



# *Invloed van ROS op de kwaliteit van het sperma*

**Kris BOUCHET**

promotor :

dr. E. BOSMANS, dr. Luc MICHIELS

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad  
Master in de biomedische wetenschappen afstudeerrichting  
klinische en moleculaire wetenschappen



# INHOUDSTAFEL

Voorwoord .....	
Samenvatting.....	2
1 Inleiding .....	3
1.1 Spermatogenese .....	3
1.2 Reactive zuurstofradicalen en DNA schade.....	4
1.3 Parameters voor fertiliteitsevaluatie .....	7
1.3.1 Viscositeit .....	7
1.3.2 pH,citraat, fructose, $\alpha$ -glucosidase .....	7
1.3.3 Volume.....	8
1.3.4 Motiliteit .....	8
1.3.5 Morfologie .....	9
1.3.6 Concentratie .....	10
1.4 Apoptose .....	10
1.5 Klinische relevantie .....	12
1.6 Proefopzet.....	14
2 Materiaal en methoden .....	15
2.1 Staalname en stockage .....	15
2.2 Analyse referentieparameters en parameters voor fertiliteitsonderzoek.....	16
2.3 8-OHdG bepaling in seminaal plasma .....	17
2.4 Flowcytometrische spermatozoa telling.....	18
2.5 Overleving van spermatozoa .....	19
2.6 Osmolaliteit .....	20
2.7 Bewaren van zaadcellen in fixeer-oplossing .....	20
2.8 Conjugatie van antilichamen .....	20
2.9 Bepaling van apoptose percentage met flowcytometrie .....	22
2.10 Controle van conjugatie met confocale microscopie .....	24
2.11 Statistische analyse .....	24
3 Resultaten.....	25
3.1 Correlatie tussen interval na ejaculatie en osmolaliteit.....	25
3.2 Zaadceloverleving is gecorreleerd met osmolaliteit .....	26
3.3 Zaadcelbewaring.....	27
3.4 Flowcytometrische telling van spermatozoa .....	28
3.5 Bepaling 8-OHdG .....	29
3.6 Flowcytometrie van sperma merkers: controle met confocale laser microscopie.....	34
3.7 Apoptose detectie met Flowcytometrische analyse .....	36
4 Discussie .....	39
5 Conclusies .....	45
Bronnen.....	47

## Voorwoord

In de huidige samenleving hoort men steeds vaker geruchten over het afnemen van de mannelijke fertiliteit. Steeds vaker hoor je koppels in je naaste omgeving die moeilijkheden ondervinden om op natuurlijke wijze hun kinderwens te realiseren. Het hele proces rond zwangerschap en alle problemen betreffende bevruchting heeft me al enige tijd kunnen fascineren. Tijdens het laatste jaar van mijn opleiding biomedische wetenschappen was ik dan ook blij een keuze in dit onderzoeksgebied te hebben en zo een steentje te kunnen bijdragen aan de oplossing van deze problematiek.

Ik ging in dit project dieper in op aantal elementen die de fertiliteit van de man mogelijk negatief beïnvloeden. Verwacht wordt dat zuurstofradicalen hierin een belangrijke bijdrage leveren. De aanmaak van zuurstof radicalen worden deels door externe factoren gestimuleerd en heeft vermoedelijk een negatieve invloed op de fertiliteitspotentiaal van de man. De vraag of er een link bestaat tussen de beschadiging aan het DNA van zaadcellen door deze radicalen en apoptose is deel van mijn onderzoeksstage.

Bij het oplossen van deze vraag heb ik hulp gekregen waarvoor ik zeer dankbaar ben.

Allereerst wil ik mijn begeleider promotor, Eugene Bosmans, bedanken voor het verlenen van een stageplaats en nodige middelen voor het uitvoeren van dit onderzoek. Ook bij de statistische analyse bood je steeds oplossingen wanneer de analyse vast leek te lopen. Het was een leerrijke ervaring om samen een onderzoek uit te voeren en te leren van je onuitputbare bron van onderzoeksideeën. Ook mijn co-promotor, dr Luc Michiels, wil ik bedanken voor het opvolgen van mijn onderzoek.

Verder wil ik Dr Mario Berth van harte bedanken voor de uiterst goede hulp bij de flowcytometrische analyses en Elisa procedures. Deze vormden een essentieel deel van mijn proefopzet.

Ook wil ik de klinisch biologen Marc Uytterhoeven, Dr Wim Dhoore bedanken voor de medewerking en de analyse van respectievelijk zware metalen en cotinine in het seminale plasma. Ook alle laboranten, in speciaal Els en Mark, wil ik mijn dank betuigen voor de gekregen hulp en praktisch advies tijdens mijn stage.

Tenslotte wil ik ook de afdeling fysiologie aan de universiteit Hasselt, in bijzonder prof. dr. Marcel Ameloot en dr. Martin Vandeven bedanken voor het gebruik van hun confocale laser microscoop. Ook mijn medestudent Nick Smisdom wil ik bedanken voor de hulp met deze confocale analyses.

## **Samenvatting**

In het onderzoek naar mogelijke redenen van subfertiliteit is er een groeiende interesse naar het concept van de reactieve zuurstofradicalen. Deze worden zowel endo- als exogeen aangemaakt en worden verdacht een belangrijke bijdrage te leveren aan de inductie van DNA-schade en apoptose van zaadcellen. Oxidatieve DNA-schade kan bepaald worden met behulp van een gemodificeerd (gehydroxyleerd) en verwijderd guanine molecule, het 8-hydroxy-2deoxyguanosine (8-OHdG). Deze moleculen zijn detecteerbaar in urine of bloedplasma met behulp van een HPLC of ELISA procedure. In dit project was een doelstelling om deze molecule te detecteren in seminaal plasma en de gedetecteerde schade te correleren aan het apoptosepercentage aanwezig in he ejaculaat. We analyseerden elk zaadstaal voor 30 cytologische, morfologische en biochemische parameters om mogelijke correlaties te vinden tussen deze parameters en het aanwezige apoptosepercentage en DNA-schade.

De overleving van zaadcellen, essentieel voor fertilisatie, wordt beïnvloed door vele factoren. Een van de factoren waar in dit onderzoek nader werd gekeken is de osmolaliteit. Stalen werden in functie van de tijd opgevolgd voor hun toename in osmolaliteit en de overlevingscapaciteit ervan werd vergeleken gebruik makend van media met een verschillende osmolaliteit. Een ander aspect in dit onderzoek is de automatisatie van de arbeidsintensieve spermatelling in routine andrologisch onderzoek. Spermatellingen zijn immers onderhevig aan een grote variatie tussen verschillende waarnemers, indien de telling niet wordt uitgevoerd door goed getrainde onderzoekers en er zijn zelfs intra-observer effecten mogelijk. Voor de overleving en automatisatie kan besloten worden dat de overleving sterke afhankelijkheid vertoont met de osmolaliteit. Om sperma analyses te verbeteren, biedt de UF-100 een goede, minder werkintensieve en nauwkeuriger alternatief voor de telling van spermatozoa. Tenslotte werden de conventionele spermaparameters (concentratie, totaal aantal, motiliteit, morfologie) en biochemische parameters van seminaal plasma (8-OHdG, totaal eiwit, urinezuur, creatinine, zink, transferine, glucosidase, ijzer, carnitine, Zn/Cu ratio,  $\beta$ -Trace) vergeleken.

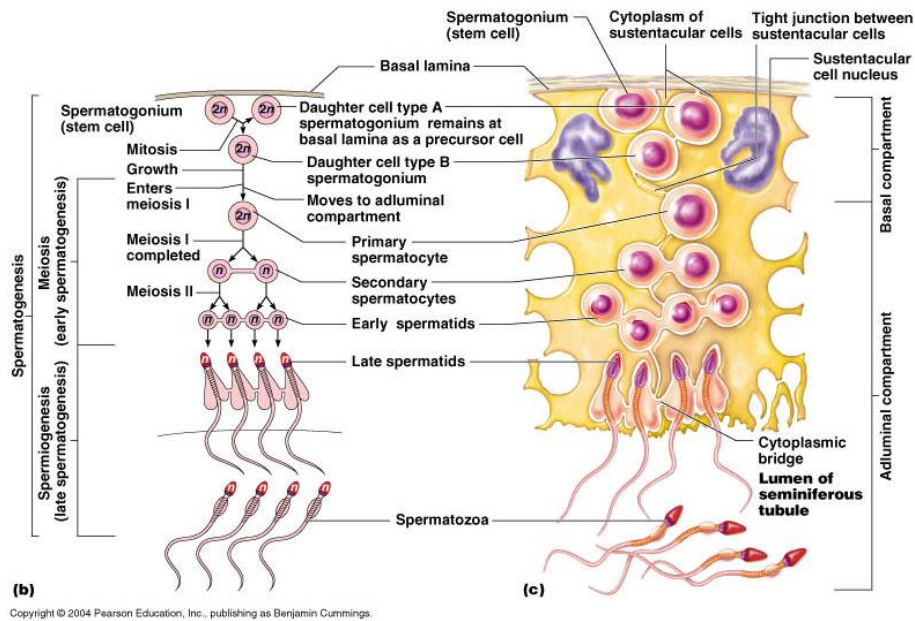
**Sleutelwoorden:** 8-OHdG, metalen, ROS, sperma, osmolaliteit

# 1 Inleiding

## 1.1 Spermatogenese

Spermatogenese is een proces dat zich afspeelt in de testis van iedere man waarbij nieuwe zaadcellen aangemaakt worden uit voorlopercellen, de spermatogonia (fig 1). Deze zijn gelegen tussen de sertolicellen. De spermatogonia zijn een soort van stamcellen van de kiemlijn. Ze gaan in tegenstelling tot de oöcyten, die enkel in het foetale stadium meiose ondergaan, pas beginnen met delen in de pubertijdjaren van de man. De rijping van de nieuw gevormde cellen gebeurt in een radiale wijze, dit wil zeggen dat de minst gedifferentieerde cellen en de meest gedifferentieerde respectievelijk aan de buiten- en de aan de binnenzijde van de tubuli seminiferi gelegen zijn.

Bij de eerste mitotische deling worden er twee typen nakomelingen gevormd uit de voorlopercellen. Het eerste type (A) zorgt ervoor dat de populatie van spermatogonia behouden blijft en gaat bijgevolg aan de buitenszijde van de tubuli seminiferi gelocaliseerd blijven. Het tweede type cel dat na deling ontstaat (B) gaat zich verder (meiotisch) delen en differentiëren tot er uiteindelijk vier zaadcellen uit ontspruiten. De vorming van deze cellen is een complex proces dat uit verschillende fasen bestaat.

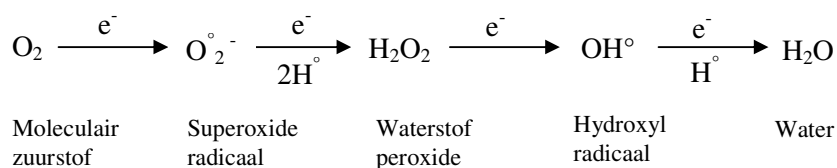


**Figuur 1: Overzicht van de spermatogenese.** Het proces in de testis waarbij er nieuwe zaadcellen aangemaakt worden uit voorlopercellen, de spermatogonia.

Allereerst ondergaat de dochtercel B, de primaire spermatogonium genoemd, opnieuw een deling en vormt zo de secundaire spermatocyten. Dit gebeurt via een eerste meïotische deling waardoor er twee haploïde cellen ontstaan. De twee haploïde secundaire spermatocyten gaan vervolgens de tweede meïotische deling ondergaan en zo ontstaan er vier (haploïde) spermatiden. Deze zijn echter nog steeds maar de voorlopers van wat later de zaadcellen zullen worden genoemd. Ze moeten immers nog een proces van morfologische veranderingen ondergaan (spermiogenese) voordat we echt over spermacellen kunnen spreken. Tijdens deze fase gaat de spermatide over van een ronde naar een kikkervis-achtige structuur (1). Deze structuur omvat drie essentiële elementen namelijk de kop, het middenstuk en de staart die in orde dienen te zijn voor een goede fertiliteit. Bij afwijkingen van de normale morfologie zal de bevruchttingscapaciteit afnemen (zie verder).

### 1.2 Reactive zuurstofradicalen en DNA schade

Reactieve zuurstofradicalen (ROS) zijn zeer reactieve oxiderende moleculen met een extreem korte halfwaardetijd en worden zowel door endo- als exogene bronnen geproduceerd. De endogene bronnen omvatten vele cellen betrokken bij de afweer tegen vreemde componenten zoals micro-organismen en of andere lichaamsvreemde partikels. Cellen die ROS kunnen aanmaken omvatten ondermeer de macrofagen, leukocyten (2). Verder zijn de mitochondriën een zeer voorname bron van radicalen door middel van productie van ATP, de zuurstoftransportketen. De omzetting van zuurstof tot water, waarbij er ATP gegenereerd wordt, gebeurt door een quadrivalente reductie van zuurstofmoleculen (fig 2). Dit proces verloopt helaas niet steeds volledig en bijgevolg kunnen er onvolledig gereduceerde moleculen ontsnappen uit de elektrontransportketen.



**Figuur 2: Schematische weergave van de reductie van O<sub>2</sub> tot H<sub>2</sub>O.** Het is een quadrivalente reductie van het zuurstofmolecuul. Bij een eerste reductie ontstaat er het superoxide radicaal dat verder wordt gereduceerd tot H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en OH<sup>°</sup>. Tenslotte wordt bij de vierde en laatste reductie het watermolecule gevormd. De bovenstaande reactieketen is echter niet volledig accuraat waardoor er onvolledig gereduceerde moleculen (radicalen) ontsnappen en schade aan biomoleculen kunnen aanrichten.

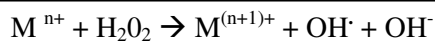
Enkele van deze moleculen bevatten slechts één elektron in hun buitenste schil (ongepaard) en worden radicaal genoemd (3). Deze radicalen zijn zeer reactief en reageren met niet-radicalen

waardoor deze laatste ook tot een radicaal kunnen omgevormd worden. Wanneer echter twee radicalen met elkaar reageren kan de radicaalketen doorbroken worden.

Zuurstofradicalen worden echter ook in de spermacellen gevormd onder invloed van xanthine oxidase en hebben in de spermatozoa een fysiologische functie als signaalmolecule. Lage intracellulaire radicaal concentraties moeten dus als normaal worden beschouwd.

Het lichaam bevat ook andere mechanismen om zich te beschermen tegen schade aangebracht door deze radicalen (4). Er zijn enzymen zoals SOD en catalase (5, 6) die zorgen voor de neutralisatie van de radicalen terwijl er anderzijds ook moleculen zoals  $\alpha$ -tocoferol, Glutathion, ... zorgen voor de terminatie van de radicaalreactie.

Behalve de interne productie van radicalen worden er ook radicalen geïnduceerd onder invloed van de omgeving. Omgevingsfactoren (roken, industriële gassen, uitlaatgassen, straling, overgangsmetalen,...) stimuleren de productie van ROS (7). Overgangsmetalen (M) zijn redox gevoelig en kunnen de radicaalproductie via de Fenton reactie stimuleren (fig 3). In het menselijk lichaam is dit overgangsmetaal vaak ijzer.



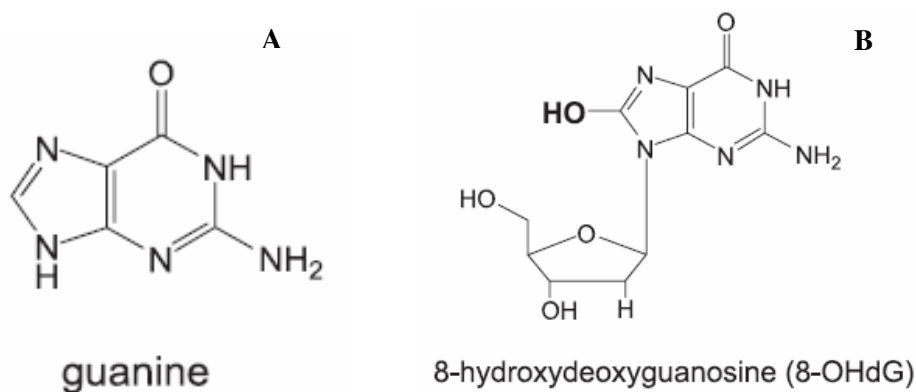
*Figuur 3: Fentonreactie. Via de Fenton reactie wordt het aantal radicalen verhoogd. Bij deze reactie wordt een overgangsmetaal, in gereduceerde toestand, geoxideerd en gelijktijdig wordt een H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molecule omgezet tot OH<sup>·</sup> en het schadelijke OH<sup>-</sup>. Op deze wijze catalyseren overgangsmetalen de productie van radicalen en kan dit leiden tot een verhoogde celschade*

Wanneer de verdedigingsmechanismen van het lichaam, ook wel anti-oxidanten genoemd, de oxidant productie niet meer kan compenseren en er dus een onevenwicht optreedt tussen oxidanten en antioxidanten spreekt men van oxidatieve stress (8). Deze heeft zeer schadelijke gevolgen op verschillende cellulaire niveaus. Zowel eiwitten, lipiden en het DNA van cellen zijn zeer gevoelig aan radicaalbeschadiging. Wanneer radicalen lipiden (oa aanwezig in membranen) aantasten, gebeurt dit meestal bij onverzadigde bindingen in vetzuren. We spreken dan van lipidenperoxidatie. Een geperoxideerd membraan wordt meer star en dit kan verschillende nadelige cellulaire effecten tot gevolg hebben. In het geval van zaadcellen zullen enkele effecten te zien zijn op vlak van de motiliteit en de membraanfusie tijdens de bevruchting (9).

Zoals eerder vermeld, is ook het DNA, zowel het nucleair als mitochondriaal (10-12), uiterst gevoelig voor schade aangebracht door radicaalreacties. Radicalen kunnen zorgen voor chromatine crosslinking, breuken en modificaties van het DNA (13) het Y-chromosoom is hier immers veel gevoeliger voor in vergelijking met het X-chromosoom (14). Verder kan



oxidatieve stress ook de inductie van apoptose induceren door ondermeer inductie van cytochroom c en caspasen (15,16). Een merker voor de DNA-schade is het hydroxylatieproduct van Guanoside moleculen. Guanoside is een purine, dit is een bouwsteen van DNA en is het meest gevoelig voor modificaties. De gemodificeerde, gehydroxyleerde, vorm wordt ook 8-hydroxy-2-deoxyguanoside (8-OHdG) genoemd en is afgebeeld in figuur 4 (17). Dit molecule ontstaat door een interactie van de C-8 positie van guanosine met hydroxylradicalen of singlet zuurstof (18). Belangrijk is dat deze parameter niet enkel een weerspiegeling is van oxidatieve stress maar het 8-OHdG, dat vrijgesteld wordt, is tevens een merker van herstel van het DNA (19,20). Het menselijk lichaam heeft voor dit herstel mechanismen ontwikkeld voor het herkennen en het herstellen van de aangebrachte schade. De belangrijkste methode is het base *excision-repair* systeem (BER) (21, 22) . Het is dit systeem dat ondermeer thymidine dimeren herkent die worden gevormd onder invloed van zonlicht. Het is anderzijds ook dit systeem dat de gemodificeerde guanosine moleculen herkent. Een belangrijk enzym bij het herstel van de waargenomen schade is het 8-oxoguanine glycosylase (8-OGG1). Het is dit enzyme dat zorgt voor de verwijdering van ondermeer de 8-OHdG moleculen (21). De verwijdering ervan is van groot belang omdat het gehydroxyleerde purine mutagene effecten heeft. Herstel verhindert een GC→TA transitie. Deze mutaties zorgen immers voor een verandering van het readingframe en dit leidt zo tot gemanipuleerde eiwitten, wat een verstoring van functie tot gevolg kan hebben.



**Figuur 4: Chemische structuur van guanine.** Guanine een DNA-bouwsteen (A) en het zijn gemodificeerde vorm 8- hydroxyguanosine (B zijn weergegeven). De gemodificeerde vorm wordt uit het DNA verwijderd door herstelenzymen en is zo detecteerbaar in lichaamsvloeistoffen zoals urine, bloed en seminaal plasma.

Het opsporen van 8-OHdG in chromosomaal DNA kan dus aanwijzingen geven over de aanwezigheid en de mate van DNA-beschadigingen. Beschadigingen van het sperma-DNA kunnen leiden tot problemen met de fertiliteit. Het DNA bevat immers de helft van alle

gegevens van het embryo en defecten in het genetische materiaal kunnen detrimetale effecten hebben. Detectie van dit molecuul in chromosomaal DNA kan via immunohistochemie of flowcytometrie daar waar het vrije 8-OHdG bepaald wordt door onder andere een ELISA essay (23) of met behulp van HPLC (24). Een protocol voor de detectie van 8-OHdG bestaat reeds voor serum en urine maar nog niet voor seminaal plasma. De oppuntstelling van de 8-OHdG bepaling op seminaal plasma is onderdeel van mijn onderzoekstage samen met het bepalen van andere spermaparameters om de detectie van 8-OHdG aan te relateren. Na het wegcentrifugeren van spermatozoa blijven er immers nog heel wat chemische bestanddelen over in seminale plasma die dienst kunnen doen als diagnostische parameters, ondermeer het 8-OHdG voor sperma DNA-schade. Mogelijk bestaat er een verband tussen de gemodificeerde vorm van guanine en een ander chemisch element in het seminaal plasma. Het vinden in seminaal plasma van een factor die correleert met 8-OHdG zou een belangrijk bijkomende aanwijzing vormen voor de aanwezigheid van DNA-schade geïnduceerd door ROS.

### ***1.3 Parameters voor fertiliteitsevaluatie***

Om de kwaliteit van het sperma te beoordelen zijn er historisch een aantal parameters vooropgesteld (25,26). Het betreft kenmerken die macroscopisch, microscopisch of met aangepaste analytische technieken kunnen aangetoond worden. De voornaamste parameters worden hieronder vervolgens besproken.

#### *1.3.1 Viscositeit*

De viscositeit van het sperma beïnvloedt de mobiliteit van het sperma. Vers geëjaculeerd sperma vormt een semi-vaste gel voornamelijk door het aanwezige semenogeline, een proteïne dat overvloedig aangemaakt wordt in de zaadblaasjes. Na de initiële stolling zal sperma in een tijdspanne van enkele tot 20 minuten terug vervloeien onder invloed van prostaat specifiek antigeen (PSA). De viscositeit wordt best gemeten na vervloeiing van het sperma. Deze vervloeiing houdt in dat er een digestie plaatsvindt van semenogelines door het PSA uit het prostaatvocht wat de mobiliteit van de aanwezige spermatozoa danig verhoogt (27).

#### *1.3.2 pH, citraat, fructose, $\alpha$ -glucosidase*

De pH van sperma (normale waarden tussen 7,2 en 8) wordt voornamelijk bepaald door secreties van de seminale vesikels en de prostaat. De pH van deze twee secreties is verschillend. De zuurtegraad van eerste is eerder alkalisch (basisch) dit om de lage pH van de

vagina te neutraliseren, terwijl de prostaat eerder een iets zuurdere pH heeft in vergelijking met het vocht van de seminale vesicles door de aanwezigheid van citroenzuur.

De samenstelling van beide secreties is ook sterk verschillend. Het prostaatvocht bevat veel citraat wat het zink, dat overmatig aanwezig is, in het epididymisvocht zal complexeren. Deze hoge zinkconcentratie, in de epididymis, is nodig voor het behouden van een gecondenseerde chromatinestructuur in de uitgerijpte spermatozoïden en beperkt de motiliteit van de spermacellen. Het vocht gesecreteerd door de seminale vesicles heeft een samenstelling die sterk verschilt van het prostaatvocht. Zaadblaasjes produceren immers fructose, een zeer belangrijk element, omdat zaadcellen het gebruiken als energiebron. Wanneer men seminaal plasma analyseert zal men citraat doseren als merker van de prostaatfunctie, fructose als merker van de seminale vesikels en glucosidase om obstructie van de bijbal na te gaan. Tenslotte dient te worden vermeld dat CD52, een fosfatidyl inositol verankerde membraanmerker voor spermatozoïden, in de epididymis op het spermamembraan wordt aangebracht (28).

### *1.3.3 Volume*

Het volume van het ejaculaat bepaalt mede de fertiliteit van de man en is ondermeer afhankelijk van de duur van onthouding (29). Het grootste aandeel van het volume wordt geleverd door secreties van verschillende klieren (prostaat, seminale vesicles of zaadblaasjes) daar waar de bijdrage van het epididymal vocht, dat de spermatozoïden bevat, eerder beperkt is. Een klein ejaculaatvolume (volume lager als 1,5 ml) kan een probleem weerspiegelen (25). Een klein volume kan een indicatie zijn voor een tekort aan hetzij prostaatvocht hetzij zaadblaasjesvocht. Aangezien deze vochten een essentiële functie bezitten in verband met de beweeglijkheid en voeding van de zaadcellen (fructose, zink,...) spreekt het voor zich dat het uitvallen van een van deze functies erg ongunstig zal zijn voor een natuurlijke bevruchting (30).

### *1.3.4 Motiliteit*

De beweeglijkheid is een belangrijke parameter in het geheel van de kwaliteit van de zaadcellen. De spermacellen dienen immers in staat te zijn om de afstand vanaf de baarmoederhals tot aan de eicel in de eileider te overbruggen. Bij onvoldoende beweeglijkheid spreekt men van astenospermie en dit wordt als een van de oorzaken van subfertiliteit bij de man beschouwd (30). Zoals eerder vermeld speelt ook de viscositeit een belangrijke rol bij de bepaling van de motiliteit van spermatozoa.

De motiliteit evaluatie dient op verse stalen te gebeuren maar wordt ook vaak gebruikt om de overlevingscapaciteit van spermatozoïden na te gaan. In dit geval meet men zowel vers als na toenemende tijdsintervallen. De sperma overleving kan beïnvloed worden door verschillende factoren zoals de osmolaliteit van het medium, de concentratie van de cellen en in dit werk werd ook de invloed van de materiaalsamenstelling van het recipiënt nagegaan.

### *1.3.5 Morfologie*

In de literatuur is aangetoond dat er een duidelijk verband bestaat tussen een afwijkende zaadcelmorfologie en subfertiliteit (31). Er is echter veel minder duidelijkheid over de onderliggende oorzaak van morfologische afwijkingen. Wel is vastgesteld dat er ook een verband bestaat tussen de morfologie van de zaadcellen en hun beweeglijkheid. Dit verband is immers vanzelfsprekend daar een perfecte morfologie wijst op intacte celfuncties. Het begrip normale morfologie is echter historisch geëvolueerd. Volgens de oudere WHO-criteria werden tot 70 % normale vormen gevonden (25). Volgens de nieuwe WHO-normen is de grens voor normaliteit op 30% gesteld, maar indien men destrictie criteria voor spermamorfologie gebruikt, zal men 10% als grenswaarde voor normale morfologie stellen en beneden de 10% normale vormen, zal men de indicatie subfertil met slechte prognose gebruiken voor sperma met minder als 5% normale vormen en subfertil met goede prognose voor sperma met morfologie tussen 5 en 10 % (32). Volgens de strikte criteria beschouwt men dus drie klassen namelijk slechte, matige en optimale morfologie aanwezig in het ejaculaat.

De zaadcel is opgebouwd uit drie belangrijke componenten: de kop, middenstuk en de staart. Elk deel bezit eigen specifieke functies (33), celorganellen en heterogeniteit in vorm en compositie (34).

Voor alle componenten zijn afwijkingen gekend. Voor het kopgedeelte is een normale kern tot acrosoom ratio belangrijk en mogen er geen vacuolen zichtbaar zijn. Indien de energievoorziening, aanwezig in het middenstuk, (namelijk de mitochondriën) onvoldoende is, dan zal de zaadcel geen substraten kunnen omzetten naar ATP, dat nodig is voor de aandrijving van de roterende staartbeweging met beperkte voortbeweging of asthenospermie tot gevolg. Tijdens de zaadcelontwikkeling en differentiatie kunnen fouten optreden. Een goed voorbeeld hiervan is het overblijven van cytoplasma-fragmenten in het middenstuk (*cytoplasmic droplet*). De aanwezigheid van dergelijke misvormde cellen in sperma is frequent geassocieerd met subfertiliteit (35,36). Een belangrijke correlatie werd ook gevonden tussen een teveel aan cytoplasma in het middenstuk van de zaadcel en een toegenomen ROS-

productie. Deze verhoogde productie van radicalen heeft een belangrijke invloed op de mannelijke subfertiliteit, onder meer via ATP depletie en lipideperoxidatie (37).

Tenslotte kunnen ook aan de staart defecten optreden met onder andere twee staarten, een krulstaart, of een verkeerde inplanting van de staart. Afwijkende morfologie in het microscopisch onderzoek wijst op subfertiliteit en kan ook geassocieerd zijn met een verminderde viabiliteit in vergelijking met morfologisch correcte zaadcellen (35).

#### *1.3.6 Concentratie*

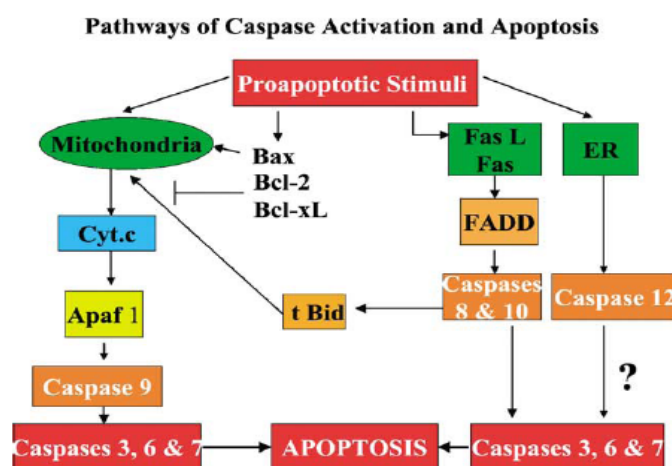
De concentratie zaadcellen in een staal bepaalt in grote mate mee het fertiliteitspotentieel van de man. Bij een lage concentratie is er minder kans op bevruchting van de eicel. Bij een normale man ligt de zaadcelconcentratie tussen de 20 en 200 miljoen (25). Een hoge concentratie lijkt gunstiger omdat men daarbij compensatie kan verwachten voor andere defecten bij zaadcellen. Wel is het niet enkel de concentratie die telt, zo is de overleving in de tijd ook zeer belangrijk. Vele zaadcellen die niet of nauwelijks in staat zijn om in de vrouwelijke tractus te overleven, leveren geen of geringe bijdrage aan de fertiliteit.

#### *1.4 Apoptose*

Apoptose, ook wel geprogrammeerde celdood genoemd, is een proces dat door de cel zelf wordt geïnitieerd. Het is een natuurlijk proces en komt voor in alle meercellige organismen om de cellulaire homeostase te behouden. Het komt zowel voor in fysiologische als in pathologische omstandigheden. Oudere, beschadigde cellen gaan plaats maken voor nieuwe gezonde cellen (1). Het proces gaat van start zodra de cel onderhevig is aan een te grote stress of defecten vertoont (DNA beschadiging,...) en kan zowel door interne als externe factoren geïnduceerd worden.

De belangrijkste apoptose wegen worden hier even kort toegelicht (fig 5). De bekendste externe apoptose initiator is het Fas ligand (CD95). Cellen bezitten voor deze molecule een membraanreceptor. De interactie tussen deze twee eiwitten zorgt voor de trimerisatie van Fas-receptoren die dan FADD (Fas-associated death domain) aantrekken. Dit complex tussen Fas en FADD bindt dan aan de intracellulaire effector caspase 8 of 10. Een andere manier van apoptose wordt intern en intracellulair geïnduceerd door de release van cytochrome C uit de mitochondriën. Deze zal in het cytosol binden aan Apaf 1. De door de binding geactiveerde Apaf-moleculen activeren op hun beurt het effector enzyme caspase 9. Eenmaal als dit actief is, is de cascade vertrokken en worden er andere effector caspases actief, wat leidt tot

proteolyse van eiwitten waardoor essentiële cellfuncties verloren gaan en morfologische veranderingen geassocieerd met apoptose, optreden (1,38).



*Figuur 5: schema apoptose-inductie. In deze figuur zijn 3 verschillende wegen van apoptose voorgesteld. De pro-apoptotische signalen kunnen leiden tot een caspase cascade en uiteindelijk tot celdood.*

De cel bepaalt zelf deels of hij in apoptose gaat of niet. De beslissing wordt gestuurd door een balans tussen pro- en anti-apoptotische moleculen. Apoptose vertoont ook grote verschillen vergeleken met een andere vorm van celdood; necrose. Bij apoptose wordt er geen immuunrespons opgewekt omdat de cel ervoor zorgt dat alle celcomponenten zorgvuldig ingepakt blijven door een membraan. De gevormde afsnoeringen worden *apoptotic bodies* genoemd. Er zijn ook een groot aantal andere verschillen tussen het proces geassocieerd met necrose en apoptose zoals de celzwellings, fragmentatie,...

Tijdens het proces van apoptose gaan er heel wat cellulaire veranderingen plaatsvinden, zowel op membraanair als op eiwitniveau. Zo gaat de membraan lipide bouwsteen fosfatidylserine, (PS) dat zich normaal enkel in de binnenste lipidenlaag van de fosfolipidelaag bevindt door membraandestabilisatie tijdens apoptose, zich ook naar de buitenste membraanshil verplaatsen. Deze veranderingen treden vroegtijdig op tijdens de apoptose en vormen het basisfenomeen voor een aantal testen voor de vroegtijdige detectie van apoptose. Zo wordt het molecuule Annexine V gebruikt om de bovenstaande membraanwijziging te detecteren.

Een andere manier om apoptose te detecteren zijn de detectie van caspases of eiwitten die er een *target* van zijn (bv PARP). Caspases zijn immers enzymen die enkel tijdens de irreversibele fase van de apoptose zijn geactiveerd en het aantonen van hun activiteit toont dus ook apoptose aan. Enkele belangrijke effector caspases zijn caspase 3 en 9.

In de gametogenese wordt het apoptosemechanisme omwille van fysiologische redenen toegepast. Het wordt er gebruikt om een overproductie van zaadcellen te voorkomen en zo te vermijden dat de Sertoli-celfunctie overbelast geraakt (39). De spermatogene cellen die apoptose ondergaan, worden door de Sertolicellen gefagocyteerd van zodra er translocatie van fosfatidylserine plaatsvindt naar de buitenste lipidenlaag van het membraan (40).

Welke mechanismen voornamelijk gebruikt worden is nog niet volledig geweten. Wel is reeds aangetoond dat de caspaseactiviteit bij infertiele mannen hoger ligt (41), terwijl er geen correlatie werd teruggevonden tussen membranaire veranderingen en zaadcelafwijkingen (42).

### ***1.5 Klinische relevantie***

Subfertiliteit is een probleem waarmee ongeveer 15% van de koppels met kinderwens geconfronteerd worden en bij ongeveer de helft van deze koppels is de subfertiliteit mede te wijten aan een kwaliteitsprobleem van de zaadcellen. Tegenwoordig vermoedt men dat zuurstofradicalen en de eraan gekoppelde oxidatieve stress belangrijke oorzakelijke factoren zijn, betrokken bij de daling van de fertiliteit (43). Zo wordt er in studie vaak een verhoogde concentratie van vrije radicalen teruggevonden bij infertiele patiënten (44,45).

Spermacellen hebben een paradoxale relatie met betrekking tot ROS. Enerzijds hebben ze voor een aantal essentiële processen, zoals de capacitatie, nood aan de vorming van ROS als fysiologische signaal transductie moleculen (43,45). De spermatozoa produceren namelijk deze radicalen zelf via aërobe respiratie op twee belangrijke manieren, via het NADPH oxidase systeem en via het NADPH afhankelijk oxido-reductase (46). Het zijn vooral de mitochondriën in het middenstuk van de spermatozoa die een grote bron zijn van zuurstofradicalen. Deze zijn immers de energiecentrales die zorgen voor ATP die nodig is voor de beweging van de flagella (47). Verder is er in een ejaculaat ook altijd een populatie van leukocyten aanwezig die ROS in overmaat produceren (48). Behalve de nood aan radicalen zijn de zaadcellen anderzijds ook uiterst gevoelig voor schade door deze radicalen aan hun lipide membranen, eiwitten en DNA. Wanneer de genetische informatie, opgeslagen in het DNA van de gameten, beschadigd is door de radicalen, zal dit niet alleen een negatieve invloed hebben op de fertiliteit maar verhoogt tevens het risico op genetische afwijkingen bij kinderen waar het natuurlijk en apoptose gestuurd eliminatieproces gefaald heeft tijdens de gametogenese en de embryonale ontwikkeling. ROS geïnduceerde DNA-schade zal de inductie van apoptose in gameten versnellen wat leidt tot verminderde aantallen gameten en daling van de fertiliteit (49).

Het membraan van de spermatozoïden kan ook nog geperoxideerd worden wat een sterke vermindering van de motiliteit tot gevolg heeft, wat ook weer een negatief effect op de fertiliteit heeft. De gevoeligheid van de membraan is het gevolg van de aanwezigheid van onverzadigde vetzuren in hun membraan (9).

Sperma bezit gelukkig heel wat oxidatie remmende en ROS neutraliserende enzymen in het seminal plasma, waardoor het zich kan verweren tegen radicaalschade (45,50). Deze neutraliserende mechanismen omvatten ondermeer superoxide dismutase en catalase (5,6). Behalve de enzymatische afweermechanismen bevat het seminaal plasma ook nog niet enzymatische elementen zoals urinezuur, tocoferol, vitamine E, taurine, thiolgroep bevattende eiwitten en semenogelin dat belangrijke ROS neutraliserende eigenschappen heeft. Er is reeds aangetoond dat deze beschermingsmechanismen in het seminaal plasma een belangrijke rol spelen bij zowel de natuurlijke fertiliteit als bij de geassisteerde reproductie technieken (ART) (51). Het cytoplasma van de zaadcellen zelf bevatten immers slechts zeer lage hoeveelheden van *scavenging* enzymen en de protectie van de zaadcellen berust bijgevolg dus voornamelijk op de beschermende werking van het plasma. Dit wordt bevestigd in een studie waarbij aangetoond is dat het semen van infertiele mannen een verlaagde hoeveelheid anti-oxidant mechanismen bevat (52). Op chromosomaal vlak is er een DNA-beschermingsmechanisme door het DNA in chromatinekorrels zeer compact te stapelen en in te pakken met behulp van protamines en histone eiwitten (53).

In omstandigheden waarbij de productie van radicalen echter de aanwezige bescherming overtreft, en dat zal zich voornamelijk uiten bij spermatozoïden waarin het chromatine minder compact gestapeld werd en makkelijker toegankelijk is voor ROS, zal er toch schade optreden en vermindert de mannelijke fertiliteit. Een belangrijke parameter om schade aangebracht aan het DNA op te meten, is het meten van 8-OHdG, een gemodificeerd purine in de DNA-keten. Beschadigde guanosine residus in DNA kunnen echter uitgeknipt worden door herstel-enzymen (21). De 8-OHdG molecule komt na herstel dan terecht in de omgevende lichaamsvochten, dus ondermeer in het seminale plasma. Dit plasma kan bijgevolg gebruikt worden als weerspiegeling van de DNA-schade die de spermacellen hebben opgelopen door de ROS. Dit op voorwaarde dat het herstelsysteem functioneel is. Naast het gesecreterde 8-OHdG zal het DNA en celgebonden 8-OHDG de ideale parameter zijn om ROS-schade aan DNA te meten. Het is dus belangrijk te weten of 8-OHdG in seminaal plasma, correleert met de spermatozoon en de DNA gebonden hoeveelheid van 8-OHdG. Dit vooral omdat het meten van chromosomaal 8-OHDG impliceert dat het DNA uit spermatozoïden geëxtraheerd wordt en de zaadcellen dus niet meer kunnen gebruikt worden voor ART. Het is van groot belang



om te weten of die goede correlatie tussen extra- en intracellulair 8-OHdG aanwezig is en of er bijkomende seminaal plasma parameters bestaan met een goede correlatie tot het cellulair 8-OHdG niveau en de fertilisatiepotentieel van sperma. Op dit ogenblik is er echter nog geen duidelijkheid over deze correlatie en over de echte betekenis van de aanwezigheid van deze moleculen in het seminale plasma, noch over alternatieve betrouwbare parameters. Op cellulair en kernniveau zal DNA-schade gedetecteerd worden via detectie en herstelmechanismen waarbij DNA herstellende eiwitten zoals het P53 en de 8-OHdG excissie-enzymen eerst in werking treden en trachten de schade te herstellen. Indien de beschadiging aan het DNA te groot is, dan kan de cel zelf de apoptose cascade triggeren en overgaan tot geprogrammeerde celdood. Als dit proces van start gaat doen er zich een aantal veranderingen van de cel (membranair,...) voor. Al deze intracellulaire veranderingen kunnen ook microscopisch en of flowcytometrisch gedetecteerd en gevolgd worden met behulp van antistoffen. Antistoffen zoals P53 en anti-Fas gaan in dit onderzoek gebruikt worden om na te gaan of het percentage apoptotische zaadcellen te relateren is aan de hoeveelheid 8-OHdG aanwezig in het seminale plasma en er dus een rechtstreeks verband bestaat tussen radicalen en een verlaagde fertiliteit door DNA schade.

### ***1.6 Proefopzet***

In dit project werd de invloed van radicalen op DNA-schade en apoptose nagegaan. Het opzet was om te analyseren of er een verband bestond tussen enerzijds ROS of factoren die de productie ervan catalyseren en anderzijds schade aan het DNA van spermatozoa. Per staal werden hiervoor 25 parameters, die mogelijk, gerelateerd zijn aan mannelijke fertiliteit en eventueel aan onevenwicht in de ROS productie, geanalyseerd. De stalen werden eerst geanalyseerd op routineparameters voor het opstellen van een fertiliteitsbilan, daarna werden ze gecentrifugeerd en op het bekomen plasma werd de hoeveelheid 8-OHdG gerelateerd aan DNA-schade, bepaald aan de hand van een ELISA-procedure. Verder werd dit plasma gebruikt voor de analyse van bijkomende parameters zoals  $\alpha$ -glucosidase, urinezuur, transferrine, carnitine, zink, koper en andere zware metalen. Een cotininebepaling werd ingelast om het effect van roken te kunnen analyseren. Andere methodes die gebruikt werden in dit onderzoek voor de detectie van DNA-schade en apoptosepercentage, waren de flowcytometrische of Facs-analyse. Hierbij werden de spermatozoïden voor drie parameters aangekleurd. De parameters waren gerelateerd aan de detectie van zaadcellen of aan het apoptoseproces. In de Facs-analyse werd het percentage aan apoptotische spermatozoa nagegaan. De resultaten van de Facs werden vervolgens gekoppeld aan de resultaten van de

Elisa en onderworpen aan statistische analyse. In de statistische analyse, uitgevoerd met regressie en logistische regressietechnieken, werd gezocht naar verbanden tussen de gemeten parameters, de hoeveelheid DNA-schade (8-OHdG) en de fertiliteitsstatus van de patiënten.

Een ander aspect in het project is het verbeteren van bestaande standaardtechnieken voor het meten van klassieke spermparameters zoals concentratie. Tot hiertoe gebeuren deze analyses voornamelijk microscopisch door getrainde onderzoekers. Uiteraard is deze bepaling niet volledig vrij van menselijke fouten en automatisering zou bijdragen tot grotere betrouwbaarheid van de resultaten. Vandaar dat een onderzoek werd gestart naar het bepalen van de zaadcelconcentratie met behulp van een flowcytometer voor urinaire analyses namelijk de UF-100 als een onderdeel van dit project.

Bovendien stelt er zich vaak reeds in de preanalytische fase, namelijk bij het binnenbrengen van stalen in het laboratorium, het probleem dat het tijdstip van staalname niet of onjuist werd ingevuld. Maar om betrouwbare informatie op te leveren moet sperma binnen een bepaald tijdsinterval na ejaculatie, worden geanalyseerd. Vandaar dat het handig zou zijn om over een parameter te beschikken die op een alternatieve manier toch een goede schatting van het ejaculatie-tijdstip kan geven en als controle kan dienen voor een al dan niet correct geregistreerd tijdsinterval. Registratie van het tijdstip van staalname levert immers een belangrijke bijdrage aan een correcte interpretatie van analyseresultaten. Dit aspect werd onderzocht door van stalen, waarvan het ejaculatie tijdstip goed gekend was, de evolutie van de osmolaliteit in functie van de tijd te volgen. Het verband tussen osmolaliteit en tijdsinterval na ejaculatie werd grafisch geanalyseerd.

De geplande staalopwaardering door negatieve selectie van spermastalen via depletie van spermastalen van witte bloedcellen en spermacellen door apoptose geïnduceerd tot geprogrammeerde celdood, is wegens tijdsgebrek, niet aan bod kunnen komen in dit eindwerk. Dit proces zal, op basis van de kennis opgedaan in monitoring van apoptose en DNA-beschadiging in dit eindwerk, in de toekomst geoptimaliseerd en toegepast worden.

## **2 Materiaal en methoden**

### ***2.1 Staalname en stockage***

Stalen (n=130) werden bekomen van mannen die zich in het labo aanboden voor fertiliteitsonderzoek. Onder deze stalen waren patiënten met normospermie (n=15) oligospermie (n=30), asthenospermie (n=26), teratospermie (T1: n=43 en T2: n=44), azospermie (n=3) en vasectomie (n= 4). De stalen werden bekomen door masturbatie na een

aangeraden periode van 3-5 dagen onthouding om een optimale concentratie te bekomen. Na het verkrijgen van het staal werd het 30 minuten op 37°C met 5% CO<sub>2</sub> bewaard om het staal te laten vervloeien. Na het vervloeien werden de standaardparameters onderzocht (mobiliteit, morfologie, volume, concentratie, pH). Na deze evaluatie werd het staal gecentrifugeerd tegen 2000 toeren/min gedurende 10 minuten in een vaste hoek rotor centrifuge. (Hettich EBA 3S, Tuttlingen, Duitsland). Het bovenstaande seminale plasma werd zorgvuldig afgenomen en bewaard op -20°C tot de analyse van de hoeveelheid 8-OhdG en andere parameters uitgevoerd kon worden.

## ***2.2 Analyse referentieparameters en parameters voor fertiliteitsonderzoek***

De standaardparameters voor de bepaling van de kwaliteit van het verse spermastaal, bekomen door zowel macroscopisch als microscopisch onderzoek, worden uitgevoerd zoals voorgeschreven door de World Health Organisation (WHO) met uitzondering van de spermamorfologie die bepaald wordt volgens de strikte criteria volgens Kruger (62). De WHO heeft ook standaardwaarden voor een gezond staal geformuleerd. Aan de hand van deze waarden werd bepaald of een patiënt spermatogenese afwijkingen vertoonde of niet, waarbij ook weer voor de spermamorfologie de patiënten gecatalogeerd werden volgens normaalwaarden voor strikte criteria.

Als eerste werden de pH, volume en het viscositeit van een vers staal nagegaan. De pH-meting gebeurde aan de hand van een pH-gevoelige strip (Merck, Darmstadt, Duitsland), het volume werd bepaald door het optrekken in een pipet. Hierdoor werd tevens de viscositeit bestudeerd. Hoe meer visceus, hoe langer de draden zijn die zich vormen bij het langzaam leeg druppellen van de pipet.

Na het macroscopisch deel wordt het onderzoek microscopisch verder gezet en dit nog steeds op het verse staal. Microscopisch evalueert men eerst de motiliteit bij een vergroting van 200 x (Laborlux Leitz, Leica microsystems, Rijswijk, Nederland) met behulp van een speciaal ontwikkelde telkamer voor het tellen van sperma, de *Makler telkamer* (Sefi Medical instruments, Haïfa, Israël). In deze telkamer wordt 50 µl van een staal gebracht en worden vervolgens 100 zaadcellen beoordeeld op beweeglijkheid. Er zijn vier mogelijke categorieën waarin een zaadcel kan ondergebracht worden die gaan van goed, matig beweeglijk tot ter plaatste blijven trillen of totaal geen beweeglijkheid meer. Deze worden respectievelijk als a, b, c, d weergegeven.

Een tweede parameter die onmiddellijk hierbij kan nagegaan worden is de concentratie van het sperma. Hierbij werd opnieuw de Makler gebruikt en de instructies van de producent opgevolgd, waarbij er twee rijen werden geteld en de zaadcellen in elke rij staan voor het aantal per ml. Er moet bij het tellen op gelet worden dat er voldoende gehomogeniseerd is, anders kunnen er wel eens verkeerde tellingen optreden. De schatting werd gevolgd door een meer nauwkeurige telling met behulp van de Fuchs Rosenthal telkamer. De werkwijze is analoog met die van de Makler telkamer.

Verder werden van elk staal uitstrijkjes gemaakt, gefixeerd (labofix, labonord) en nadien gekleurd met de Papanicolaou kleuring. Na de kleuring werden de uitstrijkjes beoordeeld op morfologie. Van de uitstrijkjes werden in duplo 100 cellen op basis van een tweedelige classificatie (normaal/abnormaal) gescoord.

Na deze analyses werden zoals eerder vermeld in 2.1 de stalen afgedraaid en op -20°C bewaard tot gebruik. Bij ontdooide stalen werd na vortexen 300 µl afgenomen en andermaal afgedraaid. Het bovenstaande heldere plasma werd vervolgens geanalyseerd op zes parameters die een verband kunnen hebben met radicaalproductie. Deze parameters omvatten ijzer (Fe), urinezuur (UA), creatine (CREA), totale eiwitten (TP), carnitine en transferrine (TRSF). Ook werden het triglyceriden- en het cholesterolgehalte van een aantal (n= 70) stalen nagegaan. De analyse vond plaats op de modular (Roche Diagnostics, Vilvoorde, België) met de overeenkomstige reagentia (Roche diagnostics). Het is een detectie op basis van een biochemische kleurreactie. Dit doordat elke parameter deel uitmaakt van een specifieke metabole pathway. De detectie is op basis van fotometrie. Tenslotte werden een reeks (n= 90) stalen waarvan de 8-OHdG-titer was bepaald ook onderworpen aan een analyse voor verschillende overgangsmetalen (Fe, Zn, Cu, Cd, Mg, Mo) en werd het gehalte van prostaglandine D synthase nagegaan. Deze laatste parameter werd met een β-trace kit (DADE-Behring, Liederbach, Duitsland) gedetecteerd en is een maat voor de testiculaire reserve.

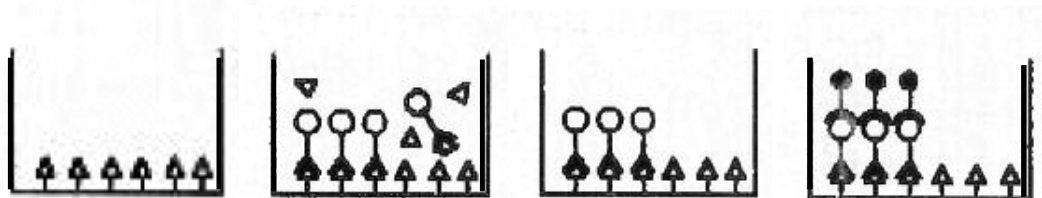
### ***2.3 8-OHdG bepaling in seminaal plasma***

Stalen waarop de hoeveelheid 8-OHdG diende bepaald te worden werden volledig ontvrozen. Na ontdooiing en vortexen werd 200 µl van het staal afgenomen en gecentrifugeerd gedurende 20 minuten. Dit opdat alle debris in een pellet neergeslagen werd en er zodus een bovenstaande heldere vloeistof werd bekomen.

Deze vloeistof werd vervolgens gebruikt om een bepaling van 8-OHdG in te zetten met behulp van een enzym linked immunosorbent assay (ELISA).

De ELISA wordt uitgevoerd met behulp van de BioRad PhD ELISA processor (Phd, Hercules, CA) volgens de instructies van de 8-OHdG-kit fabrikant (Gentaur, Brussel, België).

De gebruikte assay is een competitieve ELISA.



**Figuur 6:** Schema van gebruikte ELISA procedure. De gebruikte ELISA-procedure berust op een competitie (B) van antilichaambinding tussen enerzijds 8-OHdG-moleculen in het seminale plasma en anderzijds een hoeveelheid gecoat op de microtiter plaat (A). Na incubatie en wasstap (C) werd een enzym-gelabeld secundair antilichaam toegevoegd (D) dat aan het primaire antilichaam bond en kleurde, in verhouding met aanwezige hoeveelheid 8-OHdG in plasma, na toevoeging van substraatoplossing

In het kort wil dit zeggen dat er een competitie zal optreden, voor binding van het monoklonaal antilichaam, aan een 8-OHdG-dragers eiwit gekoppelde moleculen (8-OHdG-BSA) gecoat op een ELISA-plaat en het vrije 8-OHdG aanwezig in het seminale plasma. Hoe meer moleculen 8-OHdG er aanwezig zijn in het plasma, hoe meer ze in staat zijn om te binden aan het antilichaam. Hierdoor zal er minder antilichaam aan de gecoatde 8-OHdG BSA moleculen binden. In een volgende stap worden de antilichamen, gebonden aan 8-OHdG moleculen van een staal, gewassen. Vervolgens werd een enzym gekoppeld secundair antilichaam toegediend dat bindt aan het reeds gebonden (primaire) antilichaam. Na een wasstap werd een substraat toegevoegd en trad een kleurreactie op dat in proportie was met de aanwezige hoeveelheid 8-OHdG in het sample. Na toediening van een reactie terminatie-oplossing werd het resultaat met een absorptiemeter afgelezen (Anthos, Wals, Oostenrijk). Een schematische voorstelling van de gebruikte ELISA procedure kan worden gezien in fig 6.

#### **2.4 Flowcytometrische spermatozoa telling**

Zaadcellen werden met de UF-100 (Sysmex cooperation, Kobe, Japan) geteld. Een vers staal werd voor centrifugatie verdund door er 50 µl van op te lossen in fysiologisch water. De verdunningen waren 1/50 en 1/100 zodat dit neerkwam op 2,45 ml en 4,95 ml fysiologisch water respectievelijk. Na verdunning werden deze oplossingen geteld op de UF-100. Dit toestel is ontworpen voor het tellen van bacteriën, cellen en gisten in urines, maar is tevens zo

geprogrammeerd dat het in staat is om zaadcellen te herkennen en te tellen tijdens flowcytometrische meting op urine of van een spermastaal verdund in een fysiologische oplossing.

Van ieder staal werden vijf metingen uitgevoerd op de 1/100 verdunning in 5 ml, wat perfect mogelijk is omdat het toestel ongeveer 800 µl van de verdunning verbruikt per telling.

Van 20 stalen werd de verdunning 1/50 ook driemaal opgemeten. Er werd nagegaan of het gemiddelde van deze tellingen overeenstemt met de schatting in de Makler en de referentietelling in de Fuchs Rosenthal telkamer. De tellingen met beide verdunningen werden vergeleken met de referentietelling om te achterhalen of er verschil bestaat in de correlatie met de telling in Fuchs Rosenthal en of een 1/50 telling toelaat van lagere spermatozoa-aantallen te detecteren en of er met minder verdund sperma eventueel meer missers op treden dit wil zeggen stalen waarin wel spermatozoa aanwezig zijn, maar die dan niet door de UF-100 herkend worden. Vooral dit laatste fenomeen is belangrijk voor de betrouwbaarheid van de instrumentele telling.

### ***2.5 Overleving van spermatozoa***

De overlevingsverschillen tussen sperma, afkomstig van stalen van verschillende patiënten uitgezet in verschillende media en volgens verschillende bewaarcondities, werden nagegaan. Zo werd de invloed van alternatief capacitiemedium, samenstelling van de kweekbuisjes en van hun stoppen en de osmolaliteit van het capacitiemedium vergeleken. Noch doppen met Cd (rood) noch deze met TiO (wit) hadden enige invloed op overleving. Enkel osmolaliteit werd als enige overlevingsbepalende factor weerhouden. In het kort de wijze waarop dit verliep. Een staal werd in duplo 1/10 verdund in standaard capacitiemedium EBSS (Earls Balanced Salt Solution (Cambrex, cat BE02-027F) aangerijkt met humaan serum albumine (HSA). Vervolgens werden de buisjes met een verschillende dop afgesloten en omgekeerd op 37°C met 5,0% CO<sub>2</sub> bewaard. Na 3, 6 en 24 uur werd de overleving tussen beide buisjes vergeleken.

De osmolaliteit van het capacitiemedium EBSS-HSA werd getest door aan het standaard capacitiemedium (285 mOsm) verschillende volumes 1,5M NaCl aan te rijken. De osmolaliteit liep hierdoor stapsgewijs op 325, 350 en 365. In dit medium werd vervolgens 50 µl staal toegevoegd en onder op 37°C met 5% CO<sub>2</sub> bewaard. Ook hiervan werd de overleving na 3, 6 en 24 uur opgevolgd.

## **2.6 Osmolaliteit**

Van alle spermastalen werd op verschillende tijdstippen na ejaculatie de osmolaliteit bepaald. De osmolaliteit, gedefinieerd als het aantal deeltjes per volume-eenheid, opgemeten met behulp van de Advanced micro osmometer (Advanced instruments, Norwood, Massachusetts, USA). In dit toestel brengt men met behulp van een speciale *sampler* 20  $\mu$ l van het staal in een peltier gestuurde koeleenheid en men vriest in. Het toestel bepaalt dan bij welke temperatuur het staal invriest (vriespunt) en berekent hieruit de osmolaliteit van het staal. De osmolaliteitresultaten werden verzameld en vergeleken met het tijdsinterval tussen ejaculatie en meting.

## **2.7 Bewaren van zaadcellen in fixeerooplossing**

Een gedeelte van het verse staal (100  $\mu$ l) werd geconserveerd om het flowcytometrisch en met confocale laser microscopie later in reeksen te analyseren met behulp van monoclonale antistoffen en/of apoptosemerkers. Het gebruikte fixatiemedium is SurePath preservative fluid (Tripath imaging, worthing UK). De fixatie werd standaard uitgevoerd met een 1/10 verdunning van staal in dit preservatiemedium en vervolgens bewaard op kamertemperatuur. Apoptose en membraanmerkers werden op het einde van de studie op twee manieren bepaald: flowcytometrisch en door middel van confocale laser microscopie. Voor deze laatste techniek werden cytospin-preparaten (Shandon, waltham, MA) gemaakt van de gefixeerde en gekleurde spermastalen. De confocale laser microscopie werd gebruikt om flowcytometrische bepalingen te onderbouwen.

## **2.8 Conjugatie van antilichamen**

De antilichamen, gebruikt voor de Facs analyses, werden met een fluorochroom gekoppeld. De fluorochromen Alexa 488 (Molecular Probes, Leiden, Nederland), DY495, DY648 en DY510 XL (Dyomics, Jena, Duitsland) werden met een rechtstreekse, covalente binding tussen het NHS geactiveerde chromogeen en de NH<sub>2</sub>-groepen van aminezuurrestidues ( bvb  $\epsilon$ -amino groep van lysine) van de anti-p53, anti-CD52 (Campath, Genzyme, Cambridge MA) en de drie clones (10D3, 3C3 en 5D7) van Fas gekoppeld. Een overzicht van de absorptie- en emissiegolflengte per fluorochroom is gegeven in tabel 1. Covalente binding garandeert grote stabiliteit van de conjugaten en dient om onderlinge uitwisseling van fluorescerende labels tussen de verschillende antilichamen tegen te gaan. De koppeling werd uitgevoerd volgens de instructies van de fabrikant. Een schematische weergave van de gehele procedure is weergegeven in figuur 7.

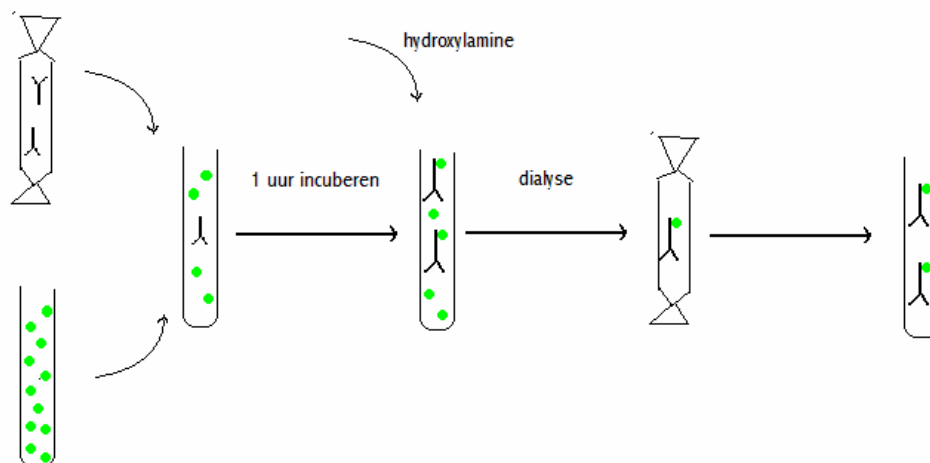
Om de koppeling uniform en zonder inhibitoren te kunnen uitvoeren werden de antilichamen voorafgaandelijk gedialyseerd met behulp van een cellulose membraan (Sigma-Aldrin, St-Lois, MO) permeabel voor zeer kleine moleculen, (<8000 D) waarbij grotere eiwitmoleculen tegengehouden worden. Op deze manier wordt het antilichaam ontdaan van storende elementen uit zijn bewaarbuffer. De reden waarvoor deze zuiveringsstap werd ondernomen is dat NHS-esters gebruikt werden voor de koppeling. In deze reactie werken kleine amine (NH<sub>2</sub>) bevattende moleculen storend.

*Tabel 1: overzicht gebruikte fluorochromen.*

	<b>Alexa 488</b>	<b>Dy 510 XL</b>	<b>Dy648</b>
<b>Absorptie (nm)</b>	494	510	653
<b>Emissie (nm)</b>	519	590	674

De cellulose membranen voor dialyse werden driemaal gedurende 30 minuten gekookt in MilliQ water. Hierna werden de membranen andermaal gekookt in een oplossing met de helft MQ en Ethanol (Acros, Geel, Belgium). Na deze laatste wasstap werden de membranen bewaard in een dialyse bewaarbuffer samengesteld uit NaHCO<sub>3</sub>, EDTA, NaN<sub>3</sub> en MQ. De membranen dienen voor gebruik enkele malen met MQ afgespoeld te worden.

Bij het gebruik werd aan weerszijden van het membraan een knoop gelegd en werd de antilichaamoplossing in het membraan gebracht. De dialyse werd uitgevoerd in een 0,1-0,2M bicarbonaat buffer op pH 9. De buffers werden vervangen na 1, 3, 12 en 14 uur.



**Figuur 7: overzicht van conjugatie-procedure.** Het schema geeft weer hoe er te werk werd gegaan om de geconjugeerde antilichamen te bekomen. Eerst werden de antilichamen gezuiverd uit hun stockoplossing om aspecifieke bindingen te voorkomen. Vervolgens werden de antilichamen aan de amine reactieve fluorochromen toegevoegd. Dit mengsel incubeerde voor een uur. De geconjugeerde antilichamen dienen tenslotte van ongekoppelde resten gescheiden te worden door andermaal een dialyse.



Na grondige dialyse van de antilichamen werd de koppeling uitgevoerd door langzaam en intens mengen van de gezuiverde antilichamen (concentratie 1-5 mg/ml) en een fractie van de in 350  $\mu$ l watervrije DMSO (Acros) opgeloste, chromoforen (concentratie 2,8 mg/ml) in zodanige volumeverhoudingen dat ratio's van 5 tot 20 geactiveerde chromofoormoleculen per molecule antilichaam werden bekomen. Na 60 minuten incubatie in het donker werd de reactie gestopt door middel van toevoeging van 0,1 ml 1,5 M hydroxylamine op pH 8,5. Na het uitvoeren van de koppeling werden de geconjugeerde antilichamen andermaal gedialyseerd om het mengsel van niet gereageerde fluorocroom te ontdoen. Deze dialyse verliep in een 10 mM PBS buffer met  $\text{NaN}_3$  op pH 7,5. De buffers werden op hetzelfde tijdschema verversd als bij de eerste (bicarbonaat) dialyse. De dialyse werd in het donker uitgevoerd om fotobleaching van de fluorochromen te vermijden. Na het doorlopen van deze dialyse werden de stockoplossingen van de geconjugeerde antilichamen aangelengd tot een concentratie van 1 mg antilichaam per ml met een BSA-oplossing. De geconjugeerde antilichamen werden in het donker op 4°C bewaard tot gebruik. De stockoplossing werd bij gebruik nog 1/100 of verder verdund in een 1/1 volumemengsel van solugel 7.5% en 7,5% BSA zodat de gebruikconcentraties van de conjugaten gelegen waren tussen 2.5 en 10  $\mu$ g antilichaam per ml.

### ***2.9 Bepaling van apoptose percentage met flowcytometrie***

Tijdens de analyses met de FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA) werden drie parameters nagegaan. Stalen bestaande uit, hetzij 100  $\mu$ l spermatozoïden in fixatievloeistof, hetzij uit 100  $\mu$ l vers sperma, werden voorafgaandelijk gewassen met fysiologisch water en de pellet hernomen in 100  $\mu$ l fysiologische oplossing. Deze suspensies werden voor vier kenmerken aangekleurd door toevoeging van de hiervoor geconjugeerde antilichamen. Per staal werd er 10  $\mu$ l van CD45, CD52, fas en p53 toegevoegd en gedurende 15 minuten in het donker geïncubeerd. Na kleuring werd een wasstap met PBS uitgevoerd om een overmaat aan antilichaam en debris te verwijderen.

De vier gebruikte parameters zijn belangrijk. Enerzijds voor het lokaliseren en identificeren van respectievelijk spermatozoïden en witte bloedcellen (WBC) op het scatterdiagram van de meting (CD 52 voor zaadcellen plus WBC en CD45 om binnen de CD52 geïdentificeerde groep de zaadcellen te herkennen). Anderzijds om de cellen verwikkeld in een apoptoseproces (fas, p53) te kunnen herkennen. De CD45 en een referentie Fas monoclaal conjugaat evenals Annexine V een vroegere merker van apoptose, gelabeld met respectievelijk PerCP Cy 5.5 voor CD45 en FITC voor de apoptosemerkers werden bekomen van Becton

Dickinson. De reden hiervoor is dat conjugatie van CD45 niet meer in het beschikbare tijdsbestek haalbaar bleek en de efficiëntie van het fluorochroom Dy 510 door ons gebruikt door het conjugeren van 3 clones fas-antilichamen laag bleek te zijn bij vergelijking met de BD-analogen in controle-experimenten.

Het flowcytometrisch toestel dat gebruikt werd bij analyses, de Facs Calibur, bezat een Argon Ion Laser en een diode laser. Deze hebben een excitatiegolflengte op respectievelijk 488 nm en 635 nm. De Calibur is in onze opstelling in het bezit van zes detectoren, waarvan er vier geschikt zijn voor fluorogene detectie.

De positie van spermatozoa werd nauwkeurig bepaald op basis van de CD52, een glycoproteïne dat aanwezig is op mature zaadcellen, en CD45-detectie enkel aanwezig op WBC. Enkel de cellen positief voor CD52 en negatief voor CD45 werden geselecteerd, en vervolgens gebruikt voor analyse van apoptose (anti-Fas en/of Annexine V) of DNA-schade (P53). Door deze voorafgaandelijke selectie werd het mogelijk enkel zaadcellen te tellen zonder achtergrondruis en interferentie van andere celtypen. Er werden per staal 10 000 uitgevensterde events opgemeten en geanalyseerd met de *Cell Quest Pro* Software (Becton Dickinson). Verder werd de voorwaartse en zijwaartse scatter van de te analyseren spermatozoidenpopulatie zodanig aangepast dat het analysevenster maximaal benut kon worden. De optimalisatie van de zaadcelpositie gebeurde met behulp van een ongelabelde pool spermatozoa. De pool werd bekomen door het samenvoegen van enkel de spermatozoa van verschillende stalen. Het opzuiveren van de verschillende stalen gebeurde door middel van dichtheitsgradiënt centrifugatie. Pure sperm (100%) (Nicadon, Gothenborg, Sweden) een silicone suspensie met maximale dichtheid werd verdund tot 70% met fysiologisch water zodat lichtere cellen (dode spermatozoieten, WBC en onvoldoende gedifferentieerde zaadcellen) met lage dichtheid op basis van hun dichtheid niet door de siliconensuspensie gaan, terwijl volledig rijpe en gedifferentieerde spermatozoiden met hoge specifieke dichtheid er wel doorheen gecentrifugeerd kunnen worden. Op deze dense massa werd vervolgens, afhankelijk van het volume van het staal, een 0,5 - 1 ml sperma op de 70% Pure Sperm aangebracht. Dit werd gedurende 15 minuten zacht afgedraaid (450 g). Na deze centrifugatie bevonden enkel de mature en morfologisch normale zaadcellen zich in de onderste laag van de proefbuis. De pellet werd vervolgens nogmaals gewassen met fysiologische oplossing en gedurende 5 tot 10 minuten aan een laag toerental afgecentrifugeerd. Na deze wasstap met fysiologisch water, werden de zaadcellen in fixatiemedium overgebracht en geconserveerd tot op het tijdstip van de analyse met de Facs Calibur.

Als laatste werd er voor gezorgd dat de gebruikte fluorochromen een zo beperkt mogelijke spectrale emissieoverlap toonden tijdens analyses. Dit werd bekomen door spermatozoa voor CD52, in de drie verschillende fluorochromen aan te kleuren, vervolgens de spanningen van de detector aan te passen, en tenslotte de overlappende signalen van de verschillende fluorochromen elektronisch te compenseren zodat de overlap minimaliseerde.

### ***2.10 Controle van conjugatie met confocale microscopie***

Het gelabelde staal van de Facs-analysen werd verder ook nog gebruikt voor de confocale analyse. Van het gekleurde staal werd een cytospin preparaat (Shandon) in duplo aangemaakt, waarbij de gekleurde spermatozoïden in een speciale centrifugehouder, vastgehecht op een microscopie draagglasje, aan laag toerental worden afgecentrifugeerd zodat zich een laagje van mooi gefixeerde en uitgespreide cellen vormt op de draagglasjes. Deze werden vervolgens onder de confocale microscoop (Zeiss LSM 510 META, Carl Zeiss Advanced Imaging Microscopy, Jena, Duitsland) geanalyseerd om het verband tussen de eerder vermelde parameters ook visueel vast te leggen.

Het werkingsprincipe wordt beknopt toegelicht. Na aankleuring van fas en CD52 bestraalt een laser met golflengte van respectievelijk 488 en 635 het preparaat. De zaadcellen, die fas tot expressie laten komen, reageren met de anti-P53 antilichamen en hun labels worden door de laser geëxciteerd. Omdat het molecuul hierdoor in een hoger energieniveau terechtkomt, is het energetisch minder stabiel en zal het terug naar een stabiele grondtoestand willen keren. Dit gaat gebeuren door het emitteren van lichtenergie. Het uitgezonden licht is van een lager energieniveau en bijgevolg van een hogere golflengte. Dit verschil in excitatie en emissiespectrum wordt ook wel de stokes shift genoemd. Door deze shift is het mogelijk om de aangekleurde moleculen te bekijken ten opzichte van een donkere lichtvrije achtergrond. Confocaliteit (strikt planaire confocale belichting) en stricte monochromiciteit (laser belichting) zijn de eigenschappen die de confocale microscopie tot een zeer krachtige detectiemethode maken met buitengewone resolutie.

### ***2.11 Statistische analyse***

Het onderzoek valt onder te verdelen in twee grote delen. Deze delen werden uitgevoerd op een verschillende patiëntenpopulatie. Het eerste deel van het onderzoek heeft betrekking op de osmolariteit en de metingen op de flowcytometer voor urine analyse. Het tweede deel van het onderzoek had betrekking op de correlatie van ROS en het apoptosepercentage. De

populatie van het eerste deel van de studie bestond uit 130 patiënten terwijl het tweede deel uit 89 proefpersonen bestond. De patiënten (n=89) betrokken in het deel met betrekking tot apoptose werden willekeurig uit de eerste populatie (n = 130) geselecteerd.

De populatie in het tweede deel werd verder onderverdeeld volgens de conventionele sperma kwaliteitsdiagnostiek in 10 verschillende categorieën, afhankelijk van de motiliteit, het aantal spermatozoa/ml en de morfologie. In de categorie motiliteit werd een onderverdeling gemaakt op basis van de mate van progressief beweeglijke cellen (klasse a+b). Indien deze som minder dan 45% percent bedroeg, werd deze als astenospermie (A) genoteerd.

In de categorie van de concentratie werd de hoeveelheid van <20 miljoen per ml beschouwd als abnormaal (O) terwijl >20 miljoen gezien werd als oligospermie.

In de laatste klasse, de morfologie, werden drie onderverdelingen gemaakt namelijk 0-5, 5-10 en >10 waarbij deze respectievelijk T2, T1 en normaal worden beschouwd. Het verschil tussen T1 en T2 zit in de fertiliteitsprognose voor de patiënt. De personen die tot de groep T1 behoren hebben een betere prognose als de groep T2. Er werd gekeken naar de cellen die voor deze drie categorieën normaal waren en deze worden later vermeld als NMC.

Effecten van roken of niet roken worden nagegaan door de stalen in te delen volgens hun cotininebepaling, niet rokers hebben < 10 ng/ml cotinine in hun seminaal plasma, bij rokers kan het cotinine gehalte stijgen tot boven de 500 ng/ml.

Op basis van deze indeling in klassen volgens al of niet aanwezig zijn van geïsoleerde en eventueel gecombineerde defecten in sperma, werden met de statistische programma's MedCalc en NCSS, beschrijvende statistische overzichten opgesteld, correlatie-analysen uitgevoerd en tenslotte werd via logistische regressie-analyse het belang van de verschillende diagnostische parameters verwerkt met Odd's-ratios en ROC-analyses.

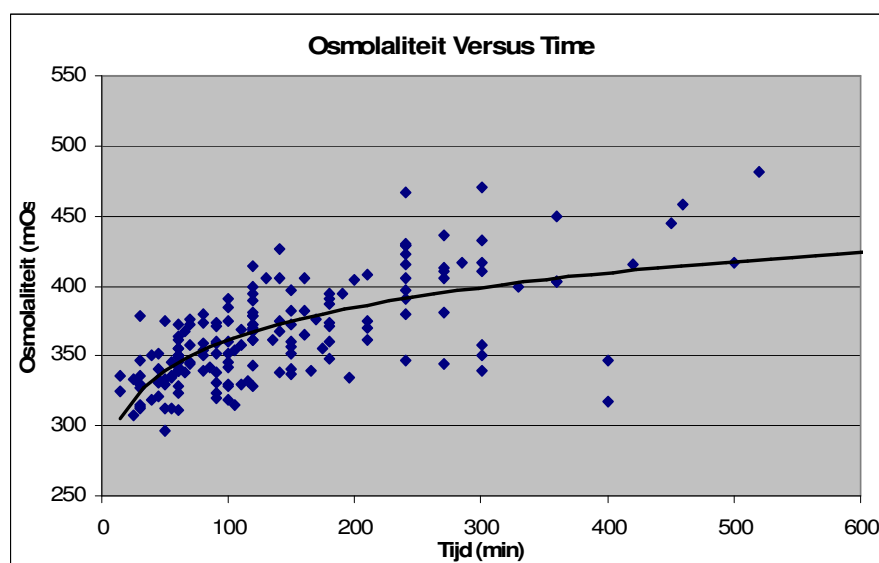
### **3 Resultaten**

#### ***3.1 Correlatie tussen interval na ejaculatie en osmolaliteit***

Uit de resultaten kan afgeleid worden dat er een positief verband bestaat tussen de tijd verstreken sinds de ejaculatie en de osmolaliteit, mogelijk te wijten aan enzymatisch opsplitsen van suikers en eiwitten aanwezig in het ejaculaat. Eiwitten zoals semenogelin worden door sperma serine proteasen zoals PSA (52) afgebroken en hyaluronzuurpolymeren door hyaluronidase. Verwacht wordt dat na verloop van tijd een stationaire plateaufase bereikt

wordt door uitputting van het substraat en de osmolaliteit dus niet verder stijgt. Op de globale uitzetting van tijd ten opzichte van de osmolaliteit (fig 8) is de toename in functie van de tijd duidelijk waar te nemen. Er is te zien dat de osmolaliteit per staal duidelijk verschillend is, maar dat ze allen een stijging van osmolaliteit ondergaan .

Op de globale weergave in figuur 8 is de verwachte plateaufase enkel als trend waarneembaar, door gebrek aan langdurige opvolging. Opvolging tijdens de eerste uren na ejaculatie toonde echter wel duidelijk de stijging waargenomen in osmolaliteit en de evolutie naar een maximum of een plateaufase volgens de trendlijn.



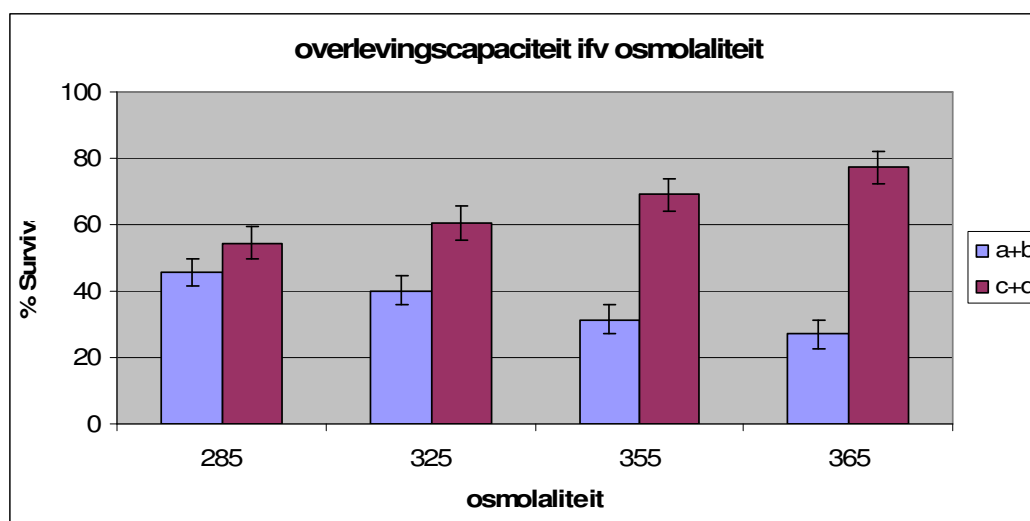
**Figuur 8: tijd tov osmolaliteit.** Van 130 verschillende patiëntenstalen werd de osmolaliteit opgemeten in de tijd. Er werd een positieve tendens waargenomen. Hoe langer de tijd hoe hoger de osmolaliteit van het staal. Een trendlijn is weergegeven en vertoont na een toename een aanzet tot plateaufase.

### ***3.2 Zaadceloverleving is gecorreleerd met osmolaliteit***

In dit luik van het onderzoek werd de invloed van een aantal verschillende aspecten op de overlevingscapaciteit van zaadcellen geanalyseerd. Zo werd naar een verschil in coating gekeken van zowel de dop als de samenstelling van de verzamelbuis zelf. Deze leken echter geen significante verschillen aan het licht te brengen betreffende de overlevingscapaciteit van de zaadcellen. De overleving bij zowel glazen als plastieken proefbuisjes was vergelijkbaar en bleek geen invloed uit te oefenen op de overlevingsmogelijkheden van een zaadstaal. Er kon besloten worden dat de invloed van verschillende type kweekbuizen en stopfels (Cd en TiO) geen bijdrage levert aan de overlevingscapaciteit van zaadcellen.

Vervolgens werd er ook naar de overleving van stalen in verschillende media geanalyseerd. Het medium waar gebruik werd gemaakt, is dit waarin tevens capacitaties worden uitgevoerd,

namelijk EBSS-HSA. Het wordt geacht om goede condities te verschaffen voor de spermatozoiden en ze in leven te houden. De osmolaliteit van dit medium is aangepast voor



**Figuur 9: Overleving in functie van osmolaliteit.** De grafiek geeft weer dat het percentage beweeglijke spermatozoa (blauwe balken) afneemt indien de osmolaliteit toeneemt van 285 tot 365. Het percentage onbeweeglijke cellen (paarse balken) neemt bijgevolg dus toe bij een hogere osmolaliteit. Ook wordt telkens de standaardfout weergegeven per balk.

deze functie. Het doel van deze opstelling was te achterhalen of de overleving afhankelijk was van de osmolaliteit van het medium waarin spermatozoiden zich bevinden.

Na het inzetten van overlevingen werd duidelijk dat de overlevingscapaciteit van een zaadstaal afhankelijkheid vertoont van de osmolaliteit. Hoe hoger deze is, hoe lager de overleving van een staal (fig 9). Bij het experiment is zichtbaar dat het aantal progressief beweeglijken (a of b gescoord bij motiliteitonderzoek) afneemt vanaf 3 uur terwijl het aantal onbeweeglijke zaadcellen toeneemt bij een hogere osmolaliteit.

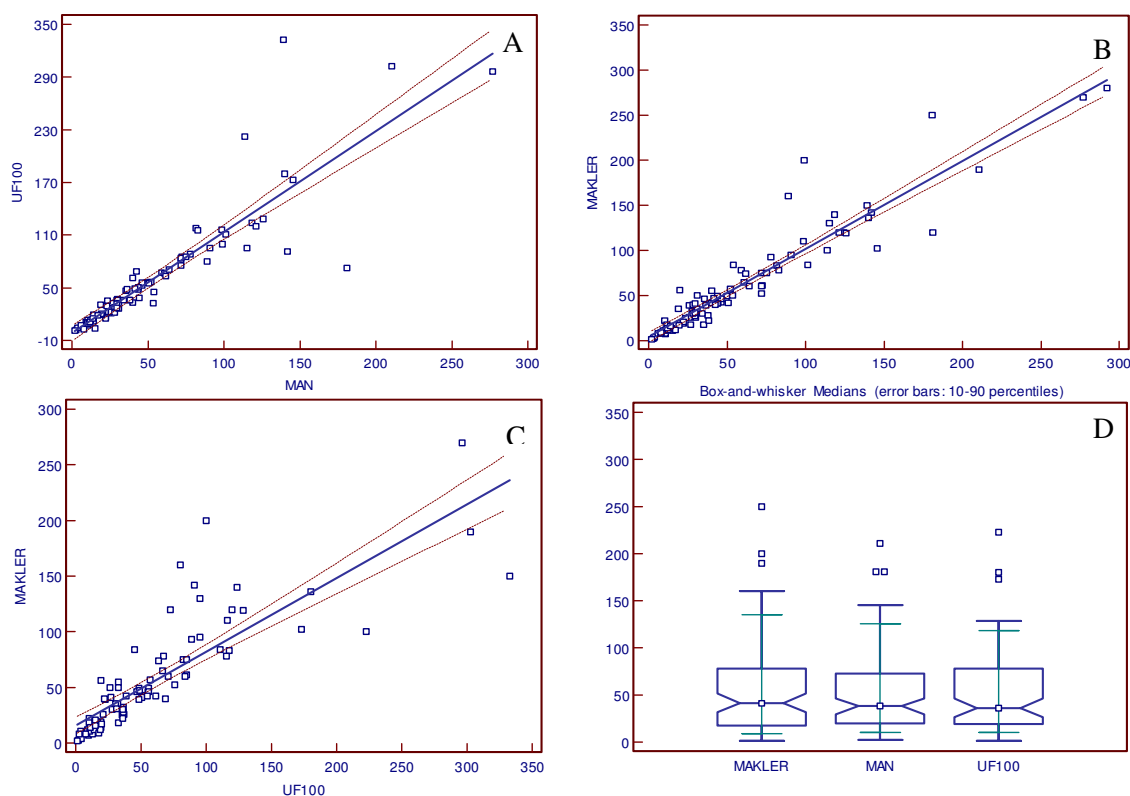
### 3.3 Zaadcelbewaring

De zaadstalen werden voor een efficiënte manier van werken tijdens flowcytometrische analyses, een tijd bewaard zodat verschillende stalen gelijktijdig konden geanalyseerd worden. Hierdoor was er nood aan een methode die in staat was om zaadcellen geruime tijd te bewaren. In dit onderzoek werd gebruikt gemaakt van een conservatiemedium dat reeds wordt toegepast voor de bewaring van baarmoederhalsuitstrijkjes. Dit medium bleek goed in staat om spermatozoa te bewaren. Door de cellen in dit medium toe te voegen, werden de zaadcellen gelijktijdig gefixeerd en bijgevolg werd de membraan permeabel zodat intracellulaire labeling met antilichamen mogelijk gemaakt werd. De in fixatieoplossing bewaarde zaadcellen bleven stabiel tot gebruik. Dit werd nagegaan door geregeld een manuele telling uit te voeren in de Makler telkamer. Conservatie bleek op lange termijn (>2 maand) te

leiden tot een verhoging aan debris van gefragmenteerde spermatozoa. Deze toename aan debris stoort de flowcytometrische analyse van de zaadstalen. De kleuring van de spermatozoa met fluorescent gemerkte antilichamen, ondervond echter geen hinder van de fixatie. Besloten werd dat dit medium geschikt is om gedurende 4 weken zaadcellen te bewaren zonder dat ze hun fenotypische kenmerken (merkers) verliezen.

### 3.4 Flowcytometrische telling van spermatozoa

Van 105 stalen werd manueel zowel een schatting met de Makler telkamer, een telling in de Fuchs Rosenthal telkamer en een automatische telling uitgevoerd. De sample-preparatie werd zoals eerder beschreven (sectie 2.4) uitgevoerd. Aanvankelijk werd een brede verdunningsreeks aangemaakt, maar er werd later verder gewerkt met slechts twee verdunningen, 1/50 en 1/100 omdat ze de meest efficiënte telling opleverden. Uiteindelijk werd uitsluitend met de 1/100 verdunning verder gewerkt omdat de 1/50 geen significant voordeel bood.



**Figuur 10: Vergelijking tussen meetmethoden.** Elk staal ( $n=105$ ) werd op drie manieren geteld. Enerzijds de standaardwijze, manuele telling met de Fuchs Rosenthal en een schatting met de Makler telkamer en anderzijds de geautomatiseerde telling met de UF-100 met een verdunning van 1/100. Het verband tussen de tellingen is weergegeven in de grafieken. Er werd een regressielijn aangebracht om het verband te verduidelijken. Verder werd er telkens een 95% betrouwbaarheidsinterval aangegeven (stippellijn). In panel A een vergelijking van de automatische telling ten opzichte van de manuele telling. In panel B een vergelijking met de standaardwerkwijze, de makler en de Fuchs Rosenthal. De UF-100 toont een betere correlatie met minder uitschieterende waarden in vergelijking met de schatting in de Makler. In panel C wordt de schatting van de makler uitgezet tegen de telling met de UF-100. In panel D box plots van de drie methoden. In deze is het duidelijk dat de variatie en de mediaan lager zijn. Verder ook duidelijk waarneembaar dat de UF-100 zeer goed overeenstemt met de manuele telling.

De gemiddelden van de vijf tellingen met verdunning 1/100 van ieder staal, werden op bovenstaande grafieken (fig 10A) uitgezet ten opzichte van een nauwkeurige referentietelmethode nl microscopische telling in de Fuchs Rosenthal telkamer. De schatting van de spermacentratie in de Makler telkamer, werd eveneens met de referentietelling in de Fuchs Rosenthal vergeleken (fig 10B).

Uit de vergelijking tussen de instrumentele telling op de UF-100 en de manuele telling met de Fuchs Rosenthal blijkt dat er een rechtevenredig verband bestaat tussen de geautomatiseerde en de manuele tellingen. De automatische telling wijkt slechts in beperkte mate af van de referentiemethode. De afwijkingen overschrijden meestal niet het 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) van de referentietechniek. Vanaf zeer hoge concentraties (>100 miljoen/ml) treden afwijkingen t.ov. de referentie op. Deze verschillen zijn meer uitgesproken vergeleken met de Makler en de Fuchs Rosenthal telkamers.

Tenslotte werd een vergelijking gemaakt tussen de telling in de Makler telkamer en de UF-100 (fig 10C). Hieruit bleek dat de telling met de UF-100 nauwkeuriger was dan de manuele schatting in de Makler en bovendien vergelijkbaar in tijdswinst. Het verschil in nauwkeurigheid werd vooral bij zaadcelconcentraties vanaf 100 miljoen waargenomen.

Van de vijfvoudige metingen per staal op de UF-100 werd de variatiecoëfficiënt (cv) berekend. Deze variatiecoëfficiënt was zeer goed en situeert zich binnen een 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) van 2.72 tot 4.13 met een mediaan van 3.25 wat reproduceerbaarheid en betrouwbaarheid van de meting bewijst.

In enkele gevallen (n= 4) of 3% van de 130 getelde patientstalen gaf de UF-100 geen spermacentratie aan. Om omgekeerde redenen werden spermacellen in deze stalen niet herkend.

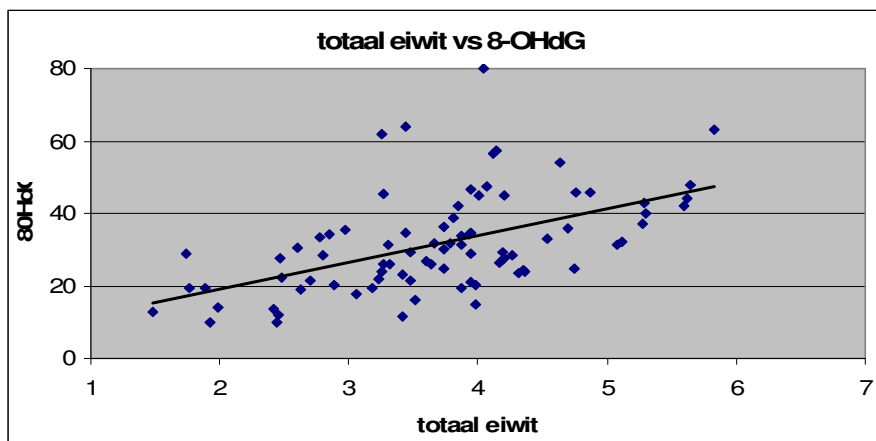
### ***3.5 Bepaling 8-OHdG***

De concentraties van 8-OHdG in seminaal plasma werden gemeten met een ELISA procedure. Na centrifugeren van het seminale plasma aan 12000 tpm in een Eppendorf centrifuge werd het helder plasma gebruikt voor analyse.

Literatuuronderzoek leverde maar 1 enkel experiment op (54) voor testen uitgevoerd op seminaal plasma met behulp van een ELISA procedure. Over de klinische relevantie is dus nog niet veel geweten en er zijn er dus ook nog geen referentiewaarden voor deze parameter gekend. Er werden 90 verschillende stalen onderworpen aan een 8-OHdG-titratie en simultaan werden van deze stalen 30 cytologische en biochemische parameters geanalyseerd, die mogelijk in verband staan met spermatogenese, maar ook met de productie van zuurstofradicalen en ROS-geïnduceerde 8-OHdG vorming en vrijzetting. Correlatieanalyses



tussen de verschillende parameters bekomen op 89 stalen werden uitgevoerd. Herhaalde metingen voor dezelfde patiëntstalen op verschillende tijdstippen bleken niet significant verschillend. Deze goede reproduceerbaarheid garandeert de betrouwbaarheid van de competitieve ELISA-procedure en bewijst dat 8-OHdG over relatief korte termijn stabiel blijft in ingevrozen seminaal plasma.



**Figuur 11: Totaal eiwit tov 8 OHdG.** De 8-OhdG-concentratie vertoont een positieve trend vergeleken met het totaal eiwitgehalte. Er werd een trendlijn weergegeven die de relatie tussen beide parameters verduidelijkt.

Na analyse van de Spearman correlatiematrix werden met betrekking tot het 8-OHdG molecule een zeer beperkt aantal significante correlaties opgemerkt. Er werd een positieve correlatie waargenomen tussen het seminaal plasma 8-OhdG-gehalte en het totaal eiwitgehalte. (fig 11). Dit ondanks het feit dat in het ejaculaat de eiwitconcentratie voor een groot deel bepaald wordt door de semenogelines, eiwitten met een sterke anti-oxidatieve functie, en men dus eerder een omgekeerd effect zou verwachten. Verder werd er ook een significante relatie gevonden met het aanwezige ijzer (Fe) in seminaal plasma. Deze observatie werd wel verwacht aangezien ijzer, via de Fentonreactie, de aanmaak van ROS catalyseert. Ook was de detecteerbare hoeveelheid 8-OHdG afhankelijk van het ejaculaatvolume. Hoe kleiner dit volume, hoe hoger de concentratie van 8-OhdG, wat logisch lijkt als men ervan uitgaat dat de productie van 8-OHdG cellulair gebeurt en slechts vrijgesteld 8-OHdG in seminaal plasma terechtkomt.

Indien elementen van de levensstijl in verband gebracht worden met fertiliteit en negatieve invloeden van ROS, denkt men altijd eerst aan de negatieve effecten van roken. Roken wordt beschouwd als een belangrijke catalysator voor het ontstaan van zuurstofradicalen. Een eerste vraag die zich dan stelt is of een patient rookt en hoeveel. Om patiënten objectief en kwantitatief te evalueren volstaat het om zijn cotinine uitscheiding in urine te meten, samen

met de hoeveelheid creatinine als maat voor zijn urinaire clearance. Vermits in deze studie enkel seminaal plasma beschikbaar was en geen informatie over al of niet-roken van de patient, werd nagegaan of met de cotinine immunoassay bepaling van DPC, gevoelig cotinine in seminaal plasma kon worden gedetecteerd en of de patiënt bij rokers of niet-rokers werd ingedeeld. Dit bleek wel degelijk een efficiënte benadering en 79 van de onderzochte semen-stalen werden onderzocht op hun cotininegehalte. Hiervan werden er 27 positief gevonden met andere woorden 39% van de onderzochte populatie betrof rokers. Tijdens de verdere verwerking van de data werd nagegaan of een verband met dit afbraakproduct van nicotine kon gebruikt worden om te zien of er een verband bestaat tussen roken, het gehalte aan het 8-OHdG en ROS-productie, het apoptoseniveau of invloeden op andere semenparameters.

Bij vergelijking van de 8-OHdG-concentraties in semen van rokers en niet-rokers werden echter geen significante verschillen waargenomen zoals uit een ROC-analyse voor deze parameter blijkt. Bovendien kwamen de bevindingen uit deze studie niet overeen met eerder gepubliceerde waarden (62) betreffende 8-OHdG concentraties in semen bij rokers en niet-rokers. Vermits het 8-OHdG in seminaal plasma maar een cellulair afscheidingsproduct is en daar ROS-radicalen maar 8-OHdG kunnen vormen indien ze inwerken op cellulair DNA, werd de design van de studie gewijzigd en werd het 8-OHdG-gehalte per spermacel gedefinieerd en de 8-OHdG-spermatozoonratio of de verhouding van de 8-OHdG-concentratie over de spermaconcentratie werd de nieuwe parameter.

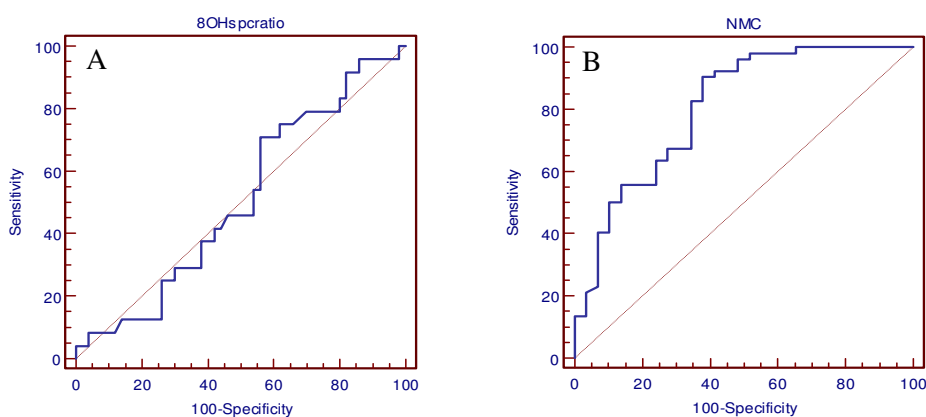
Met deze nieuwe parameter werden zeer significante correlaties met zowel conventionele semenmerkers i.e. NMC als nieuwe biochemische merkers i.e. carnitine,  $\beta$ -trace gevonden zoals blijkt uit tabel 2.

*Tabel 2: Correlaties van standaardparameters met 8-OHdG per zaadcel geproduceerd. BI: 95% betrouwbaarheidsinterval, T Carn: totaal carnitine, V Carn: vrij carnitine, tot count: totaal aantal spermatozoiden per ejaculaat.*

	$\beta$ -trace	Motiliteit	Morfologie	NMC	Tot count	T Carn	V Carn
Correlatie	-0.46	-0.20	-0.15	-0.64	-0.56	-0.40	-0.36
BI	-0.68	-0.40	-0.36	-0.75	-0.69	-0.61	-0.58
	-0.16	-0.009	0.06	-0.49	-0.39	-0.14	-0.09
p-waarde	0.0035	0.06	0.15	0.0001	0.0001	0.0036	0.0092

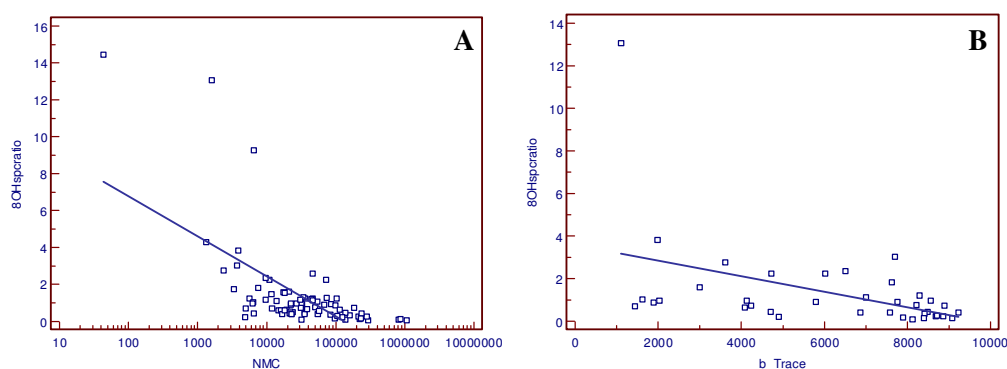
Deze nieuwe parameter de 8-OHdG per zaadcelmerker is blijkbaar niet gevoelig aan het effect van roken, vermits een ROC-analyse voorgesteld in figuur 12, niet toelaat om maar enig onderscheid aan te tonen voor deze parameter bij roken of niet-roken.

De AUC of area onder de curve voor deze parameter is slechts 50.9% wat wijst op een zeer geringe invloed van roken op de 8-OHdG output per zaadcel. Indien we echter deze parameter in een ROC-analyse gaan toetsen aan aan predictie voor een optimale zaadcelkwaliteit uitgedrukt als een minimum NMC dan bekomen we een ROC curve met 80.6 % AUC, wat staat voor een uitstekende prognostische waarde



**Figuur 12: ROC analyses van 8-OHdG per zaadcel.** In panel A de ROC-analyse van het 8-OHdG per zaadcel in functie van roken of niet-roken. In panel B het NMC of de optimale spermatozoieten output in vergelijking met de 8-OHdG per zaadcel (cutoff 0.5)

Regressieanalyse (fig 13) toont sterk negatieve correlaties van het 8-OHdG per zaadcel, niet alleen met stijgende kwaliteit in conventionele spermaparameters zoals totale sperma output, totale output aan optimaal sperma per ejaculaat, ab spermamotiliteit en stijgende spermamorfologie, maar ook in functie van de nieuwere biochemische spermaparameters zoals vrij en totaal carnitine in seminaal plasma, merker voor de energiehuishouding van spermatozoiden en van  $\beta$ -trace dat beschouwd wordt als een merker voor de testiculaire spermatogene reserve.



**Figuur 13: Correlaties tussen het 8-OHdG en standaard of biochemische parameters.** In panel A is de significante ( $p < 0.005$ ) negatieve correlatie van de hoeveelheid 8-OHdG met de normale zaadcellen weergegeven. In B wordt de correlatie tussen de 8-OHdG waarde weergegeven tegen een nieuwe biochemische merker. Ook deze correlatie is statistisch significant ( $p < 0.001$ ). B-trace:  $\beta$ -trace, 8OHdGsp: ratio tussen de hoeveelheid 8OHdG gedetecteerd in seminaal plasma en de sperma concentratie.

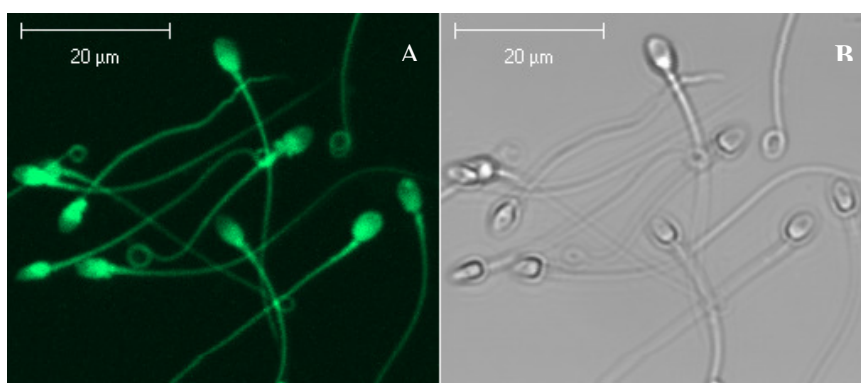
**Tabel 3: overzicht van de significante correlaties.** Grafische voorstelling van correlaties tussen de geanalyseerde parameters. De Pearson correlatiecoëfficiënt is steeds weergegeven gevolgd door het hun p-waarde aangeduid met een cijfer. De verschillende significantie niveaus (a, b, c of d respectievelijk 0,05, 0,01; 0,001; 0,0001 en <0,0001) worden visueel voorgesteld met eenkleurschakering met toenemende intensiteit bij hogere significantie. (RC:ronde cellen, prec:precursoren, vol:volume, βT: β-trace, chol:cholesterol, WBC: witte bloedcellen, Ur:ureum, Tcar:totaal carnitine, V car: vrij carnitine, cotin: coninine, gluc: α-glucosidase, uz: urinezuur, TRSF: transferrine, crea: creatinine)

	C/ml	tot/te	motil	moif	MMC	Osm60	Crea	Fe	UZ	TP	TRSF	Cotin	VCar	Tcar	Gluc	80HdG	80HdG/C	Ca	Zn	Cd	Cu	Zn/Cu	Mg	WBC	Chol	βT	Vol	prec	RC
leeftijd																													
concent/ml	1e	0.83 e	0.24 a	0.39 e	0.77 e		-0.29 b				0.47 e				0.43 c				0.31 b				0.30 b				0.43 d	0.41 d	
concefeac	0.83 e	1e	0.27 a	0.87 e			-0.36 c				0.33 b				0.32 b				0.31 b						0.29 b	0.27 a	0.26 a		
motiliteit	0.24 a		1e	0.24 a											0.27 a								0.24 a						
MORFOL	0.39 c	0.27 a		1e	0.49 e																								
MMC	0.77 e	0.87 e	0.24 a	0.48 e	1e	0.43 b																	0.46 c	0.39 b			0.32 a	0.38 b	
GSM_60	-0.35 c	-0.36 c				1e				0.40 b													-0.23 a	-0.31 b			-0.31 b	-0.23 a	
Creatinine							1e			0.42 c	0.27 a																		
ijfer								1e		0.42 d	0.36 c	-0.26 a																	
Urinezuur									1e	0.42 d	0.36 c	-0.26 a																	
TotaalEiwit						0.41 b	0.42 c	0.43 d	1e	1e	0.42 d	0.36 c	-0.26 a																
TRSF1	0.47 e	0.33 b				-0.27 a				0.35 c	1e								0.30 a										
Cotinine										-0.26 a	-0.29 b	1e																	
v Carnitine				0.39 b						0.38 b	0.38 a	1e	0.94 e	0.38 a															
Tcaritine										0.40 b	0.34 e	1e	0.40 b																
Glucosidase	0.43 c	0.32 a		0.27 a						0.43 c	-0.27 a	0.38 a	1e										0.35 b	0.29 a	0.50 b	0.35 b	0.56 e	0.47 c	
80HdG										0.51 a																			
80HdG/C																													
Calcium																													
Zink	0.32 a	0.32 a																											
Cadmium																													
Koper																													
Zn/Cu ratio	0.29 a	0.28 a																											
Magnesium																													
WBC	0.31 b																												
Cholesterol																													
β-Trace																													
Volume																													
precursoren	0.43 d	0.27 a																											
ronde cellen																													
P10	13.2	20.7	32.0	2.0	4885	320.0	4.3	8.5	3.3	2.5	0.1	1.0	101	146	27.1	16.3	0.2	4.8	36046	0.1	48.6	383.7	26596	20.0	3.0	1944.0	2.0	180.5	100.0
P90	125.0	584.3	84.4	10.2	221956	377.0	8.5	27	6.7	5.1	10.1	413	550	542	144	53.3	2.3	14.9	246180	0.6	160.2	2578	109615	1690.0	27.3	8882.0	6.0	2280.0	3600.0
median	38.9	148.5	60.0	5.0	31633	344.0	5.8	15	4.8	3.8	1.8	1.0	248	260	615	30.4	0.8	10.5	98682	0.2	85.5	1220.1	53360	160.0	12.7	7580.0	4.0	650.0	700.0
unit	ml/ml	ml/l	ml/l	%	N/l	μmol/l	mg/dl	μg/dl	μg/dl	g/dl	mg/dl	ng/ml	μmol/l	μmol/l	mU/l	ng/ml	ng/ml	meq/l	ppb	ppb	ppb	ppb	ppb	mm3	mg/dl	mg/dl	ml	mm3	mm3

De volledige correlatiematrix van alle cytologische en biochemische parameters, samen met het significantie niveau van de correlatie, is weergegeven in tabel 3. Deze tabel zal in de toekomst kunnen gebruikt worden voor het optimaliseren van hun eventuele predictieve eigenschappen voor spermakwaliteit en van mannelijke fertiliteit.

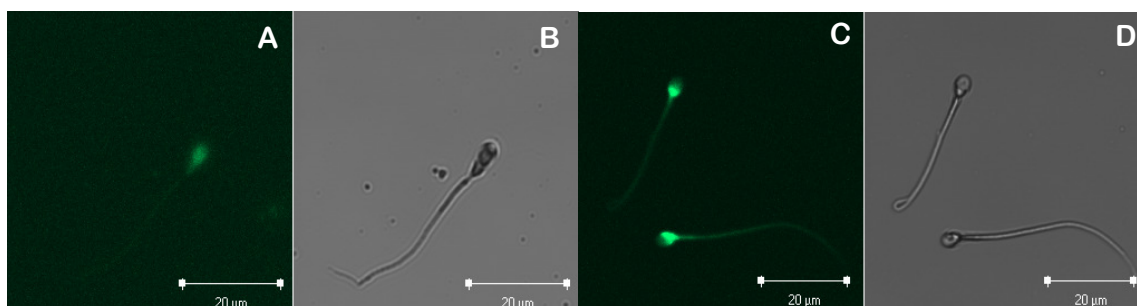
### 3.6 Flowcytometrie van sperma merkers: controle met confocale laser microscopie

Om spermamerkers op een geautomatiseerde wijze op grote sperma-aantallen te kunnen uitvoeren voor het opsporen van laagfrequente afwijkingen, moet men kunnen beschikken over multifuorochroom gemerkte antilichamen. Deze fluorochroom gemerkte antilichamen worden best op hun correcte werking vooraf gecontroleerd op de celpopulaties die later geanalyseerd zullen worden. Dit deel beschrijft de resultaten van controles van antilichamen



**Figuur 14: proflabeling sperma.** Er werd een rechtstreekse labeling uitgevoerd van een spermapool met Alexa 488 (A). Transmissiebeeld van zelfde opname spermapool aangekleurd met Alexa488 (B).

gemarkt met het fluorochroom Alexa 488 (Molecular Probes), Dy510 en Dy648 (Dyomics) via confocale laser scanning microscopie (CLSM) uitgevoerd op spermatozoa. Bij de eerste set van proflabelingen werden drie verschillende soorten koppelingen nagegaan.

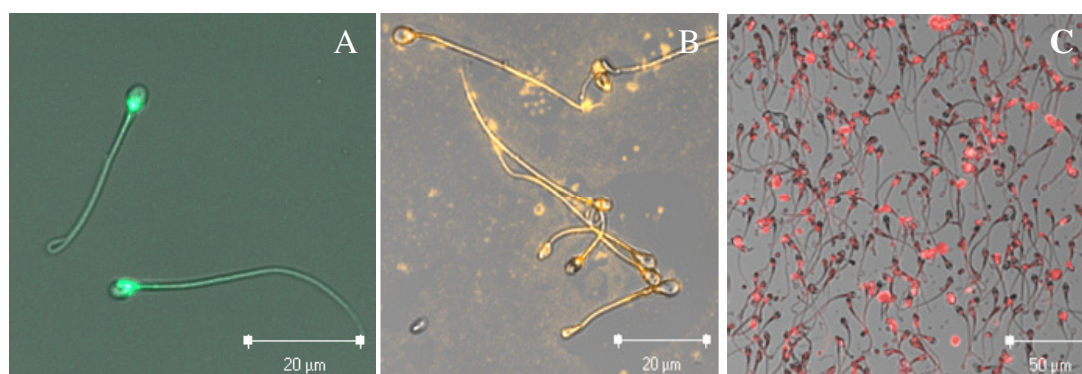


**Figuur 15: Kleuring van spermatozoa met Alexa 488 geconjugeerde antilichamen.** In panel A werden de spermatozoa aangekleurd met een geconjugeerd antilichaam voor p53. Panel B geeft een transmissiebeeld van dezelfde opname. In panel C en D werden de spermatozoa met Alex488 geconjugeerde CD52 antilichamen gekleurd en respectievelijk op een fluorescentie (C) en een transmissiebeeld (D) weergegeven.

In een eerste benadering werden de fluoroforen rechtstreeks aan de spermatozoa gekoppeld (fig 14). Bij deze koppeling was de efficiëntie uiterst hoog en bleek in de CLSM dat er in het kopgedeelte van de zaadcellen sprake was van een overlappend. Er werd besloten in de toekomst minder labelingsreagens toe te voegen aan het staal.

Bij de volgende labelingen werd niet meer rechtstreeks gekoppeld aan spermatozoa maar werden tussen de antilichamen p53, anti-Fas antilichamen en CD52 met Alexa 488, Dye 510 en Dy 648 . De bekomen antilichaam conjugaten bleken eveneens adequaat spermatozoa aan te kleuren zichtbaar vergelijkbaar met de rechtstreekse koppeling van het fluorogeen met de zaadcel. De spermatozoa kleurden met de CD52 conjugaten (fig. 15 C) hoofdzakelijk het kopgedeelte en in mindere mate de staart.

Labeling van p53 geeft enkel een oplichting weer in een klein percentage van apoptotische zaadcellen (fig 15 A). De niet gekleurde zaadcellen zijn een uitstekende indicatie dat de conjugaten specifiek p53 kleuren en geen willekeurige eiwitten aanwezig in alle cellen.



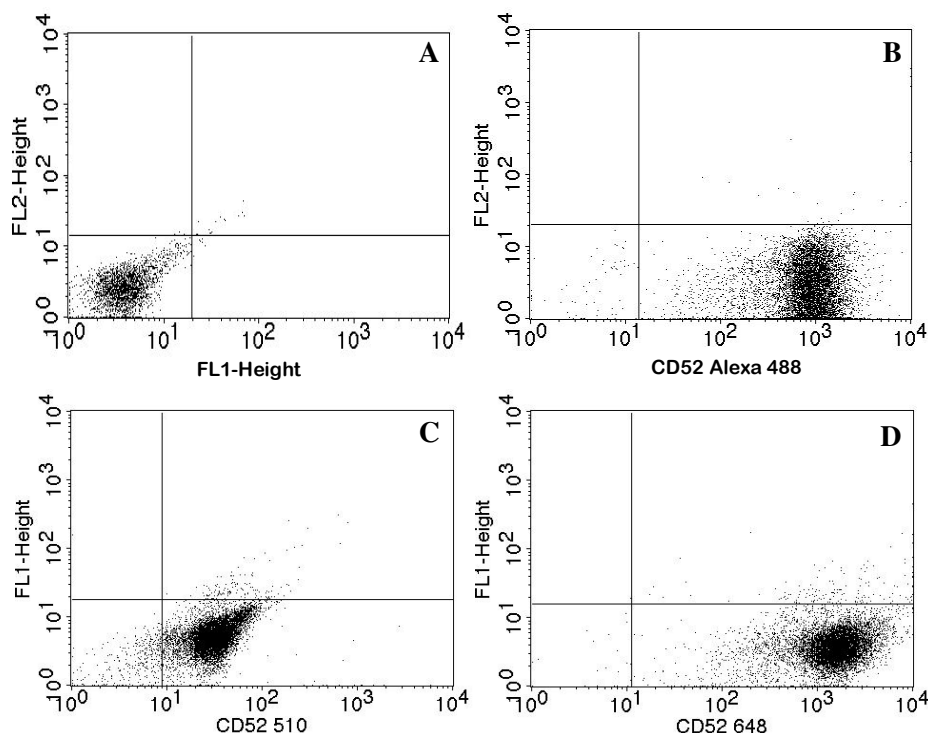
**Fig 16: Kleuring van spermatozoa met CD52 antilichamen.** De figuur toont de aankleuring van zaadcellen met CD52 antilichamen. Deze antilichamen werden in het opzet gelabeld met drie verschillende fluorogenen. Op panel A werden de de CD 52 antilichamen gekoppeld aan Alexa 488. In panel B en C werden respectievelijk Dy 510XL en Dy 648 gekoppeld aan de CD 52 antistoffen. De weergave is een mix van transmissie en fluorescentie zodat zowel de zaadcel als de fluorescentie duidelijk zijn.

Om de meest optimale combinatie aan merkers voor de flowcytometrie te kunnen kiezen werd elk antilichaam (p53, Fas, CD52) met de drie verschillende fluorochromen geconjugeerd. Ook deze koppelingsprocedure werd met behulp van CLSM gecontroleerd. Hierbij werd vastgesteld dat de CD52-antilichamen, met Dy510XL geconjugeerd, slechts een matige fluorescentie vertoonden en mogelijk niet efficiënt gekoppeld waren. Geregeld was er fluorescentie diffusie rond de spermatozoa terug te vinden, wat zou kunnen wijzen op aspecifieke en niet-covalent gekoppeld fluorochroom. Het CD52-antilichaam gekoppeld aan Dy 648 vertoonde daarentegen een hoge affiniteit en een sterk signaal. De CD52-labels met de verschillende fluorochromen worden weergegeven in fig 16. De antilichamen gericht tegen

de apoptosesignalen (p53 en de drie fas-klonen) vertoonden een binding, maar slechts een zwak signaal. Dit komt overeen met de verwachtingen, aangezien meestal slechts weinig cellen in apoptose waren op het moment van fixatie van de cellen. Op basis van de efficiëntie van de verschillend geconjugeerde antilichamen werd de meest optimale combinatie gebruikt tijdens de analyses. De combinatie bestond uit p53 en CD52 respectievelijk geconjugeerd met Alexa 488 en Dy 648.

### 3.7 Apoptose detectie met Flowcytometrische analyse

Voorafgaand aan de op puntstelling van flowcytometrische sperma-analysen, werden eerst controles uitgevoerd om te zien of de geconjugeerde antilichamen ook effectief door de Facs Calibur konden gedetecteerd worden. De fluorochromen Alexa 488 en Dy 510 XL bleken een vrij grote spectrale overlap te hebben. Dit probleem werd opgelost door de detectorspanningen van de beide fluorochromen aan te passen tijdens de calibratie en de gepaste compensaties in te stellen. Deze afregeling liet toe een duidelijk onderscheid te maken tussen cellen aangekleurd met deze fluorochromen. De kleurstof, Dy 648, werd in het verwachte kanaal gedetecteerd, maar vertoonde geen spectrale overlap zodat er niet gecompenseerd werd.



**Figuur 17: Compensaties CD52-aangekleurde zaadcellen met verschillende fluorochromen.** Deze figuur geeft weer dat de aankleuring met de CD52 geconjugeerde antilichamen werkzaam en detecteerbaar waren op de flowcytometer. De gebruikte fluorochromen ondergingen een goede afregeling en compensatie zodat de overlap tussen de verschillende kanalen minimaal is. In panel A wordt een blanco staal weergegeven. In panel B, C en D werden spermatozoa met een Alexa 488, Dy510XL en Dy648 geconjugeerd antilichaam gelabeld. Het Dy510XL chromogeen vertoont het minst sterk emissiesignaal in vergelijking met de andere

De compensaties konden worden afgeregeld door gebruik te maken van een pool zaadcellen, waarvan een deel gelabeld en een deel ongelabeld.

De niet-gelabelde zaadcelpool werd gebruikt om de positie van de spermatozoa te bepalen in het analysevenster en deze daarna te focuseren in het eerste kwadrant, waardoor achteraf een maximale resolutie kon worden bekomen. Vervolgens werd de pool, afzonderlijk gekleurd met elke kleurstof, geanalyseerd om de fluorescentie-overlap uit die van andere detectie kanalen te halen (fig17). De laatste stap hield in dat de drie afzonderlijk gekleurde pools werden gecombineerd om na te gaan of alle populaties zichtbaar waren zoals geïllustreerd in figuur (18C )

Er werd voor op puntstelling voor een spermapool geopteerd, omdat er in een pool meer inter-individuele veranderingen aanwezig zijn, waardoor later bij analyse van individuele zaadstalen minder afwijkende situaties voorkomen. Hierdoor was het mogelijk om een ruim, maar selectief scattergebied voor zaadcellen te bepalen dat interindividuele variaties omvat.

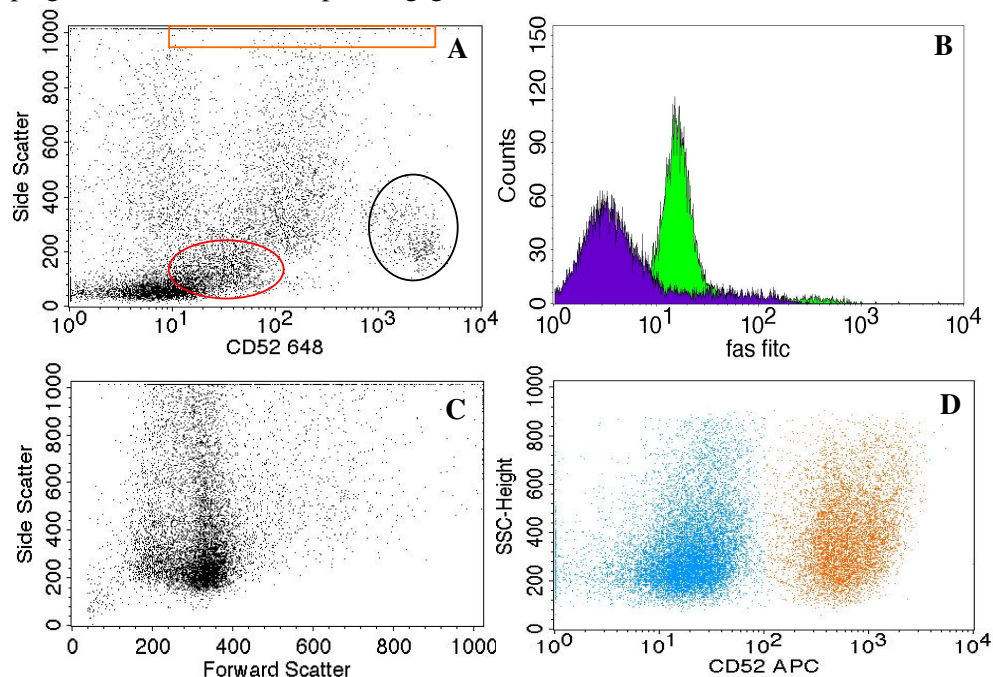
Deze geoptimaliseerde instellingen werden opgeslagen en gebruikt voor analyses op spermastalen, gebruik makend van de eigen geconjugeerde antilichamen. Voor de detectie van de spermamerkers werd een apart analysebestand aangemaakt met de geoptimaliseerde instrumentinstellingen en compensaties voor optimale detectie.

Daar spermastalen vaak witte bloedcellen bevatten die kunnen storen in de Facs-analyse werd voorafgaandelijk nagegaan waar lymfocyten, erythrocyten, granulocyten gepositioneerd waren in het sperma scatterpatroon. Via de uitvenstering werden deze celpopulaties uit de zaadcelpopulatie gefilterd. De granulocyten komen omwille van hun hoge korreligheid en bijgevolg hoge zijdelingse lichtverstrooiing ten opzichte van de zaadcellen, volledig tegen de de bovenrand van het analysevenster te liggen (fig 18A) waardoor confounding van celpopulatie makkelijk kan vermeden worden.

Tenslotte werd er een positieve controle gezocht voor de fas en p53 antilichamen (fig 18 B). Deze werd aangemaakt vertrekkend van populaties witte bloedcellen waarvan de ene helft als controle diende en de andere helft met UV-straling tot apoptose geïnduceerd werd, waarna beide populaties met anti-P53 en anti-Fas gekleurd werden. De geconjugeerde antilichamen waren wel degelijk in staat apoptose te detecteren, wel met een lagere efficiëntie als een commercieel bekomen Fas antilichaam FITC-conjugaat. Hierdoor werd beslist om de commercieel bekomen Fas-antilichamen in het onderzoek verder te gebruiken.



De vooropgestelde analysemethode werd stapsgewijs uitgebouwd. Eerst werd het gebied van de CD52-positieve cellen afgebakend, waarin zowel de spermatozoa als de lymfocyten terecht komen. Om enkel de spermatozoa te analyseren werden de CD45-positieve cellen uitgefilterd en niet gebruikt voor analyse. In een derde kanaal worden overige parameters geplaatst zoals apoptose en/of P53. Figuur 18C illustreert de ligging van populatie spermatozoa, zeer goed herkenbaar, in het forward en side scatter profiel. Heterogeniteit van deze populatie is weerspiegeld in een zeer breed spreidingsgebied van de zaadcellen.



**Figuur 18 : Controles en patronen bij facs analyses.** In panel A werden aan een zaadstaal WBC, RBC en granulocyten toegevoegd. Deze populaties kunnen aanwezig zijn in sperma en de positie ervan werd bepaald in onze worksheet. De lymfocyten, erythrocyten zijn weergegeven in respectievelijk de zwarte en rode cirkel en de granulocyten in het oranje vierkant. In panel B is de toename van fas-positieve celen, aangekleurd met commercieel fas FITC-conjugaten, waar te nemen bij positieve controle. De controle werd uitgevoerd door WBC met UV te bestralen gedurende 10 minuten, het staal werd na 12 uur geanalyseerd. In panel C wordt een gefixeerd zaadstaal weergegeven met zijn voorwaartse en zijdelingse lichtverstrooiing. De populatie is goed herkenbaar en hetrogeen. In panel D de twee waarneembare populaties met verschillende CD52 expressieprofiel

Opvallend was een vaak voorkomend fenomeen dat twee grote populaties voorkwamen op het zijwaartse CD52-lichtverstrooiingsprofiel. De vraag rees of beide celpopulaties uit spermatozoa zouden bestaan omdat ze, op basis van hun forward en side scatterprofiel, immers identiek zijn. Wat beide populaties wel van elkaar onderscheidt is hun CD52 expressieprofiel. Het verschil in expressie van de CD52 merker is bovendien zeer sterk. Een zwak CD52 positieve populatie contrasteert met een sterk positieve populatie voor deze membraanmerker (fig 18 D ). Bovendien wordt frequent een hogere fas-positiviteit gezien binnen de zwak CD52-gekleurde populatie. Hieruit ontstond een nieuwe werkhypothese

waarbij cellen die lang bewaard worden of in apoptose gaan het fosfatidyl verankerde CD 52 zouden verliezen door mebraandestabilisaties. Gevolg hiervan is dat het verlies van deze merker en dus de aan- of afwezigheid van CD52 op zichzelf een aanwijzing kan vormen over de apoptosestatus in de zaadcellen. Indien deze indicatie van de verhoogde apoptose bevestigd wordt kan ze gebruikt worden in de toekomst als diagnostische merker om zaadcellen met een verminderd bevruchtigingspotentieel te detecteren.

De aankleuring van apoptose verliep zeer inefficiënt en dit zowel met de commerciële fluorochromen als met de eigen antilichaamconjugaten. Om zekerheid te bekomen of zeer zwakke aankleuringen kunnen veroorzaakt worden door verlies van apoptose markers tijdens bewaring van de zaadcellen, werden opnieuw controle-experimenten uitgevoerd op een apoptosemodel. Een vers staal werd in twee kweekbuizen uitverdeeld. Een buis werd blootgesteld aan UV-straling en de andere helft diende als controle. Van beide buizen werd een blanco, een fas en een annexine kleuring uitgevoerd. Uit deze vergelijking bleek dat de inductie van apoptose in spermatozoa met UV-licht niet of zeer laag was, waarbij zelfs annexine niet sterk positief werd na UV-bestraling.

#### **4 Discussie**

In dit onderzoek werd de invloed van verschillende factoren op de overlevingscapaciteit van zaadcellen nagegaan. Het voornaamste verband werd waargenomen in betrekking met de osmolaliteit van de omgeving waarin een staal zich bevindt. Hoe hoger deze osmolaliteit is, hoe lager de overleving. Er werd toename van de osmolaliteit waargenomen in functie van de tijd na ejaculatie. De bekomen resultaten vormen een sterk argument om spermastalen zo snel mogelijk na ejaculatie te analyseren opdat de analyseparameters voor de scoring van de fertiliteit ook effectief de werkelijkheid weerspiegelen. Anderzijds kan een eenvoudige osmolaliteitsmeting uitsluitsel geven of een spermastaal al dan niet snel in het laboratorium voor analyse werd aangeboden.

Toename in osmolaliteit na ejaculatie kan verschillende redenen hebben.

Een eerste reden is dat de spermapopulatie voor de ejaculatie zich in een strict osmotisch gereguleerd midden bevindt, dat drastisch verandert in samenstelling en osmolaliteit tijdens en na de ejaculatie. Na ejaculatie komen de zaadcellen in de vrouwelijke tractus waar ze in een hypo-osmotische omgeving terecht komen. Om zich tegen inkrimping te verzetten heeft het sperma een systeem ontwikkeld dat bestaat uit de opname van osmolieten door epidimaal

sperma. Dit is mogelijk doordat de osmolaliteit van het testiculair naar epididymis vocht toeneemt. De osmolieten omvatten ondermeer kleine organische moleculen (aminozuren, carnitine,...) (55,56). De toename van de osmolaliteit in vitro kan bijgevolg veroorzaakt worden door deze opgenomen moleculen. Verder draagt ook de afbraak van eiwitten (ondermeer semenogeline), aanwezig in de secreties van de zaadblaasjes, bij tot de toenemende osmolaliteit. Het vrijkomen van kleine organische moleculen en/of de afbraak van eiwitten verklaart waarom de osmolaliteit van een spermastaal toeneemt in functie van de tijd.

In het bepalen van de concentratie bij routinematig onderzoek is men op zoek naar een standaardmethode die nauwkeurig is en hoge analysesnelheid bezit. Tegenwoordig wordt deze telling immers manueel uitgevoerd door hiervoor getraind personeel. De metingen bezitten echter een hoge variatie tussen verschillende metingen en laboranten.

Het gebruik van de UF-100 kan een oplossing bieden voor de zoektocht naar een standaardmethode voor telling van spermastalen in routine-analyse. Dit onderzoek toont aan dat de metingen nauwkeurig betrouwbaar en de variatie tussen verschillende herhaalde metingen gering zijn. Bij vergelijking van meting tussen UF-100 en Makler, bleek dat de meting van de meting van de UF-100 veel nauwkeuriger was. Dit verschil kwam duidelijk tot uiting bij hogere zaadcelconcentraties en valt te verklaren doordat in de telkamer de zaadcellen vrij kunnen rondzwemmen en bij hogere concentraties een unieke telling van elke zaadcel uiterst moeilijk is. In de flowcytometer is dit fenomeen echter niet mogelijk doordat er gebruik gemaakt wordt van hydrodynamische focusering waardoor elke zaadcel slechts eenmaal kan gedetecteerd en geteld worden. Hierdoor zal een overschatting van de concentratie uitgesloten zijn. Een andere factor die aan de basis ligt van de nauwkeurigheid van de flowcytometrische zaadceltelling, is het feit dat er een groter aantal cellen wordt geanalyseerd in vergelijking met de telling in de Makler.

De huidige manuele methode voor de telling van zaadcellen, vereist meer arbeid en tijd. Een voordeel is dat de flowcytometrische methode minder arbeidsintensief is en er een hogere throughput mogelijk is. Een ander voordeel, dat gepaard gaat met de automatische telling, is dat de UF-100 steeds dezelfde nauwkeurige manier van meten heeft, terwijl de betrouwbaarheid van de manuele telling altijd van persoon tot persoon en zelfs van telling tot telling zal variëren.

Een belangrijke waarneming tijdens dit aspect van het onderzoek was dat bij enkele stalen (n=4) door de UF-100 een nulwaarde gegenereerd werd en dit ondanks de aanwezigheid van talrijke spermatozoa in het staal. Een eerste reden kan zijn dat de morfologie van deze stalen

zo sterk afwijkend was dat de cellen niet meer als sperma werden herkend. Deze reden bleek echter onwaarschijnlijk aangezien er vele andere stalen met een vergelijkbare morfologie toch een nauwkeurige telling opleverde met de UF-100.

Een andere reden kan zijn dat de zaadcelconcentratie van het staal te hoog lag. Deze reden werd onderzocht door de stalen, die een hoge concentratie bezaten, verder te verdunnen (1/200). De flow bleef echter een nulwaarde geven waardoor ook deze reden waarschijnlijk niet aan de basis van deze deficiëntie zal liggen.

Een laatste reden zou kunnen zijn dat de osmolaliteit van het staal te hoog was en dat hierdoor de zaadcellen een osmotische zwelling ondergaan hebben. Door deze zwelling verandert het celvolume en bestaat de mogelijkheid dat flowcytometer de zaadcellen niet meer herkent of onderbrengt in een andere celcategorie. In een gelijkaardig onderzoek voor een zaadceltelling op de UF-100 van Muylaert (57), werd waargenomen dat zaadcellen in enkele gevallen geregistreerd werden samen met de gisten. Deze observatie werd op onze stalen waarbij de UF-100 faalde, nagetrokken. We konden echter de conclusie niet bevestigen.

Flowcytometrie is voor celtellingen en analyses van ondermeer apoptose, het middel bij uitstek geworden, mede omdat er verschillende parameters gelijktijdig snel kunnen nagetrokken worden. In dit onderzoek werd dan ook deze methode ontwikkeld voor de detectie van apoptose in zaadcelpopulaties. Op basis van enkel forward en side scatter is er geen volledig nauwkeurige localisering van zaadcellen mogelijk. Dit doordat de vorm van elke zaadcel anders is en debris of zaadcelfragmenten dezelfde eigenschappen kunnen vertonen als zaadcellen en hierdoor beschouwd worden als een element van de spermapopulatie. Zo kunnen er afwijkingen sluipen in de metingen en dus verbanden minder of niet zichtbaar worden. Om dit uit te sluiten werd in ons opzet gebruik gemaakt van de aankleuring van een zaadcelspecifiek antigeen, CD52. Een belangrijke vraag tijdens de analyses was, of het CD52-molecuul, verankerd aan de oppervlakte van spermatozoa na apoptose vastgehecht blijft aan de buitenzijde van de zaadcel. Aan de hand van onze waarnemingen vermoeden we dat dit niet het geval is. Onze bevindingen bevestigen wel eerder beschreven observaties in verband met veranderingen van CD52-expressieprofiel na acrosoomreactie (58). Het CD52 is een GPI verankerd glycoproteïne en speelt mogelijk een rol bij de interactie met de eicel. Het blokkeren van dit eiwit, door ondermeer sperma antistoffen die vaak epitopen van CD52 herkennen (59), leidt tot een verminderde zaadcel-zona interactie (60) en suggereert dat CD52 een rol speelt bij signaaltransductie tijdens capacitatie of eicelinteractie. Bovendien is het geweten dat een anti-CD52 behandeling met

Campath leidt tot infertiliteit en dat sperma autoimmuun antistoffen vaak spermacidaal zijn. De spermadoding zou complement gemedieerd of apoptose geïnduceerd kunnen zijn (61). Foccarelli heeft opgemerkt dat tijdens het capacitatieproces er modificaties en veranderingen in expressieprofiel van CD52 plaatsvinden.

Een verklaring voor het verlies van CD52 zou kunnen schuilen in het feit dat de merker een GPI verankerd eiwit is aan de oppervlakte van het zaadcelmembraan. Het bekomt deze merker bij passage langs de epididymis via cel-cel uitwisseling met epitheelcellen (28). Bij apoptose wordt het membraan onstabiel, waardoor het CD52 los kan komen. Een andere mogelijkheid bestaat in het feit dat het glycoproteïne modificaties ondergaat tijdens maturatie en/of acrosoomreactie. Door de vaststelling van dit verlies van CD52 kan de analyse, zoals ze nu uitgewerkt is, niet meer toegepast worden. De vooropgestelde selectieprocedure om specifieke spermatozoa te analyseren kan door het verlies van membraan CD52 niet universeel toegepast worden en zeker niet op gefixeerde en bewaarde stalen. Overwogen kan worden om op basis van de voorwaartse en zijdelingse lichtverstrooiing en selectie op CD45-negativiteit verder te werken, aangezien de zaadcelpopulatie op deze wijze goed onderscheidbaar is van aanwezige debris en leukocyten.

Een mogelijke reden voor het verlies van CD52 zou kunnen liggen bij de de GPI-verankering die mogelijk een fysiologische betekenis kan hebben tijdens de bevruchting van de eicel. Indien de aanwezigheid van intacte CD52-moleculen op het zaadcelmembraan een belangrijke factor speelt bij de bevruchting van de eicel, dan zullen apoptotische zaadcellen, door inductie van CD52 verlies, minder in staat zijn om eicellen te bevruchten. Op deze manier wordt verhinderd dat niet competente of apoptose geïnduceerde zaadcellen een zygote vormen en worden de daarmee latere defecten vermeden.

Apoptose-inductie op mature zaadcellen bleek een moeilijke opgave te zijn. Dit kan erop wijzen dat in de testis het apoptoseproces, hoofdzakelijk omwille van fysiologische redenen, wordt toegepast. Zo worden beschadigde en het teveel aan cellen reeds door de sertoli-cellen via fas stimulatie verwijderd door middel van apoptose. Enkel gezonde en mature zaadcellen zullen dus enkel de testis verlaten (53). Fertiele zaadcellen worden gekenmerkt door vergaande differentiatie met zeer sterk gecompacteerd kernmateriaal zodat ze nog amper in staat zijn tot snelle gen-expressie. Het is onzeker of ze nog instaat zijn om vlot hersteleiwitten als p53 en andere eiwitproductie (zoals fas) op te reguleren. Hierdoor zullen bijgevolg ook weinig van deze eiwitten kunnen gedetecteerd worden. Een betere detectie van apoptose in

zaadcellen zou kunnen gebaseerd zijn op membraanveranderingen gedetecteerd met Annexine en detectie van geactiveerde caspases of hun enzymatische klievingsproducten.

De detectie van apoptose op spermatozoa in ons project, bleek ook zeer moeizaam, dit zowel met de zelf geconjugeerde antilichamen als met de commercieel verkregen Fas-conjugaten. Een reden hiervoor kan liggen in het feit dat de aanmaak van eiwitten niet meer efficiënt of volledig niet meer kan plaatsvinden in de mature en sterk gedifferentieerde zaadcelpopulatie die de testis verlaten bij ejaculatie. In de literatuur zijn echter reeds studies gepubliceerd, waarbij men wel slaagt in de detectie van apoptose. Het belangrijkste probleem dat we ondervonden tijdens flowcytometrische analyses voor de detectie van apoptose, is het stellen van een objectieve en universele drempelwaarde vanaf daar waar het apoptosesignaal als positief beschouwd wordt. Het is deze drempel die weergeeft in welke mate er apoptose aanwezig is in de zaadstalen en waarvoor een objectieve manier vereist wordt.

Indien we het signaal vanaf de eerste decade registreerden, bekwamen we in onze studie ook celpopulaties, positief voor apoptose. We zochten echter naar een objectieve manier voor het bepalen van een drempelwaarde rekening houdend met ondermeer de achtergrondruis.

In de toekomst zou deze methode kunnen uitgebreid worden met een toevoeging van een antilichaam gericht naar de rechtstreekse detectie van oxidatieve DNA-schade in de celkern. Op deze wijze kan er in een flowcytometrische analyse de link worden gelegd tussen schade aan het cellulair DNA en het optreden van apoptose in de zaadcelpopulatie. Nu werd de opheldering van dit mogelijk verband beoogd te bereiken via een ELISA op seminaal plasma voor de meting van 8-OHdG en Facs-analyse voor de detectie van apoptose. Het verband tussen beide kon in deze studie niet onderzocht worden omwille van het ontbreken van objectieve drempelwaarden voor apoptosedetectie enerzijds en het ontbreken van aangepaste antilichaam-conjugaten voor de in situ detectie van 8-OHdG-detectie in cellulair DNA anderzijds. Ook kan uitgekeken worden naar een ander fixatiemedium, meer geschikt voor flowcytometrie. Het gebruikte medium bevat een lage concentratie van formalaldehyde wat kan zorgen voor autofluorescentie. Een overstap naar een medium, waarbij deze stof niet aanwezig is, zou bijgevolg een verbetering van de analyse kunnen opleveren. Een alternatieve oplossing kan zijn dat er wordt overgeschakeld naar verse stalen. Verse stalen bieden bovendien het voordeel dat er ook met annexine kan worden aangekleurd wat, ook in onze studie, een beter resultaat opleverde voor het aantonen van apoptose.

Leukocyten zijn een primaire bron van ROS in het ejaculaat (9). Met het specifiek aankleuren van leukocyten met CD45, hebben we voor dit fenomeen wel een aangepaste analyse-methode.

Wat de alternatieve benadering voor het opmeten van ROS-beschadiging aan DNA betreft, was het meten van 8-OHdG in seminaal plasma een redelijk originele benadering. Enkel Nakamuro (54) heeft tot hiertoe analyses op seminaal plasma uitgevoerd met een immunoassay- methode, en enkele auteurs hebben getracht 8-OHdG via HPLC in seminaal plasma te kwantificeren.

Bij de analyse van de resultaten en de opbouw van dit onderzoek naar ROS-geïnduceerde DNA-schade, werd nagegaan welke bronnen er bestonden van de radicaalproductie. Daarna werd getracht parameters te identificeren die meetbaar en relevant waren voor deze bronnen. Zo werd het aantal leukocyten nagegaan in het ejaculaat. Zoals Aitken eerder aantoonde leveren ze immers een belangrijke bijdrage aan de radicaalschade. Verder werden ook mogelijk catalytische enzymen, betrokken bij de productie van ROS of de bescherming ertegen, geëvalueerd aan de hand van de concentraties aan overgangsmetalen zoals Fe, Zn, Cd, Cu die aanwezig zijn in vele catalytische sites van deze enzymen. In deze studie werden niet alleen de indicatoren van DNA-schade nagegaan, maar ook parameters die instaan voor bescherming tegen ROS, zoals antioxidanten zoals urinezuur, carnitines, eiwitten waarvan sommige componenten zoals semenogeline, een belangrijke antioxidatieve werking vertonen.

Met een geheel van 30 parameters, waaronder een aantal conventionele sperma kwaliteitsmerkers werd een correlatie matrix opgesteld waarbij, door middel van statistische analyse oriënterende trends werden opgespoord om ze te toetsen aan epidemiologische evidentie. Zo werd ondermeer roken of niet roken, als klassieke boosdoener voor het ontstaan van ROS-geïnduceerde DNA-schade geanalyseerd aan de hand van cotinine bepalingen op seminaal plasma, nauwkeurig gedocumenteerd voor 82 patiënten.

Opvallend bij deze analyse was dat er geen verband gezien werd tussen de waarden van 8-OHdG en conventionele sperma kwaliteitsparameters, waarbij men in eerste benadering zou kunnen stellen dat er geen verband is tussen ROS en sperma DNA-beschadiging. Na deze teleurstellende vaststelling werd de werkhypothese aangepast. Daar waar er bij de start van de studie van uitgegaan was dat de 8-OHdG-concentratie gevonden in het seminaal plasma, proportioneel zou zijn met de aangerichte DNA-schade, werd er in de herziene werkhypothese van uitgegaan dat DNA schade voornamelijk intracellulair wordt aangericht en dat het

seminaal plasma 8-OHdG maar een eliminatieproduct is van het 8-OHdG in de celkernen van spermatozoieten en als zodanig maar een beperkt deel van de totale DNA-schade weerspiegelt. Bovendien moet die ROS-geïnduceerde DNA-schade proportioneel gemeten worden in verhouding tot de totale hoeveelheid DNA, betrokken bij de spermatogenese. Vandaar dat de definitie 8-OHdG output per zaadcel werd ingevoerd die wel degelijk een merker is voor de omvang van de DNA-schade op cellulair vlak. Eenmaal deze parameter gedefinieerd als merker bleken tal van functionele en sterk prognostische klassieke sperma parameters, die goed overeenstemmen met fertiliteitsprognoses, wel sterk afhankelijk te zijn van de 8-OHdG output per zaadcel, en hoe lager deze berekende output voor een patiënt was, des te beter scoorde voor wat zijn fertiliteitskansen betreft.

## **5 Conclusies**

Van de vooropgestelde doelstellingen om een flowcytometrische methode te ontwikkelen voor de simultane detectie van apoptose-inductie en DNA-schade in spermatozoïden, is enkel de ontwikkeling van de methodologie haalbaar gebleken en werd de methodologische basis gelegd voor de toepassing ervan op een patiëntenpopulatie. Limiterende factoren voor de uitwerking van deze benadering waren uitsluitend van budgetaire aard voor wat betrof de beschikbaarheid van voldoende monoclonale antistof, specifiek voor 8-OHdG, zonder dewelke simultane celgebonden detectie van apoptose en ROS niet mogelijk was.

Het gedeelte apoptose kon wel efficiënt afgerond worden, en een flowcytometrische detectie van spermacellen en apoptose in spermacellen werd succesvol uitgevoerd, inclusief de aanmaak van eigen 3 kleuren fluorescentie antilichaam conjugaten en controle van hun kwaliteit via confocale laser scanningsmicroscopie.

Er werd tevens een essentiële bijdrage geleverd aan het routine spermaonderzoek door een zeer betrouwbare en hoog reproduceerbare instrumentele techniek voor spermaconcentratie-metingen te ontwikkelen. Aan de controle van de pre-analytische aspecten van het sperma-onderzoek werd eveneens een waardevol analyse-instrument toegevoegd om onderscheid te maken tussen vers geëjaculeerde spermastalen en stalen waarvan de kwaliteit niet meer voldoet omwille van te lang tijdsinterval tussen ejaculatie en onderzoek.

Bij het op punt stellen van een alternatieve methode om DNA schade aan sperma via een immunoassay bepaling van 8-OHdG in seminaal plasma te koppelen aan een reeks van fertiliteitsmerkers voor humaan sperma kon een database van 30 parameters bepaald op 80 semenstalen samengesteld worden en hiervoor werd een correlatie matrix opgesteld.



Deze matrix werd gebruikt voor het zoeken naar nieuwe diagnostische en prognostische parameters voor het evalueren van spermakwaliteit en mannelijk fertiliteit.

Uitgaande van deze matrix werd aangetoond dat 8-OHdG-concentraties gemeten in seminaal plasma, een weinig informatieve parameter vormen met betrekking tot het voorspellen van zaadkwaliteit.

Roken of niet-roken, een vaak in negatieve zin aangehaald lifestyle-fenomeen met betrekking tot ROS geïnduceerde DNA-schade had in deze bestudeerde patiëntengroep geen significante invloed noch de conventionele spermakwaliteitsmerkers, noch op de nieuwe biochemische parameters zoals ROS geïnduceerd 8-OHdG.

Om tot een sluitend model te komen om de invloed van ROS op de spermatogenese te verklaren, werd een nieuwe prognostische parameter gedefinieerd namelijk de 8-OHdG productie of output per zaadcel.

Gebaseerd op de eerder ontwikkelde patiëntendatabase en correlatie matrix, bleek deze nieuwe parameter zeer significant te correleren met tal van andere kenmerken die sterk significant de spermakwaliteit en fertiliteit mede bepalen namelijk de morfologie, de a+b motiliteit, de testiculaire sperma output, het aantal volledig normale spermatozoïeden per ejaculaat en nieuwere biochemische kenmerken zoals  $\beta$ -trace beschouwd als merker voor testiculaire reserve en totaal en vrij carnitine, merkers voor de mitochondriale energiehuishouding van de spermacel.

Roken of niet roken kon echter niet in verband gebracht worden met deze nieuwe parameter van 8-OHdG-output per zaadcel.

Samenvattend kunnen we echter stellen dat de analyse van een berekende parameter, de 8-OHdG-output per zaadcel een essentiële maar sluitende bijdrage vormt in het verklaren van de rol van ROS-geïnduceerde DNA-schade in de spermatogenese.

## Bronnen

- 1 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Cell Cycle and Programmed Cell Death. In: Anderson MS, Dilernia B, redactie. Molecular Biology of the cell. New York: Garland Publishing; 2002
- 2 Nairn R, Helbert M. Phagocytes in Immunology Toronto: Mosby 2002 p 167-177
- 3 Markesbery W R, Carney J M. Oxidative Alterations in Alzheimers Disease. Brain Pathology 1999; 9: 133-146
- 4 Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertility and sterility 2003; 79: 829-43
- 5 Zini A., Fischer M.A., Mak V., Phang D. Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma Jarvi Urol Res 2002; 30: 321 – 3
- 6 Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayarac R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. Gamete Res 1989; 24: 185–196
- 7 Sinclair S. Male Infertility: Nutritional and Environmental Considerations. Alternative Medicine Review 2000 5 (1) 29-38
- 8 Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology 1996; 48 (6): 835-50
- 9 Aitken JR, Clarkson JS, and Fishel S: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol Reprod 1989; 40: 183–197
- 10 Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasi H, Tanak T Increased deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil Steril 1997; 65:519-524
- 11 Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasmamembrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15:1338-1344
- 12 Lewis SE, Aitken RJ DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. Cell Tissue Res 2005 (in press)
- 13 Twigg J.P., Irvine D.S., Aitken R.J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection Human Reproduction 1998; 13 (7) :1864–1871
- 14 Agarwal A, Said T M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Human Reproduction Update, 2003; 9 (4) 331-45

- 15 Wang X, Sharma RK, Sikka SC. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 80 (3): 531-5
- 16 Sharma RK, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 2004; 6: 139-148
- 17 Wu LL., Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics *Clinica Chimica Acta* 2004; 339: 1–9
- 18 Schneider, J. E., Price, S., Maitt, L., Gutteridge, J. M. C. and Floyd, R. AMethylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18, 631–5.
- 19 Krapfenbauer K, Birnbacher R., Vierhapper H., Herkner K., Kampel D. and Lubec G. Glycooxidation, and protein and DNA oxidation in patients with diabetes mellitus. *Clinical Science* 1998; 95: 331–7
- 20 Loft S., Nielsen A. F., Jeding I. B., Vistisen K. and Poulsen H. E. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J. Toxicol. Environ. Health* 1993; 40: 391–404
- 21 Hiroshi Ide, Mitsuharu Kotera. Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27(4): 480-485
- 22 Olsen AK, Bjortuft H, Wiger R. Highly efficient Base excision repair in human and rat germ cells. *Nucleic Acid Research* 2001; 29 (8): 1781-90
- 23 Shimoi K, Kasai H, Yokota N, Toyokuni S, Kinae N. Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:767– 70
- 24 Orhan H, Vermeulen N.P.E., Tump C, Zappey H., Meerman J H.N Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxyguanosine oxidation products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage. *Journal of Chromatography B*, 2004; 799 245–54
- 25 World Health Organization. Laboratory manual for the examination of Human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge university press 1999
- 26 World health organisation manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. . 4th ed. New York: Cambridge University Press, 1999

- 27 Robert M, Gagnon C. Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 944-60
- 28 Domagala A, Kurpisz M. CD 52 antigen-a review. *Med Sci monit* 2001; 7 (2): 325-331
- 29 De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertility and Sterility* 2004; 82 (1): 57-65
- 30 Elzanaty S, Richtoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epidymal and accessory sex gland functions on sperm motility. *Human Reprod* 2002; 17 (11): 2904-11
- 31 Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Vandepuut H et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod* 1997; 12: 987-993
- 32 Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS, Bengtsson AC and Wikland M. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology. *Human Reproduction* 1996; 11(5) 1019—1022
- 33 Abraham-Peskir JV, Chantler E, Uggerhoj E, Fedder J. Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. *Human reproduction* 2002; 17 : 375-82
- 34 Ladha S. lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *Journal of Membrane Biology* 1998; 165: 1-10
- 35 Jouannet P, Ducot B, Feneux D. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. Study of sperm characteristics. *Int J Androl*, 1988; 11: 379-94
- 36 Keating J, Grundy CE, Fivey PS. Investigation of the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *J Reprod Fertil* 1997; 110: 71-77
- 37 Okmeci D, oxidative stress, male infertility and the role of carnitine, *Folia Med* 2005; 47(1):26-30
- 38 Sinha Hikim A P., Lue Y, Diaz-Romero M, Yen P H., Wang C, Swerdloff R S. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2003; 85:175–182
- 39 Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 2000; 22: 423-430
- 40 Shiratsuchi A, Umeda M, Ohba Y, Nakanishi Y. Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by sertoli cells of the rat. *J.Biol.Chem* 1997; 272: 2354-58

- 41 Paasch U, Grunewald S, Agarwal A and Glander H-J Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2004; 81:802–809
- 42 Ricci G, Perticarari S, Fragonas E. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human reproduction* 2002; 17 (10): 2665-72
- 43 Saleh RA, Argarwal A. Oxidative stress and male Infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 2002; 23 (6): 737-53
- 44 de Lamirande E, Gagnon C. Impact of oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human reproduction* 1995; 10: 15-21
- 45 de Lamirande E, Jiang H, Zini A et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of reproduction* 1997; 2: 48-54
- 46 Gavella M, Lipovac V. NADH-dependent oxido-reductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl* 1992; 28:135–41
- 47 Y-H Wei, S-H Kao. Mitochondrial DNA Mutation and Depletion Are Associated with Decline of Fertility and Motility of Human Sperm. *Zoological Studies* 2000 39(1): 1-12
- 48 Tomlinson MJ, White A, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes. *Hum Reprod* 1992; 7: 517–22
- 49 Marchetti C, Marchetti P. Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 2005; 33: 669–677
- 50 Vernet P., Aitken R.J., Drevet J.R. Antioxidant strategies in the epididymis, *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 21: 631–39
- 51 Lay M, Richardson ME, Boone W. Seminal plasma and IVF potential, Biochemical constituents of seminal plasma of males from In Vitro Fertilisation Couples. *Journal of assisted Reproduction and genetics*. Vol 18 n3 144-150 (2001)
- 52 Lewis SEM, Boyle PM, Mc Kinney. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995; 64:68-70
- 53 Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi P. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of reproduction* 1999; 4: 31-47
- 54 Nakamura H, Kimura T, Nakajima A. Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated sperm from subfertile male patients. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2002; 105:155–160

- 55 Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 in press
- 56 Cooper TG , Yeung CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc. Res. Techn.*, 60
- 57 Muylaert A, Schoonjans F, Berard D Comhaire F, Delanghe J. Analysis of samples on the Sysmex UF-100. *Acta clinica Belgica* 2000
- 58 Focarelli R, Rosati F, Terrana B.. Sialylglycoconjugate release during in vitro capacitation of human spermatozoa. *J. Androl.* 1990b; 11: 97-104
- 59 Diekman AB, Norton EJ, Klotz KL, Westbook VA, Shibahara H. N-Linked glycan of a sperm CD52 glycoform associated with human infertility. *FASEB J* 1999; 13: 1303-13
- 60 Mahony MC, Fulgham DL Blackmore PF, Alexander NJ. Evaluation of human sperm-zona pellucida tight binding by presence of monoclonal antibodies to sperm antigens. *J Perod Immunol* 1991; 19: 268-85
- 61 Xia MQ, Hale G, Lively MR. Structure of te campath-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein wich is an exceptionally good target for complement lysis. *Biochem J* 1993: 293, 633-40
- 62 Sakkas D, Manicardi GC, Bianci PG, Bizarro D, Bianchi U. Relationship between the prescence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biology of reproduction* 1995; 52: 1149-55
- 63 Shen HM, Chia SE, Ni ZY, New AL, Lee BL Ong CN. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reproductive Toxicology* 1997;11 (5) 675-680

# Auteursrechterlijke overeenkomst

*Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen en uw akkoord te verlenen.*

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

## **Invloed van ROS op de kwaliteit van het sperma**

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

**Kris BOUCHET**

Datum: