

De expressie van inhibine B en stam cel factor in testiculair weefsel van azoösperme patiënten en de relatie tot zwangerschapskans bij vruchtbaarheidsbehandeling

Elke WEVERS

promotor :

dr. Willem OMBELET;

Prof. dr. Lena DE RYCK

Inhoudstabel

<i>Inhoudstabel</i>	
<i>Afkortingenlijst</i>	
<i>Voorwoord en dankwoord</i>	
<i>Samenvatting</i>	
<i>1 Inleiding</i>	<i>1</i>
<i>2 Materiaal en methoden</i>	<i>11</i>
<i>2.1 Patiëntenpopulatie</i>	<i>11</i>
<i>2.2 Onderzochte parameters</i>	<i>11</i>
<i>2.3 Verwerking van een biopsie bekomen door testiculaire sperma extractie (TESE)</i>	<i>12</i>
<i>2.4 Verloop van een intracytoplasmatische injectie</i>	<i>13</i>
<i>2.5 Histologische verwerking van het testisbiopsie</i>	<i>13</i>
<i>2.6 Immunohistochemische kleuring van inhibine B</i>	<i>14</i>
<i>2.7 Immunohistochemische kleuring van stam cel factor</i>	<i>15</i>
<i>2.8 Histologisch onderzoek van de coupes van inhibine B_α en stam cel factor (SCF)</i>	<i>15</i>
<i>2.9 De verse score</i>	<i>16</i>
<i>2.10 Statistische analyse</i>	<i>16</i>
<i>3 Resultaten</i>	<i>17</i>
<i>3.1 Patiëntenpopulatie</i>	<i>17</i>
<i>3.2 Sperma in testisbiopsie</i>	<i>19</i>
<i>3.3 Vruchtbaarheidsbehandeling met Intracytoplasmatische Injectie (ICSI)</i>	<i>20</i>
<i>3.4 Histologisch onderzoek van inhibine B_α</i>	<i>23</i>
<i>3.5 Histologisch onderzoek van Stam cel factor</i>	<i>29</i>
<i>4 Discussie</i>	<i>36</i>
<i>Bronnen</i>	<i>40</i>

Afkortingenlijst

ABP	Androgen-bindend proteïne
FSH	Follikelstimulerend hormoon
SCOS	<i>Sertoli cell only syndrome</i>
SCF	Stam cel factor
LH	Luteïniserend hormoon
TESE	Testiculaire sperma extractie
ICSI	Intracytoplasmatische injectie
OAT	oligoasthenoteratospermie
hCG	humaan choriongonadotrofine

Voorwoord en dankwoord

Vorig jaar, begin mei 2005, werden we voor een moeilijke keuze gesteld. We moesten een afstudeerrichting kiezen en een bijhorende stageplaats. Als snel werd duidelijk dat de afstudeerrichting klinische moleculaire levenswetenschappen mij het meest interesseerde. Ook over de stageplaats had ik al een idee gevormd, ik wilde stage doen in een ziekenhuis omdat mij dit de gelegenheid gaf om te zien hoe het er aan toe ging in laboratoria buiten de universiteit. Gelukkig kreeg ik mijn eerste keuze, ik mocht naar het Ziekenhuis Oost-Limburg naar de dienst Fertiliteit. Hier heb ik de kans gekregen mijn eigen capaciteiten te leren kennen, bovendien hebben ze mij hier bijgebracht hoe je een goed onderzoek kunt leiden en tenslotte heb ik ook veel mogen leren over het onderwerp zelf.

Daarom wil ik Dr. Prof. Stinissen en Dr. Prof. W. Ombelet bedanken omdat zij de stage op de dienst Fertiliteit in het Ziekenhuis Oost-Limburg mogelijk hebben gemaakt.

De goede begeleiding van Embryologe Martine Nijs heeft ertoe geleid dat ik mijn stageperiode tot een goed einde heb kunnen brengen. Ze heeft me vijf maanden lang begeleid en geholpen met mijn onderzoeksproject, zowel het praktisch als het schriftelijk gedeelte.

Ook Anemie Cox, Mia Janssen, Dimitri Stevens en Elke Vanheusden hebben mij geholpen met het beantwoorden van vele vragen. Wanneer Martine er niet was, waren zij immers de personen die dan de taak van Martine Nijs tijdelijk overnamen.

Mijn experimenten heb ik in het laboratorium anatoompathologie mogen uitvoeren dankzij Dr. Linda Stessen, Dr. Johan Van Robays en Dr. Peter Van Eyken. Ook zij stonden steeds paraat wanneer ik vragen had.

Dr. Prof. Lena de Ryck, mijn externe promotor, heeft erop toegezien dat alles goed verlopen is doorheen deze 5 maanden. Bedankt! Ook bedankt aan Dr. Liesbeth Bruckers voor het uitvoeren van de statistische analyse.

Als laatste wil ik nog mijn ouders bedanken omdat zij de mensen zijn die het studeren hebben mogelijk gemaakt, zonder hen was ik nooit zover geraakt.

Samenvatting

Inhibine B reguleert de negatieve feedback naar de hypothalamus en de hypofyse tijdens de spermatogenese. Dit testiculair peptide bestaat uit een α -subunit gesynthetiseerd en gesecreteerd door Sertoli cellen en een β -subunit dat in de volwassen man aangemaakt en gesecreteerd wordt door germinatieve celtypen (vooral spermatocyten en vroege spermatiden). SCF, eveneens geproduceerd door Sertoli cellen, speelt een belangrijke rol in de proliferatie, differentiatie en overleving van de germinatieve celtypen tijdens de spermatogenese. Het bestaat in een membraangebonden en een oplosbare vorm. SCF en inhibine B kunnen een marker zijn voor een goede spermatogenese en succesvolle TESE.

Het doel van de studie is het onderzoeken van het expressiepatroon van inhibine B $_{\alpha}$ en SCF in testiculaire bipten van azoösperme mannen en mannen met extreme oligoasthenoteratospermie. Vervolgens werd een verband gezocht tussen het expressiepatroon van inhibine B $_{\alpha}$ en SCF en de aanwezigheid van spermatozoa in de testis, het bevruchtend vermogen van deze spermatozoa, het ondersteunend vermogen van de embryonale ontwikkeling en de zwangerschapskans wanneer deze spermatozoa gebruikt worden bij een ICSI behandeling.

De patiëntenpopulatie in deze studie omvat 5 patiëntengroepen met cryptorchidie (5 patiënten), SCOS (8 patiënten), sterilisatie (6 patiënten), sterilisatie met gefaald herstel (15 patiënten) en extreme oligoasthenoteratospermie (12 patiënten). De methode gebruikt om het expressiepatroon aan te tonen van inhibine B $_{\alpha}$ en SCF is de DAB-kleuring. De expressie van SCF is bekeken in de germinatieve celtypen en in de Sertoli cellen (celmembraan en cytoplasma). De inhibine B $_{\alpha}$ expressie daarentegen is bekeken in de Sertoli cel. Er is een onderscheid gemaakt tussen drie intensiteitsniveaus (intens, matig en zwak).

Bij inhibine B $_{\alpha}$ expressie zijn intense kleuringen bij SCOS gezien wanneer de spermatozoa afwezig zijn. De andere vier studiegroepen bevinden zich in de intense of matige groep wanneer spermatozoa aanwezig zijn. Wanneer bij SCF expressie de spermatozoa afwezig zijn, dan bevinden zich de meeste bipten in de groep waar de germinatieve celtypen afwezig zijn. Bij aanwezigheid van spermatozoa bevinden de patiënten zich in vooral in de intense groep. Sterilisatie met herstel, waarbij een significant hogere leeftijd teruggevonden is, is de enige studiegroep met succesvolle zwangerschappen.

Om een correct statistisch verband aan te tonen tussen de expressie van inhibine B $_{\alpha}$, SCF en een hogere leeftijd bij de man, kans op zwangerschap en de ICSI behandeling, zijn de patiëntengroepen te klein.

1 Inleiding

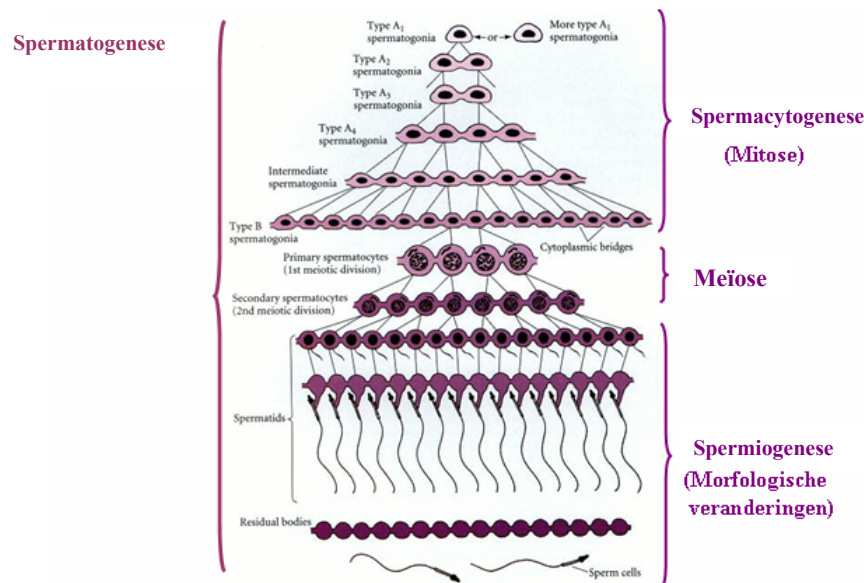
Spermatogenese is het proces waarbij spermatozoa, mature spermacellen, ontstaan uit spermatogonia in de seminifere tubulus van de testis. Het hele proces, van spermatogonia tot spermatozoa, duurt 64 dagen en kan onderverdeeld worden in drie fasen (Figuur 1). De eerste fase is de spermatocytogenese, hierbij differentiëren de spermatogonia in primaire spermatocyten. Daarna gaan de cellen over naar de meiotische fase, waarbij haploide spermatiden verkregen worden. De spermiogenese, de laatste fase, is de transformatie van spermatiden in spermatozoa. Elke fase bestaat uit een specifieke opeenvolging van gebeurtenissen.¹

Bij de spermatocytogenese delen de type A spermatogonia om type A₁ spermatogonia te vormen. Deze laatste bevinden zich in de omgeving van het basale membraan van de seminifere tubulus. Na stimulatie van type A₁ spermatogonia met testosteron gaan deze cellen in mitose, waaruit twee soorten cellen ontstaan. Enerzijds opnieuw de type A₁ spermatogonia voor zelfgeneratie en anderzijds de type A₂ spermatogonia. Uit de type A₂ spermatogonie wordt een A₃ spermatogonie gevormd en vervolgens ontstaat door middel van mitose een type A₄ spermatogonie. Dit laatste celtype kan in apoptose gaan, opnieuw na mitose een type A₄ spermatogonie vormen of ze kan differentiëren in een intermediaire spermatogonie. Door middel van mitose worden uit de intermediaire spermatogonia type B spermatogonia gevormd. Dit is de laatste cel die in mitose gaat om de primaire spermatocyt te genereren. Dit mitotisch proces blijft zich gedurende het verdere leven van de volwassen man herhalen. De spermatogonia zijn namelijk de stamcellen waaruit de spermacellen ontstaan en blijven dus het hele leven van de man actief. Eens dat de spermatogenese geïnitieerd wordt in de puberteit gaan de spermatogonia over in meïose (Figuur 1).¹

Tijdens de meiotische fase ondergaat de primaire spermatocyt een eerste meiotische deling. Hierbij wordt de DNA inhoud van de dochtercellen gehalveerd (naar 2n DNA). Bovendien verplaatst de immature spermacel zich van het basale naar het adluminale compartiment van de seminifere tubulus met behulp van Sertoli cellen. Na het voltooien van de eerste meiotische deling ontstaat de secundaire spermatocyt, welke vrijwel onmiddellijk overgaat naar de tweede meiotische deling. Bij deze deling wordt de DNA inhoud gereduceerd naar 1n.¹

Tijdens mitose en meïose in voorgaande processen scheiden de cellen niet volledig. Er ontstaan cytoplasmatische bruggen, ook syncytium genoemd, tussen de dochtercellen.

Hierdoor staan de cellen met elkaar in contact wat als voordeel heeft dat de dochtercellen synchroon ontwikkelen (Figuur 1).¹



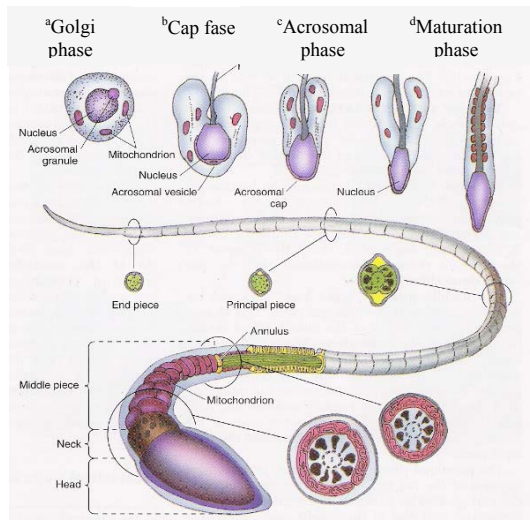
Figuur 1: Het mechanisme van de spermatogenese. De spermatogenese bestaat uit 3 mechanismen, de spermatocytogenese, meïose en spermiogenese. De spermatocytogenese is een mitotische proces dat voor en na de puberteit optreedt. Tijdens de meïose treedt er een reductie op van het DNA. Tijdens de spermiogenese, treden er morfologische veranderingen op. De meïotische fase en de spermiogenese komen enkel na de puberteit tot uiting.²

De laatste fase van de spermatogenese is spermiogenese. Hierbij ontwikkelen de spermatiden, aan elkaar verbonden door middel van cytoplasmatische bruggen, tot volwaardige spermatozoa (Figuur 1).¹ De spermiogenese neemt ongeveer 21 dagen in beslag.³

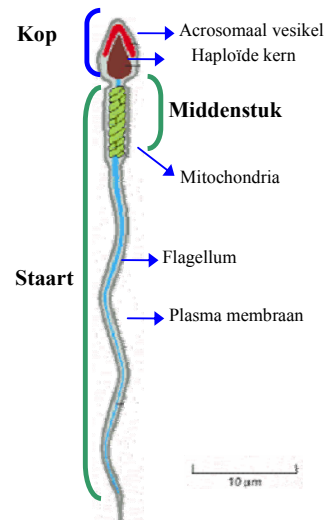
Spermiogenese bestaat uit vier stadia. Een eerste wordt de Golgi fase genoemd. In dit stadium vormen zich de pre-acrosomale granules. Deze versmelten tot een acrosomaal vesikel dat bindt aan het nucleair membraan. Dit vesikel bevindt zich recht tegenover het flagel aan de andere kant van de kern. In het volgende stadium, Cap fase, neemt het acrosomaal vesikel toe en groeit het uit tot zijn uiteindelijke grote en vorm, het acrosoom.¹

Tijdens de acrosomale fase treden er een hele reeks morfologische veranderingen op. De ronde cellen verlengen, de mitochondria verplaatsen zich naar het middenstuk en door een condensatie van de chromosomen wordt de kern kleiner. Bovendien ontstaat het axoneem in dit stadium. De laatste fase van de spermiogenese is de maturatie fase. Het overschot aan cytoplasma wordt hier gefagocyteerd door Sertoli cellen, waarna het syncytium scheurt en de individuele spermatozoa losgelaten worden in het lumen van de seminifere tubulus. In dit buizensysteem verkrijgen de spermatozoa hun motiliteit door het toevoegen van bepaalde substanties aan de spermacellen. Bovendien wordt hier glycerolfosfocholine gesecreteerd wat ervoor zorgt dat de capacitatie geïnhibeed wordt (Figuur 2).

Uiteindelijk is een spermatozoön een kleine compacte cel met een haploïde DNA inhoud. Het bestaat uit twee delen, een kop en een staart waarbij de staart onderverdeeld is in een middenstuk en een staartgedeelte. De kop bestaat uit een acrosomaal vesikel en een haploïde kern. De mitochondria bevinden zich in het middenstuk rond het axoneem.¹ Een volwassen spermatozoön is 60 tot 65 μm lang.^{1,4} De kop bedraagt ongeveer 5 μm , het middenstuk 10 μm en de rest van de staart gemiddeld 50 μm . (Figuur 3).¹



Figuur 2: De vier fasen van de spermiogenese. De spermiogenese bestaat uit 4 fasen de Golgi fase (a), Cap fase (b), acrosomale fase (c) en maturatie fase (d).¹

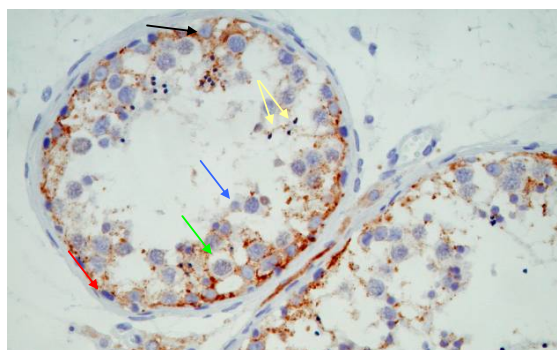


Figuur 3: longitudinale sectie van een spermatozoön. De spermatozoön bestaat uit 2 grote delen, een kop en een staart. Bovendien bestaat de staart uit het middenstuk met zijn mitochondriën en het flagellum. De kop bevat het acrosomaal vesikel en een haploïde kern.⁵

De testis: microscopische observatie van testiculaire weefsel

De testis is opgedeeld in lobules. Deze lobules bestaan uit seminifere tubuli waarin de spermatogenese plaatsvindt en uit een interstitiële ruimte waar onder andere bloedvaten en Leydig cellen zitten. Het gestratificeerd epitheel van de seminifere tubuli is samengesteld uit ontwikkelende spermacellen alsook Sertoli cellen. De Sertoli cel (Figuur 4) heeft een lange smalle structuur met een onregelmatige vorm. Het cytoplasma van de Sertoli cel strekt zich uit van het basaal tot aan het lumaal gedeelte. Typisch voor de kern is de eivormige of driehoekige structuur waarin zich duidelijk afgelijnde nucleoli bevinden. Tussen en rond het cytoplasma van de Sertoli cellen bevinden zich de verschillende soorten cellen van de spermatogenese. De spermatogonia (Figuur 4) liggen tegen het basale membraan van de seminifere tubuli. Er kunnen in de tubuli twee soorten spermatogonia onderscheiden worden, type A met een ronde of eivormige kern voorkomend in verschillende grote en type B. Deze

laatste hebben een ronde kern eveneens voorkomend in variërende grootte. Het volgende celtype, al iets meer lumaal, is de primaire spermatocyt (Figuur 4) grenzend aan de spermatogonia. De kernen van de spermatocyt zijn aanwezig in verscheidene grootten en vormen afhankelijk van het meiotische stadium waarin ze zich bevinden. De aanwezigheid van fijn chromatine in de kern indiceert het leptoteen stadium van de meiose, een stijging in celgrootte en een verdikking van de chromosomen geeft een donker gekleurde kern, dit komt voor in de zygoten fase van de meiose. Als laatste, de pachyteen fase, hierbij vergroot de cel nogmaals en worden de chromosomen nog dikker. Na deze meiotische deling ontstaan zoals eerder vermeld de secundaire spermatocyten. Karakteriserend voor de cellen is dat ze kleiner zijn als de primaire spermatocyten. De spermatiden zijn nog kleiner dan de secundaire spermatiden en liggen in groepjes bij elkaar dicht tegen het lumen van de seminifere tubulus (Figuur 4). Door de morfologische veranderingen tijdens de spermiogenese ontstaan de spermatozoa. Typisch hierbij is de staart van deze cellen dat uitsteekt tot in het lumen van de tubuli.⁶



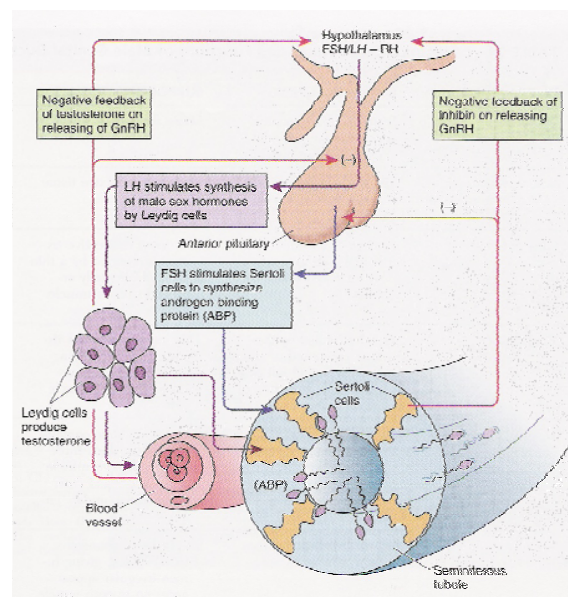
Figuur 4: Dwarsdoorsnede van een seminifere tubulus. De kleuring die hier gezien kan worden is een DAB kleuring waarbij het cytoplasma van de Sertoli cel kleurt. Er is een hematoxyline tegenkleuring (blauw) gebruikt. Bovendien zijn hier naast de kernen en het cytoplasma van de Sertoli cel (zwarte pijl) ook de spermatogonia (rode pijl), spermatocyten (groen pijl), spermatiden (blauwe pijl) en spermatozoa (gele pijl) te zien.

Hormonale regulatie

De spermatogenese wordt gereguleerd door Sertoli en Leydig cellen in samenwerking met de hypofyse. Naast regulatie van de spermatogenese door onder andere de Sertoli cel, vormt dit celtype ook de bloed-testis barrière door middel van zonnullae occludentes.^{1,4} Hierdoor ontstaat bovendien een scheiding van de seminifere tubuli in het basaal en adlumaal compartiment. Naast fysische ondersteuning van ontwikkelende spermacellen en fagocytose van het overschot aan cytoplasma, secreteren Sertoli cellen een fructoserijk medium. Dit

medium is de voedingsstof voor de spermacel en maakt het transport van de spermatozoa doorheen de tubuli gemakkelijker.¹

Één van de belangrijkste functies van Sertoli cellen is het aanmaken van tenminste drie soorten hormonen. Allereerst produceren deze cellen het antimulleriaan hormoon dat tijdens de embryogenese tot expressie komt. De functie is de onderdrukking van de mulleriaanse buis, een voorloper van het vrouwelijke reproductiesysteem. Vervolgens synthetiseren en secreteren Sertoli cellen het androgen-bindend proteïne (ABP) en ook inhibine B. Door binding van ABP aan testosteron, ontstaat een lokale concentratieverhoging van testosteron en zo kan deze de seminifere tubuli moeilijk verlaten. De productie van ABP kan plaats vinden doordat de hypofyse het follikelstimulerend hormoon (FSH) produceert wat gaat binden aan FSH-receptoren op Sertoli cellen. Inhibine, gesynthetiseerd en gesecreteerd door Sertoli cellen, zorgt voor een negatief *feedback* systeem naar de hypofyse toe. De hypofyse gaat vervolgens de FSH synthese onderdrukken (Figuur 5).¹



Figuur 5: Hormonale regulatie van de spermatogenese. De hypofyse, geactiveerd door de hypothalamus, secreteert Luteïniserend (LH) en Follikel stimuleren hormoon (FSH). FSH activeert het androgen-bindend proteïne in de Sertoli cellen welke zorgen voor een lokale concentratieverhoging van testosteron. LH activeert de Leydig cellen welke testosteron produceren en secreteren. Inhibine B is het hormoon dat zorgt voor een negatieve feedback naar de hypothalamus en een daling van FSH. Een daling van LH treedt op wanneer testosteron een bepaalde drempelwaarde overschrijdt.¹

De belangrijkste functie van Leydig cellen is de productie van testosterone. Dit hormoon kan geproduceerd worden ter hoogte van de seminifere tubuli doordat de hypofyse het luteïniserend hormoon (LH) synthetiseert en secreteert. LH bindt op LH-receptoren op het celmembraan van de Leydig cellen. Wanneer de concentratie van testosterone een bepaalde

drempel overschrijdt, zal dit hormoon de hypothalamus en hypofyse bereiken en zal de LH productie worden stopgezet (Figuur 5).¹

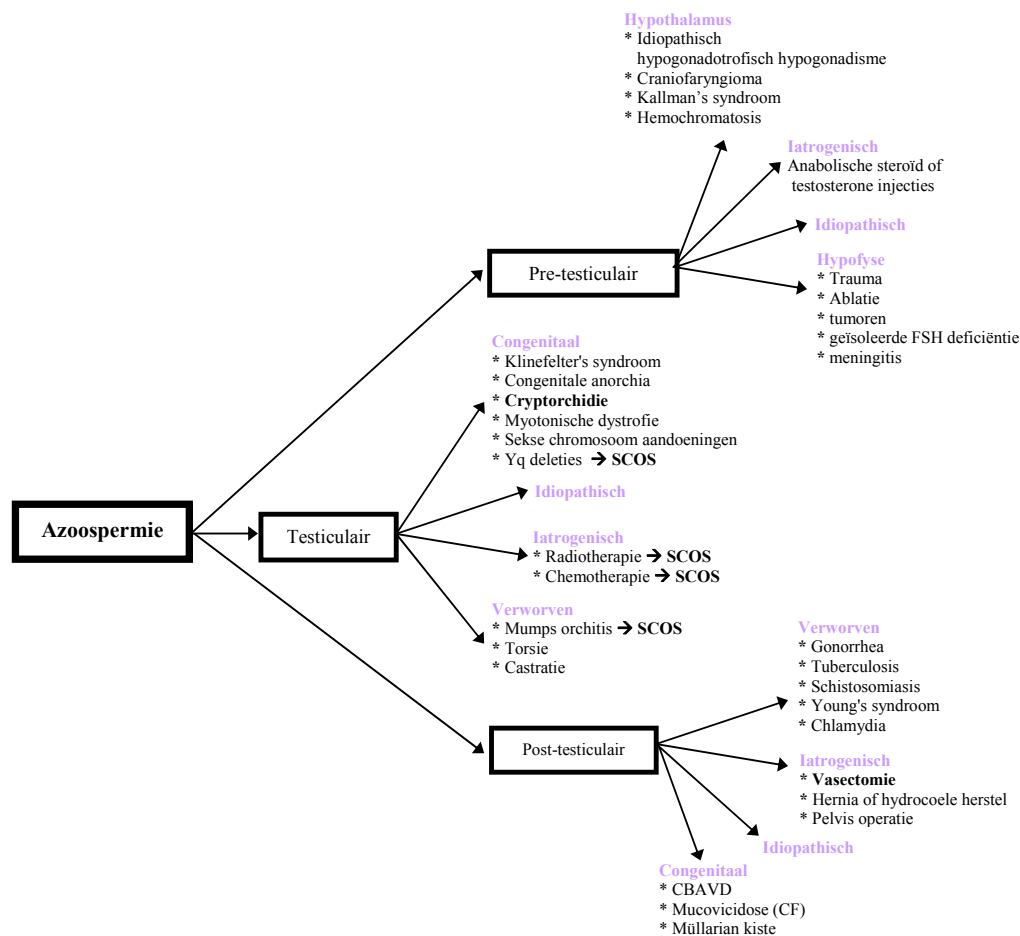
Mannelijke onvruchtbaarheid

10 – 15 % van de paren met kinderwens, heeft een vruchtbaarheidsprobleem. Hierbij ligt in 35 % van de gevallen de oorzaak bij de man. Azoöspermie is een vruchtbaarheidsprobleem waarbij geen spermatozoa aanwezig zijn in het ejaculaat.⁷ Bij azoöspermie kunnen drie types duidelijk onderscheiden worden. Een eerste type is pre-testiculair, dit omvat alle gevallen van hypogonadotrofische hypogonadisme. Deze kunnen van congenitale, verworven (onder andere trauma), iatrogenische (bijvoorbeeld parabolische steroïden), of idiopathische aard zijn. Testiculaire azoöspermie, het volgende type, omvat alle testiculaire aandoeningen en kan congenitaal (voorbeeld Y-chromosoom deletie), verworven (door bijvoorbeeld radiotherapie) of iatrogenisch (radiotherapie) zijn. Het laatste type is post-testiculair, deze omvat alle vormen van ductale obstructie of disfunctie (bijvoorbeeld retrograde ejaculatie). De obstructie kan congenitaal voorkomen ter hoogte van de vas deferens (congenitale bilaterale afwezigheid van vas deferens of CBAVD) of kan verworven zijn via infectie of postoperatief (zoals bij sterilisatie).⁸ Alle soorten azoöspermie die zich bevinden onder deze drie typen, zijn weergegeven in Figuur 6.⁹

In deze studie zullen patiënten met cryptorchidie, het *Sertoli cell only syndrome* (SCOS) en sterilisatie bestudeerd worden. Bij cryptorchidie, het niet voldoende indalen van de testis in de balzak op prepuberale leeftijd, ontstaat er een temperatuursverhoging in de testis, wat het spermatogenisch proces kan beïnvloeden op jonge leeftijd en azoöspermie kan veroorzaken.¹⁰ De afwezigheid van kiemcellen geassocieerd met een gereduceerd aantal of een volledige rijpingsstop van kiemcellen wordt ook SCOS genoemd. Dit fenotype van SCOS kan geassocieerd worden met deleties in de AZFa (azoöspermie factor a) locus. Bovendien kan SCOS ook ontstaan door blootstelling aan chemotherapie, straling of bof.⁷ Vasectomie, een volgende oorzaak van azoöspermie, is een contraceptie methode waarbij de vas deferens wordt afgesloten op chirurgische wijze. Op deze manier kan er geen sperma meer passeren doorheen de urethra en bevat het ejaculaat geen spermacellen meer.¹¹ Een herstel van de vasectomie kan uitgevoerd worden. In 76 % van de gevallen leidt dit tot een volledig herstel. 52 % van de partners van deze mannen werd ook effectief zwanger.¹²

Een laatste groep zijn de mannen met een extreme oligoasthenoteratospermie (OAT), de reden van het ontstaan van deze infertiliteit is variabel.

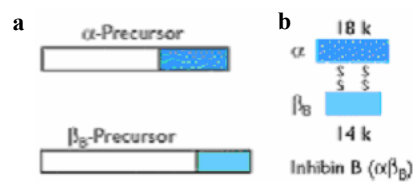
Deze vorm van infertiliteit heeft als typische kenmerken: een lage sperma concentratie, een gereduceerde beweeglijkheid en een toegenomen abnormale morfologie van de zaadcellen.¹³



Figuur 6: Onderverdeling van azoöspermie. Azoöspermie kan op pre-testiculair, testiculair of post-testiculair niveau ontstaan. Pre-testiculair omvat alle problemen omtrent hypogonadotrofische hypogonadisme, testiculair bevat alle testiculaire aandoeningen. Terwijl post-testiculair eerder een obstructie of disfunctie aangeeft van de ductus.

De spermatogenese: de rol van inhibine B in de spermatogenese

Inhibine is een testiculair peptide dat behoort tot de glycoproteïnes van de *transforming growth factor* (TGF) - β familie.¹⁴ In het mannelijk menselijk lichaam is inhibine B de biologische meest actieve vorm van de inhibine-familie en bovendien als enige detecteerbaar in het serum.¹⁵⁻¹⁷ Het peptide bestaat uit een α - en β_B -subunit die covalent gebonden zijn aan elkaar.^{18,19} Enkel wanneer beide subunits in deze dimeer-vorm voorkomen is inhibine B actief (Figuur 7).¹⁵



Figuur 7: Structurele visualisatie van inhibine B. De α -precursor, β_B -precursors (a) en de volledige visualisatie van inhibine B (b) zijn te zien in deze figuur.²⁰

Wanneer een te hoge concentratie aanwezig is van het follikel-stimulerend-hormoon (FSH) in de testis, dan secreteert de Sertoli cel inhibine B. Dit hormoon vormt de negatieve feedback van de Sertoli cel naar de hypothalamus en hypofyse. Dit betekent dat door een concentratiestijging van inhibine B een daling ontstaat van de FSH concentratie ter hoogte van de hypothalamus, hypofyse en later ook ter hoogte van de testis.^{15,21} Er bestaat tussen beide hormonen dus een inverse correlatie, welke tot stand komt tijdens de puberteit.¹⁷ Het is mogelijk dat FSH de expressie stimuleert van het mRNA van de α -subunit in de Sertoli cellen. De andere subunit (β_B -subunit) staat onder de controle van de voorlopercellen van de spermacel, in het bijzonder van spermatocyten en vroege spermatiden. Wanneer deze voorlopercellen afwezig zijn, is er geen β_B -subunit aanwezig en kan vervolgens geen inhibine B aangemaakt worden.^{18,22}

Door de afhankelijkheid van inhibine B, vanaf de puberteit, van de voorlopercellen van de spermacel, is dit hormoon mogelijk een goede marker voor de kwaliteit van de spermatogenese. Dit wilt zeggen hoe slechter de spermatogenische status is, hoe lager de serum inhibine B concentratie is.

Bij *Sertoli cell only syndrome* (geen spermatogenische activiteit), hypospermatogenese, spermatogonie of spermatocytische rijpingsstop wordt in de literatuur een lage serum inhibine B concentratie teruggevonden wanneer deze groepen vergeleken worden met de waarden van dit hormoon bij mannen met een normale spermatogenische activiteit.^{18,23,24} Maar bij obstructieve vormen van azoöspermie of rijpingsstop op spermatidisch niveau kan geen onderscheidt gemaakt worden op basis van het inhibine B niveau ten op zichte van mannen met een normale spermatogenese.^{18,23} Bovendien zijn er een aantal gevallen in studies gevonden bij SCOS die toch een normale serum inhibine B waarde vertonen.^{18,23,24}

Naast mogelijke spermatogenische marker kan serum inhibine B ook aanzien worden als een voorspeller voor het terugvinden van testiculair sperma bij het uitvoeren van een testiculaire sperma extractie (TESE). Uit de meeste studies blijkt dat een lage concentratie aan inhibine B de kans op het terugvinden van sperma in een TESE enorm doet dalen. Toch geeft een lage

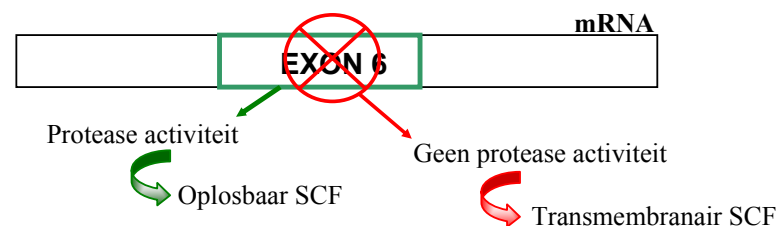
concentratie geen uitsluitel. De concentratie van inhibine B geeft dus wel een trend aan voor het niet vinden van testiculaire zaadcellen maar geen definitieve uitkomst.^{22,25,26}

Stam cel factor in de testis

Één van de vele functies toegewezen aan Sertoli cellen is het secreteren van substanties nodig voor de spermatogenese, zoals inhibine B en *androgen binding protein* (ABP). Naast deze substanties secreteren Sertoli cellen ook stam cel factor (SCF). Aanvankelijk werd gedacht dat SCF enkel van belang was bij de gametogenese tijdens de vroege embryogenese, maar studies hebben aangetoond dat dit complex ook een belangrijke functie heeft in de postnatale ontwikkeling.^{27,28}

Het proteïne staat in voor de proliferatie, differentiatie en overleving van voorloper spermacellen tijdens de spermatogenese. SCF kan in twee vormen voorkomen als gevolg van alternatieve *splicing* van exon 6. Wanneer deze geknipt wordt door proteasen, dan ontstaat er de oplosbare vorm van SCF, anders blijft de membraangeassocieerde vorm bestaan (Figuur 8).^{27,28} Beide vormen zijn liganden van de c-kit receptor. Deze receptor is gelokaliseerd op spermatogonia en Leydig cellen en heeft een tyrosine kinase activiteit na activatie met stam cel factor.²⁹

De membraangebonden vorm (mSCF) en de oplosbare vorm van SCF (sSCF) oefenen beiden een andere functie uit op het spermatogenisch proces. Zo is het mSCF verantwoordelijk voor de adhesie van vroege spermacellen aan Sertoli cellen en waarschijnlijk ook voor de ondersteuning en overleving van primordiale kiemcellen. Hiernaast stimuleert sSCF de DNA synthese van spermatogonia en speelt het een rol in de differentiatie van spermacel voorlopers.²⁸



Figuur 8: Alternatieve splicing van Stem cel factor (SCF). Exon 6 is het gedeelte van het mRNA dat zorgt voor het ontstaan van 2 vormen, oplosbare en transmembranaire, van SCF. Wanneer het exon geknipt wordt door proteasen ontstaat de oplosbare vorm, anders de transmembranaire vorm.

Het voorkomen en mogelijke rol van sSCF en mSCF in de testis is slecht onderzocht in deze studies. Volgens Fujisawa *et al* (1998), zijn beide quasi in een gelijke hoeveelheid aanwezig in de normale testis maar in de studie van Fox *et al* (2000), is er tussen verschillende patiënten een sterk variërende ratio gevonden tussen beide factoren.^{27,28}

SCF speelt naast inhibine B ook een belangrijke rol in het spermatogenisch proces. Er is dus mogelijk een verband tussen de spermatogenische status en de SCF concentratie. Uit de studie van Fujisawa *et al* (1998), bleek dat de concentratie van SCF significant gecorreleerd is met de hoeveelheid spermacellen, maar niet met motiliteit, serum niveau van FSH, LH of testosteron.²⁸

In tegenstelling tot de vorige studie, vindt Fox *et al* (2000) geen correlatie tussen de concentratie van primordiale kiemcel productie en beide vormen van SCF. Naast deze bevinding, heeft deze groep een significant hogere expressie van SCF ontdekt in patiënten met SCOS.²⁷ Een andere studie vond geen correlatie tussen de aanwezigheid van SCF en het terugvinden van sperma bij een TESE.²² Maar een hoge intensiteit van SCF en een minieme concentratie van GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) geven een hoge succesratio aan voor het terugvinden van sperma bij een TESE.²²

Het doel van deze studie is de expressie van SCF en inhibine B_α aantonen in testiculair weefsel van azoösperme mannen. Meer bepaald mannen die lijden aan cryptorchidie, SCOS, sterilisatie, een gefaald herstel na sterilisatie en extreme OAT. Vervolgens zal gezocht worden of er een verband bestaat tussen het expressiepatroon van beide proteïnes in het testiculaire weefsel en leeftijd, spermakwaliteit, eicelkwaliteit en zwangerschapskans.

2 Materiaal en methoden

2.1 Patiëntenpopulatie

De patiëntengroep in deze studie omvat mannen met azoöspermie met als oorzaak cryptorchidie, SCOS of extreme oligo- astheno- teratospermie (OAT). Een vierde en vijfde groep bestaat uit patiënten die een sterilisatie hebben ondergaan en een eventueel gefaald herstel hiervan. De studiepopulatie is geselecteerd uit de patiëntendatabank (FIVET) van de dienst Fertiliteit in het Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL). Er zijn 46 paren opgenomen in deze studie, uit de periode oktober 1998 tot januari 2006 waarvan 29 uiteindelijk gestart zijn met een vruchtbaarheidsbehandeling met eigen spermatozoa op de dienst Fertiliteit in het ZOL. Mannen in de studiepopulatie die geen van bovenstaande oorzaken hebben van azoöspermie, die geen testiculaire sperma extractie (TESE) ondergaan hebben en/of geen nummer hebben in het anatoompathologische laboratorium zijn niet opgenomen in de studiegroep. Ook patiënten waarvan onvoldoende informatie aanwezig is over hun biologie of hun medische achtergrond behoren niet tot deze studiepopulatie. In het totaal hebben de paren 62 pogingen ondergaan met artificiële reproductietechnieken (ART) om een mogelijke zwangerschap te bekomen. De ART procedure die in deze studie gehandhaafd is, is het uitvoeren van een TESE met een daaropvolgende intra-cytoplasmatische injectie (ICSI). Dit houdt in dat de zaadcel, verkregen na TESE, met behulp van een micropipette in de eicel wordt gebracht.

2.2 Onderzochte parameters

Een eerste parameter die onderzocht zal worden betreffende deze paren is de keuzebepaling van deze patiënten met kinderwens na de diagnose van azoöspermie door de fertiliteitstarts. Volgende parameters die onderzocht zullen worden, zijn de kenmerken van de partners van deze patiëntengroep zoals de leeftijdsverdeling van beide partners en de pathologieën, zwangerschapsstatus met bijhorende parameters zoals aantal bevruchte eicellen, embryokwaliteit, zwangerschap, kans op een baby thuis.

De laatste parameters waarnaar gekeken wordt zijn de expressiepatronen van inhibine B en SCF in de testiculaire biopten. Deze worden gerelateerd met de uitslag van de testisbioptie en van de resultaten van de vruchtbaarheidsbehandeling. Zo ook zal de intensiteit van de expressie van inhibine B en SCF gerelateerd worden aan de aan –of afwezigheid van spermatozoa in het testiculair biopt.

2.3 Verwerking van een biopt bekomen door testiculaire sperma extractie (TESE)

Voor het bekomen van een testis biopt dient de patiënt onder narcose gebracht te worden. Vervolgens zal een incisie gemaakt worden doorheen het scrotum, de tunica vaginalis en de tunica albuginea aan de ventrale zijde van de testis tot aan de seminifere tubuli.³⁰ Klemscharen klemmen deze drie lagen aan weerszijden van de incisie zodat de biopsies van de seminifere tubuli gemakkelijker genomen kunnen worden. Het aantal en de grootte van de biopten, meestal drie aan beide kanten, hangt af van de grootte van de testis.

De biopten worden vervolgens in een medium gebracht bestaande uit Earle's Balanced Salt Solution (Sigma, USA), 100 mM Sodium pyruvate (500 µl op 500 ml) (Sigma, USA), Penicillin-Streptavidin, 750 µL op 500 ml (GIBCO, USA) en 10 % Humaan Serum albumine (HSA) (Vitrolife, Zweden) en naar het laboratorium vervoerd.

Het nemen van de biopsie alsook het verwerken van de biopten gebeurt op een aseptische manier. Uit het biopt worden spermatozoa opgezuiverd met als doel te gebruiken in een ICSI. Een klein deel van dit biopt wordt naar het anatoompathologisch laboratorium gebracht voor een histologische studie, ter bevestiging van de vooropgestelde analyse.

Opzuivering van spermatozoa uit testisbiopten

De biopten worden uit de proefbuizen gehaald en onder de stereomicroscop (vergroting 200 maal) in een petrischaaltje geplaatst in hetzelfde medium als voorheen. Met steriele Tubeculine naalden worden de tubuli vervolgens uit elkaar getrokken en opengescheurd. Vervolgens zullen het aantal spermatozoa, eveneens onder de microscoop op vergroting 200 maal geschat worden. Hierna volgt een gedetailleerde evaluatie onder de microscoop met vermelding van de aanwezigheid van kernen van Sertoli cellen, spermatozoa, spermatiden en spermatozoa. Door middel van de gradiëntcentrifugatie zullen vervolgens de morfologisch meest normale en meest motiele spermatozoa geselecteerd worden. Bij de gradiëntcentrifugatie wordt een drielagig gradiënt aangebracht in proefbuizen van 15 ml, bestaande uit 90, 70 en 40 % SpermgradTM-125 (Vitrolife, Zweden).³¹

Hierop wordt de sperma suspensie aangebracht. Na centrifugatie van de proefbuizen voor 25 minuten op een snelheid van 250 g in een Eppendorf centrifuge (5702) worden de lagen 90 en 70 % SpermgradTM-125 gewassen met wasmedium. De concentratie van de spermacellen wordt hierna opnieuw bepaald. Daarna worden de spermacellen in cryoprotectant gebracht en

vervolgens verdeeld over 400 µl cryorietjes. Deze worden eerst dertig minuten boven de vloeibare stikstof geplaatst, dan in de vloeibare stikstof ondergedompeld en zo gestockeerd tot verdere verwerking bij -196°C .³¹

2.4 Verloop van een intracytoplasmatische injectie

Bij een intracytoplasmatische injectie of ICSI zal de patiënte eerst hormonaal gestimuleerd worden om meerdere eicellen te doen aanrijpen. Met een humaan choriongonadotrofine of hCG injectie zal daarna een ovulatie uitgelokt worden. 36 uren na deze injectie vindt de operatieve eicelcollectie plaats. Enkel rijpe eicellen (metafase II) worden gebruikt voor de ICSI. Na het bekomen van de metafase II eicellen zal het testiculaire sperma ontdooid en gewassen worden. Hierna wordt de morfologisch beste en meest motile zaadcel onder de microscoop (vergroting 200 maal) geïnjecteerd in een rijpe eicel. 24 uren na deze injectie zullen de eicellen opnieuw bekeken worden onder de microscoop (vergroting 200 maal). Dit om te kijken of een bevruchting tot stand gekomen is. Het aantal normaal bevruchte eicellen per aantal metafase II eicellen zullen hier vervolgens gecodeerd worden als 2 pronucleï (2PN). Er kunnen ook abnormaal bevruchte eicellen per aantal metafase II aanwezig zijn, deze worden benoemd als XPN of meer of minder dan 2 pronucleï. Op dag 2 en 3 worden de bevruchte eicellen met goede kwaliteit in cultuur gebracht. Vervolgens zal een embryotransfer van 1 of 2 goede kwaliteitsembryo's naar de uterus plaatsvinden. Wanneer een bloedafname 14 dagen na de embryotransfer een HCG waarde geeft groter dan 25, dan is de patiënte zwanger. 6 weken na de embryotransfer zal een echografie de aanwezigheid aantonen van de hartactiviteit en van een vruchtzak, en is de zwangerschap evolutief. De uiteindelijke geboorte van een gezond kind wordt ook geëvalueerd als baby thuis-ratio.

2.5 Histologische verwerking van het testisbiopt

Wanneer testisbiopsies verwerkt worden tot coupes, worden deze laatste in speciale cassettes bewaard in formol of Bouin. Vervolgens treedt er overnacht in een automatisch gestuurde machine, Tissue-Tek[®] VIPTM van Sakura, een dehydratie op van het weefsel. Eerst komt het weefsel terecht in formol, dan in alcohol 70%, alcohol 90%, in absolute alcohol, in toluol en als laatste wordt het geplaatst in een paraffine bad (60°C) voor de rest van de nacht. Vervolgens wordt het weefsel verwerkt in de paraffineermachine Tissue-Tek[®] TekTM van

Sakura. Eerst wordt het biopt aangebracht op een verwarmde plaat in een metalen mal. Op deze mal wordt paraffine (60°C) gegoten door middel van een pompje. Hierna wordt de cassette met de achterkant in de hete paraffine gelegd en dit geheel zal afkoelen op een koude plaat van -6°C. De paraffine stolt heel snel en de overtollige paraffine wordt verwijderd met een mes na het uithalen van de cassette uit de metalen mal. Als laatste wordt de cassette op een koude plaat van -14°C geplaatst. Dit is de ideale snij-temperatuur. Vanaf dit moment kan de paraffine (waarin zich het weefsel bevindt) op de cassettes versneden worden tot coupes met de microtoom met een dikte van 3 micron. De coupes worden op "Superfrostplus" preparaatglasjes (Intermedical, België) in water geplaatst op een verwarmde plaat van ongeveer 55°C om uit te rekken. Bovendien zal het water verdampen op de verwarmde plaat en de coupes drogen zo vast op de preparaatglasjes.

2.6 Immunohistochemische kleuring van inhibine B

Bij de immunohistochemische kleuring van inhibine B is het van belang dat de testiscoupes eerst en vooral gerehydrateerd en gedeparaffineerd worden. Om de coupes voldoende te deparaffineren doorlopen ze een batterij waarbij deze 15 minuten in een xylol-bad zitten, daarna in 100 % alcohol, 94 % alcohol en vervolgens in 70 % alcohol. Hierna treedt een spoeling van de coupes in gedestilleerd water op en worden ze in Tris-EDTA buffer geplaatst welke zich bevindt in bakjes in het waterbad (100°C). Na 20 minuten zullen de coupes 15 minuten afkoelen in de Tris/EDTA buffer, hierna treedt nogmaals een spoeling op met lopend gedestilleerd water. Na het plaatsten van de coupes in Tween buffer en het instellen van de dako-autostainer van Dakocytomation moet de verdunning (1/80) van het antilichaam klaargemaakt worden. De hier gebruikte verdunning is met een positieve controle (testis van een patiënt met SCOS onafhankelijk van de studiestudiepopulatie) op punt gesteld, wat noodzakelijk is voor het verkrijgen van de juiste intensiteit bij de kleuring. Naast een positieve controle is ook een negatieve controle ingezet (testisbiopt van 2 patiënten uit deze studiestudiepopulatie). Deze heeft dezelfde stappen doorlopen als alle testisbiopten, maar het antilichaam zit ditmaal niet in de verdunningsvloeistof. De verdunningsvloeistof die gebruikt wordt is Dako REALTM antibody diluent met code S2022 (Dakocytomation, Denemarken). Het antilichaam dat aangebracht wordt om inhibine B op te sporen is het *Mouse Monoclonal Antibody Inhibin alpha Ab-1* (clone R1, MS-1863S) (NeoMarkers, USA). Het monoclonale antilichaam bindt de inhibine- α subunit in het cellulair cytoplasma. Vooraleer de coupes in de dako-autostainer terecht komen, dient een dwarse streep getrokken te worden over de coupes

met de dakoCytomation Pen (Dakocytomaton, Denemarken) zodat het opgeloste antilichaam zich niet over het hele glaasje verspreidt. Nu kunnen de coupes in de dako-autstainer geplaatst worden en kan de run starten.

Eerst wordt een peroxidase blokkeringsreagens (Dakocytomation, Denemarken) toegevoegd. Hierna kan het primaire antilichaam (*Mouse Monoclonal Antibody Inhibin alpha Ab-1*) aan de α -subunit van inhibine B binden. Vervolgens wordt het secundair antilichaam toegevoegd. Het gebruikte secundaire antilichaam bij deze techniek is envision (Dakocytomation, Denemarken). Deze heeft aan zijn uiteinde een polymeerstructuur waarop het *horseradish* peroxidase (HRP) enzyme zit. Deze zal reageren met waterstofperoxidase en diaminobenzidine (DAB) (Dakocytomation, Denemarken). Op deze manier kan de visualisatie van de binding van het antilichaam plaatsvinden.

Na de run zal met haematoxiline (VWR, België) nog een tegenkleuring plaatsgrijpen. Daarna start de dehydratatie van de coupes door het spoelen ervan in verscheidene concentraties alcohol en xylol. De concentraties gaan van 70 % naar absolute alcohol, vervolgens naar een bad met $\frac{1}{2}$ absolute alcohol en $\frac{1}{2}$ xylol en zo naar zuivere xylol. Als laatste stap zullen de dekglazjes op de coupes geplaatst worden met behulp van lijm van clearium (Surgipath, USA).

2.7 Immunohistochemische kleuring van stam cel factor

De immunohistochemische kleuring van stam cel factor gebeurt op analoge wijze als deze van inhibine B. Met het verschil dat hier gewerkt wordt met aankleuring van SCF met een polyclonaal antilichaam, anti-*human SCF (K089) rabbit IgG* (IBL, Japan). Bovendien is hier de positieve controle ovarium epitheel. Aan de hand hiervan is de verdunning 1/75 geselecteerd.

2.8 Histologisch onderzoek van de coupes van inhibine B $_{\alpha}$ en stam cel factor (SCF)

Het histologisch onderzoek van de coupes gebeurt onder een lichtmicroscop met vergroting 400 maal. Bij de semi-kwantitatieve analyse van inhibine B zullen telkens het aantal Sertoli cellen geteld worden in 100 tubuli per biopt. Bovendien zal ook een intensiteitsbepaling per biopt plaatsvinden. Hierbij kan een onderscheidt gemaakt worden tussen intens (++) , matig (+) en negatief (-). Bij de expressie van stam cel factor in de verscheidene coupes zal

nagegaan worden in welke celtypes stam cel factor tot expressie komt en met welke intensiteit. Hiernaast zal ook gekeken worden in welke tubuli (ook 100 geteld) SCF tot expressie komt in de Sertoli cel (cytoplasmatisch of aan de celwand). Zo zal ook hier de maatstaf voor de intensiteit intens (++), matig (+) of negatief (-) zijn. Hier zullen per tubulus deze beide parameters bepaald worden, zo ook kan hier genoteerd worden wanneer een bepaald celtype ontbreekt in de tubulus (A). Bij het bepalen van de expressie van stam cel factor zullen ook 100 tubuli bekeken worden.

De inhibine B_a en SCF expressie wordt intens genoemd wanneer meer dan 10 % van de tubuli intens aankleuren, matige wanneer minder dan 10 % intens aankleurt maar meer dan 10 % matig en negatief wanneer minder dan 10 % van de tubuli aankleuren. Dit is volgens de methode van Fujita et al (2005).²²

2.9 De verse score

Bij de verse evaluatie van de spermatogenische activiteit wordt het biopt in het petrischaaltje onder de fase-contrast microscoop geplaatst na openscheuren van de seminifere tubuli. Daarna zal bij de vergroting 200 maal een gedetailleerd beeld weergegeven worden van alle cellen aanwezig in het weefsel. De beoordeling van deze score gebeurt aan de hand van een telling van 100 voorlopers van spermacellen (spermatogonia, spermatocyten en spermatiden) die het biopt vertoont en van Sertoli cellen in 10 microscopische velden.

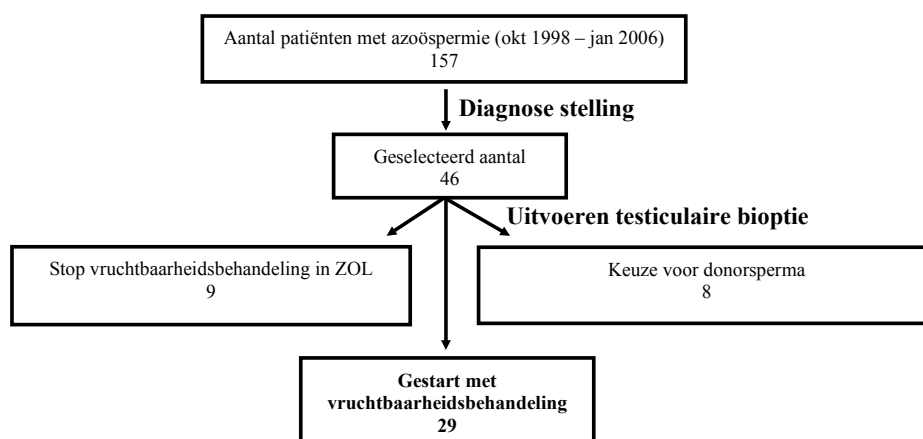
2.10 Statistische analyse

De statistische analyse is hier uitgevoerd met de Fisher exact test en de Wilcoxon rank sum test. De testen zijn gebruikt om verschillen te zoeken tussen de 5 patiëntengroepen (cryptorchidie, SCOS, sterilisatie, sterilisatie met gefaald herstel en extreme OAT) met betrekking tot alle besproken parameters. Wanneer de p –waarde kleiner is dan 0,05 worden de data als statistisch significant gezien.

3 Resultaten

3.1 Patiëntenpopulatie

Tijdens de periode van oktober 1998 tot januari 2006 werden 157 paren met een kinderwens op de dienst Fertilititeit in het Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL) gediagnosticeerd met azoöspermie of extreme OAT. Aan de hand van deze patiëntengroep werd een database opgesteld waarin alle medische informatie opgenomen is (data niet getoond). 46 paren zijn uit deze database geselecteerd. Deze is gebaseerd op het uitvoeren van een TESE, een volledig medische dossier en de oorzaak van de azoöspermie of extreme OAT. De gekozen patiëntengroepen zijn cryptorchidie, SCOS, sterilisatie, sterilisatie met gefaald herstel en extreme OAT (Figuur 1). Na het stellen van de diagnose van azoöspermie of extreme OAT hebben 9 paren van de 46 besloten niet verder te gaan met een vruchtbaarheidsbehandeling in het ZOL. Ook hebben 8 paren geopteerd voor donorsperma. Uiteindelijk startten 29 patiënten met een vruchtbaarheidsbehandeling op de dienst Fertilititeit in het ZOL.



Figuur 1: De studiepopulatie. De studiepopulatie omvat 46 paren waarvan 9 paren gestopt zijn met een vruchtbaarheidsbehandeling op de dienst Fertilititeit in het ZOL, 8 paren hebben voor donorsperma gekozen. De eigenlijke patiëntengroep bevat dus 29 paren die een vruchtbaarheidsbehandeling hebben ondergaan met een TESE.

Allereerst is de procentuele hoeveelheid berekend van het voorkomen van de 5 patiëntengroepen (cryptorchidie, SCOS, sterilisatie, sterilisatie met gefaald herstel en extreme OAT) in de totale studiepopulatie (46 patiënten). Zoals weergegeven in Tabel 1a bevat de groep cryptorchidie 5 (11 %) patiënten. In de volgende studiegroep, SCOS, bevinden zich 8 (17 %) patiënten. Sterilisatie en sterilisatie met gefaald herstel omvatten respectievelijk 6 (13 %) en 15 (33 %) patiënten (Tabel 1a). De laatste groep omvat 12 mannen met extreme OAT.

De partners van deze patiënten kunnen ook lijden aan één van de volgende onvruchtbaarheidspathologieën: endometriose of ovariële pathologie of andere factoren (hogere leeftijd (≥ 40 jaar), slechte ovariële respons of baarmoederafwijkingen). In het totaal kampen 13 (28 %) vrouwen van onze studiegroep met een vruchtbaarheidsprobleem, het overige deel van de vrouwen, 33 (72 %), bleken normaal (Tabel 1b). Endometriose en ovariële pathologie komen in het totaal voor bij 4 (8 %) patiënten. De meeste vrouwen, 9 (20 %), situeren zich in de categorie andere factoren.

In de eerste studiegroep, mannen met cryptorchidie, bevindt zich geen enkele partner met een vruchtbaarheidsprobleem. Bij mannen met SCOS en sterilisatie situeren zich respectievelijk 12,50 % en 50 % van de partners met een vrouwelijke factor. Tenslotte situeren zich in de groep die een sterilisatie met gefaald herstel ondergaan hebben 1 op 2 van de vrouwelijke partners en in de extreme oligoasthenoteratospermie (OAT) patiëntengroep 20 % (data niet getoond).

Samenvattend blijkt dat de meeste mannen van onze patiëntengroep een sterilisatie of sterilisatie met gefaald herstel hebben ondergaan.

28 % van de vrouwelijke partners van onze studiegroep kampt met een vruchtbaarheidsprobleem. Zo hebben 50 % van de partners van mannen met een sterilisatie of extreme OAT een vrouwelijk vruchtbaarheidsprobleem. Doch is er geen significant verschil in verdeling van de vrouwelijke pathologieën over de verschillende studiegroepen ($p = 0,1988$).

Tabel 1: Beschrijving studiegroep: mannelijke en vrouwelijke indicaties

^a Soort pathologie	% Mannen	^b Soort pathologie	% Vrouwen
Cryptorchidie	5 (11%)	Endometriose	2 (4%)
SCOS	8 (17%)	Eierstokken	2 (4%)
Sterilisatie	6 (13%)	Andere factoren	9 (20%)
Sterilisatie + herstel	15 (33%)	Normale vrouwen	33 (72%)
Extreme OAT	12 (26%)		
Totaal	100%	Totaal	100 %

^aHet aantal mannen die aanwezig zijn in de studiepopulatie (cryptorchidie, extreme OAT, SCOS, sterilisatie en sterilisatie met gefaald herstel); ^bDe hoeveelheid vrouwelijke patiënten met een vruchtbaarheidsprobleem.

In Tabel 2 is de gemiddelde leeftijd van de man en de vrouw per pathologie uitgezet.

De gemiddelde leeftijd van de groep patiënten met cryptorchidie is voor mannen en vrouwen 30 jaar. Enkel de minima en maxima verschillen. De leeftijd van de man gaat respectievelijk van 32 tot 37 jaar, bij de vrouw is dit respectievelijk van 25 tot 33 jaar. Mannen met SCOS zijn gemiddeld 38 jaar oud, de minimum leeftijd is hier 32 jaar, de maximum leeftijd 46. Hun

partners hebben gemiddeld een leeftijd van 33 jaar, waarbij het minimum 29 is en het maximum 39. De patiënten die een sterilisatie ondergaan hebben, zijn gemiddeld 42 jaar oud (minimum leeftijd 37 en maximum 47 jaar). De vrouwelijke patiënten zijn hier gemiddeld 31 jaar oud (27 tot 35 jaar). In de groep sterilisatie met gefaald herstel hebben de mannen een gemiddelde leeftijd van 44 jaar, waarbij de leeftijd minimaal 33 en maximaal 52 is. Terwijl de vrouw gemiddeld 35 jaar oud is met een spreiding tussen 26 en 41 jaar. In de groep mannen die een extreme OAT hebben, is de gemiddelde leeftijd 34 jaar (minimum 25, maximum 40). De partners zijn gemiddeld 30 jaar oud (22 tot 39 jaar) (Tabel 2).

Tussen de leeftijd van de vrouwen is er geen significant verschil ($p=0,2562$). De mannen in de sterilisatie met gefaald herstel hebben een significant hogere leeftijd ($p=0,0016$) dan de mannen in de andere patiëntengroepen. De mannen in de cryptorchidiegroep zijn significant jonger dan de mannen in de andere patiëntengroepen.

Tabel 2: De leeftijd van de man en vrouw (47 patiënten).

	leeftijd mannen		Leeftijd vrouwen	
Cryptorchidie (5p)	30*	(32-37)	30	(25-33)
SCOS (8p)	38	(32-46)	33	(29-39)
Sterilisatie (6p)	42	(37-47)	31	(27-35)
Sterilisatie + herstel (12p)	44*	(33-52)	35	(26-41)
Extreme OAT (15p)	34	(25-40)	30	(22-39)

De leeftijd van de man is berekend op de datum van de biopsie en van de vrouw op de datum van de pick-up. De uitzondering hierop is de groep met SCOS, hierbij is de leeftijd van de vrouw berekend op de dag van de biopsie aangezien alle patiënten gekozen hebben voor donorsperma.

*Significant verschil tussen de leeftijd van deze patiëntengroep en de rest van de patiëntengroepen (p -waarde = 0,0016).

3.2 Sperma in testisbiopsie

Tabel 3 geeft een overzicht van het wel of niet vinden van sperma in het testiculair biopsie bij de verschillende studiegroepen. Hiernaast zijn ook de patiënten genoteerd die overgestapt zijn op donorsperma na diagnosestelling en de patiënten die na een ICSI poging met eigen sperma overgestapt zijn op donorsperma.

Bij de groep mannen met cryptorchidie, zijn voor alle 5 patiënten spermatozoa gevonden tijdens de TESE. 1 paar is na een ICSI poging met eigen spermatozoa overgestapt op donorsperma. In de volgende patiëntengroep, deze met SCOS, werd bij geen enkele patiënt sperma gevonden in de TESE. Bovendien zijn, zoals eerder vermeld, alle 8 (100 %) patiënten

onmiddellijk na diagnosestelling overgegaan op donorsperma. Bij de patiëntengroep die een sterilisatie hebben laten uitvoeren (6 patiënten), is sperma gevonden in het testiculair biopt. In de voorlaatste groep, sterilisatie met gefaald herstel, heeft 1 (7 %) patiënt geen sperma in de TESE. 1 patiënt in deze groep (7 %) is na een poging met eigen spermatozoa overgestapt op donorsperma. Niemand in deze groep is rechtstreeks na diagnosestelling overgegaan op donorsperma. Tenslotte zijn bij 11 mannen (92 %) met een extreme OAT spermatozoa gevonden in het testiculair biopt, bij 1 man (8%) was dit niet het geval. 1 patiënt is bovendien overgegaan op donorsperma na een ICSI poging met eigen spermatozoa.

Samenvattend kan gesteld worden dat bij geen enkele patiënt met SCOS sperma gevonden is in het testiculair weefsel ($p < 0,0001$). Alle patiënten hebben hier geopteerd voor donorsperma ($p < 0,0001$). Bij de meeste andere mannen zijn wel spermatozoa gevonden in de TESE.

Tabel 3: Procentuele hoeveelheid mannen per indicatie waarbij geen spermacellen in TESE zitten en welke overgaan op donor, na ICSI met eigen zaad of rechtstreeks.

	^a Sperma TESE		Geen sperma TESE		^b Donor na TESE + ICSI		Rechtstreeks naar donor	
Cryptorchidie	5/5	(100 %)	0/5	(0 %)	1/5	(20 %)	0/5	(0 %)
SCOS	0/8	(0 %)	8/8*	(100 %)	0/8	(0 %)	8/8 *	(100 %)
Sterilisatie	6/6	(100 %)	0/6	(0 %)	0/6	(0 %)	0/6	(0 %)
Sterilisatie + her	14/15	(93 %)	1/15	(7 %)	1/15	(7 %)	0/15	(0 %)
Extreme OAT	11/12	(92 %)	1/12	(8 %)	1/12	(8 %)	0/12	(0 %)

In tabel 3a is gekeken hoeveel patiënten in iedere groep spermacellen hebben in hun testiculair biopt bekomen door een testiculaire sperma extractie (TESE). In tabel 3b is gekeken naar de paren die gekozen hebben voor donorsperma na een behandeling met eigen spermatozoa (TESE + ICSI) en deze die rechtstreeks zijn overgegaan op donorsperma. * ($p < 0,0001$).

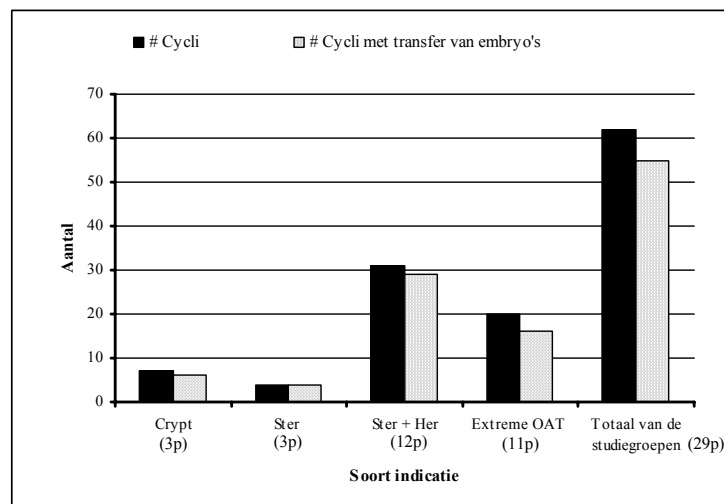
3.3 Vruchtbaarheidsbehandeling met Intracytoplasmatische Injectie (ICSI)

Aangezien alle patiënten (8) met SCOS opteerden voor een verdere behandeling met donorsperma wordt deze patiëntengroep niet verder beschouwd in dit deel van de studie. In het totaal werden 62 ICSI cycli met testiculair sperma uitgevoerd voor deze studiegroep. Voor 55 cycli (88,7 %) kon een embryotransfer plaats vinden.

De 3 paren van mannen met cryptorchidie hebben 7 ICSI cycli ondergaan waarvan 6 cycli met embryotransfer (85 %). Dit betekent dat in één cyclus geen embryotransfer kon plaatsvinden. 3 paren in de sterilisatiegroep hebben 4 cycli ondergaan waarvan alle 4 met embryotransfer (100 %). Voor mannen met een sterilisatie met gefaald herstel (12 patiënten) zijn 31 cycli uitgevoerd om een mogelijke zwangerschap te bekomen. 29 cycli hiervan (93,5 %) waren met

embryotransfer, dus 2 cycli zonder embryotransfer. Van de groep mannen met extreme OAT hebben 11 paren 20 ICSI cycli ondergaan, waarvan uiteindelijk 16 cycli (80 %) resulteerden in een embryotransfer. Dit betekent dat er 4 cycli zijn geweest waarbij geen embryotransfer heeft plaats gevonden (Figuur 2).

Als conclusie kan hier gesteld worden dat niet bij alle ICSI cycli een embryotransfer heeft plaats gevonden voor de verschillende patiënten. Er is geen significant verschil tussen de 4 groepen betreffende het aantal cycli en het aantal cycli met embryotransfer ($p = 0,4740$).



Figuur 2: Informatie over de cycli (29 patiënten). Er is betreffende het aantal cycli en het aantal cycli met embryo's geen significant verschil tussen de 4 groepen ($p = 0,4740$).

Het gemiddeld aantal eicellen voor alle 4 de patiëntengroepen werd berekend. Zo is het gemiddeld aantal eicellen voor de vrouwelijke partners bij mannen met cryptorchidie 9 en bij gesteriliseerde mannen 8. Bij mannen die een sterilisatie ondergaan hebben met gefaald herstel en bij mannen met extreme OAT bedragen deze gemiddelden respectievelijk 8 en 11. Er is geen significant verschil ($p = 0,3582$) tussen de 4 studiegroepen betreffende het aantal eicellen bekomen voor de ICSI behandeling (Tabel 4).

Tabel 4: Samenvattende tabel embryokwaliteit en zwangerschapskans

	Aantal cycli	^a Gem aantal MII eicellen	^b Aantal en percentage 2PN	^c Aantal en percentage XPN	^d Percentage Grade A + B	^e Gem aantal embryo's / ET	^f Aantal en percentage zwangeren	^g Aantal en percentage Zwangeren / ET	^h Aantal en percentage BTH	ⁱ Aantal en percentage BTH / ET
Crypt (3)	7	9	29/64 (45 %)	14/64 ¹ (22 %)	15/64 (23 %)	1,75	0/3 (0 %)	0/6 ² (0 %)	0/3 (0 %)	0/6 (0 %)
Sterilisatie (3)	4	8	22/33 (67 %)	5/33 (15 %)	20/33 (61 %)	1,5	2/3 (67 %)	1/4 (25 %)	0/3 (0 %)	0/4 (0 %)
Ster + her (12)	31	8	150/240 (63 %)	22/240 (9 %)	83/240 (35 %)	1,65	4/12 (33 %)	4/29 ² (13 %)	3/12 ³ (25 %)	3/29 ⁴ (10 %)
Extreme OAT (11)	16	11	99/214 (46 %)	33/214 (15 %)	61/214 (29 %)	1,2	1/11 (9 %)	1/16 ² (6 %)	0/11 (0 %)	0/16 (0 %)

^a Gem aantal MII eicellen = het gemiddeld aantal metafase II eicellen bekomen per patiënt. ^b Aantal en percentage 2PN, dit is het aantal normaal bevruchte eicellen per aantal metafase II eicellen. ^c Aantal en percentage XPN, dit is het abnormaal bevruchte eicellen per aantal metafase II eicellen. ^d percentage grade A + B zijn de goede kwaliteitembryo's. ^e Het gemiddeld aantal embryo's / ET is het gemiddeld aantal embryo's dat teruggeplaatst wordt per embryotransfer. ^f Het aantal en het percentage zwangerschappen per patiënt. ^g Het aantal en percentage zwangerschappen per cyclus met een embryotransfer. ^h Het aantal en percentage geboortes (BTH = baby take home) per groep. ⁱ Het aantal en percentage BTH/ ET is het aantal geboortes per cyclus met embryotransfer. ¹ Significantieniveau is bereikt, $p = 0,0372$, ² Hier is eveneens het significantie niveau bereikt tussen de 4 patiëntengroepen ($p=0,0281$), er is bovendien een significant verschil tussen sterilisatie met gefaald herstel en cryptorchidie ($p = 0,0097$) en extreme OAT ($p = 0,0369$), ³ Significantieniveau ($p=0,0013$), ⁴ Significantieniveau ($p=0,0031$).

Naast het aantal eicellen is hierin ook het aantal 2PN (het aantal normaal bevruchte eicellen over het aantal metafase II eicellen) weergegeven voor de 4 groepen. Zo zijn bij de vrouwelijke partners van mannen met cryptorchidie 29 eicellen bevrucht op 64 metafase II eicellen (45 %). 14/64 eicellen (22 %) is abnormaal bevrucht in deze groep. Het aantal grade A en grade B embryo's is hier 15/64 (23 %). De partners van de gesteriliseerde mannen hebben 22 normaal bevruchte eicellen op 33 metafase II eicellen (67 %). Vijf eicellen van de 33 (15 %) hebben een abnormale bevruchting en het aantal grade A en grade B embryo's bedraagt hier 22/33 (61 %). 150 eicellen van alle 240 (63 %) metafase II eicellen die gecollecteerd zijn in de groep sterilisatie met gefaald herstel werden normale bevrucht. 5/33 (15 %) heeft een abnormale bevruchttingspatroon en het aantal grade A en grade B embryo's bedraagt hier 83/240 (35 %). In de laatste groep, extreme OAT, werden bij de vrouwelijke partners 99/214 (46 %) normaal bevruchte eicellen bekomen. 33/214 (15 %) hadden een abnormale bevruchting. 29 % (61/214) van de bevruchte eicellen groeide uit tot goede embryo's (grade A + B) (Tabel 4).

Er is geen significant verschil tussen de groepen betreffende het aantal normaal bevruchte eicellen (2PN) op het aantal metafase II eicellen ($p = 0,6737$). Wel is een significant verschil gevonden tussen de 4 groepen voor het aantal abnormaal bevruchte eicellen (XPN) ($p = 0,0372$). Dit komt omdat het aantal XPN hoger ligt in de cryptorchidie groep in verhouding met

de rest van de patiëntengroepen. Voor grade A en grade B embryo's is ook geen significant verschil aanwezig tussen de 4 groepen ($p = 0,5405$) (Tabel 4).

Het gemiddeld aantal embryo's dat terug geplaatst wordt per transfer bij de vrouw is voor mannen met cryptorchidie 1,75, bij gesteriliseerde mannen zijn dit gemiddeld 1,5 embryo's. In de laatste twee groepen, gesteriliseerde mannen met gefaald herstel en mannen met extreme OAT bedraagt het gemiddeld aantal embryo's dat teruggeplaatst wordt per transfer respectievelijk 1,65 en 1,2. Hier is eveneens geen significant verschil tussen de 4 studiegroepen ($p = 0,9148$) (Tabel 4).

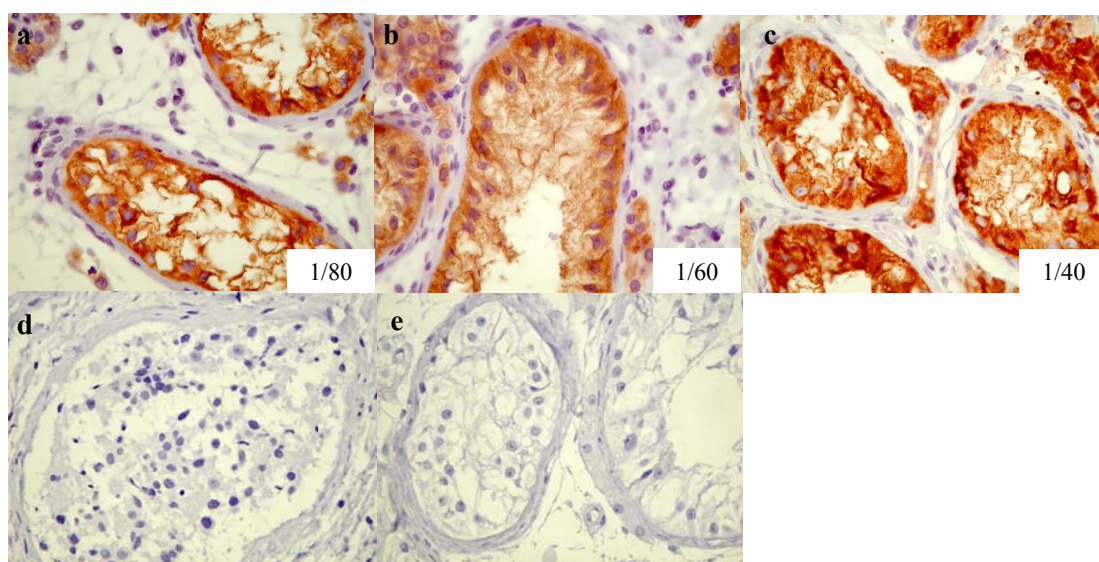
In de groep mannen met cryptorchidie kon geen zwangerschap bekomen worden. In de sterilisatiegroep werden 2 van de 3 patiënten zwanger (4 cycli), deze eindigden allen in een miskraam. In de groep mannen met sterilisatie met gefaald herstel zijn 4/12 (33 %) patiënten zwanger geworden. In het totaal hebben deze paren 31 cycli met embryotransfer ondergaan, in 4 van deze cycli (13 %) is een zwangerschap bekomen. Drie van de 12 paren (25 %) hadden een 'baby thuis'. In de laatste groep patiënten, mannen met extreme OAT, werd 1 patiënte zwanger van de 11 (9 %). Dit is 1 cyclus op 16 met een zwangerschap. Deze zwangerschap resulteerde in een miskraam (Tabel 4).

Wat betreft het aantal zwangerschappen per groep is er geen verschil tussen de 4 patiëntengroepen in deze studie ($p = 0,1949$). Wel is een significant verschil gevonden tussen de groepen bij het aantal zwangerschappen per cyclus met embryotransfer ($p = 0,0281$). Hier zit een significant verschil tussen de groep sterilisatie met gefaald herstel enerzijds en mannen met cryptorchidie en extreme OAT anderzijds. De p-waarden zijn hier respectievelijk 0,0369 en 0,0097 (Tabel 4). Bij de baby thuis-ratio en baby thuis-ratio per cyclus met embryotransfer is een significant verschil gevonden tussen de 4 groepen, de p-waarden zijn respectievelijk 0,0013 en 0,0031. Van de volledige patiëntenpopulatie werden dus enkel gezonde zwangerschappen bekomen bij patiënten die een gefaald herstel na sterilisatie hebben ondergaan (Tabel 4).

3.4 Histologisch onderzoek van inhibine B_α

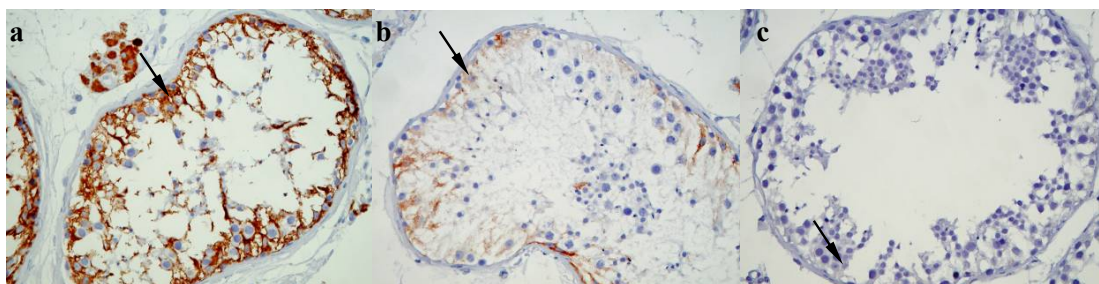
De volgende stap in het onderzoek is het kleuren van testiscoupes via immunohistochemie. Bij deze techniek is het op punt stellen van de immunologische kleuring van uiterst belang omdat het histologisch onderzoek bij de juiste intensiteit moet gebeuren. Deze methode werd voor inhibine B_α op punt gezet met behulp van een testiscoupe met SCOS, van een patiënt onafhankelijk van onze studiegroep. Deze coupe moet positief kleuren voor inhibine B_α en

wordt eveneens als positieve controle bij de kleuringen gebruikt. Om de juiste intensiteit te kunnen bepalen zijn verder 3 coupes van dezelfde testis aangekleurd met drie verschillende verdunningen: 1/80 (Figuur 3a), 1/60 (Figuur 3b) en 1/40 (Figuur 3c). De evaluaties zijn genomen op een vergroting van 400 maal. De beste intensiteit voor het beoordelen van de histologische coupes is 1/80 (Figuur 3a) omdat hier het minste kleuring aanwezig is op de achtergrond en de kleuring in de cellen nog eveneens duidelijk te zien is. Hier is dus het meeste contrast aanwezig tussen de achtergrond en de cellen die moeten aankleuren. Naast positieve controles zijn ook negatieve controles ingezet. De negatieve controles zijn testiscoupes van 2 patiënten uit onze database. Deze zijn ingezet om aan te tonen dat de kleuring niet te wijten is aan een aspecifieke binding van het antilichaam. In Figuur 3d is een negatieve controle te zien met volledige spermatogenese en in Figuur 3e met SCOS.



Figuur 3: De positieve en negatieve controle van inhibine B_α. De Figures 3a tot 3c stellen de positieve controle voor van inhibine B_α (testis van patiënt met SCOS onafhankelijk van de studiepopulatie). Figures 3d en 3e stellen de negatieve controle voor van inhibine B_α en SCF. De figuren zijn gemaakt op vergroting 400 maal.

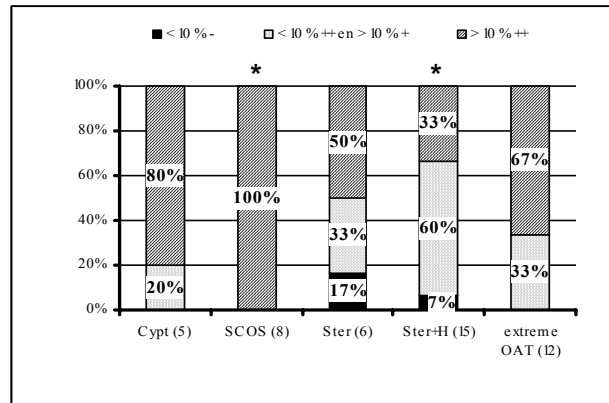
Voor de kwantificatie van de intensiteit van de kleuringen zijn minimaal 100 tubuli geteld per patiënt. Voor 4 patiënten konden maximaal 95 tubuli geteld worden. Eén testiscoupe van een patiënt bezit geen volwaardige seminifere tubuli. Ook waren hier geen Sertoli cellen aanwezig. Deze patiënt bevindt zich in de groep sterilisatie met gefaald herstel. Drie intensiteitsniveaus werden gehanteerd bij de evaluatie van de testiscoupes, volgens de methode van Juijita *et al* (2005).²² Zo kan de kleuring intens (++), matig (+) of negatief zijn (-). In Figures 4a tot 4c worden intensiteitsniveaus voor inhibine B_α getoond op vergroting 400 maal.



Figuur 4: Intensiteit verschil (intens, matige en negatief) tussen coupes van inhibine B α . De Figuren 4a tot 4c stellen respectievelijk de intense, matige en negatieve kleur voor van Inhibine B α op vergroting 400 maal (zie ↘). Deze indeling is gemaakt aan de hand van de methode volgens Juijita *et al* (2005).²²

In Figuur 5 is het expressiepatroon voor inhibine B α weergegeven voor de 5 groepen cryptorchidie (5 patiënten), SCOS (8 patiënten), sterilisatie (6 patiënten), sterilisatie met gefaald herstel (15 patiënten) en extreme OAT (12 patiënten).

In de eerste groep, mannen met cryptorchidie is een volgend expressiepatroon op te merken: 20 % van de tubuli zijn matig gekleurd en 80 % intens. De Sertoli cellen in de tubuli van mannen met SCOS kleuren allemaal intens. Bij gesteriliseerde mannen heeft 17 % een negatieve kleuring voor het cytoplasma van de Sertoli cel, 33 % een matige en 50 % een intense kleuring. In de groep mannen die een sterilisatie met gefaald herstel ondergaan hebben, heeft 7 % een negatieve kleuring, 60 % een matige en 33 % een intense kleuring. In de laatste patiëntengroep (mannen met extreme OAT) is 33 % matig gekleurd en 67 % intens. Samengevat kan men stellen dat bij SCOS enkel intens gekleurde Sertoli cellen in de tubuli aanwezig zijn. Bij sterilisatie met gefaald herstel is 60 % van de tubuli matig aangekleurd. Alle andere indicaties hadden een wisselende expressie van inhibine B α . Opvallend is wel dat bij sterilisatie en sterilisatie met gefaald herstel er ook tubuli zijn zonder enige expressie van inhibine B α . Er is een significant verschil tussen het expressiepatroon van SCOS en de andere 4 groepen, zo ook voor sterilisatie met gefaald herstel ($p < 0,001$).



Figuur 5: Het inhibine B_a expressiepatroon. In deze Figuur is het expressiepatroon van inhibine B_a per indicatie (cryptorchidie, SCOS, sterilisatie, sterilisatie met gefaald herstel en extreme OAT) gevisualiseerd. Er zijn 100 tubuli per patiënt geteld. Uitgezonderd voor 4 patiënten voor welke maximaal 95 tubuli geteld werden omdat het biopt te klein was. De indeling in de drie soorten expressiepatronen (< 10 % +, < 10 % ++ en > 10 % +, > 10 % ++) is gebeurd volgens de methode van Fujita et al (2005). * Er is bij deze twee een afwijkend expressiepatroon te zien ten opzichte van de andere groepen (p < 0.001)

Naast het expressiepatroon van inhibine B_a in de Sertoli cel per tubulus is onderzocht hoeveel Sertoli cellen per tubulus gemiddeld aanwezig zijn per patiëntengroep (Tabel 5a). Er zijn telkens per patiënt 100 tubuli bekeken. Bij 4 patiënten is het biopt niet voldoende groot. Het maximum aantal tubuli dat hier geteld konden worden was 95. Bovendien heeft 1 patiënt in de groep sterilisatie met gefaald herstel geen volwaardige tubuli en konden hier geen Sertoli cellen gedetecteerd worden.

Tabel 5: Het gemiddeld aantal Sertoli cellen per tubulus aanwezig bij inhibine B

	Gemiddeld aantal Sertoli cellen per tubulus		Gemiddeld aantal positieve Sertoli cellen per tubulus	
Cryptorchidie (5p)	19	(1-122)	19	(1-122)
SCOS (8p)	24*	(1-141)	24*	(1-141)
Ster (6p)	21	(2-132)	17	(0-132)
Ster+Her (15p)	22	(1-130)	21	(0-130)
Extreme OAT (12p)	20	(0-133)	19	(0-133)

Voor alle 5 de indicaties (cryptorchidie, SCOS, sterilisatie en sterilisatie met gefaald herstel en extreme OAT) is het gemiddeld aantal Sertoli cellen berekend. Hierbij zijn 100 tubuli per patiënt geteld, vervolgens is er een gemiddelde gemaakt per patiënt van het aantal Sertoli cellen en daarna per indicatie. * Er zijn significant meer Sertoli cellen aanwezig bij mannen met SCOS (p < 0,0001) in deze studiepopulatie (47 mannen).

Mannen met cryptorchidie hebben gemiddeld 19 Sertoli cellen per tubulus met een spreiding van 1 tot 122 Sertoli cellen per tubulus. Bij mannen met SCOS is de gemiddelde waarde van het aantal Sertoli cellen per tubulus 24. De minimumwaarde in deze patiëntengroep is 1 en de maximumwaarde 141 Sertoli cellen per tubulus (Tabel 5).

Mannen die een sterilisatie of sterilisatie met gefaald herstel hebben ondergaan, bezitten een gemiddeld aantal Sertoli cellen per tubulus van respectievelijk 21 en 22. Het minimum aantal Sertoli cellen in de groep mannen die gesteriliseerd zijn bedraagt hier 2, het maximum aantal 132. De laatste patiëntengroep (mannen met extreme OAT) heeft gemiddeld 20 Sertoli cellen per tubulus (minimaal 0 en maximaal 133) (Tabel 5).

De patiëntengroep met SCOS heeft gemiddeld het meest aantal Sertoli cellen in hun tubuli ($p < 0,0001$).

Wanneer gekeken wordt naar het gemiddeld aantal Sertoli cellen met een positieve expressie voor inhibine B_{α} in de 5 patiëntengroepen, dan heeft cryptorchidie gemiddeld 19 positieve Sertoli cellen per tubulus met een minimum aantal van 1 en een maximum aantal van 122 Sertoli cellen per tubulus. Zo is dit aantal voor SCOS 24 (spreiding van 1 tot 141). Bij gesteriliseerde mannen bedraagt deze hoeveelheid 17 met een spreiding van 0 tot 132. Mannen die een sterilisatie met gefaald herstel hebben ondergaan, bezitten een gemiddeld aantal van 21 (met minimum waarde 0 en maximum waarde 130). Mannen met extreme OAT hebben gemiddeld 19 Sertoli cellen in een tubulus zitten (0 tot 133) (Tabel 5). Hier zijn het meest aantal positieve Sertoli cellen aanwezig in de tubuli bij de groep mannen met SCOS ($p < 0,0001$).

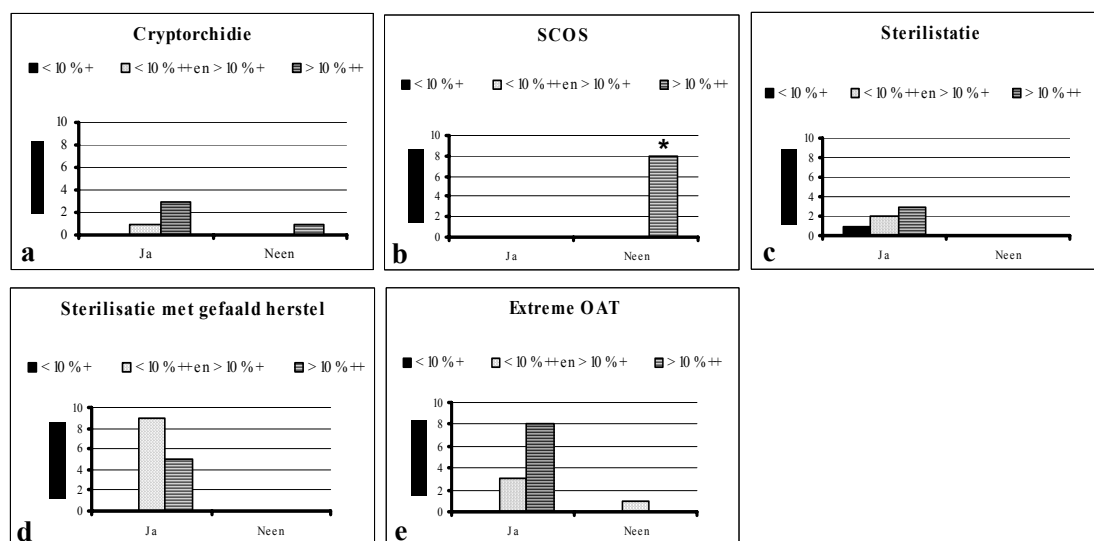
In het laatste onderdeel van de histologische studie op inhibine B_{α} is de relatie tussen de aan – en afwezigheid van spermatozoa in het testiculaire biopt en de expressie van inhibine B_{α} weergegeven. Afwezigheid van spermatozoa wilt zeggen dat in het verse biopt geen spermatozoa gezien zijn, aanwezigheid wilt zeggen dat in het verse biopt wel mature spermatozoa aangetroffen zijn.

In Figuur 6 is de aanwezigheid van de spermatozoa weergegeven voor inhibine B_{α} . Er is per patiëntengroep (cryptorchidie, SCOS, Sterilisatie, sterilisatie met gefaald herstel en extreme OAT) het aantal patiënten weergegeven met aan – en afwezigheid van spermatozoa in hun testiculair biopt, rekening houdend met het expressiepatroon (negatief, matige, intens).

In Figuur 6a is de aan – en afwezigheid van spermatozoa in het testiculair biopt weergegeven voor mannen met cryptorchidie, rekening houden met het expressiepatroon. 1 op 5 patiënten heeft geen spermatozoa in het testiculair biopt. Het biopt kleurde hier intens voor inhibine B_{α} .

De overige patiënten hebben wel spermatozoa in hun testiculair biopt. 1 biopt kleurde hierbij matig en de andere intens. Bij mannen met SCOS zijn geen spermatozoa in het testiculair biopt aangetroffen (zoals reeds eerder vermeld). De Sertoli cel kleurde telkens intens in deze groep (Figuur 6b). In Figuur 6c (gesteriliseerde mannen) zijn bij iedere patiënt spermatozoa aangetroffen in het testiculair biopt. De Sertoli cellen van 1 patiënt kleuren negatief, bij 2 patiënten matig en bij 3 patiënten intens voor inhibine B_a. In Figuur 6d, gesteriliseerde mannen met gefaald herstel, zijn ook in alle biopten spermatozoa gezien. Hier kleuren de Sertoli cellen van 9 patiënten matig, van 5 intens. Bij mannen met extreme OAT (Figuur 6e) heeft 1 patiënt geen spermatozoa in zijn testiculair biopt, bij de overige patiënten (11) zijn wel spermatozoa gevonden. Bij 3 patiënten hiervan is een matige kleuring van het biopt te zien voor de Sertoli cel, de anderen hadden een intense kleuring.

De beperkte aantallen patiënten in deze studie laten het niet toe correct vast te stellen of er een relatie bestaat tussen de expressie van inhibine B_a en de aan –of afwezigheid van spermatozoa (ondanks een statistische significantie met $p = 0,0436$). Enkel voor SCOS is een significant verschil gevonden, afwezigheid van spermatozoa geeft hier een intense kleuring aan van inhibine B_a.

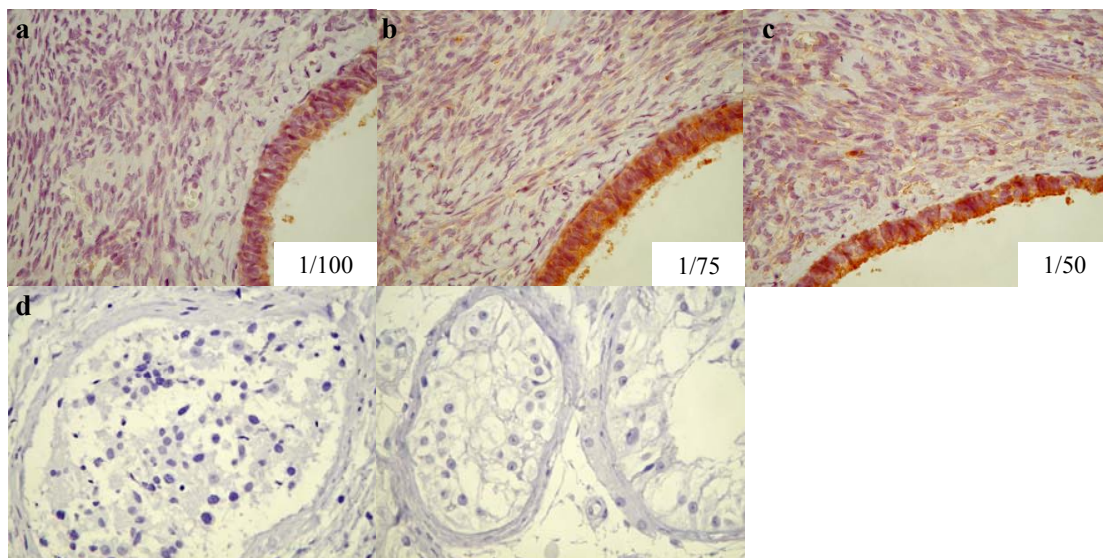


Figuur 6: De relatie tussen aanwezigheid van spermatozoa in het testiculair biopt en de inhibine B_a expressie. Naast de aan –en afwezigheid van spermatozoa is hier ook rekening gehouden met de intensiteit van aankleuring van inhibine B_a bij cryptorchidie (a), SCOS (b), sterilisatie (c), sterilisatie met gefaald herstel (d) en extreme OAT (e). De indeling in de drie soorten expressiepatronen (< 10%+, < 10%++ en > 10%++) is gebeurd volgens de methode van Fujita et al (2005). Ja = de aanwezigheid van spermatozoa in het testiculair biopt, neen = geen aanwezigheid van spermatozoa in het testiculair biopt. *Significantie is bereikt ($p = 0,0436$).

3.5 Histologisch onderzoek van Stam cel factor

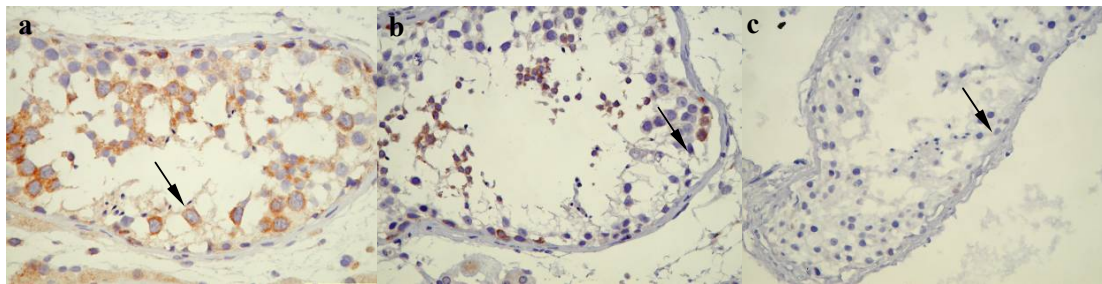
De positieve controle die hier gebruikt is voor het op punt stellen van de juiste verdunning van SCF in ovariumepitheel. Het epitheel moet hierbij positief aankleuren voor SCF.³² De verdunningen die hierbij gebruikt zijn op drie verschillende coupes van hetzelfde ovarium zijn achtereenvolgens 1/100 (Figuur 7a), 1/75 (Figuur 7b) en 1/50 (Figuur 7c). De verdunning 1/75 geeft de beste intensiteit weer bij histologische studie (Figuur 7b).

Naast positieve controles zijn ook negatieve controles ingezet. Deze zijn testiscoupes van 2 patiënten uit onze database en zijn ingezet om aan te tonen dat de kleuring niet te wijten is aan een aspecifieke binding van het antilichaam. In Figuur 7d is een negatieve controle te zien met volledige spermatogenese en in Figuur 7e met SCOS.



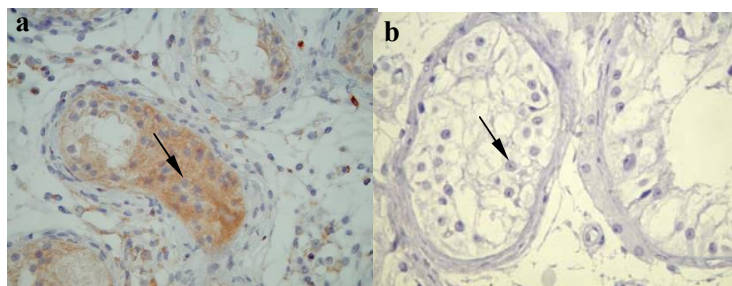
Figuur 7: De positieve en negatieve controle van SCF. De Figuren 7a tot 7c stellen de positieve controle voor van SCF (ovariumepitheel). Figuren 7d en 7e stellen de negatieve controle voor van SCF. De figuren zijn gemaakt op vergroting 400 maal.

Voor de kwantificatie van de intensiteit van de kleuringen zijn eveneens maximaal 100 tubuli bekeken met uitzondering van 4 patiënten, waarbij maximaal 95 tubuli geteld werden. De reden hiervoor is dat de biopten te klein zijn. 1 patiënt in de groep sterilisatie met gefaald herstel heeft geen volwaardige tubuli. De drie intensiteitsniveaus volgens Fujita *et al* (2005) worden zoals bij inhibine B_a ook hier als methode gebruikt. In Figuren 8a tot 8c worden de intensiteiten voor SCF gedefinieerd. Bij coupes gekleurd voor SCF is gekeken in welke celtypen dit proteïne tot expressie komt, hiernaast is ook rekening gehouden met de intensiteit van de kleuring. Ook hier is een verschil te zien tussen intense, matige of negatieve kleuring op vergroting 400 maal (Figuur 8).



Figuur 8: Intensiteit verschil (intens, matige en negatief) tussen coupes van SCF. De figuren 8a tot 8c stellen respectievelijk de intense, matige en negatieve kleur voor van SCF bij vergroting 400 maal (zie ). Deze indeling is gemaakt aan de hand van de methode volgens Juijita *et al* (2005).²²

Tijdens de histologische studie is bij SCF niet enkel kleuring van de verschillende germinatieve celtypen (spermatogonia, spermatocyten en spermatiden) opgemerkt maar ook de Sertoli cel (SC) vertoonde SCF expressie (Figuur 9a en 9b).



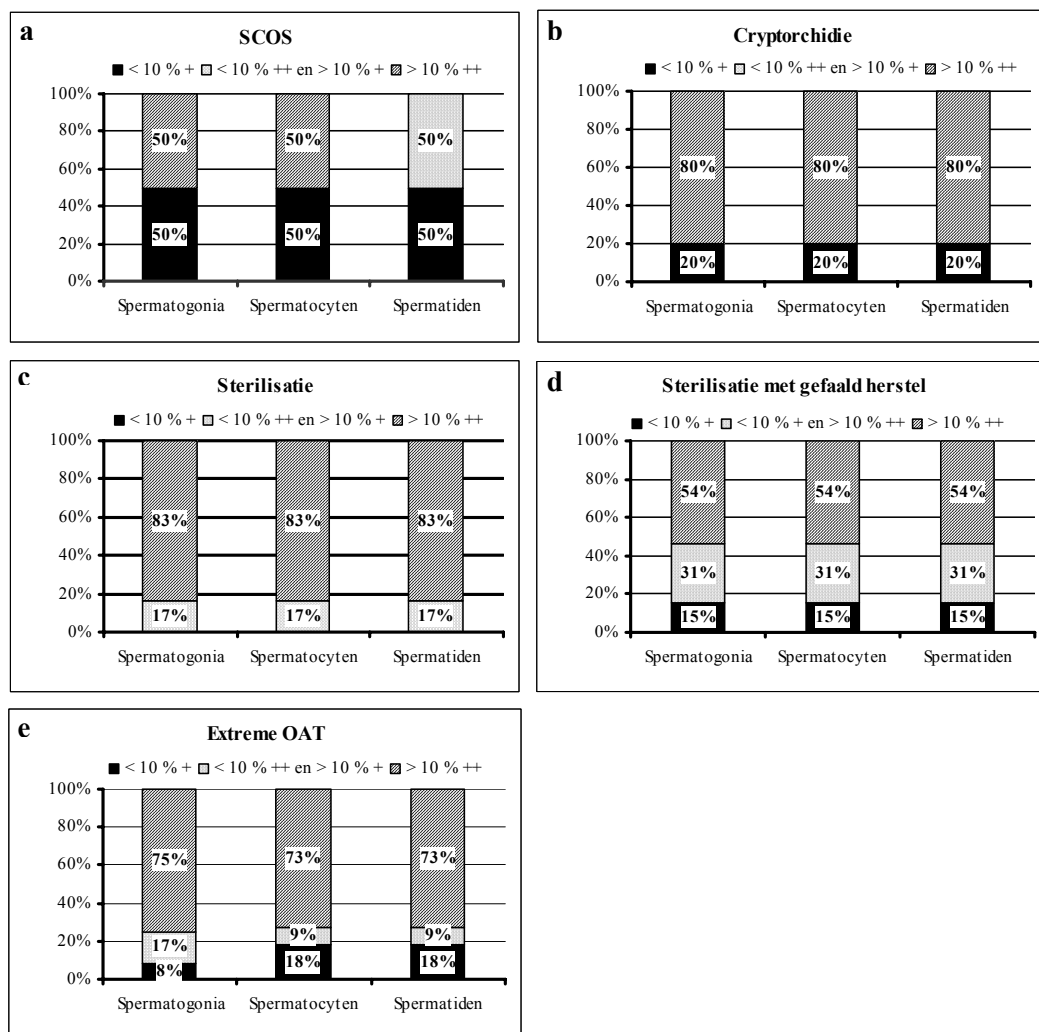
Figuur 9: De positieve kleuring van de Sertoli cel bij SCF kleuring. In Figuur 9a kan gezien worden dat de Sertoli cel positief kleurt voor SCF, als hierlangs de negatieve controle (9b) geplaatst wordt. De gebruikte vergroting is hier 400 maal.

In Figuur 10 is het expressiepatroon van SCF voor alle 5 de groepen weergegeven per celtype. Het expressiepatroon van SCF voor mannen met cryptorchidie is gevisualiseerd voor 3 celtypen: spermatogonia, spermatocyten en spermatiden. In 20 % van alle tubuli geven de spermatogonia, spermatocyten en spermatiden een negatieve kleuring voor SCF en 80 % van de tubuli (voor alle drie de celtypen) zijn intens gekleurd (Figuur 10a). Bij mannen met SCOS, waarbij enkel in 2 patiënten germinatieve celtypen gevonden zijn, geven de spermatogonia en de spermatocyten voor één helft een negatieve kleuring en de andere helft een intense kleuring aan voor SCF. De spermatiden kleuren hier in 50 % van de tubuli voor SCF negatief de andere helft kleurt matig (Figuur 10b). In de groep waarbij de mannen gesteriliseerd zijn, zijn alle drie de celtypen voor 17 % matig aangekleurd voor SCF en voor 83 % intens (Figuur 10c).

Bij mannen die een sterilisatie ondergaan hebben met gefaald herstel, is in 15 % van de tubuli voor alle drie de celtypen geen expressie van SCF. 31 % is matig gekleurd voor SCF en 54 %

intens (Figuur 10d). De spermatogonia kleuren in 8 % van de tubuli negatief voor SCF, 17 % kleurt matig en het andere deel (75 %) kleurt intens. De andere twee celtypen (spermatocyten en spermatiden) kleuren in 18 % van de tubuli negatief, in 9 % matig en in 73 % intens.

Samenvattend kan hier gesteld worden dat voor de 5 patiëntengroepen geen significant verschil aanwezig is tussen het expressiepatronen in de drie germinatieve celtypen (spermatogonia ($p = 0,6780$), spermatocyten ($p = 0,6611$) en spermatiden ($p = 0,3636$)): een wisselend expressieniveau voor SCF wordt waargenomen voor alle celtypen bij alle typen indicaties. 50 % van de 3 germinale celtypen bij SCOS hadden een zeer laag expressieniveau voor SCF.



Figuur 10: Het Stam cel factor expressiepatroon per celtype voor de 5 patiëntengroepen. Het expressiepatroon van SCF bij mannen met cryptorchidie (a), SCOS (b), sterilisatie (c), sterilisatie met gefaald herstel (d) en extreme OAT (e) van de drie verschillende germinatieve celtypen (spermatogonia, spermatocyten en spermatiden). De indeling in de drie soorten expressiepatronen (< 10 % +, < 10 % ++ en > 10 % +, > 10 % ++) is gebeurd volgens de methode van Fujita et al(2005). Het significantieniveau is hier niet bereikt. Significantieniveau is niet bereikt: spermatogonia ($p = 0,6780$), spermatocyten ($p = 0,6611$) en spermatiden ($p = 0,3636$).

Opmerking: De groep SCOS telt hier slechts 2 patiënten.

Naast het expressiepatroon van SCF per celtipe per patiëntengroep is ook gekeken naar de positiviteit van de Sertoli cel. Hierbij is een onderscheid gemaakt tussen cytoplasmatische positiviteit en membraanre positiviteit van de cel. Hier zijn telkens, zoals bij inhibine B_a, 100 tubuli bekeken per patiënt. Ook zijn bij hetzelfde aantal patiënten niet alle tubuli geteld. De maximum waarde is eveneens 95.

In de patiëntengroep met cryptorchidie is het cytoplasma van de Sertoli cel in gemiddeld 53 van de 100 tubuli positief gekleurd voor SCF. De minimum en maximum waarden liggen in deze groep tussen 0 en 99. Het membraan is in 13 van de 100 tubuli positief voor SCF (minimum 0 en maximum 64). Wanneer de positiviteit van het cytoplasma in de tubuli van de mannen met SCOS bekeken wordt, dan zijn deze Sertoli cellen in 86 van de 100 tubuli positief aangekleurd voor SCF. De minimumwaarde is hierbij 0 de maximumwaarde 100. In 48 % van de tubuli kleurt het membraan van de Sertoli cel positief voor SCF (0 tot 100) (Tabel 6).

Tabel 6: Gemiddeld aantal tubuli die positieve kleuren voor Sertoli cellen voor SCF

	Cytoplasma positief	Membraan positief
Cryptorchidie (5)	53 (0-99)	13 (0-64)
SCOS (8)	86* (0-100)	48* (0-100)
Ster (6)	52 (0-100)	2* (0-10)
Ster+Her (14)	34* (0-100)	14 (0-100)
Extreme OAT (12)	70 (6-100)	17 (0-99)

Voor alle 5 de indicaties is het gemiddeld aantal Sertoli cellen die positief kleuren in cytoplasma of aan het celmembraan voorgesteld. Hierbij zijn 100 tubuli per patiënt geteld, vervolgens is er een gemiddelde gemaakt per patiënt van het aantal Sertoli cellen en daarna per indicatie.

Voor 4 patiënten konden slechts maximaal 95 tubuli geteld worden. 1 patiënt bezat geen volwaardige seminifere tubuli, er zijn hier geen Sertoli cellen aanwezig. Deze patiënt bevindt zich in de groep sterilisatie met gefaald herstel. *Significantie is bereikt ($p < 0,0001$).

SCF komt in 52 van de 100 tubuli tot expressie in het cytoplasma van de Sertoli cellen bij mannen die gesteriliseerd zijn (minimum 0 en maximaal 100). Het celmembraan van de Sertoli cel is in 2 % van de tubuli positief bevonden voor SCF (minimum 0 en maximaal 10). Bij mannen die een sterilisatie met gefaald herstel ondergaan hebben, is het gemiddeld aantal tubuli waarbij de Sertoli cellen cytoplasmatisch positief kleuren voor SCF 34 (minimum 0 en maximum 100). Het celmembraan is hier gemiddeld in 14 tubuli positief. In deze patiëntengroep komt een spreiding voor van 0 tot 100. Bij mannen met een extreme OAT bezitten 34 op 100 tubuli een cytoplasmatisch positieve aankleuring in de Sertoli cel voor

SCF. De minimumwaarde is 0 en de maximumwaarde 100. Het celmembraan van de Sertoli cel is in 14 op 100 tubuli positief bevonden (minimum 0 en maximum 100).

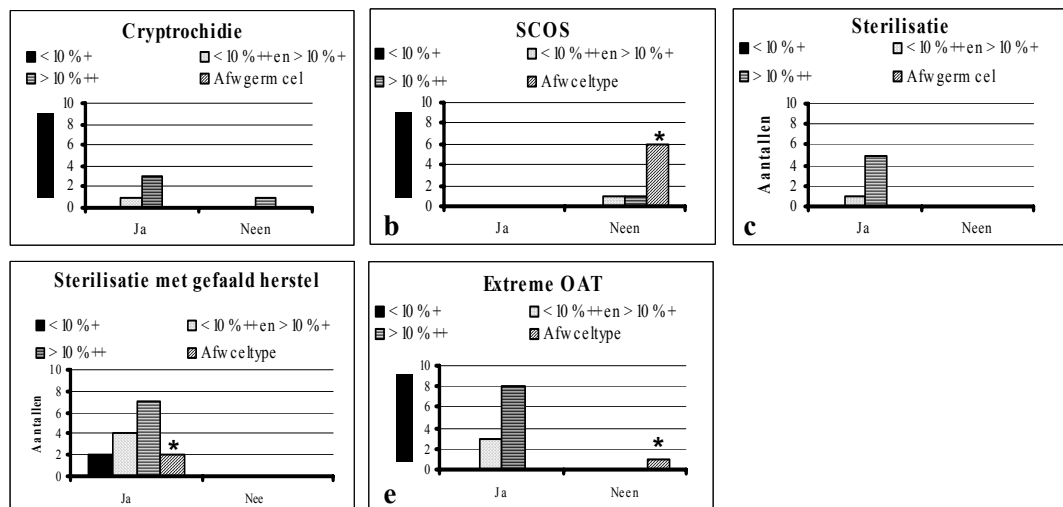
Er is een significant verschil tussen de 5 patiëntengroepen betreffende het aantal tubuli die positief kleuren voor de Sertoli cellen in zowel het cytoplasma als in het membraan ($p < 0,0001$).

De expressie van SCF in het cytoplasma van de Sertoli cel is het laagst bij mannen die sterilisatie met gefaald herstel hebben ondergaan. Het celmembraan is het minst aangekleurd voor SCF in de groep mannen met een sterilisatie. Bij de patiënten met SCOS vertoont SCF het hoogste expressiepatroon in de Sertoli cel (zowel cytoplasma als celwand).

In Figuur 11 is de aan –en afwezigheid van spermatozoa te zien in alle 5 de patiëntengroepen, rekening houdend met de intensiteit waarmee SCF tot expressie komt in de tubuli. De drie celtypen zijn hier samen bekeken. Afwezigheid van spermatozoa wil hier, zoals bij inhibine B_a, zeggen dat in het verse biopt geen spermatozoa gezien zijn, aanwezigheid wilt zeggen dat in het verse biopt wel spermatozoa aangetroffen zijn.

In Figuur 11a kan gezien worden dat 3 patiënten met cryptorchidie spermatozoa hebben in hun biopt. 1 biopt hiervan kleurt matig voor SCF, de andere 3 intens. Bij mannen met SCOS (Figuur 11b) werd geen sperma gevonden in de biopten. Doch is er een intensiteitsverschil, 1 biopt kleurt matige en 1 biopt kleurt intens. In de andere 6 biopten zijn geen germinatieve celtypen aanwezig. De gesteriliseerde mannen (6) hebben allemaal spermatozoa in hun biopt, 1 biopt kleurt matig, de andere 5 intens voor SCF. Wanneer gekeken wordt naar de aan –en afwezigheid van spermatozoa in figuur 11d (gesteriliseerde mannen met gefaald herstel), dan kan hier ook vastgesteld worden dat in elk biopt spermatozoa aanwezig zijn, enkel de intensiteit verschilt. Er zijn 2 patiënten waarbij de SCF kleuring negatief is in alle drie de germinatieve celtypen, 4 patiënten hebben een matige aankleuring, 7 patiënten een intense en 2 hebben geen germinatieve celtypen in het biopt.

Als conclusie kan gesteld worden dat de meeste patiënten met afwezigheid van mature spermatozoa in de groep zitten waarbij een afwezigheid is van de germinale celtypen ($p = 0,0012$). De patiënten waarbij wel spermatozoa gevonden zijn bevinden zich vooral in groep C.



Figuur 11: De relatie tussen de aanwezigheid van spermatozoa in het testiculair biopt bij SCF expressie (in germinale cellen) bekomen door een testiculaire sperma extractie. Naast de aan – en afwezigheid van spermatozoa is hier ook rekening gehouden met de intensiteit van aankleuring van SCF in de verschillende patiëntengroepen, cryptorchidie (a), SCOS (b), sterilisatie (c), sterilisatie met gefaald herstel (d) en extreme OAT (e). De indeling in de drie soorten expressiepatronen (< 10 %+, < 10 %++ en > 10 %+, > 10 %++) is gebeurd volgens de methode van Fujita et al (2005). * Het significantieniveau is bereikt (p = 0,0012).

In Tabel 7 zijn alle resultaten met hun significantieniveaus in het kort samengevat betreffende de patiëntengroep, de ICSI cyclus, het expressiepatroon van inhibine B_a en SCF.

Tabel 7: Samenvatting van de resultaten

Patiënten groep		
Vrouwelijke pathologie	Geen verschil tussen studiegroepen	p = 0,1988
Leeftijd vrouw	Geen verschil	p = 0,2562
Leeftijd man	Significant verschil: - sterilisatie met herstel = hoger - cryptorchidie = lager	p = 0,0016*
Sperma gevonden in TESE	SCOS geen sperma	p < 0,0001*
Keuze donorsperma	SCOS alle patiënten	p < 0,0001*
ICSI cyclus		
Aantal cycli	Geen verschil tussen de groepen	p = 0,4740
Gemiddeld aantal eicellen	Geen verschil tussen de groepen	p = 0,3582
Aantal 2PN	Geen verschil tussen de groepen	p = 0,6737
Aantal XPN	Hoogste bij cryptorchidie	p = 0,0372*
Aantal grade A + Grade B	Geen verschil tussen de studiegroepen	p = 0,5405
Zwangerschappen per patiënt	Geen verschil tussen de studiegroepen	p = 0,1949
Zwangerschappen / ET	Bij sterilisatie met gefaald herstel meeste zwangerschappen	p = 0,0281*
Baby thuis-ratio	Enkel de groep sterilisatie met gefaald herstel heeft geboortes	p = 0,0013*
Baby thuis-ratio / ET	Enkel geboortes bij sterilisatie met gefaald herstel	p = 0,0031*
Expressiepatroon inhibine B_a		
Expressiepatroon inhibine B _a	100 % intens voor SCOS	p < 0.001*
Inhibine B _a expressie in Sertoli cellen	SCOS: - meeste aantal Sertoli cellen - hoogst aantal cellen met expressie	p < 0.0001*
Expressiepatroon en aan -of afwezigheid sperma	Meer kleuring in groep C wanneer er geen sperma in zit → SCOS Wanneer er sperma in zit, zitten ze vooral in groepen B en C	p = 0.0346*
Expressiepatroon SCF		
Expressiepatroon SCF	Vergelijkend expressiepatroon voor de drie verschillende germinatieve celtypen (spermatogonia, spermatocyten, spermatiden) over de 5 patiëntengroepen.	Spermatogonia: p = 0,6780 Spermatocyten p = 0,6611 Spermatiden p = 0,3636
Positief cytoplasma Sertoli cel bij SCF	Meest aantal Sertoli cellen positief in het cytoplasma bij SCOS Sterilisatie met gefaald herstel het minst	p < 0.0001*
Positief celmembraan bij Sertoli cel bij SCF	Meest aantal Sertoli cellen positief in het celmembraan bij SCOS Sterilisatie het minst	p < 0.0001*
Expressiepatroon en aan -of afwezigheid sperma	Afwezigheid van sperma zit vooral in de groep waarbij de celtypen afwezig zijn (geen sperma = afwezigheid van germinatieve celtypen). Wel sperma zitten vooral in de intense groep (groep C)	p = 0,0012*

* Significantie is bereikt

4 Discussie

Inhibine B is biologisch de meest actieve vorm van de inhibine-familie en bovendien als enige detecteerbaar in het serum.¹⁵⁻¹⁷ Inhibine B bestaat uit twee subunits (α en een β_B subunit) covalent gebonden aan elkaar. Bij een concentratiestijging van inhibine B ontstaat een daling van de FSH concentratie ter hoogte van de hypothalamus, hypofyse en later ook ter hoogte van de testis.^{15,21} Inhibine B $_{\alpha}$ zorgt dus voor de negatieve feedback naar de testis tijdens de spermatogenese. De α -subunit wordt geproduceerd en gesynthetiseerd door de Sertoli cellen. De β_B -subunit staat onder controle van de voorlopercellen van de spermacel, vooral van de spermatocyten en vroege spermatiden. Wanneer deze voorlopercellen afwezig zijn, is er geen β_B -subunit aanwezig en kan vervolgens geen inhibine B aangemaakt worden.^{18,22} Hieruit volgt dat inhibine B een goede marker kan zijn voor de spermatogenese en ook een voorspeller kan zijn of er sperma in een TESE aanwezig zal zijn of niet.^{22,25,26}

Sertoli cellen produceren en synthetiseren naast inhibine B en andere factoren ook SCF. Dit proteïne staat in voor proliferatie, differentiatie en overleving van voorloper spermacellen tijdens de spermatogenese. Het kan bovendien in 2 vormen voor komen in een oplosbare en membraanvrije vorm. Dit ontstaat door alternatieve *splicing* van exon 6.^{27,28}

Naast inhibine B kan SCF ook een belangrijke rol spelen in het spermatogonisch proces. Dit omdat de concentratie van SCF significant gecorreleerd is met de hoeveelheid spermacellen.²⁸ Naast een spermatogonische marker kan SCF ook een voorspellende waarde geven door het terugvinden van sperma bij een TESE. Een hoge SCF intensiteit en een lage GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) geven een hogere succesratio voor het terugvinden van spermatozoa in de TESE bij azoosperme patiënten.²²

Het doel van deze studie is om de expressie van SCF en inhibine B $_{\alpha}$ na te gaan in testiculair weefsel van mannen die lijden aan cryptorchidie, SCOS, sterilisatie, een gefaald herstel na sterilisatie of extreme OAT. Tevens werd gezocht of een verband bestaat tussen het expressiepatroon van beide proteïnes in het testiculaire weefsel en leeftijd, spermakwaliteit, eikelkwaliteit en zwangerschapskansen.

Vooreerst werd een wisselend expressiepatroon waargenomen voor alle 5 de patiëntengroepen. In deze studie kan aangetoond worden dat de expressie van inhibine B $_{\alpha}$ in Sertoli cellen bij SCOS hoger ligt ten opzichte van al de andere pathologieën (cryptorchidie, SCOS, sterilisatie, sterilisatie met herstel en extreme OAT) die hier bestudeerd werden. Deze hogere expressie van inhibine B $_{\alpha}$ bij SCOS is ook teruggevonden in de studie van Fujisawa *et al* (2004) en Fujita *et al* (2005).^{33,22} Hiernaast hebben Bergh *et al* (1990) en Marchetti *et al*

(2003) in hun studies gezien dat de inhibine B_{α} expressie hoger ligt bij SCOS dan bij mannen met normale spermatogenese.^{34,35}

In geen enkel testiculair biopt van de SCOS patiënten kunnen mature spermatozoa gevonden worden, daar bij Fujita *et al* (2005) bij 50 % van de SCOS patiënten toch nog spermatozoa aanwezig waren.²² De reden hiervoor is dat bij het vooronderzoek in het ZOL van de azoösperme patiënt meer parameters worden bestudeerd voor het bepalen voor al dan niet SCOS. Een patiënt heeft enkel SCOS wanneer zijn FSH te hoog is en serum inhibine te laag is. Zo ook mag de patiënt geen obstructieve azoöspermie hebben en moet het volume van de testis klein zijn. Noch mogen spermatozoa gevonden zijn in de TESE en moet een bevestiging komen na een anatoompathologisch onderzoek in het testis biopt van afwezigheid van spermatozoa. Vooral deze laatste twee onderzoeken zijn bepalend. Wanneer toch spermatozoa gevonden worden bij het anatoompathologisch onderzoek, wordt de pathologie eerder als focale of microspermatogenese benoemd.

Het voorkomen van de verschillende expressieniveaus (intens, matige en negatief) van inhibine B_{α} gevonden bij de 4 patiëntengroepen kan mogelijk verklaard worden door een actieve spermatogenese, weliswaar beperkt, waar inhibine B_{α} actief zijn rol speelt in het spermatogenisch proces, dit door hormonale controle uit te oefenen op de spermatogenese. Een voorspellende waarde in deze studie kon echter niet aangetoond worden tussen de inhibine B_{α} expressie en het vinden van spermatozoa, omdat het aantal patiënten jammer genoeg te beperkt is om een correcte statistische analyse uit te voeren.

Deze studie is uniek omdat het de eerste maal is dat de expressie van inhibine B_{α} aangetoond kon worden bij patiënten met cryptorchidie, sterilisatie en sterilisatie met gefaald herstel. Hiernaast is dit ook één van de weinige studies waar inhibine B_{α} in testiculaire biopten werd onderzocht. In de meeste studies is gewerkt met serum inhibine B_{α} (Andersson *et al* (2001)) , (Pierik *et al* (2006)).^{15,16} Een relatie tussen deze twee kon tot op heden niet aangetoond worden (Fujita *et al* (2005)).²²

Bij SCF is de expressie nagegaan in de drie germinatieve celtypen (spermatogonia, spermatocyten en spermatiden) voor de 5 verschillende patiëntengroepen. SCF kwam in alle germinatieve celtypen tot expressie in alle groepen (cryptorchidie, SCOS, sterilisatie, sterilisatie met gefaald herstel en extreme OAT). Voor SCOS zijn er verschillende intensiteiten (intens, matige, negatief) aangetoond en dit bevestigt de resultaten van Fujita *et al* (2005).²²

Het unieke aan deze studie is niet alleen dat de bevindingen gedaan zijn bij SCOS patiënten maar ook bij de andere 4 studiegroepen (cryptorchidie, sterilisatie, sterilisatie met gefaald

herstel en extreme OAT). Bovendien is hier ook gewerkt op het expressieniveau in testiculaire biopten, wat naast de studie van Fujita *et al* (2005) nog geen enkele studie heeft aangetoond.²² Wat SCF expressie bij SCOS betreft, blijkt dat SCF vooral te vinden is in het cytoplasma van de Sertoli cel, zoals eerder beschreven: één van de vele functies toegewezen aan Sertoli cellen is het secreteren van stoffen nodig voor de spermatogenese, zoals inhibine B en *androgen binding protein* (ABP). Naast deze substanties secreteren Sertoli cellen ook stam cel factor (SCF).

Mogelijk is de intense expressie in het cytoplasma bij SCOS te wijten aan een ophoping van de membraanvrije vorm van SCF. In deze pathologie (SCOS) zijn geen germinatieve celtypen (spermatogonia, spermatocyten en spermatiden) aanwezig. De normale functie van SCF is immers de proliferatie en differentiatie van deze celtypen en deze laatste cellen zijn niet aanwezig in deze pathologie. De hoge SCF expressie bij Sertoli cellen in het celmembraan (bij SCOS) kan mogelijk verklaard worden door de opstapeling van de membraanvrije vorm van SCF. Zoals eerder vermeld kan SCF in twee vormen voorkomen als gevolg van alternatieve *splicing* van exon 6. Wanneer deze geknipt wordt door proteasen, dan ontstaat er de oplosbare vorm van SCF, anders blijft de membraangeassocieerde vorm bestaan. Doch kan geen rechtstreeks verband aangetoond worden tussen het vinden van spermatozoa en SCF expressie aangezien de patiëntenpopulatie in deze studie te klein is om een correcte interpretatie te kunnen geven.

Eveneens uniek in deze studie is het zoeken naar een mogelijk verband tussen SCF en inhibine B_α expressie en het resultaat van de fertiliteitbehandeling (ICSI) met mature spermatozoa uit de testis van de 4 patiëntengroepen (cryptorchidie, sterilisatie, sterilisatie met gefaald herstel en extreme OAT). Voor de 4 studiegroepen waar spermatozoa gevonden zijn, moet vastgesteld worden dat geen correlatie kon aangetoond worden tussen de expressie van inhibine B_α en SCF en het bevruchtend vermogen en het ondersteunen van de embryonale ontwikkeling. Algemeen gesteld resulteerde de fertiliteitbehandeling voor de verschillende patiënten in een zeer kleine slagingskans (baby thuis). De enige studiegroep die een “baby thuis” heeft, is de groep mannen die een sterilisatie met gefaald herstel ondergaan hebben. Bij deze mannen werd nochtans een significant hogere leeftijd gevonden ten opzichte van de andere studiegroepen. Alhoewel de leeftijd van mannen hoger is bij sterilisatie met gefaald herstel, is dit de enige studiegroep die een baby-thuis ratio heeft. Dit toont mogelijk aan dat de kwaliteit van de spermatozoa niet afhankelijk is van de leeftijd. Doch is de baby thuis-ratio nog steeds laag. Dit kan liggen aan verhoogde apoptose (geprogrammeerde celdood) in de testis die deze patiënten hebben door de uitgevoerde sterilisatie (Lewis *et al* (2006)).³⁶ Deze

auteurs toonden een verhoogde aanwezigheid van Fas en Fas ligand aan in testiculaire bipten van mannen met een sterilisatie. Ook zij zagen een opmerkelijk lagere slagingskans bij ICSI behandeling met sperma bekomen uit de testis van mannen met een sterilisatie. Er is in het spermatogenisch proces namelijk een accurate regulatie nodig van de apoptose om een normale proliferatie en overleving te verkrijgen van de voorlopers van de spermatozoa (Weikert *et al* (2005)).³⁷ Voor de andere groepen werd geen enkele doorgaande zwangerschap bekomen. Een verklaring hiervoor is dat de testis van cryptorchidie patiënten voor lange tijd werd blootgesteld aan een verhoogde temperatuur met mogelijke nefaste gevolgen voor de spermacellen. Naast de verhoogde temperatuur hebben de cryptorchidie patiënten in deze studiepopulatie ook azoöspermie. Wanneer gekeken wordt naar de obstructieve cryptorchidie patiënten, dan is hier het slagingspercentage voor een baby thuis wel hoger (21 %) (Slabbert *et al* (2006)).³⁸ Er kan geen duidelijke verklaring gegeven worden voor het niet slagen van een succesvolle zwangerschap in de andere twee groepen (sterilisatie en extreme OAT).

In de hierop volgende studies zal de database van patiënten met cryptorchidie, SCOS, sterilisatie, sterilisatie met gefaald herstel en extreme OAT verder uitgebreid moeten worden zodat mogelijke andere verbanden statistisch gevalideerd kunnen worden. Andere voorspellers voor een succesvolle TESE met goede zwangerschapskans kunnen zijn: *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) (Fuijta *et al* (2005)) en aquaporine.^{22,39} Deze laatste is betrokken bij het transport van cel secreties naar de testiculaire vesikels (Nicotina *et al* 1999).³⁹ Door een verstoord transport treedt er een opstapeling op van SCF en inhibine B_α in de Sertoli cel. C-kit receptor expressie kan ook meer informatie geven: bij verhoogde apoptose treedt een verlaagde expressie op van de c-kit receptor op de celmembranen (Feng *et al* 2001).⁴⁰ Het uitwerken en verfijnen van een betere chirurgische methode waarbij plaatsen met focale spermatogenese opgespoord kunnen worden tijdens de TESE zou de opbrengst kans van gezonde spermatozoa kunnen verhogen.

Bronnen

1. Gartner LP, Hiatt JL. Male reproductive System. Color Textbook of Histology. Philadelphia: W.B Saunders Company; 2001. p. 487-508.
2. Gilbert SF. Developmental Biology. The saga of the germ line. In: Ed. Gilbert SF. Developmental Biology. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Hoofdstuk 19.
3. Acosta AA. Spermatogenesis and intratesticular sperm maturation. In: ed. Anibal AA, Thinus FK. Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Londen, New York: The parthenon Publishing Group; 1996. p. 3-12.
4. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reprod Biol Endocrinol. 2003 Nov; 1: 107.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Germ Cells and Fertilization. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing; 2002. Hoofdstuk 20.
6. Di Fiore MH. Testis: seminiferous tubulus (transverse section). Atlas of human histology. Philadelphia; 1975. p. 194-6.
7. Disteche CM. Y Chromosome Infertility. In: Ed. Cassidy SB, Baskin PK. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington; 2006.
8. Hirsh AV. In vitro fertilisatie and assisted reproduction. In: ed. Brinsden PR. In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction. Carnforth (UK): The Parthenon Publishing Group; 1999. p. 27-52.
9. Khaldoun S. Reclassification of azoospermia: the time has come. Hum Reprod. 2000 Feb; 15(2): p. 237-8.
10. Nussey S, Whitehead S. The gonad. Endocrinology. London (UK): BIOS Scientific Publishers; 2001.
11. Labrecque M, Pile J, Sokal D, Kaza RC, Rahman M, Bodh SS, et al. Vasectomy surgical techniques in South and South East Asia. BMC Urol. 2005 mei; 5(1): p. 10-8.
12. Papadopoulos O, McO'Brien B, McLeod A, Morrison W. Complications of vasectomy: review of 16,000 patients. Br J Urol. 1984 Dec; 56(6): p. 745-8.
13. Vandekerckhove P, Lilford R, Vail A, Hughes E. Bromocriptine for idiopathic oligo/asthenospermia. Cochrane Database Syst Rev. 2000; (2).
14. Byrd W, Bennett MJ, Carr BR, Dong Y, Wians F, Rainey W. Regulation of biologically active dimeric inhibin A and B from infancy to adulthood in the male. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Aug; 83(8): p. 2849-54.

15. Andersson AM, Skakkebaek NE. Serum inhibin B levels during male childhood and puberty. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Jun; 180(1-2): p. 103-7.
16. Pierik FH, Vreeburg JTM, Stijnen T, De Jong FH, Weber RFA. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jan; 83(9): p. 3110-4.
17. Anderson RA, Irvine DS, Balfour C, Groome NP, Riley SC. Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum Reprod*. 1998 Apr; 13(4): p. 920-6.
18. Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibine B in male reproduction pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol*. 2001 Nov; 145(5): p. 561-71.
19. Vernaev V, Tournaye H, Schiettecatte J, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P. serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 2002 Apr; 17(4): p. 971-6.
20. Nussey S, Whitehead S. Non-steroidal factors in the control of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology*. London (UK): BIOS Scientific Publishers; 2001.
21. Klingmuller D, Haidl G. Inhibin B in men with normal and disturbed spermatogenesis. *Hum Reprod*. 1997 Nov; 12(11): p. 2376-8.
22. Fujita K, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Matsumiya K, Koga M, et al. Expression of inhibin alpha, glial cell line-derived neurotrophic factor and stem cell factor in Sertoli cell-only syndrome: relation to successful sperm retrieval by microdissection testicular sperm extraction. *Hum Reprod*. 2005 Aug; 20(8): p. 2289-94.
23. Foresta C, Bettella A, Petraglia F, Pistorello M, Luisi S, Rossato M. Inhibin B levels in azoospermic subjects with cytologically characterized testicular pathology. *Clin Endocrinol*. 1999 Jun; 50(6): p. 695-701.
24. Halder A, Fauzdar A, Kumar A. Serum inhibin B and FSH hormone levels as markers in the evaluation of azoospermic men: a comparison. *Andrologia*. 2005 Okt; 37(5): p. 173-9.
25. Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Calamera JC, Urrutia F, Nodar F, Acosta AA. Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2001 Dec; 76(6): p. 1124-9.

26. Bailly M, Guthauser B, Bergere M, Wainer R, Lombroso R, Ville Y, et al. Effects of low concentration of inhibin B on the outcome of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2003 Apr; 79(4): p. 905-8.
27. Fox RA, Sigman M, Boekelheide K. Transmembrane versus soluble stem cell factor expression in human testis. *J Androl*. 2000 Jul-Aug; 21(4): p. 579-85.
28. Fujisawa M, Kanzaki M, Okuda Y, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Stem cell factor in human seminal plasma as a marker for spermatogenesis. *Urology*. 1998 Maart; 51(3): p. 460-3.
29. Abe K, Jin Y, Yamamoto T, Abe S. Human recombinant stem cell factor promotes spermatogonial proliferation, but not meiosis initiation in organ culture of newt testis fragments. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jun; 294(3): p. 695-9.
30. Moore KL, Dalley AF. Inguinal region. Lippincott Williams & Wilkins. *Clinically Oriented Anatomy*. 2005. p. 214-29.
31. Basics in IVF: andrologie laboratorium cursus
32. Parrott JA, Kim G, Skinner MK. Expression and action of kit ligand/stem cell factor in normal human and bovine ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Biol Reprod*. 2000 Jun; 62(6): p. 1600-9.
33. Fujisawa M, Yamazaki T, Fujioka H, Takenaka A. Differential regulation of inhibin subunits by germ cells in human testes. *Arch Androl*. 2004 Sept-Okt; 50(5): p. 339-45.
34. Bergh A, Cajander S. Immunohistochemical localization of inhibin-alpha in the testes of normal men and in men with testicular disorders. *Int J Androl*. 1990 Dec; 13(6): p. 463-9.
35. Marchetti C, Hamdane M, Mitchell V, Mayo K, Devisme L, Rigot JM *et al*. Immunolocalisation of inhibin and activin alpha and betaB subunits and expression of corresponding messenger RNAs in the human adult testis. *Biol Reprod*. 2003 Jan; 68(1): p. 230-5.
36. Lewis *et al.*, 2006. Abstract Irish Fertility society meeting. Dublin 2006.
37. Weikert S, Schrader M, Christoph F, Schulze W, Krause H, Muller M, Miller K. Quantification of survivin mRNA in testes of infertile patients and in testicular germ cell tumours: high levels of expression associated with normal spermatogenesis. *Int J Androl*. 2005 Aug; 28(4): p. 224-9.
38. Slabbert *et al.*, 2006. Abstract European society of human reproduction and embryology meeting. Praag 2006.

39. Nicotina PA, Romeo C, Arena S, Impellizzeri P, Antonuccio P, Arena F, Zuccarello B, Romeo G. Immunohistology of aquaporin-1 and stem cell factor-receptor in human undescended testes. *Pediatr Surg Int.* 2004 Apr; 20(4): p. 271-5.
40. Feng HL, Sandlow JJ, Sparks AE, Sandra A, Zheng LJ. Decreased expression of the c-kit receptor is associated with increased apoptosis in subfertile human testes. *Fertil Steril.* 1999 Jan; 71(1): p. 85-9.

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:

De expressie van inhibine B en stam cel factor in testiculair weefsel van azoösperme patiënten en de relatie tot zwangerschapskansen bij vruchtbaarheidsbehandeling

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,

Elke WEVERS

Datum: