de gegevens van Lindholmer en Eliasson (1974). Deze namen waar dat de beweeglijkheid van de verschillende fracties onmiddellijk na ejaculatie, niet verschilde. Pas na enige uren zouden de verschillen duidelijker worden. Zij veronderstelden dat dit wordt veroorzaakt door verschillen in chemische samenstelling van de fracties. Dit fenomeen kan echter ook anders worden uitgelegd: zowel in het eerste deel als in het laatste deel van het ejaculaat, zijn direct na ejaculatie, als gevolg van coagulatie geen of vrijwel geen beweeglijke zaadcellen waarneembaar (7.2). De verschillen tussen de percentages beweeglijkheid van de fracties kunnen misschien verklaard worden door een synergisme van effecten veroorzaakt door verschillen in zaadcelmorfologie (8.5) en verschillen in samenstelling van het spermaplasma.

Het is bekend dat er een relatie is tussen de vorm van de zaadcel en de beweeglijkheid. Door Makler en Itzkovitz en medewerkers (1979) is een weliswaar geringe, maar significante positieve correlatie aangetoond tussen het percentage beweeglijkheid en het percentage normale zaadcellen. Ook bij de in hoofdstuk 4 beschreven groep patiënten kon een dergelijke relatie worden aangetoond ($n=109$, $r=0.24$, $p<0.02$). Voorts is herhaaldelijk waargenomen, dat het percentage normale zaadcellen van in medium opgezwoomen zaadcellen hoger was, dan het percentage normale

zaadcellen van niet-opgezwommen en dus niet-progressief beweeglijke zaadcellen.

Vergelijking van de gegevens van experiment 1 met de resultaten van experiment 2 toont aan dat door split-ejaculatie in medium de snelheid van de zaadcellen wel toeneemt ($F=44.52$, $p < 0.01$, $df=1$ en 25), maar dat de rechtlijnige verplaatsing vermindert ($F=8.86$, $p < 0.01$). De beweeglijkheidspercentages verschillen niet. Over het algemeen kan worden waargenomen dat verdunning van het spermplasma een bevorderende invloed uitoefent op de snelheid, waardoor de zaadcel een meer rechtlijnige beweging maakt. Dit laatste komt niet overeen met de hier beschreven resultaten. Wellicht zijn kortdurende contacten tussen spermplasma en zaadcellen noodzakelijk om een normale beweeglijkheid te krijgen.

8.7 Het in vitro bevruchtend vermogen van zaadcellen uit verschillende fracties van split-ejaculaten

Zestien donoren werden geïnstrueerd om ejaculaat in drie fracties op te vangen (8.5). Na liquefactie werden de fracties opgewerkt om uiteindelijk met hamstereicellen te worden geïncubeerd (2.2 en 2.3). Het in vitro bevruchtend vermogen werd alleen getest, indien voldoende hoeveelheden bewegende zaadcellen aanwezig waren. Daardoor konden fracties van 2 donoren niet worden vergeleken.

De beweeglijkheid van de zaadcellen, die met behulp van meervoudige belichtingsfotografie werd berekend, is weergegeven in tabel 8.3. Aangezien de donoren, die aan dit experiment meededen, niet dezelfde waren, als de donoren van experiment 1, kunnen de getallen van beide experimenten, niet in absolute zin worden vergeleken. Overeenkomstig de resultaten van experiment 1 werd aangetoond, dat de beweeglijkheidspercentages en de zaadcelconcentraties tussen de fracties significant verschillend zijn. De absolute aantallen (bewegende) zaadcellen van de fracties waren niet verschillend.

Zaadcellen uit de eerste fracties hadden een gemiddeld bevruchtingspercentage van 25%. Dit verschilt niet met het bevruchtingspercentage van de derde fractie (gemiddeld 22%, tabel 8.4). Dit wordt mogelijk veroorzaakt doordat, zoals door anderen werd aangetoond, in 10% van de ejaculaten, het laatste deel de meest bewegende zaadcellen bevat (Amelar en Hotchkiss, 1965). De hier gebruikte methode van driedelige ejaculatie vergroot de kans op een heterogene verdeling van de zaadcellen. In ongeveer 40% van de gevallen is de tweede fractie dan

Tabel 8.3 Verschillende parameters (gemiddelden en standaardafwijkingen) bepaald door meervoudige belichtingsfotografie van zaadcellen in fracties van split-ejaculaten, welke eveneens gebruikt werden om het in vitro bevruchtend vermogen te testen.

parameter	split fractie nummer			n	F	vrijheids- graden	p
	1	2	3				
zaadcelconcentratie (x 10 ⁶ /ml)	79 ± 20	90 ± 18	36 ± 10	16	3.3	2 en 30	< 0.05
concentratie bewe- gende zaadcellen (x 10 ⁶ /ml)	34 ± 10	27 ± 6	8 ± 4	16	3.9	2 en 30	< 0.05
totaal aantal zaadcellen (x 10 ⁶)	55 ± 17	77 ± 17	48 ± 13	16	1.1	2 en 30	n.s.*
totaal aantal bewe- gende zaadcellen (x 10 ⁶)	23 ± 8	24 ± 6	10 ± 3	15	1.8	2 en 28	n.s.*

* niet significant

Tabel 8.4 Het in vitro bevruchtend vermogen van zaadcellen uit split-ejaculaatfracties van 14 donoren (experiment 3). De bevruchtingspercentages van 2 verschillende fracties zijn statistisch vergeleken door ze te rangschikken volgens verschillende parameters.

vergelijkings- volgorde	percentage in vitro bevruch- ting van de fracties *		F	vrijheids- graden	p
	A	B			
eerste (A) versus derde fractie (B)	25 ± 4	22 ± 8	0.37	1 en 13	n.s**
fractie met hoogste (A) versus fractie met laagste percentage beweeglijkheid	23 ± 6	23 ± 7	0	1 en 13	n.s
fractie met hoogste (A) versus fractie met laagste zaadcelconcentratie (B)	33 ± 7	20 ± 7	6.7	1 en 13	< 0.05
fractie met hoogste (A) versus fractie met laagste concentratie bewegende zaadcellen (B)	32 ± 8	21 ± 6	4.4	1 en 13	n.s
fractie met hoogste (A) versus fractie met laagste aantal zaadcellen (B)	33 ± 8	17 ± 6	6.7	1 en 13	< 0.05
fractie met hoogste (A) versus fractie met laagste aantal bewegende zaadcellen	33 ± 8	19 ± 6	5.3	1 en 13	< 0.05

* gemiddelden en standaardafwijkingen.

** niet significant

relatief de beste. Een directe vergelijking van het in vitro bevruchtend vermogen van de eerste en de laatste fractie is niet reëel omdat het totaal aantal (bewegende) zaadcellen van de fracties individueel verschilt. Indien het in vitro bevruchtend vermogen van de zaadcellen uit de fracties wordt vergeleken, moet er dus met andere semen-parameters rekening worden gehouden. Om deze redenen werden de resultaten gehergroepeerd, zodat bijvoorbeeld de fracties met het hoogste aantal zaadcellen vergeleken kunnen worden met de fracties met het laagste aantal zaadcellen (tabel 8.4).

Uit de gegevens van tabel 8.4 blijkt, dat de bevruchtingspercentages van fracties, gerangschikt volgens afnemend percentage beweeglijkheid of afnemende concentratie bewegende zaadcellen, niet verschillend zijn. Daarentegen hebben fracties met hoge zaadcelconcentraties een hoger bevruchtend vermogen (gemiddeld 33%) dan fracties met lage zaadcelconcentraties (gemiddeld 20%). Een dergelijke relatie kan ook worden aangetoond, nadat de fracties gerangschikt werden volgens het aantal (bewegende) zaadcellen.

Bevruchtingspercentages van individuele split-ejaculaat fracties kunnen onderling vaak verschillen. Dit kan niet door experimentele variatie worden verklaard (4.6). Waarschijnlijk veroorzaakt de verdeling van de zaadcellen over het ejaculaat, belangrijke kwalitatieve verschillen.

Mogelijk is het in vitro bevruchtingspercentage van fracties van split-ejaculaten een belangrijke parameter voor de prognose van de inseminatie. Aangezien de zaadcelconcentratie en het aantal (bewegende) in de fractie aanwezige zaadcellen een invloed hebben op het bevruchtingspercentage kunnen dergelijke parameters mogelijk indirect een prognostische waarde hebben. Een dergelijke mogelijkheid werd reeds door Marmar en medewerkers (1979) geopperd, nadat deze een kleine groep patiënten waarbij inseminatie met split-fracties werd toegepast, hadden geëvalueerd. Helaas hebben deze onderzoekers alleen de concentratie bewegende zaadcellen geëvalueerd en geen andere parameters bij het onderzoek betrokken.

SAMENVATTING

Verminderde vruchtbaarheid of onvruchtbaarheid bij mannen kan door vele factoren veroorzaakt worden. In de meerderheid van de gevallen worden bij het sperma-onderzoek afwijkingen gevonden. Er bestaat geen absolute relatie tussen de kans op een zwangerschap en de uitslag van het sperma-onderzoek. Ook is het sperma-onderzoek van weinig belang voor de lokalisatie van het defect. Desalniettemin is het gebruikelijk nieuwe vruchtbaarheidstesten te evalueren in relatie tot één van de sperma-parameters, zoals de zaadcelconcentratie.

De meeste factoren die bij het sperma-onderzoek worden gemeten, gaan aan de werkelijke functie van de zaadcel voorbij. In het huidige onderzoek werd daarom het in vitro bevruchtend vermogen van zaadcellen van patiënten en donoren bestudeerd. Dit werd bepaald door de interactie met eischilvrije hamstereicellen te bestuderen. Eveneens werd het sperma-onderzoek geobjectiveerd door de beweeglijkheid fotografisch vast te leggen met behulp van meervoudige (stroboscopische) belichtingsfotografie. De fotografische informatie werd door middel van een reproduceerbare computertechniek in verschillende parameters gekwantificeerd.

Toepassing van de semi-automatische beweeglijkheidsmethode kan alleen geadviseerd worden, indien er meer ejaculaten worden bestudeerd. Toch kan men aan deze methode de voorkeur geven, omdat nieuwe parameters worden verkregen, die een indruk geven omtrent de (constantheid van de) snelheid en rechtlijnigheid van de voortbeweging (hoofdstuk 3). Deze laatste parameters zijn onafhankelijk van de zaadcelconcentratie, welke bij de subjectieve methode vaak een correcte beoordeling in de weg staat (hoofdstuk 8).

Na de ejaculatie moet de zaadcel eerst "rijpen" voordat deze een eicel kan bevruchten. Dit proces wordt capacitatie genoemd (hoofdstuk 2). Door de zaadcellen in vitro gedurende 6 uur te preïncuberen in een medium dat geen spermaplasma bevat, kunnen deze spontaan capaciteren. Een langere preïncubatie van 16 uur heeft geen invloed op de uiteindelijke bevruchting van de hamstereicel.

De bevruchting van zona-vrije hamstereicellen door menselijke zaadcellen kan het beste worden vastgesteld, wanneer er een reductie in de dichtheid van het kernmateriaal optreedt (decondensatie). Deze decondensaties zijn microscopisch goed waarneembaar (hoofdstuk 2). Doordat elke zaadcelluspensie met ongeveer 25 eicellen werd geïncubeerd,

kan de in vitro bevruchting in een bevruchtingspercentage (aantal bevruchte/totale aantal eicellen) worden gekwantificeerd. Het werd aangetoond dat dit een betrouwbare en reproduceerbare maat is voor het bestuderen van het in vitro bevruchtend vermogen (hoofdstuk 4).

Het bevruchtingspercentage is een karakteristieke parameter, welke varieert tussen 0 en 100 % (hoofdstuk 2). De percentages kunnen alleen objectief worden vergeleken, indien er tussen de 1 en 4 miljoen bewegende zaadcellen per milliliter worden geïncubeerd. Morfologisch abnormale zaadcellen kunnen in dezelfde mate als normale zaadcellen aan het eiceloppervlak binden.

Indien gewenst kan deze methode ook worden uitgevoerd in laboratoria die niet over proefdierfaciliteiten bezitten, door de eicellen op te slaan in vloeibare stikstof. Eicellen, die zonder eischil of binnen het oviduct waren ingevroren, hadden een hoge (55-93 %) overleving. Deze eicellen werden in dezelfde mate als niet-ingevroren eicellen bevrucht (hoofdstuk 2).

Het in vitro bevruchtend vermogen van 122 patiënten met verminderde vruchtbaarheid of onvruchtbaarheid en 26 vruchtbare donoren werd onderzocht (hoofdstuk 4). Het gemiddelde percentage bevruchting van de vruchtbare donoren was 54 % (spreiding 11-100 %). Indien een bevruchtingspercentage van 10 % of minder als negatief wordt beschouwd, dan hadden slechts 19 van de 79 patiënten, waarvan bij de vrouwelijke partner geen aantoonbare afwijking van het reproductie-systeem werd gevonden, een positieve test. Zaadcellen van patiënten (n=43) waarvan bij de vrouwelijke partner wel afwijkingen werden gevonden, hadden een grotere kans (54 %) op een positieve test. Bij 26 van deze patiënten was het sperma-onderzoek normaal. Tien daarvan hadden echter een negatieve test, hetgeen suggereert dat de verminderde vruchtbaarheid op het niveau van bevruchting kan worden gelokaliseerd (hoofdstuk 4).

Zaadcellen van oligosperme patiënten bevruchten eicellen in dezelfde mate als die van normosperme patiënten. Zaadcellen van patiënten met (onder andere) asthenospermie hadden veelal een lage in vitro bevruchting (93% van de testen negatief), in tegenstelling tot zaadcellen van patiënten met (onder andere) teratospermie (50% van de testen negatief).

Gegevens betreffende het induceren van zwangerschappen door de geteste patiënten werden verzameld (hoofdstuk 4). Daardoor kon worden aangetoond, dat een negatieve hamstereiceltest, geen absoluut bewijs hoeft te zijn voor onvruchtbaarheid. In drie gevallen werden zwangerschappen geconstateerd, welke waren geïnduceerd door patiënten met een in vitro bevruchtingspercentage van 0 %, enige maanden na het uitvoeren van de

testen. Daarentegen heeft een positieve hamstereiceltest mogelijk wel een klinische waarde, daar werd aangetoond dat zaadcellen van 16 patiënten met een kinderwens, die langer duurde dan 6 jaar (de kans op een zwangerschap is dan zeer gering), geen positieve testen hadden. Bij de patiënten kon worden vastgesteld, dat het percentage in vitro bevruchting, in tegenstelling tot andere parameters, gecorreleerd was met de duur van de kinderwens.

Significante maar lage correlaties werden gevonden tussen het percentage in vitro bevruchting enerzijds en het percentage normale zaadcellen (n=109) en de zaadcelconcentratie van het sperma anderzijds. Een matige correlatie werd gevonden tussen de concentratie beweeglijke zaadcellen in het ejaculaat en het percentage in vitro bevruchting (n=63). Hoge bevruchtingspercentages werden alleen gevonden bij zaadcellen afkomstig van sperma, waarin de zaadcellen met matige snelheid bewogen (hoofdstuk 5).

Toevoeging van zaadcelagglutinatie-positief serum aan sperma gedurende korte tijd, veroorzaakte zelfs bij zeer grote verdunning (1/800) een remming van de in vitro bevruchting, ondanks de aanwezigheid van voldoende bewegende zaadcellen in het incubatiemedium (hoofdstuk 5).

Cryopreservatie van sperma (hoofdstuk 6) vermindert de beweeglijkheid en de in vitro bevruchting significant. Bij circa 15 % van de donoren is het in vitro bevruchtingspercentage vóór en na de cryopreservatie gelijk. Verschillende invriessnelheden bleken geen verschillend effect op het bevruchtend vermogen na ontdooien te hebben (n=5). Ook konden geen verschillen tussen de beschermende werking van glycerol en eigeelmedium worden aangetoond (n=9). Wel werd vastgesteld dat zaadcellen, welke in een omgeving van 4°C werden ontdood, significant minder eicellen bevruchten, dan zaadcellen die bij kamertemperatuur of bij 37°C werden ontdood. Een hoge in vitro bevruchting van verse zaadcellen bleek niet altijd een garantie te zijn voor een hoge bevruchting na cryopreservatie.

De invloed van abnormaal spermoplasma op de zaadcellen werd in een aantal experimenten bestudeerd (hoofdstuk 5, 7 en 8). Verdunning van sperma van patiënten (n=40) direct na de ejaculatie, veroorzaakte een significante verhoging van de in vitro bevruchting. Met name bij 5 van de 12 patiënten met hoog visceus spermoplasma bleek deze methode effectief te zijn. Incubatie van zaadcellen van 8 patiënten met abnormaal spermoplasma in heteroloog spermoplasma van donoren, bleek geen significant effect te hebben op de in vitro bevruchting en de beweeglijkheid. Bij 3 patiënten met een hoge viscositeit van het spermoplasma, kon echter wel een verbetering worden waargenomen. Om de invloed van het spermoplasma op de

zaadcellen in verschillende fracties van split-ejaculaten te bestuderen, werd de beweeglijkheid van de zaadcellen in ejaculaten, die in drie delen waren verzameld (n=19), vergeleken met die van split-ejaculaten, welke in medium werden opgevangen (n=14). In beide gevallen was het percentage beweeglijkheid van het eerste deel van de split-ejaculaten significant hoger dan die van het laatste deel. Dit fenomeen kan ten dele verklaard worden uit de waarneming, dat bij split-ejaculaten van 15 van 19 donoren er in vergelijking met de derde fractie, meer normale zaadcellen in de eerste fractie aanwezig waren.

Gemiddeld was het bevruchtingspercentage (25 %) van de eerste fracties van split-ejaculaten van 16 donoren gelijk aan dat van de laatste fracties (22 %). Daarentegen hadden fracties met hoge zaadcelconcentraties en fracties met een hoog aantal (bewegende) zaadcellen een significant hogere in vitro bevruchting dan fracties met lage waarden.

SUMMARY

Male infertility can be caused by a variety of factors. In most of the cases the disorder can be confirmed by abnormalities in the semen. A clear prognosis can not be made on the basis of data obtained from several semen analyses only. Due to the complexity of the male reproductive system it is difficult to trace the origin of the anatomical or biochemical defect. Nevertheless numerous tests for the evaluation of infertility have been proposed. It is regrettable that the majority of these potential tests has been related to the semen analysis as the only criterium for fertility.

Most of the semen parameters give insufficient information about the actual function of the spermatozoa. Therefore the present study was undertaken in order to assess the in vitro fertilizing capacity of spermatozoa from subfertile and infertile patients and fertile or presumably fertile donors. The fertilization process was studied by using the in vitro fertilizing ability of human spermatozoa in penetrating zona-free hamster ova. Likewise part of the routine semen analysis was objectively analysed by using a multiple exposure photography method. Sperm images visible on photographs were stored into a minicomputer and sperm counts as well as several motility parameters were quantified.

Application of the semi-automatic motility analysis system is only advisable if several ejaculates have been studied. This disadvantage applies to other motility determination techniques as well. However the presented method is preferred because it has the advantage, that several parameters describing the speed and the linearity of movement of the spermatozoa can be obtained (chapter 3). The parameters are assessed independently from the sperm concentration, which otherwise interferes with the estimated quality of motility (chapter 8).

Spermatozoa are not able to fertilize immediately after ejaculation, but acquire this ability soon after they have matured or capacitated (chapter 2). Spermatozoa preincubated in seminal plasma-free medium capacitate within 6 hours after ejaculation, but a longer preincubation of 16 hours does not diminish the fertilizing capacity of the spermatozoa.

The best criteria for fertilization of zona-free hamster ova by human spermatozoa can be established during the stage of decondensation prior to the formation of the male pronucleus (chapter 2). The decondensed sperm heads can be observed accurately. The fertilization assay is quantified by determining the fertilization percentage. Therefore more or less 25 ova

were incubated with each tested sperm suspension. It has been demonstrated that the in vitro fertilization percentage is a reliable and reproducible parameter for studying the in vitro fertilizing capacity (chapter 4).

The in vitro fertilization percentage varies between 0 and 100 % depending on the tested individual (chapter 2). Objective comparisons between the data are allowed when $1-4 \times 10^6$ motile spermatozoa per milliliter are incubated with the ova. Morphologically abnormal spermatozoa attach to the ova surfaces to the same extent as do normal spermatozoa.

Zona-free hamster ova frozen and stored in liquid nitrogen survived as well as ova which were frozen inside the oviduct. Human spermatozoa fertilize frozen-thawed hamster ova as frequently as nonfrozen controls (chapter 2). Therefore it was concluded that this fertilization test can be applied when laboratory animal facilities are not at hand.

The in vitro fertilizing capacity of 122 subfertile or infertile patients and 26 fertile donors was investigated (chapter 4). The average in vitro fertilization percentage of the fertile donors was 54 % (range 11-100 %). Tests below the lowest donor value (11 %) were considered to be negative assays. It has been shown that 19 out of a group of 79 patients (24 %) from which the partners did not show evidence of reproductive dysfunction penetrated the ova in the same order as fertile donors. Spermatozoa from patients (n=43) whose partners showed evidence of reproductive dysfunction had more frequently positive assays (54 %). In 26 of these cases the semen analyses were considered to be in the normal range. However 10 patients from this group had a negative test, which shows that the fertilization assay can be used for the understanding of idiopathic infertility (chapter 4).

Spermatozoa from oligospermic patients fertilize ova to the same extent as normospermic patients. Fifty percent of the patients with teratozoospermia had negative assays, whereas 93 % of the patients with asthenozoospermia had negative assays.

Spontaneous pregnancies induced after the fertilization tests were performed, were registered (chapter 4). It was demonstrated that a negative assay does not necessarily mean that the patient is sterile. Since in three cases pregnancies were induced by patients which had fertilization percentages of 0 %. On the other hand a positive assay may indicate a higher chance of in vivo fertilization. Spermatozoa from 16 patients with a long duration of infertility (more than 6 years) did not have positive in vitro fertilization percentages. It is known that the

chance of a pregnancy in such cases is extremely low. Significant negative correlations were found between the duration of infertility of the patients and the in vitro fertilization percentages. Other semen values were not related to this important factor.

Significant but low correlations could be demonstrated between the percentage in vitro fertilization on the one hand and the percentage normal spermatozoa (n=109) and the sperm concentration (n=63) on the other hand. A moderate correlation was found between the concentration of motile spermatozoa in the ejaculates of 63 patients and the percentage in vitro fertilization. High fertilization rates could only be encountered in sperm suspensions in which the spermatozoa progressed with a moderate speed (chapter 5).

Administration of diluted (until 1/800) serum containing autoagglutinating antibodies to sperm during a short period decreased the in vitro fertilizing capacity of none agglutinated motile spermatozoa (chapter 5).

Cryopreservation of semen (chapter 6) results in a significant decrease of sperm motility and in vitro fertilizing capacity. Freeze-thawed spermatozoa of 15 % of the donors penetrated the ova in the same extent as did prefreeze spermatozoa. Two different freezing trajectories (slow and medium slow) and two cryoprotective media (glycerol and an egg-yolk-glucose-citrate extender) were employed. The in vitro fertilizing ability of freeze-thawed spermatozoa frozen according these different methods did not differ from each other. Sperm thawed at a temperature of 4°C fertilized significantly less ova than sperm thawed at room temperature or 37°C. It was observed that a high in vitro fertilizing capacity of pre-freeze sperm was not always a guarantee for a high post-thaw in vitro fertilization.

The influences of abnormal seminal plasma on the spermatozoa were studied in several experiments (chapters 5, 7 and 8). Immediate separation of seminal plasma from the spermatozoa caused a significant increase of the in vitro fertilization in a group of 40 patients (chapter 5). This procedure showed to be especially effective in 5 out of a group of 12 patients with high viscosity. Incubation of the spermatozoa from 8 patients with abnormal seminal plasma, in normal heterologous seminal plasma from fertile donors, did not show to have a significant beneficial effect. However the in vitro fertilizing capacity and/or the motility of spermatozoa from 3 of these patients with high viscosity of the seminal plasma was increased by incubation in heterologous seminal plasma.

The motility of spermatozoa in 3 fractions of split ejaculates from 19 donors was compared to data from 14 donors, who were instructed to collect the fractions in containers filled with medium. In both cases the percentage motility of the first part of the ejaculates was shown to be higher than the last part. This phenomenon could partly be explained by the results of another experiment, in which it was shown that the first fractions of split ejaculates from 15 out of a group of 19 donors contained more normal spermatozoa than the last fractions.

The in vitro fertilization percentages (average 25 %) of the first fractions of split ejaculates from 16 donors were comparable to the last fractions (average 22%). Fractions with high sperm concentrations or high numbers of (motile) spermatozoa had a significantly higher in vitro fertilizing capacity as compared to fractions with low semen values.

The study presented in this thesis is partly based on data presented in the following manuscripts:

In vitro fertilizing capacity of fresh and cryopreserved human spermatozoa. A comparative study of different freezing and thawing procedures.

by J. Cohen, P. Felten and G.H. Zeilmaker.
Fertility and Sterility, 36: 356-362 (1981).

Motility and morphology of human spermatozoa in split ejaculates.
by J. Cohen, R. Euser, P.E. Schenck, F.W. Brugman and G.H. Zeilmaker.
Andrologia 13(5): 491-498 (1981).

Fertilizing ability and motility of spermatozoa from fertile and infertile men after exposure to heterologous seminal plasma.
by J. Cohen, M. Mooyaart, J.T.M. Vreeburg, R. Yanagimachi and G.H. Zeilmaker.
In: Instrumental insemination. Clinic in Andrology series.
Editor: E.S.E. Hafez. In press.

Fumarase activity in human ejaculates shows no relationship with sperm-motility or penetration ability of zona-free hamster eggs.
by J.H. Aafjes, J. Cohen, H. J. Wolfensperger-van Oort and J.T.M. Vreeburg.

Andrologia, in press.

In vitro fertilizing capacity of human spermatozoa using zona-free hamster ova. Interassay variation and prognostic value.

by J. Cohen, R.F.A. Weber, J.C.M. van der Vijver and G.H. Zeilmaker.

Submitted for publication.

Fertilization of hamster ova by human spermatozoa in relation to other semen parameters.

by J. Cohen, M. Mooyaart, J.T.M. Vreeburg and G.H. Zeilmaker.

International journal of Andrology, accepted for publication.

Effects of purification or split-ejaculation of semen and stimulation of spermatozoa on motility and in vitro fertilizing ability.

by A.J. Weeda and J. Cohen. Submitted for publication.

IN DE TEKST VERMELDE REFERENTIES

- Aafjes, J.H. en J.C.M. van der Vijver: 354 mannen met verminderde vruchtbaarheid. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 120: 865-873 (1976).
- Aafjes, J.H., J.C.M. van der Vijver, R. Docter en P.E. Schenck: Serum gonadotropins, testosterone and spermatogenesis in subfertile men. *Acta Endocr., Copnh.* 86: 651-658 (1977).
- Aafjes, J.H., J.C.M. van der Vijver en P.E. Schenck: Value of a testicular biopsy rating for prognosis in oligozoospermia. *Br. med. J.* 1: 289-290 (1978a).
- Aafjes, J.H., J.C.M. van der Vijver en P.E. Schenck: The duration of infertility: an important datum for the fertility prognosis of men with semen abnormalities. *Fert. Steril.* 30: 423-425 (1978b).
- Aafjes, J.H.: Persoonlijke mededeling (1981).
- Aitken, R.J.: Tubal and uterine secretions: the possibilities for contraceptive attack. *J. Reprod. Fert.* 55: 247-254 (1979).
- Aloisi, M.: Biology in the eighteenth century as seen through the letters of L. Spallanzani to C. Bonnet. *Acta med. Hist. patav.* 21: 9-26 (1974).
- Amann, R.P.: Computerized measurements of sperm velocity and percentage of motile sperm. In: *The spermatozoon*, pp. 431-435. Eds. D.W. Fawcett en J.M. Bedford. Baltimore: Urban und Schwarzenberg (1979).
- Amelar, R.D. en R.S. Hotchkiss: The split ejaculate, its use in the management of male infertility. *Fert. Steril.* 16: 46-60 (1965).
- Amelar, R.D.: Infertility in men, pp. 34-36. Philadelphia: F.A. Davis Co. (1966).
- Amelar, R.D., L. Dubin en C. Schoenfeld: Sperm motility. *Fert. Steril.* 34: 197-215 (1980).
- Ansari, A.H.: Repeated freeze-thawing for assessment of semen freezability. In: *Homologous artificial insemination (AIH)*, pp. 177-185. Eds. J.C. Emperaire, A. Audebert en E.S.E. Hafez. Amsterdam: Martinus Nyhoff (1980).
- Ansbacher, R.: Artificial insemination with frozen spermatozoa. *Fert. Steril.* 29: 375-379 (1978).
- Aristoteles: *Historia Animalium*, boek III(22), pp. 233-235. Engelse vertaling, A.L. Peck. London: Harvard University Press (1965).
- Atherton, R.W., E.W. Radany en K.L. Polakoski: Spectrophotometric quantitation of mammalian spermatozoon motility. I. Human. *Biol. Reprod.* 18: 624-628 (1978).

- Austin, C.R.: The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature, Lond.* 170: 326 (1952).
- Austin, C.R.: Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1: 310-311 (1960).
- Austin, C.R.: The mammalian egg, PP. 98-100. Oxford: Blackwell scientific publications (1961).
- Austin, C.R. Unusual and abnormal forms of fertilization. In: *Fertilization*, pp. 109-123. Ed. C.L. Markert. New Jersey: Prentice-Hall (1965).
- Austin, C.R.: Membrane fusion events in fertilization. *J. Reprod. Fert.* 44: 155-166 (1975).
- Austin, C.R. en M.W.H. Bishop: The role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc. R. Soc. Lond.* 149: 241-248 (1958).
- Barros, C.: Capacitation of mammalian spermatozoa. In: *Physiology and genetics of reproduction, part B*, pp. 3-24. Eds. E.M. Coutinho en F. Fuchs. New York: Plenum press (1974).
- Barros, C., J. Gonzalez, E. Herrera en E. Bustos-Obregon: Fertilizing capacity of human spermatozoa evaluated by actual penetration of foreign eggs. *Contraception* 17: 88-92 (1978).
- Barros, C., J. Gonzalez, E. Herrera en E. Bustos-Obregon: Human sperm penetration into zona free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. *Andrologia* 1: 197-210 (1979).
- Beck, K.J., P.S. Schönhofer, O.E. Rodermund, V. Dinnendahl en H.D. Peters: Lack of relationship between cyclic nucleotide levels and spermatozoal function in human sperm. *Fert. Steril.* 27: 403-406 (1976).
- Bedford, J.M.: Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. *Am. J. Anat.* 123: 329-358 (1968).
- Bedford, J.M.: Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 8: 19-26 (1969).
- Bedford, J.M.: The rate of sperm passage into the cervix after coitus in the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 25: 211-218 (1971).
- Bedford, J.M. en M.C Chang: Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high speed centrifugation. *Am. J. Physiol.* 202: 179-181 (1962).
- Bedford, J.M.: Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: *Handbook of Physiology, section 7, vol.V*, pp. 303-317. Eds. D.W. Hamilton en R.O. Greep. Baltimore: Waverly Press Inc. (1975).

- Bedford, J.M., H. Calvin en G.W. Cooper: The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 18: 199-213 (1933).
- Behrman, S.J. en D.R. Ackerman: Freeze preservation of human sperm. *Am. J. Obst. Gynec.* 103:654-663 (1969).
- Behrman, S.J. en Y. Sawada: Heterologous and homologous inseminations with human sperm frozen and stored in a liquid nitrogen refrigerator. *Fert. Steril.* 17: 457-466 (1966).
- Belonoschkin, B.: Biologie der spermatozoa in menschlichen Höden und Nebenhöden. *Arch. Gynäk.* 174: 357-366 (1943).
- Bendich, A., E. Borenfreund en S. Sternberg: Penetration of somatic mammalian cells by sperm. *Science* 183: 857-859 (1974).
- Bevington, P.R.: Least-squares fit to a straight line, pp. 104-106. In: *Data reduction and error analysis for the physical sciences.* New York: McGraw-Hill (1969).
- Binor, Z., J.E. Sokoloski en D.P. Wolf: Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm. *Fert. Steril.* 33: 321-326 (1980).
- Blandau, R.J.: In vitro fertilization and embryo transfer. *Fert. Steril.* 33: 3-11 (1980).
- Braden, A.W.H., C.R. Austin en H.A. David: The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *Aust. J. Biol. Sci.* 16: 391-409 (1954).
- Brackett, B.G., W. Baranska, W. Sawicki en H. Koprowski: Uptake of heterozygous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68(2): 353-357 (1971).
- Broer, K.H. en U. Dauber: A filtering method for cleaning up spermatozoa in cases of asthenospermia. *Int. J. Fert.* 23: 234-237 (1978).
- Broesike, G.: Über die Entleerung und Beschaffenheit der menschlichen Samenflüssigkeit. *Arch. f. mikros. Anat.* 78: 128-150 (1911).
- Bronson, R.A., G. Cooper, D.L. Rozenfeld en N. Miles: Ability of antibody bound human sperm to penetrate zona-free hamster ova in vitro. *Fert. Steril.* abstract 35:246 (1981).
- Bunge, R.G., W.C. Keettel en J.K. Sherman: Clinical use of frozen semen: report of 4 cases. *Fert. Steril.* 5: 520-529 (1954).
- Bunge, R.G.: Some observations on the male ejaculate. *Fert. Steril.* 21: 639-644 (1970).
- Chang, M.C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature, Lond.* 168: 697-698 (1951).
- Chang, M.C.: A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing ca-

- capacity of sperm. *Nature, Lond.* 179: 258-259 (1957).
- Chang, M.C.: Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature, Lond.* 184: 466-467 (1959).
- Cohen, J., A. Fari, W.J. Finegold, S. Propping en M.L. Taymor: The split ejaculate. In: Homologous artificial insemination (AIH), pp. 112-119. Eds. J.C. Emperaire, A. Audebert en E.S.E. Hafez. Amsterdam: Martinus Nyhoff (1980).
- Crabbe, M.J.C.: Enzyme assay for sperm motility. *Lancet* II(2): 1295 (1976).
- Crabbe, M.J.C.: The development of a quantitative assay for male infertility from a study of enzymes in human semen. *J. Reprod. Fert.* 51: 73-76 (1977).
- Cusine, D.J.: Artificial insemination with the husband's semen after the husband's death. *J. med. Ethics* 3: 163-165 (1977).
- David, M., A. Amit, A. Bergman, G. Yedwab, G.F. Paz en Z.T. Homonnai: Sperm penetration in vitro: correlations between parameters of sperm quality and the penetration capacity. *Fert. Steril.* 32: 676-680 (1979).
- Dop, P.A. van en R. Schoysman: Epididymal disorders in infertile, oligospermic males. *Isr. J. med. Sci.* (1981).
- Dor, J., E. Rudak en R.J. Aitken: Antisperm antibodies: their effect on the process of fertilization studied in vitro. *Fert. Steril.* 35: 535-541 (1981).
- Dubin, L. en R.D. Amelar: Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fert. Steril.* 22: 469-474 (1971).
- Dubin, L. en R.D. Amelar: A plea for a more scientific approach in the treatment of male infertility. *Fert. Steril.* 34: 74-75 (1980).
- Duyn, C. van, C. van voorst en M. Freund: Movement characteristics of human spermatozoa analysed from kinemicrographs. *Europ. J. Obstet. Gynec.* 4: 121-135 (1971).
- Edwards, R.G., R.P. Donahue, T.A. Baramki en H.W. Jones: Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 96: 192-200 (1966).
- Edwards, R.G., B.G. Bavister en P.C. Steptoe: Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature, Lond.* 221: 632-635 (1969).
- Eliasson, R.: Correlation between the sperm density, morphology and motility and the secretory function of the accessory genital glands. *Andrologia* 2: 165-169 (1971).

- Eliasson, R.: Standards for investigations of human semen. *Andrologia* 3: 49-62 (1971).
- Eliasson, R.: Parameters of male fertility. In: Human reproduction, pp. 39-51. Eds. E.S.E. Hafez en T.N. Evans. Maryland: Harpers and Row (1973).
- Eliason, R., S. Arver, O. Johnson, U. Kvist en C. Lindholmer: Some effects of human seminal plasma on the spermatozoa. *P. Serono Sy.* 14: 215-220 (1978).
- Eliasson, R. en Ch. Lindholmer: Distribution and properties of spermatozoa in different fractions of split ejaculates. *Fert. Steril.* 23: 252-256 (1972).
- Elsevier, S.M. en F.H. Ruddle: Haploid genome reactivation and recovery by cell hybridization. *Chromosoma* 56: 227-241 (1976).
- Encyclopaedia Judaica: Talmudische verhandeling betreffende de huwbaarheid van een zwangere maagd met een hogepriester (Hagigah 15a) deel 3: 660-661 (1971).
- Ericsson, R.J.: Isolation and storage of progressively motile human sperm. *Andrologia* 9(1): 111-114 (1977).
- Ericsson, R.J., C.N. Langevin en M. Mishino: Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature, Lond.* 246: 421-424 (1973).
- Fair, W.R., R.B. Clark en N. Wehner: A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in the human. *Fert. Steril.* 23: 38-42 (1972).
- Farrant, J.: General principles of cell preservation. In: Frozen human semen, pp. 6-10. Eds. D.W. Richardson, D. Joyce en E.M. Symonds. Den Haag: Martinus Nyhoff (1980).
- Farrant, J., C.A. Walter, H. Lee en L.E. McGann: Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology*, 14: 273-286 (1977).
- Farris, E.J. en D.P. Murphy: The characteristics of the two parts of the partitioned ejaculate and the advantages of its use for intrauterine insemination. *Fert. Steril.* 11: 465-469 (1960).
- Fjallbrant, B.: Sperm agglutinins in sterile and fertile men. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 47: 89-101 (1968a).
- Fjallbrant, B.: Interrelation between high levels of sperm antibodies, reduced penetration of cervical mucus by spermatozoa and sterility in men. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 47: 102-118 (1968b).
- Fjallbrant, B. en D.R. Ackerman: Cervical mucus penetration in vitro by fresh and frozen-preserved human semen specimens. *J. Reprod. Fert.* 20: 515-517 (1969).

- Fleming, A.D., R. Yanagimachi en H. Yanagimachi: Fertilizability of cryo-preserved zona-free hamster ova. *Gamete Research* 2: 357-366 (1979).
- Fol, M.H.: Sur les phénomènes intimes de la fécondation. *C.R. Acad. Sci.Paris*, 84: 268-273 (1877a). Fol, M.H.: Sur le premier développement d'une Etoile de mer. *C.R. Acad. Sci.Paris*, 84: 357-360 (1877b).
- Fox, C.A., E.S. Wolff en J.A. Baker: Measurement of intravaginal and intra-uterine pressure during human coitus by radio-telemetry. *J. Reprod. Fertil.* 22: 243-251 (1970).
- Fraser, L.R.: Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *J. exp. Zool.* 202: 439-444(1977).
- Freund, M.: Interrelationships among the characteristics of human semen and factors affecting semen-specimen quality. *J. Reprod.Fertil.:* 143-159 (1962).
- Freund, M.: Standards for the rating of human sperm morphology. *Int. J. Fertil.* 11: 97-118 (1966).
- Freund, M.: Performance and interpretation of the semen analysis. In: *Management of the infertile couple*, pp. 48-66 Ed. M. Roland. Springfield: Thomas (1968).
- Friberg, J. en C. Gemzell: Inseminations of human sperm after freezing in liquid nitrogen vapors with glycerol or glycerol-egg-yolk-citrate as protective media. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 116: 330-334 (1973).
- Friberg, J. en C. Gemzell: Sperm freezing and donor insemination. *Int. J. Fertil.* 22: 148-154 (1977).
- Gaddum-Rosse, P., R.J. Blandau en W.I. Lee: Sperm penetration into cervical mucus in vitro. II Human spermatozoa in bovine mucus. *Fert. Steril.* 33: 644-648 (1980).
- Gautier, J.: De la fécondation artificielle. *Reforme medicale*, 372 (1867).
- Gottesman, I.S. en J. Bain: Subfertility and infertility in the male: a persistent dilemma. In: *Diagnosis in Andrology*, pp. 79-86. Eds. J. Bain en E.S.E. Hafez. Martinus Nyhoff (1980).
- Gregoire, A.T. en R.C. Mayer: The Impregnators. *Fert. Steril.* 16: 130-134 (1965).
- Gueneau de Mussy, N.: De quelques causes de stérilité de l'impuissance par cause morale, leur traitement. *Clin. Med.* (1875).
- Gutmacher, A.F.: Artificial insemination in sterility. *Proc. Inst. Postgrad. Med. Assembly North America*, 56 (1943).
- Gutman, A. en E.B. Gutman: Quantitative relations of a prostatic component

- (acid phosphatase) of human seminal fluid. *Endocrin.* 28: 115-118 (1941).
- Haesungcharern, A. en M. Chulavatnatol: Stimulation of human spermatozoal motility by caffeine. *Fert. Steril.* 24: 662-665 (1973).
- Hafez, E.S.E.: Gamete transport. In: *Human reproduction: conception and contraception*, pp. 85-118. Eds. E.S.E. Hafez en T.N. Evans. New York: Harper and Row (1973).
- Hafez, E.S.E.: Physiology of spermatozoa inseminated in the female reproductive tract. In: *Homologous artificial insemination (AIH)*, pp. 14-29. Eds. J.C. Emperaire, A. Audebert en E.S.E. Hafez. Den Haag: Martinus Nyhoff (1980).
- Hafez, E.S.E en C.R. Cunningham: Regulatory physiology of male accessory organs. In: *Regulation of male fertility*, pp. 35-39. Eds. C.R. Cunningham, W.-B. Schill en E.S.E. Hafez. Den Haag: Martinus Nyhoff (1980).
- Hall, J.L.: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fert. Steril.* 35:472-463 (1981).
- Hanada, A. en M.C. Chang: penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol. Reprod.* 6: 300-309 (1972).
- Hanada, A. en M.C. Chang: Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J. Reprod. Fert.* 46: 239-241 (1976).
- Harrison, R.F. en B.L. Sheppard: A comparative study in methods of cryoprotection for human semen. *Cryobiology* 17: 25-32 (1980).
- Hard, A.D.: Artificial impregnation. *Med. World* 27:163 (1909).
- Harvey, C.: The speed of human spermatozoa and the effect on it of various diluents, with some preliminary observations on clinical material. *J. Reprod. Fert.* 1:84-95 (1960).
- Harvey, C. en M. Johnson: Assessment of male fertility by semen analysis. *Lancet* 99: 134 (1945).
- Heller, C.G., W.O. Nelson, I.B. Hill, E. Henderson, W.O. Maddock, E.C. Jungck en G.E. Mortimere: Improvement in spermatogenesis following depression of the human testis with testosterone. *Fert. Steril.* 1: 415-422 (1950).
- Hellema, H.W.J. en Ph. Rümke: The micro-sperm immobilization test: the use of only motile spermatozoa and studies of complement. *Clin. exp. Immunol.* 31: 1-11 (1978).
- Hertwig, O.: Beiträge zur Kenntnis der Bildung, Befruchtung und Theilung des Thierischen Eies. *Morphol. Jahrbuch* 1: 347-434 (1876).

- Hinrichsen, M.J. en J.A. Blaquier: Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J. Reprod. Fert.* 60:291-294 (1980).
- Hirao, Y. en R. Yanagimachi: Detrimental effects of visible light on meiosis of mammalian eggs in vitro. *J. Exp. Zool.* 206:365-370 (1978).
- Hoagland, H. en G. Pincus: Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. *J. gen. Physiol.* 25: 337-334 (1942).
- Hommonnai, Z.T., H. Matzkin, N. Fainman, G. paz en P.F. Kraicer: The cation composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. *Fert. Steril.* 29: 539-542 (1978).
- Hommonnai, Z.T., G. Paz, A. Sofer, P.F. Kraicer en A. Harell: Effect of caffeine on the motility, viability, oxygen consumption and glycolytic rate of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa. *Int. J. Fert.* 21: 163-170 (1976).
- Home, E.: An account of the dissection of an hermaphrodite dog. To which are prefixed some observations on hermaphrodites in general. *Phil. Trans. R. Soc.* 1:158-178 (1799).
- Hoppe, P.C. en S. Pitts: Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol. Reprod.* 8: 420-426 (1973).
- Hotz, W. en D. Schmidt: The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J. Reprod. Fert.* 46: 227-229 (1976).
- Igboeli, G. en R.H. Foote: Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. *J. Dairy. Sci.* 51: 1703-1705 (1968).
- Jahnel, F.: Über die widerstandsfähigkeit von menschlichen spermatozoen gegenüber starker kalte. *Klin. Wschr.* 17: 88-89 (1938).
- 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* 1: 1-24 (1970).
- Jouannet, P., B. Volochine, P. Dégue, C. Serres en G. David: Light scattering determination of various characteristic parameters of spermatozoan motility in a series of human sperm. *Andrologia* 9: 36-49 (1977).
- Jouannet, P.: Measurement of human sperm motility based on an optical doppler effect. In: *The spermatozoon*, pp. 427-430. Eds. D.W. Fawcett en J.M. Bedford. Baltimore: Urban und Schwarzenberg (1979).
- Kanwar, K.C., R. Yanagimachi en A. Lopata: Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fert. Steril.* 31: 321-327 (1979).
- Katz, D.F. en J.W. Overstreet: Biophysical aspects of human sperm movement. In: *The spermatozoon*, pp. 413-420. Eds. D.W. Fawcett en

- J.M. Bedford. Baltimore: Urban and Schwarzenberg (1979).
- Katz, D.F. en J.W. Overstreet: Sperm motility assessment by videomicrography. *Fert. Steril.* 35: 188-193 (1981).
- Katz, D.F.: The assessment of human semen. In: *Research in reproduction* 13: 2 (1980).
- Keel, B.A. en A.M. Karow: Motility characteristics of human sperm, nonfrozen and cryopreserved. *Arch. Androl.* 4: 205-212 (1980).
- Keetel, W.C., R.G. Bunge, J.T. Bradbury en W.O. Nelson: Repeat of pregnancies in infertile couples. *J. Am. med. Ass.* 160: 102-105 (1956).
- Koper, A., P.R. Evans, R.O.N. Whiterow, J.T. Flynn, M. Bayliss en J.P. Blandy: A technique for selecting and concentrating the motile sperm from semen in oligozoospermia. *Brit. J. Urol.* 51: 587-590 (1979).
- Kouwenhoven, P.: *Biometrie aan zaadcelmorfologie*. Doctoraalscriptie, Rotterdam (1981).
- Kremer, J.: A simple penetration test. *Int. J. Fert.* 10: 209-214 (1965).
- Kremer, J.: In vitro sperm penetration in cervical mucus and AIH. In: *Homologous artificial insemination*, pp. 30-37. Eds. J.C. Emperaire, A. Audebert en E.S.E. Hafez. Amsterdam: Martinus Nyhoff (1980).
- Kurzrok, R. en E.G. Miller: Biochemical studies of human semen and its relation to mucus of the cervix uteri. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 15(1): 56-72 (1928).
- Leeuwenhoek, A. van: *Observationes D. Anthonii Lewenhoek, de Natis e semine genitali Animalculis*. *Phil. Trans. R. Soc.* 12:1040-1043 (1677).
- Leeuwenhoek, A. van: An abstract of a letter from Mr. Anthony Leeuwenhoek writ to Sir C.W. *Phil. Trans. R. Soc.* 13: 74-81 (1683).
- Leibo, S.P.: Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In: *The freezing of mammalian embryos*, pp. 69-92. Amsterdam: Elsevier (1977).
- Lillie, F.R.: *Problems of fertilization*, pp. 140 en 227-240. Chicago: University of Chicago press (1919).
- Lindholmer, Ch.: Survival of human spermatozoa in different fractions of split ejaculates. *Fert. Steril.* 24 :521-526 (1973).
- Lindholmer, Ch.: The importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biol. Repr.* 10: 533-542 (1974).
- Lindholmer Ch. en R. Eliasson: The effects of albumin, magnesium and zinc on human sperm survival in different fractions of split ejaculates. *Fert. Steril.* 25: 424-431 (1974).

- Liu, Y.T. en Warne, P.K.: Computerized evaluations of sperm cell motility. *Comp. Biomed. Res.* 10: 127-138 (1977).
- Lode, A.: Untersuchungen über die Zahlen- und regenerations verhältnisse der Spermatozoiden bei Hund und Mensch. *Arch. fur die Gesamte Physiol.,L.*: 278-292 (1891).
- Lopata, A., J.B. Brown, J.F. Leeton, J.M. Talbot en C. Wood: In vitro fertilization of preovulatory oocytes and embryo transfer in infertile patients treated with clomiphene and human chorionic gonadotropin. *Fert. Steril.* 30: 27-35 (1978).
- Lopata, A., M.J. Patullo, A. Chang en B. James: A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fert. Steril.* 27: 667-684 (1976).
- Lovelock, J.E.: The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta* 11: 28-36 (1953).
- Luyet, B. en J. Keane: A critical temperature range apparently characterized by sensitivity of bull semen to high freezing velocity. *Biodynamica* 7: 281-292 (1955).
- MacLeod, J.: Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. *Int. J. fertil.* 9: 281 (1964).
- MacLeod, J.: The semen examination. *Clin. Obstet. Gynecol.* 18: 115-127 (1965).
- MacLeod, J.: The semen quality in relation to male infertility. In: *Fertility disturbances in men and women*, pp. 127-134. Ed. C.A. Joël. Basel: Karger (1971a).
- MacLeod, J.: Recent advances concerning the role of varicocele in male infertility. In: *Fertility disturbances in men and women*, pp. 268-277. Ed. C.A. Joël. Basel: Karger (1971b).
- MacLeod, J. en R.S. Hotchkiss: The distribution of spermatozoa and of certain chemical constituents in the human ejaculate. *J. Urol.* 48: 225-229 (1942).
- MacLeod, J. en R.S. Hotchkiss: Semen analysis in 1500 cases of sterile marriage. *Am. J. Obstet. Gynec.* 52: 34-41 (1946).
- MacLeod, J. en Y. Wang: male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fert. Steril.* 31: 103-116 (1979).
- MacMaster, R., R. Yanagimachi en A. Lopata: Penetration of human eggs by human spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 19: 212-216 (1978).
- MacNaughton, M.C.: Treatment of female infertility. *Clin. Endocrinol. Metab.* 2: 545-560 (1973).

- Macomber, D. en Sanders, M.B.: The spermatozoa count. Its value in the diagnosis, prognosis and treatment of sterility. *New Engl. J. Med.* 200: 981-984 (1929).
- Makler, A.: A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoal motility determination. *Fert. Steril.* 30: 192-198 (1978).
- Makler, A.: Index of longevity -a new defenition of an index for sperm quality evaluation. *Int. J. androl.* 2: 21-31 (1979a).
- Makler, A.: Simultaneous differentiation between motile, non-motile, live and dead human spermatozoa by combining supravital staining and multiple exposure photography procedures. *Int. J. Androl.* 2: 32-42 (1979b).
- Makler, A.: Use of the elaborated multiple exposure photography (MEP) method in routine sperm motility analysis and for research purposes. *fert. Steril.* 33: 160-166 (1980a).
- Makler, A.: Use of a microcomputer in combination with the multiple exposure photography technique for human sperm motility determination. *J. Urol.* 124: 372-374 (1980b).
- Makler, A. en Z. Blumenfeld: Optimum measurement time for human sperm velocity determination. *Arch. Androl.* 5: 189-194 (1980).
- Makler, A., Z. Blumenfeld, J.M. Brandes en E. Paldi: Factors affecting sperm motility. II Human sperm velocity and percentage of motility as influenced by semen dilution. *Fert. Steril.* 32: 443-449 (1979).
- Makler, A., J.Itzkovitz, J.M. Brandes en E. Paldi: Sperm velocity and percentage of motility in 100 normospermic specimens analysed by the multiple exposure photography (MEP) method. *Fert. Steril.* 31: 155-161 (1979).
- Makler, A., E. Makler, J. Itzkovitz en J.M. Brandes: Factors affecting sperm motility. IV. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein, and other metabolically active compounds. *Fert. Steril.* 33: 624-630 (1980).
- Makler, A., M. Tatcher en J. Mohilever: Sperm semi-autoanalysis by a combination of multiple exposure photography (MEP) and computer techniques. *Int. J.Fertil.* 25: 62-66 (1980).
- Makler, A., I. Zaidise, E. Paldi en J.M. Brandes: Factors affecting sperm motility. I In vitro change in motility with time after ejaculation. *Fert. Steril.* 31: 147-154 (1979).
- Mann, T.: Biochemical aspects of semen. In: *Mammalian germ cells*, pp. 1-8. Ed. G.E.W. Wolstenholme. Boston: Little, Brown and Company (1953).
- Mann, T.: *Biochemistry of semen and the male reproductive tract.* London: Methuen and Co. (1964).

- Mann, T. en C. Lutwak-Mann: Male reproductive function and semen, pp. 24. Berlin: Springer-Verlag (1981).
- Mantegazza, P.: Fisologia sulla sperma umano. Rendic. R. Inst. Lomb. (matem. Nat.) 3: 183-196 (1866).
- Marmar, J.L., S. Katz, D.E. Praiss en T.J. DeBenedictis: Semen zinc levels in infertile and postvasectomy patients and patients with prostatitis. Fert. Steril. 26: 1057-1063 (1975).
- Marmar, J.L., D.E. Praiss en T.J. DeBenedictis: An estimate of the fertility potential of the fractions of the split ejaculate in terms of the motile sperm count. Fert. Steril. 32: 202-205 (1979).
- Matheson, G.W., L. Carlborg en C. Gemzell: Frozen human semen for artificial insemination. Am. J. Obst. Gynec. 104: 495-501 (1969).
- Mazur, P., S.P. Leibo, J. Farrant, E.H.Y. Chu, M.G. Hanna en L.H. Smith: Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells, pp. 69-88. In: The frozen cell. Eds. G.E.W. Wolstenholme en M.O'Connor. London: Churchill (1970).
- Meel, F.C.M. van: In vitro reactivation of human spermatozoa. Proefschrift Leiden (1980).
- Menge, A.C.: Antiserum inhibition of rabbit spermatozoal adherence to ova. Proc Soc. Exp. Biol. Med. 138: 98-102 (1971).
- Menge, A.C.: Immunoandrology. In: Techniques of human andrology, pp.225-237. Amsterdam: Elsevier(1977).
- Menge, A.C. en C.S. Black: Effects of antisera on human sperm penetration of zona-free hamster ova. Fert. Steril. 32: 214-218 (1979).
- Menkin, M.F. en J. Rock: In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. Am. J. Obst. Gynec. 55: 440-452 (1948).
- Meryman, H.T.: Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. Nature, Lond. 218:333(1968).
- Milligan, M.P., S. Harris en K.J. Dennis: The effect of temperature on the velocity of human spermatozoa as measured by time-lapse photography. Fert. Steril. 30:592-594 (1978).
- Milligan, M.P., S. Harris en K.J. Dennis: Comparison of sperm velocity in fertile and infertile groups as measured by time-lapse photography. Fert. Steril. 34: 509-511 (1980).
- Mitchell, J.A., L. Nelson en E.S.E. Hafez: Motility of spermatozoa. In: Human semen and fertility regulation in man, pp. 83-99. Ed. E.S.E. Hafez. St.Louis: Mosby (1976).
- Miyamoto, H. en M.C. Chang: The importance of serum albumin and metabolic

- intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 32: 193-205 (1973).
- Moench, G.L. en H. Holt: Sperm morphology in relation to fertility. *Am. J. Obstet. Gynec.* 22: 199-210 (1931).
- Moghissi, K.S., D. Dabich, J. Levine en O.W. Neuhaus: Mechanism of sperm migration. *Fert. Steril.* 15: 15-23 (1964).
- Mooney, J.K., A.H. Haan en J.K. Lattimer: Motility of spermatozoa in the human epididymis. *J. Urol.* 108: 443-445 (1972).
- Nelson, L.: Neurochemical control of Arbacia sperm motility. *Exp. Cell Res.* 74: 269-274 (1972).
- Nelson, C.M. en R.G. Bunge: Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fert. Steril.* 25: 503-507 (1974).
- Newport, G.: On the impregnation of the ovum in the amphibia. And on the direct agency of the spermatozoon. *Phil. Trans. R. Soc.* 2: 233-290 (1853).
- Oliphant, G. en B.G. Brackett: Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. reprod.* 9: 404-414 (1973).
- Onanoff, M.J.: Recherches sur la fécondation et la gestation des mammifères(1) (conclusions). *Compt. Rend. Soc. Biol.* 45: 719 (1893).
- Orgebin-Christ, M.C. en N. Jahad: The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: inhibition by anti-androgens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology* 103: 46-53 (1978).
- Overstreet, J.W. en W.C. Hembree: Penetration of the zona pellucida of nonliving human oocytes by human spermatozoa in vitro. *Fert. Steril.* 27: 815-830 (1976).
- Overstreet, J.W., D.F. Katz, F.W. hanson en J.R. Fonseca: A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fert. Steril.* 31: 162-172 (1979).
- Overstreet, J.W., C. Coats, D.F. Katz en F.W. Hanson: The importance of seminal plasma for sperm penetration of human cervical mucus. *Fert. Steril.* 34: 569-572 (1980).
- Overstreet, J.W., J.E. Gould, D.F. Katz en F.W. Hanson: In vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. *Fert. Steril.* 34: 604-606 (1980).
- Overstreet, J.W., R. Yanagimachi, D.F. Katz, K. Hayashi en F.W. Hanson: Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg: a study of fertile donors and infertile patients.

- Fert. Steril. 33: 534-542 (1980).
- Parkening, T.A. en M.C. Chang: Effects of cooling rates and maturity of animals on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs. Biol. Reprod. 17: 527-531.
- Paulson, J.D. en K.L. Polakoski: A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. Fert. Steril. 28: 178-181 (1977).
- Pedersen, H. en P.E. Lebeder: Ultrastructural changes in the human spermatozoon after freezing for artificial inseminations. Fert. Steril. 22: 125-133 (1971).
- Pedersen, H., H. Rebbe en R. Hammen: Human sperm fine structure in a case of severe asthenospermia-necrospermia. Fert. Steril. 22: 156-164 (1974).
- Perloff, W.H., E. Steinberger en J.K. Sherman: Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technic. Fert. Steril. 15: 501-504 (1964).
- Phadke, A.M., N.R. Samant en S.D. Deval: Significance of seminal fructose studies in male infertility. Fert. Steril. 24: 894-903 (1973).
- Phillips, S.G., D.M. Phillips, D.A. Miller, O.P. van Diggelen en O.J. Miller: Spontaneous cell hybridization of somatic cells present in sperm suspension. Expl. Cell Res. 98: 429-443 (1976).
- Pikò, L.: Immunological phenomena in the reproductive process. Int. J. Fert. 12: 377-383 (1967).
- Pikò, L.: Gamete structure and sperm entry in mammals. In: Fertilization, pp. 325-403. Eds. C.B. Metz en A. Monroy. New York: Academic Press (1969).
- Pincus, G.: Observations on the living eggs of the rabbit. Proc. R. Soc. Lond. 107: 132-167 (1931).
- Pincus, G. en E.V. Enzmann: Can mammalian eggs undergo normal development in vitro. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 20: 121-122 (1934).
- Pincus, G. en E.V. Enzmann: The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. J. exp. Med. 62: 665-675 (1935).
- Pincus, G. en E.V. Enzmann: The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. II The activation of tubal eggs of the rabbit. J. exp. Zool. 73: 195-208 (1936).
- Pinsker, M.C. en W.L. Williams: Spermatozoon decapacitation factor (DF) in human seminal plasma. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 29: 446-448 (1968).
- Polakoski, K.L., F.N. Syner en L.J.D. Zaneveld: Biochemistry of human semi-

- nal plasma. In: Human semen and fertility regulation in men, pp. 133-143. Ed. E.S.E. Hafez. St.Louis: Mosby (1976).
- Polakoski, K.L. en L.J.D. zaneveld: Biochemical examination of the human ejaculate. In: Techniques of human andrology, pp. 265-286. Ed. E.S.E. Hafez. Amsterdam: Elsevier (1977).
- Polge, C., A.U. Smith en A.S. Parker: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, Lond. 164: 666 (1949).
- Polge, C. en J.E. lovelock: Preservation of bull semen at -79°C . Vet. rec. 64: 396-397 (1952).
- Pommerenke, W.T. en E. Viergiver: Comparison of rates of penetration of unwashed and washed spermatozoa in cervical mucus. Proc. Soc. exp. Biol Med. 66: 161-163 (1947).
- Prevost en Dumas: Nouvelle Theorie de la génération. Histoire et description des animalcules spermatiques (Suite). Ann. Sci. Nat. 1: 274-292 (1824a).
- Prevost en Dumas: Deuxieme mémoire sur la génération (Suite). Ann. Sci. Nat. 2: 129-149 (1824b).
- Rehan, N.E., A.J. Sobrero en J.W. Fertig: The semen of fertile men: Statistical analysis of 1300 men. Fert. Steril. 26:492-502 (1975).
- Renieri, T.: Submicroscopical observations on abnormal human spermatozoa. J. Submicrosc Cytol. 6: 421-432 (1974).
- Richardson, D.W.: Artificial insemination in the human. In: Modern trends in human genetics 2, pp. 404-447. ed. A.E.H. Emery. London: Butterworths (1976).
- Richardson, D.W.: Factos influencing the fertility of frozen semen. In: Frozen human semen, pp. 33-54. Eds. D.W. Richardson, D. Joyce en E.M. Symonds. Den Haag: Martinus Nyhoff (1980).
- Rock, J. en M.F. Menkin: In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. Science 100: 105-106 (1944).
- Rogers, B.J. en R. Yanagimachi: Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. Biol. Reprod. 13: 568-575 (1975).
- Rogers, B.J., H. van Campen, M. Ueno, H. Lambert, R. Bronson en R. Hale: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. Fert. Steril. 32: 664-670 (1979).
- Rohleder, H.: A history of the artificial impregnation of human beings. In: Test tube babies. New York: The Pauurge Press (1934).

- Ross, A., S. Christie en P. Edmond: Ultrastructural tail defects in the spermatozoa from two men attending a subfertility clinic. *J. Reprod. Fert.* 32:243-251 (1973).
- Rotschild, Lord: The movements of spermatozoa. In: *Mammalian germ* pp. 121-132. Ed. G.E.W. Wolstenholme. Boston: Little, Brown and company (1953).
- Rowley, M.J. en C.G. Heller: Embryology, anatomy and histology of the male sexual organs. In: *Fertility disturbances in men and women.* Ed. C.A Joël. Basel: Karger (1971).
- Rozin, S.: The role of seminal plasma in motility of spermatozoa. *Acta Med. Orient.* 17: 24-25 (1958).
- Rozin, S.: Studies on seminal plasma. *Int. J. Fert.* 6: 169-174 (1961).
- Rudak, E.: *Persoonlijke mededeling* (1981).
- Rudak, E., P.A. Jacobs en R. Yanagimachi: Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature, Lond.* 274: 911-913 (1978).
- Rümke, Ph., N. van Amstel, E.N. Messer en P.D. Bezemer: Prognosis of fertility of men with sperm agglutinins in the serum. *Fert. Steril.* 25: 393-398 (1974).
- Russo, I. en C.B. Metz: Inhibition of fertilization in vitro by treatment of rabbit spermatozoa with univalent isoantibody. *J. Reprod. Fert.* 38: 211-215 (1974).
- Sawada, Y. en D.R. Ackerman: Use of frozen human semen. In: *Progress in Infertility*, pp. 731-748. Eds. S.J. Behrman en R.W. Kistner. Boston: Little, Brown and company (1968).
- Sawada, Y., D.R. Ackerman en S.J. Behrman: Motility and respiration of human spermatozoa after cooling to various low temperatures. *Fert. Steril.* 18: 775-781 (1967).
- Schellen, A.M.C.M.: The history of artificial insemination. In: *Artificial insemination in the human*, pp. 7-24. Amsterdam: Elsevier (1957).
- Schenk, S.L.: Das Säugethierei künstlich befruchtet ausserhalb das Mutterthieres. *Mitt. Embryol. Intst. Wien* 1: 107 (1878).
- Schirren, C.G., A.F. Holstein en C. Schirren: Über die morphogenese rundköpfiger spermatozoa des Menschen. *Andrologia* 3: 117-125 (1971).
- Schnieden, H.: The evaluation of cryoprotective media for human semen. In: *Frozen human semen*, pp. 59-68. Eds. D.W. Richardson, D. Joyce en E.M. Symonds. Den Haag: Martinus Nyhoff (1980).
- Schoenfeld, C., R.D. Amelar en L. Dubin: Stimulation of ejaculated human

- spermatozoa by caffeine. A preliminary report. *Fert. Steril.* 24: 772-775 (1973).
- Seitz, H.M., B.G. Brackett en L. Mastroianni, jr.: Fertilization. In: Human reproduction, conception and contraception, pp. 119-131. Eds. E.S.E. Hafez en T.N. Evans. London: Harper and Row (1973).
- Sherman, J.K.: Freezing and freezing-drying of human spermatozoa. *Fert. Steril.* 5: 357-371 (1954).
- Sherman, J.K.: Dimethyl sulfoxide as a protective agent during freezing and thawing of human spermatozoa. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 117: 261-264 (1964).
- Sherman, J.K.: Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fert. Steril.* 24: 397-412 (1973).
- Shettles, L.B.: The respiration of human spermatozoa and their response to various gases and low temperatures. *Am. J. Physiol.* 128: 408-415 (1940).
- Shettles, L.B.: Observations on human follicular and tubal ova. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 66: 235-247 (1953).
- Shettles, L.B.: A morula stage of human ovum development in vitro. *Fert. Steril.* 6: 287-289 (1955).
- Singh, B., B.B. Mahapatro en D.P. Sadhu: Chemical composition of cattle and buffalo spermatozoa and seminal plasma under different climatic conditions. *J. Reprod. fert.* 20: 175-178 (1969).
- Shorr, E.: a new technique for staining vaginal smears: II a single differential stain. *Science* 94: 545-546 (1941).
- Shulman, S., B. Harlin, P. Davis en J.V. Reyniak: Immune infertility and new approaches to treatment. *fert. Steril.* 29: 309-313 (1978).
- Smith, A.U.: Fertilization in vitro of the mammalian egg. *Biochem. Soc. Symp.* 7: 3-10 (1951).
- Smith, D., C. dura en L. Zamboni: Fertilizing ability of structural abnormal spermatozoa. *Nature, Lond.* 227: 79-80 (1970).
- Smith, K.D., L.J. Rodriguez-Rigau en E. Steinberger: Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. *Fert. steril.* 28: 1314-1319 (1977).
- Sobrero, A.J. en J. MacLeod: The immediate post coital test. *Fert. Steril.* 13: 184-189 (1962).
- Sobrero, A.J. en N.A. Rehan: The semen of fertile men. II Semen characteristics of 100 fertile men. *Fert. steril.* 26: 1048-1056 (1975).

- Spallanzani, L.: Observations and experiments on human and animal spermatid vermicles (1776). In: Book on animal and vegetable physics, vol. 2, part 2 (engelse vertaling). Edinburgh: Creech and White (1799).
- Spallanzani, L.: Tracts on the natural history of animals and vegetables. (engelse vertaling) Edinburgh: J.G. Graham Dalryell (1803).
- Spring-Mills, E.: The seminal vesicles. In: Male accessory sex glands, pp. 79-92. Eds. E. Spring-Mills en E.S.E. Hafez. Amsterdam: Elsevier (1980).
- Stambaugh, R. en J. Buckley: Identification and subcellular localization of the enzymes effecting penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa. J. Reprod. Fert. 19: 423-432 (1969).
- Stambaugh, R. en J. Buckley: Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus monkey and human spermatozoa. Biol. Reprod. 3: 275-282 (1970).
- Steeno, O., A. Adimoelja en J. Steeno: Separation of X- and Y-bearing human spermatozoa with the sephadex gel filtration method. Andrologia 7: 95-97 (1975).
- Steinman, R.P. en M.L. Taymor: Artificial homologous insemination and its role in the management of infertility. Fert. Steril. 28: 146-150 (1977).
- Stephens, P.C. en R.G. Edwards: Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet II(1): 366 (1978).
- Sun, C.N. en H.J. White: The variety of abnormal spermatozoa from patients with fertility problems, an ultrastructural study. Cytologia 43: 551-554 (1978).
- Syner, F.N., K.S. Moghissi en J. Yanez: Isolation of a factor from normal human semen that accelerates dissolution of abnormally liquefying semen. Fert. Steril. 26: 1064-1068 (1975).
- Szollosi, D.G. en H. Ris: Observations on sperm penetration in the rat. J. biophys. biochem. Cytol. 10: 275-283 (1961).
- Tauber, P.F., L.J.D. Zaneveld, D. Propping en G.F.B. Schumacher: Components of human split ejaculates. J. Reprod. Fert. 43: 249-267 (1975).
- Taylor-Robinson, D. en R.J. Manchee: Sperm adsorption and spermagglutination by mycoplasmas. Nature, Lond. 215: 484-487 (1967).
- Templeton, A.A., J. Aitken, E. Rudak en F. Newman: The fertilizing ability of spermatozoa from apparently normal infertile patients. Proc. Soc. St. Rep. 63 (1980).
- Thibault, C.: In vitro fertilization of the mammalian egg. In: Fertilization, pp. 405-435. Eds. C.B. Metz en A. Monroy. New York:

Academic Press (1969).

Timourian, H. en G. Watchmaker: Determination of spermatozoan motility. *Dev. Biol.* 21:62-72 (1970).

Toyoda, Y., M. Yokoyama en F. Hoshi: Studies on fertilization of mouse eggs in vitro. *Jap. J. Anim. Reprod.* 16: 147-157 (1971).

Tredway, D.R., G.C. Buchanon en T.S. Drake: Comparison of the fractional postcoital test and semen analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130: 647-652 (1978).

Tredway, D.R., D.S.F. Settlage, R.M. Nakamura, M. Matoshima, C.U. Umenahi en D.R. Mishell: Significance of timing for the postcoital evaluation of cervical mucus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121: 387-393 (1975).

Trounson, A.O., J.F. Leeton, C. Wood, J. Webb en G. Kovacs: The investigation of idiopathic infertility by in vitro fertilization. *Fert. Steril.* 34: 431-438 (1980).

Tsunoda, Y., T.A. Parkening en M.C. Chang: In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. *Experientia* 32: 223-224 (1976).

Tyler, E.T.: Semen studies and fertility. *J. am. med. Ass.* 146: 307-314 (1951).

Tyler, E.T.: Physiological and clinical aspects of conception. *J. am. med. Ass.* 153: 1351-1356 (1953).

Tyler, E.T. en H.O. Singher: Male infertility -status of treatment, prevention and current research. *J. am. med. Ass.* 160: 91-97 (1956).

Tyler, A.: Problems and procedures of comparative gametology and syngamy. In: *Fertilization*, pp.1-22. Eds. C.B. Metz en A. Monroy. New York: Academic Press (1967).

Uehara, T. en R. Yanagimachi: Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. reprod.* 15:467-470 (1976).

Velazquez, A., N. Pedron, N.M. Delgado en A. Rosado: Osmolality and conductance of normal and abnormal human seminal plasma. *Int. J.Fert.* 22: 92-97 (1977).

Weeda, A.J. en J. Cohen: Effects of purification or split-ejaculation of semen and stimulation of spermatozoa on the motility and in vitro fertilizing ability. *Ter publicatie aangeboden* (1981).

Weinman, D.E. en W.L. Williams: Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. *Nature, Lond.* 203: 423-424 (1964).

Whittingham, D.G.: Fertilization, early development and storage of mammali-

- an ova in vitro. In: The early development of mammals, pp. 1-24. Eds. M. Balls en A.E. Wild. Cambridge: Cambridge University Press (1975).
- Whittingham, D.G.: In vitro fertilization, embryo transfer and storage. Br. med. Bull. 35: 105-11 (1979).
- Whittingham, D.G., S.P. Leibo en P. Mazur: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . Science 178: 411-414 (1972).
- Williams, W.L., R.T. Robertson en W.R. Dukelow: Decapacitation factor and capacitation. In: Advances in biosciences, vol. 4, pp. 61-72. Ed. G. Raspe. New York: Pergamon Press (1970).
- Wilmot, I.: The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Sci., 11(2): 1071-1079 (1972).
- Wilson, V.B. en R.G. Bunge: Infertility and semen non-liquefaction. Fert. Steril. 113: 509-510 (1975).
- Wolf, D.P., J.E. Sokoloski en G.G. Haas: Human sperm autoantibodies inhibit sperm penetration of zona-free hamster eggs. Fert. Steril. abstract suppl. 35:246 (1981).
- Wulff, H.R.: Diagnose en de wetten van de kansrekening. In: Principes van klinisch denken en handelen, pp. 77-100. Nederlandse bewerking van A. Querido en J. Lubsen. Utrecht: Bohn, Scheltema en Holkema (1980).
- Yanagimachi, R.: The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J. Reprod. Fert. 23: 193-196 (1970).
- Yanagimachi, R.: Fertilization of guinea pig in vitro. Anat. Rec. 174: 9-20 (1972a).
- Yanagimachi, R.: Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs in vitro. J. Reprod. Fert. 28: 477-480 (1972b).
- Yanagimachi, R.: Specificity of sperm-egg interaction. In: Immunobiology of Gametes, pp. 255-289. Eds. M. Edidin en M.H. Johnson. Cambridge: Cambridge University Press (1977).
- Yanagimachi, R.: Sperm-egg association in mammals. In: Current topics in developmental biology, vol. 12, pp. 83-105. New York: Academic Press.
- Yanagimachi, R.: Persoonlijke mededeling (1979).
- Yanagimachi, R., A. Lopata, C.B. Odom, R.A. Bronson, C.A. Mahi en G.L. Nicolson: Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stored eggs for assessing the fertility capacity of spermatozoa. Fert. Steril. 31: 562-574 (1979).
- Yanagimachi, R., H. Yanagimachi en B.J. Rogers: The use of zona-free animal

- ova as a test-system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15: 471-476 (1976).
- Yanagimachi, R. en Y.D. Noda: Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. *J. Ultrastruct. Res.* 31:465-485 (1970a).
- Yanagimachi, R. en Y.D. Noda: Electron microscopic studies of sperm incorporation into the golden hamster egg. *Am. J. Anat.* 128: 429-462 (1970b).
- Yanagimachi, R. en Y.D. Noda: Physiological changes in the post-nuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. *J. Ultrastruct. Res.* 31: 486-493 (1970c).
- Zaneveld, L.J.D. en K.L. Polakoski: Collection and physical examination of the ejaculate. In: *Techniques of human andrology*, pp. 147-172. Ed. E.S.E Hafez. Amsterdam: Elsevier (1977).
- Zausner Guelman, B., J.E. Sokoloski, L. Blasco en D.P. Wolf: The "hamster test": its use and variability in analysing human sperm fertilizing ability. *Fert. Steril. abstract suppl.* 35: 251 (1981).
- Zavos, P.M. en M.R Cohen: Bovine mucus penetration test: an assay for fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Fert. Steril.* 34: 175-176 (1980).
- Zeilmaker, G.H. en C.M.P.M. Verhamme: A simplified method for freezing mouse embryos. *Cryobiology* 16: 6-10 (1979).
- Zukerman, Z., L.J. Rodriguez-Rigau, K.D. Smith en E. Steinberger: Frequency distribution of sperm counts in fertile and infertile males. *Fert. Steril.* 28: 1310-1313 (1977).
- Zyl, J.A. van, R. Menkveld, T.J. van W. Kotze, A.E. Retief en W.A. van Niekerk: Oligozoospermia: a seven year survey of the incidence, chromosomal aberrations, treatment and pregnancy rate. *Int. J. Fert.* 20: 129-132 (1975).
- Zyl, J.A. van, R. Menkveld, A.E. Retief en W.A. van Niekerk: Oligozoospermia. In: *Human semen and fertility regulation in men*, pp. 363-369. Ed. E.S.E. Hafez. St.Louis: Mosby (1976).

INDEX VAN ONDERWERPEN

- accessoire geslachtsorganen 3,
 17-18, 77, 97-98, 100
 Acrosomale membraan 18-19
 Acrosoom 18-20
 afwezigheid 8
 -reactie 17-20
 Agglutinatie 4, 9, 56, 75,
 77-80
 AID 82-83
 AIH 82
 Albumine 99
 Alpha-amylase 98
 Ampullaire klieren 97
 Androgeen-afhankelijk 97
 Antibiotica 85
 Antilichaam-titers 78
 Autoagglutinininen, zie immunoglo-
 bulinen
 Ascorbinezuur 99
 Asthenospermie 56, 62, 64, 107
 Azoöspermie 3, 9, 61, 65
 obstructief 3
 Baarmoederhalsslijm, zie cervix-
 slijm
 Baarmoederslijmvlies 11
 Belichtingspuls 40-41
 Benadering van de rechte lijn
 14, 46
 gemiddelde 46-47, 73, 104,
 109-110
 Bevruchting 2, 9, 11, 13, 23,
 25
 abnormale vormen 23
 criteria 11-12, 21, 23-24
 heterospecifiek 13
 in vitro 9, 10-14, 18, 48
 parameters 23-25
 Bevruchtingspercentage 25-34,
 54, 56-74, 85, 90-96,
 105, 113-116
 Beweeglijkheid 4, 8-9, 14-16,
 23, 31, 100, 109
 heterogeen 43, 97
 homogeen 42
 initiatie 99
 kwalitatief 8, 48, 51,
 103-104, 109-111
 kwantitatief 8, 14-16, 48
 mate van verplaatsing, zie
 snelheid of progressie
 objectivering 8, 38-53, 109
 percentage 8, 16, 20, 45-51,
 57-58, 63, 71-72, 93-94,
 104-116
 percentage progressief 40,
 45, 104
 Bindings-score 25, 28-29,
 58-59, 61, 63, 65,
 68-69, 93-95, 97
 Bovine serum albumine 20, 89
 Buitenechtelijk 66
 Bürker hemocytometer 48
 Bijbal, zie epididymis
 Cafeïne 89
 Capacitatie 17-18
 -duur 17, 27-28, 57
 Centrifugeren 20, 80, 101, 103,
 112
 Cervix 76
 Cervixslijm 11, 98
 hydrolyse 99
 menselijk 4, 17
 overleving van zaadcellen 11,
 86
 runder 86
 Cervixslijmpenetratie 4, 78, 86,
 99, 107

Chromosoomafwijkingen 9, 13-14
 Chymotrypsine 98
 Cinematografie 40
 Citraat 85-86, 99-100
 Coagulaat 75, 98, 101-103, 112
 Concentratie, zie zaadcelconcentratie
 Conceptie-kans, zie zwangerschap
 Condensor 38-39
 Corticale granulæ 13, 23-24
 Cowper klieren 97, 106
 Cryo-beschermende stof 35, 84-85, 90-91
 Cryobiologie 35, 82-83
 Cryobiologische preservatie 35, 82-85
 Cryoprotectie 10, 35, 83, 85
 Cyclische nucleotiden 54
 Cumulus 18, 36-37
 Decapacitatie 18
 Decapaciterende factor 18, 99
 Decondensatie van zaadcelchromatine 13, 14, 23-25, 27-28, 30, 33
 binucleaire 33, 34
 Diamine-oxidase 54, 80, 82-84
 Diepvries-sperma 84-86
 Dimethylsulfoxide 36, 85
 Donker-veld belichting 42
 Donor-sperma 20, 29, 54, 58, 96
 Donor-spermaplasma 74, 100-105
 Droogijs-koelmethode 83, 92
 Duur van de beweeglijkheid in vitro 8, 57, 68, 71, 86
 Duur van de kinderwens 56, 61, 64, 66, 67
 Eicel 2, 9, 12, 21-37
 activatie 23, 24
 cytoplasma 11, 12, 14
 degeneratie 12, 28, 30
 fragmentatie 12, 21
 isolatie 9, 12, 21, 22
 konijn 11
 mens 9-13
 oppervlak 17, 25, 26, 33, 34
 Eigeel 85, 86
 Eileider 2, 12, 17
 ampullaire deel 21
 carrier cryopreservatie 35-37
 Eischil 13, 21, 22, 23
 penetratie 12, 61
 Ejaculaat, zie sperma
 Ejaculatie 97-98, 106, 108
 split- 10, 81, 106-116
 tijd na 20, 74-76, 101, 108
 Electronische coördinatenlees-tafel, zie XY-tablet
 Embryo 10-12
 -ontwikkeling 3
 -transplantatie 10-11, 35
 -bank 35
 Eosine 71
 Epididymis 5, 11, 17, 97, 99, 106
 Erythromycine 86
 Ether-alcohol fixatie 57
 Fagocytose 13
 Fagocytotische fusie 13,23
 Fase-contrast 40
 Fertilizine 20
 Flagel 7-8, 14, 16, 19, 24, 33, 57
 Follikel 2, 12
 Fosfor 99
 Frequentieverdeling 54, 57-61
 Fructose 54, 85, 99, 106
 Fumarase 54, 80-81
 Gefractioneerde ejaculatie, zie split-ejaculatie

Gemiddeld aantal gepenetreerde
 zaadcellen per eicel 25, 29,
 58-61, 63, 65, 68-69
 Geslachtsorganen, secundair, zie
 accessoir
 G.E.C.-medium 85-95
 Glucose 85-86
 Glycerol 83-95
 Glycine 86
 Hamster 21, 57
 Hamstereicel, zie ook eicel
 eischilvrije 13-14, 21-37,
 97
 Hamstereiceltest 10, 31, 33,
 35-37, 54-67, 95-96, 101
 reproduceerbaarheid 25,
 63-65
 kinetiek 26-31
 Hamster assay, zie ook hamster-
 eiceltest 13
 Hyaluronidase 21
 Hyperspermie 101-102, 107
 Immobilisatie 76, 78, 98
 Immunoglobulinen, zie auto-
 agglutinenen
 Incubatie 26-30, 57, 71, 79,
 101, 103, 113
 Incubator 21
 Infertiliteitsduur, zie ook
 duur 1
 Inositol 99-100
 Intracellulaire ijsvorming 84
 Invriesampul 36, 86, 92
 Invriezen
 hamstereicellen 35-37
 sperma 10, 83-96
 technieken 35-37, 83-85
 zoogdierembryo's 35
 Klieving 11, 23
 Koelen van zaadcellen 82-83
 Koelsnelheid 83-87, 91-92
 Konijn-antiserum 78
 Konijn-eicel, zie eicel
 Koude-shock 84
 Kunstmatige inseminatie 4-5,
 82-84, 100, 107, 116
 Kwalitatieve en kwantitatieve
 beweeglijkheid, zie beweeg-
 lijkheid
 Lecithine 85
 Lepto-vorm 7, 57
 Lichtpulsfrequentie 44, 46
 Liquefactie 20, 74-77, 98, 101,
 109, 113
 Makler-telkamer 38-40, 48
 Meervoudige belichtingsfoto-
 grafie 10, 15, 38-53, 71-74,
 92-93, 101-105, 108-113
 Metafase-chromosomen, zie chromo-
 somen
 Metafase-plaat 21, 23, 27
 Microcomputer 15, 41, 44
 Middenstuk 7, 57
 Monospermie 68-69
 Mycoplasma 77
 Nakomelingschap, kans op 38, 55,
 60, 67
 prognose van de kans op,
 zie prognose vruchtbaarheid
 Necrospermie 8
 Normospermie 53, 61
 Nucleïnezuursynthese 13
 Nucleolus 14
 Oligospermie 3-6, 61-64, 78,
 100, 107
 criteria 6
 Ontdooien
 eicellen 35-37
 sperma 10, 83, 85, 87, 92-94
 Onvruchtbaarheid, zie ook

verminderde vruchtbaarheid
 38, 65, 83
 idiopatisch 61-63
 secundair 55-56, 62, 66
 Oöplasma 23
 Opzuiveringstechnieken 50,
 88-89
 Opzweem-techniek 20, 78-79,
 87-89, 112-113
 Orchitis 3
 Osmolariteit 17, 20, 26, 84
 Osmotische gradiënt 84
 Overleving in vitro, zie duur
 van de beweeglijkheid
 Oviduct, zie eileider
 Parthenogenese 12, 23
 Pellet 20, 103
 Percentage
 abnormale zaadcellen 7-8
 bevruchting, zie bevruch-
 ting
 levende zaadcellen 4
 normale zaadcellen 7, 70-71,
 107, 111-112
 Perivitelline ruimte 22-23
 Polyaminen 54, 100
 Polyspermie (meervoudige
 bevruchting) 14, 23, 30,
 33, 68
 Polyspermie (veel zaadcellen)
 64, 107
 Polyvinylpyrrolidon 101
 Poollichaampje 11, 21-24
 Post-oestrus 21
 Pregnyl 21, 57
 Preïmplantatie-stadium 12, 35
 Preïncubatie 17, 21, 26-30,
 57, 79, 102
 Prévasectomie 53

Progressie, wijze van 14, 32,
 38, 44-47
 Pronucleus 13-14, 23
 Prostaat 3, 97, 99-100, 106
 Prostaglandinen 99
 Prostatovesiculitis 3, 100
 Proteinase 99, 106-107
 Reageerbuisbaby 10,12
 Recovery rate 90, 93-94
 Secundaire onvruchtbaarheid,
 zie onvruchtbaarheid
 Semi-automatische analyse, zie
 meervoudige belichtings-
 fotografie
 Schijnkleving, zie fragmen-
 tatie
 Seminine 98
 Sephadex-kolom 89
 Sluiterijd 40
 Snelheid 15-16, 40, 43, 45, 50,
 73-74, 93, 95, 104,
 109-113
 Snelheidsconstante 46
 gemiddelde 47, 104, 109-110
 Somatische cel 13
 Sperma 1, 10, 20, 87
 -bank 10, 83, 94-96
 extract 78
 -onderzoek 3-5, 16, 38, 47,
 49, 51, 54, 57, 61-65
 het verkrijgen van 20, 57,
 108-109, 112-113
 vervloeijing, zie liquefactie
 Spermaplasma 4-5, 10, 17-18,
 54, 56, 74-77, 97-107
 vloeibaarheid, zie viscositeit
 zuurgraad 4
 Spermine 100
 Spermioogram, zie spermaonderzoek
 Split-ejaculatie, zie ejaculatie

Stollingstemperatuur 84
 Stroboscoop 38-39
 Stroboscoopschijf 39-40
 Superovulatie 21, 35
 Talmud 82
 Telkamer 38
 Bürker, zie Bürker
 Makler, zie Makler
 Teratospermie 7, 56, 62, 64
 criteria 7
 Terato 57
 Testisbiopsiescore 4-5
 Testikel 18, 78, 106
 Testisweefsel 4
 TMPA-medium 20
 Trypsine 21
 Uitdraaivel 41, 47-48
 Urethra 97
 Urethrale klieren 97
 Uterus 2,4, 10, 17, 98
 Vacuolisatie 33
 Vals-negatief 65
 Vals-positief 61
 Varicocèle 3-4, 64
 Vas deferens 97, 106
 Vervloeiing, zie liquefactie
 Vitellus, zie ooplasma
 Viscositeit 4, 56, 75-77,
 101-107
 Vloeibare stikstof 35, 37,
 83, 86
 Vruchtbaarheid 5, 25, 32, 50,
 55, 73, 80
 prognose 4, 5, 9, 54-55,
 64-67, 100, 116
 Vruchtbaarheid, verminderde
 diagnose 1, 5, 50, 54
 immunologische factoren
 77-80
 obstructieve factoren 3
 oorzaken 3, 98, 105
 therapie 15, 107-108
 Vruchtbaarheidsindex 9
 Vruchtbaarheidstest 1, 9, 25,
 50, 54-55, 80, 85-86, 100
 Wijze van beweeglijkheid, zie
 progressie
 XY-coördinaten 44-46
 XY-tablet 15, 41, 44
 Zaadblazen 3, 97, 99, 106
 Zaad, zie sperma
 Zaadcellen 1, 9, 11, 20, 97
 abnormale 7-8, 32-34, 100
 aggregatie, zie aggluti-
 natie
 beweeglijkheid, zie beweeg-
 lijkheid
 klontering, zie aggluti-
 natie
 niet bewegend 8, 14, 38,
 41-44
 rijping 97
 snelheid, zie snelheid
 sporen 15, 41-46
 suspensies 20-21, 29, 31,
 40, 45, 57, 62, 71, 78,
 88
 Zaadcelkop 7, 14, 18-19, 57
 Zaadcelbeweeglijkheid, zie
 beweeglijkheid
 Zaadcelconcentratie 4-6, 9,
 20, 31, 45, 48, 50-54,
 58, 80-81, 106,
 109-110, 112-116
 beweeglijke zaadcellen in
 vivo 58, 71-72, 80-81,
 113-116
 beweeglijke zaadcellen in
 vitro 20, 31-32, 68-71,
 80, 97

Zaadcelkopdiameter 7, 38
Zaadcelmembraan 18-19
Zaadcelmorfologie 4, 7-9,
32, 48, 57, 100, 108,
111-112
 classificatie 7, 57
Zaadcelstaart, zie flagel
Zaadceltransport 97-99
Zaadcel-eicelfusie 13, 23
Zaaddiertjes 1-2
 geslacht 2
Zink 54, 100
Zona pellucida, zie eischil
Zona-reactie 23
Zoutoplossing
 hypertonisch 12, 20, 84
 fosfaat-gebufferd 36
Zure fosfatase 100, 106
Zwangerschap, kans op een 3,
4, 38

NAWOORD

De bestudering van voortplantingscellen van mens en dier in één en dezelfde testsituatie is een interessante bezigheid. Dergelijk onderzoek gecombineerd met een prettige werkomgeving brachten mij in een bevoorrechte situatie waarin ik heb mogen werken, en waarvoor ik zeer dankbaar ben.

Het kweken en manipuleren van eicellen en zaadcellen vereist een bepaalde vaardigheid, die het best kan worden onderwezen door ingewijde oefenmeesters op het gebied van de Experimentele Embryologie. In mijn geval waren dat Camilla Rijkmans-Verhamme en Gerard van Marle. Ik ben eveneens dankbaar dat Dr. Yanagimachi bereid is geweest een aantal fijne kneepjes wat nader toe te lichten.

Uiteraard zijn de gegevens die dit onderzoek opleverde niet alleen door mij verkregen. Ik werd bij mijn onderzoek op voortvarende wijze geholpen door Rob Euser, Paul Felten, Peter Kouwenhoven en Alex Weeda, die - ondanks dat zij dit zelf verkozen hadden - in de ongelukkige situatie verkeerden waarin een deel van hun studie door mij werd begeleid.

Automatisering is een niet meer weg te denken onderdeel van onze maatschappij. Het is verheugend dat Maarten Mooyaart bereid was een deel van het sperma-onderzoek te automatiseren, waardoor mede door zijn enthousiasme, de andrologie op waardige wijze de tachtiger jaren werd binnengeloodst.

Het wel en het wee is in de andrologie ongelijk verdeeld. Dat inzicht werd mij duidelijk door Jaap Aafjes en Jan Vreeburg. Hun dynamische inventieviteit en kennis van de vele wonderen van de voorplantingsfysiologie waren voor mij een openbaring.

Voor de bestudering van hamstereicellen en menselijke zaadcellen is het logischerwijze noodzakelijk te beschikken over hamsters en mannen. De eerste groep werd in optimale conditie gehouden door de zorg van Anja Groen en Jan van Ophemert. De sperma-donoren bestonden uit een groep vrijwilligers en een groep patiënten welke door de poliklinieken van Interne III en Gynaecologie onderzocht werden. Dankzij vele medewerkers van deze afdelingen, maar met name door het enthousiasme van Bert Alberda, Jan Carel van der Vijver en Rob Weber, kon het sperma van patiënten op de in dit proefschrift beschreven wijze onderzocht worden. De vele vrijwilligers ben ik erkentelijk voor hun donaties. Met name wil ik diegenen bedanken die terwille van de "wetenschap" op maandagochtend vroeg, hun zaad over een aantal met vloeistof gevulde bekertjes verdeelden.

Voor een goed verloop van experimenten is het aangenaam om gesteund

te worden door medewerkers met specialistische kennis. Zo werd de morfologie van de zaadcellen op deskundige wijze bestudeerd door Dr. Brugman van Biochemie I. De fotografische techniek werd mede ontwikkeld dankzij de creativiteit en het doorzettingsvermogen van Henny Wolfensperger-van Oort. Bij de statistische verwerking van de resultaten was Peter Schenck immer een kritisch luisteraar, die met grote kennis van zaken, mij geduldig de juiste formules toefluisterde.

Gerard Zeilmaker was onverstoorbaar gemotiveerd het onderzoek op deskundige wijze te belichten, waardoor een juist inzicht in de materie werd verkregen. Ik ben hem erkentelijk voor zijn bereidheid dit onderzoek te superviseren en mij in de gelegenheid te stellen af en toe een zijweg in te slaan. De coreferenten Prof. Drogendijk en Prof. Kramer dank ik voor hun bereidwilligheid een deel van hun kostbare tijd te besteden aan het kritisch doornemen van het manuscript.

Dit proefschrift kreeg zijn uiteindelijke vorm dankzij de bijdragen en adviezen van Henk Beek, John Bovenlander, Dennis Dwinger, Albert Kuilman, Marco Roede en de medewerkers van de afdelingen audiovisuele dienst en automatische signaal verwerking. De dynamische tandem Anneke Bot en Koos van der Werff ten Bosch en alle medewerkers van de afdeling Fysiologie II dank ik voor hun steun en waarachtige collegialiteit.

Curriculum vitae

Geboren te Den Haag op 26 december 1951. Opgegroeid te Maastricht waar in 1970 het HBSb-diploma werd verkregen. Aan de Rijksuniversiteit van Leiden werd in 1978 de studie Biologie voltooid: hoofdvak reproductie-fysiologie en bijvakken fysiologische chemie en botanische morfogenese. Sinds 1978 werkzaam op de afdeling Endocrinologie, groei en voortplanting van de Medische faculteit te Rotterdam.

