

Studie van de hyaluronzuurbinding van menselijk sperma

Eva Creemers

promotor :

dr. Willem OMBELET

Prof. dr. Lena DE RYCK

co-promotor :

M. NIJS

Inhoudsopgave

Voorwoord en dankwoord.....	I
Lijst met afkortingen	II
Samenvatting	III
1. Inleiding.....	1
1.1 Spermatogenese.....	1
1.1.1 Spermacytogenese	1
1.1.2 Spermatidogenese.....	2
1.1.3 Spermioogenese.....	2
1.2 Capacitatie van de spermatozoa	4
1.3 Het bevruchtingsproces	5
1.3.1 Vasthechting aan en penetratie van de zona pellucida	5
1.3.2 Binding en fusie van spermatozoön en eicel	6
1.3.3 Decondensatie van de nucleus van de spermatozoön	6
1.3.4 Vervollediging van de meiose en ontwikkeling van pronuclei	7
1.4 Hyaluronzuur.....	7
1.4.1 Hyaluronzuur in de cumulus oophorus	8
1.4.2 Hyaluronzuurbinding van menselijk sperma.....	9
1.5 ART-behandeling: IVF en ICSI	10
1.6 Proefopzet.....	11
2. Materiaal en methoden	12
2.1 Patiëntenpopulatie	12
2.2 Staalname	14
2.3 Organisatie van het onderzoek	14
2.4 Onderzochte parameters van het spermastaal	14
2.4.1 Volume.....	15
2.4.2 Viscositeit	15
2.4.3 Bewegelijkheid	15
2.4.4 Concentratie	16
2.4.5 Morfologie	16
2.5 Hyaluronan-binding assay (HBA test)	17
2.5.1 Uitvoering van de test	17
2.5.2 Precisie van de test.....	19
2.5.3 Interpretatie van de resultaten	19
2.6 Het invriezen van sperma.....	19
2.7 Het ontdooien van sperma.....	20
2.8 Het opzuiveren van een spermastaal voor de IVF en/of ICSI behandeling	20

2.9 Parameters voor het beoordelen van bevruchting	21
2.10 Statistische analyse.....	22
3. Resultaten.....	23
3.1 Invloed van invriezen en ontdooien op de HA-binding	23
3.2 Verband tussen HA-binding en de drie sperma parameters	24
3.2.1 <i>Verband tussen HA-binding en concentratie</i>	25
3.2.2 <i>Verband tussen HA-binding en beweeglijkheid</i>	26
3.2.3 <i>Verband tussen HA-binding en morfologie</i>	28
3.3 Verband tussen HA-binding en de uitkomst van de ART-behandeling.....	29
3.3.1 <i>Verband tussen HA-binding en het bevruchtend vermogen van sperma</i>	29
3.3.2 <i>Verband tussen HA-binding en de kwaliteit van de embryo's</i>	33
3.3.3 <i>Verband tussen HA-binding en het uiteindelijke resultaat van een ART-behandeling</i>	36
3.4 HA-binding van verschillende spermastalen van dezelfde patiënt op verschillende tijdstippen	39
4. Discussie	42
Literatuurlijst	46

Voorwoord en dankwoord

Deze thesis met de daarbij horende stage is niet enkel een afsluiting van mijn masteropleiding Biomedische Wetenschappen, het is ook de afsluiting van 4 jaar ‘student zijn’ aan de Universiteit Hasselt. Deze 4 jaar zullen mij altijd bijblijven als een hele mooie periode in mijn leven. Ik heb niet enkel veel kennis opgedaan tijdens mijn opleiding in Diepenbeek, ik heb hier ook vrienden voor het leven gevonden. Dit dankwoord is dan ook gericht aan iedereen die hiertoe heeft bijgedragen.

Als eerste zou ik graag mijn promotor Prof. Dr. Willem Ombet en co-promotor Martine Nijs willen bedanken. Doordat ik in mijn omgeving al geconfronteerd ben geworden met koppels die problemen hadden om zwanger te worden, was fertiliteit een onderwerp dat mij al lange tijd boeide. Ik ben dan ook zeer dankbaar dat ik de stageplaats in het IVF-labo toegewezen heb gekregen. Verder wil ik Martine bedanken voor de dagelijkse begeleiding tijdens mijn stage en voor het nalezen en verbeteren van mijn thesis. Martine, heel erg bedankt!

Ook de andere medewerkers van het labo verdienen een bloemetje. Zij waren op één of andere manier allemaal bij mijn onderzoek betrokken en stonden altijd klaar om te helpen en om mijn vragen te beantwoorden. Annemie, Kim, Mia en Elke, dankuwel!

Ik wil ook van de gelegenheid gebruik maken om Tom Vermeiden van MidAtlantic Diagnostics te bedanken voor het ter beschikking stellen van de plaatjes voor de HBA-test.

Verder wil ik mijn interne promotor en tweede beoordelaar, Prof. Dr. Leen De Ryck, bedanken. Zij heeft er op toegezien dat alles goed verlopen is en ze heeft mij naar de juiste personen doorverwezen wanneer dit nodig was.

Ik wil ook graag Prof. Herbert Thijs en de leden van STATCOM, in het bijzonder Yovanna en Vishva, bedanken voor de hulp bij de statische verwerking van mijn resultaten. Zij hadden altijd tijd voor mij en hebben mij ongelooflijk goed geholpen. Thank you!

Tot slot zou ik nog graag mijn ouders willen bedanken voor alle steun gedurende deze 4 jaar. Bedankt om altijd voor mij klaar te staan en om altijd in mij te blijven geloven. Mijn broer, Tim, wil ik bedanken voor zijn hulp bij de opmaak van de figuren. Ook mijn vriend, Fabrice, wil ik graag bedanken voor alle steun, bemoedigende woorden en ontspanning wanneer dit nodig was.

Lijst met afkortingen

2PN	2 pronucleï
ART	Assisted Reproductive Technology
AST	Asthenozoöspermie
COC	Cumulus-oocyte complex
EBSS	Earl's balanced salt solution
HA	Hyaluronic acid, hyaluronzuur
HABP	Hyaluronzuur-bindend proteïne
HBA	Hyaluronzuurbinding assay
hCG	Humaan choriongonadotrofine
HSA	Humaan serum albumine
ICSI	Intracytoplasmatische sperma injectie
IMC	Inseminating motile count
IUI	Intra-uteriene inseminatie
IVF	<i>In vitro</i> fertilisatie
LH	Luteïniserend hormoon
MII	Metafase II
OAT	Oligoasthenoteratozoöspermie
OLI	Oligozoöspermie
PSA	Protease-specifiek antigeen
PU	Pick-up, eicelcollectie
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RHAMM	Receptor voor HA-gemedieerde motiliteit
TER	Teratozoöspermie
WHO	Wereldgezondheidsorganisatie
ZOL	Ziekenhuis Oost-Limburg
ZP	Zona pellucida
XPN	Abnormaal aantal pronucleï

Samenvatting

Hyaluronzuur (HA) is de belangrijkste component van de extracellulaire matrix. Het is een lineair polymeer dat bestaat uit een aaneenschakeling van disacchariden, namelijk N-acetylglucosamine en D-glucuronzuur. Het wordt doorheen het hele lichaam gesynthetiseerd door hyaluronsynthases. Ook de matrix van de cumulus oophorus, een zeer specifieke structuur rondom de eikel, is rijk aan dit hyaluronzuur. Om de eikel te kunnen bevruchten moeten spermatozoa deze cumulus oophorus penetreren. Ze produceren hiervoor specifieke hyaluronzuur-bindende eiwitten. Één van deze eiwitten, PH-20, heeft een hyaluronidase werking. Hyaluronzuur en zijn verschillende receptoren spelen dus een belangrijke rol in het fertilisatieproces. Er werd een diagnostische test ontwikkeld waarmee het HA bindend vermogen van spermatozoa kan worden nagegaan. Hieruit blijkt dat enkel spermatozoa die morfologisch en nucleair matuur zijn, binden aan de HA moleculen. Deze spermatozoa hebben ook minder aneuploïde afwijkingen in vergelijking met niet-gebonden spermatozoa. Volgens Huszar et al. is de grenswaarde van deze HA-binding 80%. Wanneer minder dan 80% van de spermatozoa binden aan HA, zouden deze spermatozoa een verminderde maturiteit en fysiologische werking hebben. Het doel van deze studie is na te gaan of er een verband bestaat tussen de hyaluronzuurbinding van spermatozoa en de uitkomst van een vruchtbaarheidsbehandeling. In een eerste studie, waarin 40 patiënten zijn opgenomen, wordt nagegaan of het invriezen en ontdooien van sperma invloed heeft op de HA-binding van spermatozoa. In een tweede studie, met dezelfde 40 patiënten, wordt het verband gezocht tussen HA-binding en drie sperma parameters: concentratie, beweeglijkheid en morfologie. In een derde, prospectief gerandomiseerde studie met 30 paren met een vruchtbaarheidsprobleem wordt dan een verband gezocht tussen de HA-binding en de uitkomst van een vruchtbaarheidsbehandeling (het bevruchtend vermogen van het sperma, de kwaliteit van de hieruit ontstane embryo's en het al dan niet bekomen van een zwangerschap). De HA-binding wordt onderzocht met behulp van de HBA test (hyaluronic acid binding assay). De resultaten tonen aan dat het invriezen en ontdooien van een spermastaal geen invloed heeft op de HA-binding van de spermatozoa. Er bestaat ook geen verband tussen HA-binding en de 3 sperma parameters. Verder kan er geen verband aangetoond worden tussen de HA-binding van spermatozoa en het bevruchtend vermogen van het sperma of de kwaliteit van de embryo's. Het uiteindelijke resultaat van de behandeling, zwanger of niet zwanger, is ook niet afhankelijk van de hyaluronzuurbinding van de spermatozoa.

1. Inleiding

1.1 Spermatogenese

Spermatogenese is het proces waarin mannelijke gameten ontwikkelen in rijpe spermatozoa. Bij mensen gebeurt dit in de mannelijke testis en epididymis en dit proces duurt ongeveer 64 dagen. Spermatogenese begint tijdens de puberteit en gaat daarna meestal onverstoord verder tot de dood. Het doel is de productie van rijpe mannelijke gameten die in staat zijn een eicel te bevruchten. Het hele proces wordt ingedeeld in 3 verschillende fasen, namelijk de spermatocytogenese, de spermatidogenese en de spermiogenese.

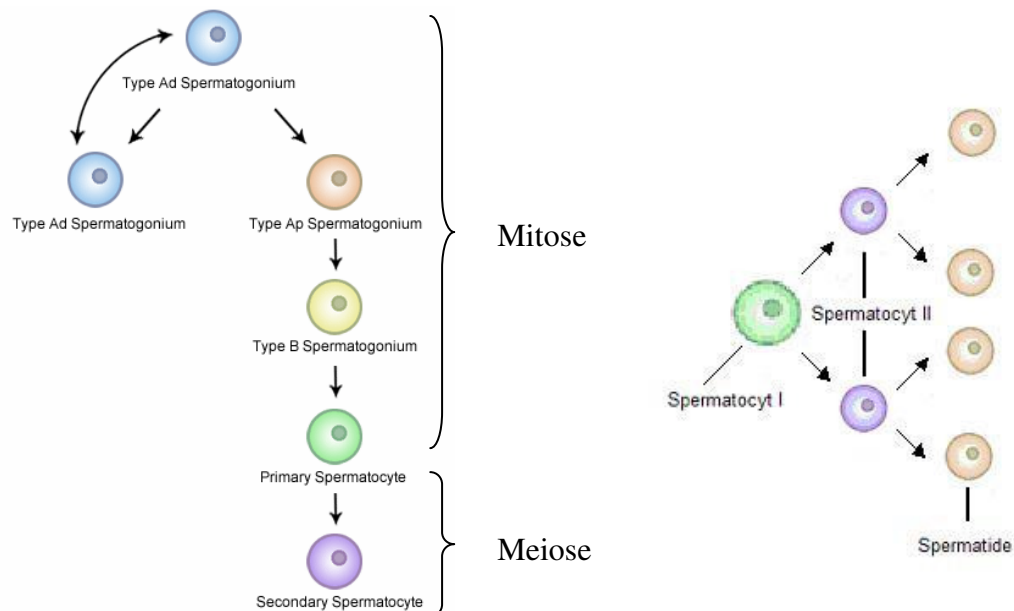
1.1.1 Spermacytogenese

Spermacytogenese begint met de mitotische proliferatie van de spermatogonia (Figuur 1). Dit zijn stamcellen die zich bevinden aan de basis van het seminifere epitheel van de testis. Men kan, op basis van het uiterlijk van hun celkern, verschillende populaties van spermatogonia onderscheiden. Er zijn type Ad (d=dark) spermatogonia en type Ap (p=pale) spermatogonia, welke mitose ondergaan. Na deze deling spreekt men dan van type B spermatogonia. Alle spermatogonia zijn verankerd aan de basis van het seminifere epitheel via Sertoli cellen. Dit zijn complexe cellen die evenredig verdeeld zijn doorheen de periferie van het seminifere epitheel. De juncties van de Sertoli cellen vormen de bloed-testis barrière. Dit is een structuur die zorgt voor scheiding tussen het interstitiële bloedcompartiment van de testis en het adluminale compartiment van de seminifere tubuli. Behalve het instandhouden van de bloed-testis barrière, hebben Sertoli cellen nog andere functies. Ze zorgen voor steun, bescherming en voeding van de zich ontwikkelende spermatozoa, ze breken de residuele lichaampjes af die vrijkomen tijdens de laatste fase van de spermiogenese en ze secreteren een fructose-rijk medium dat belangrijk is voor het transport van de vrijgekomen spermatozoa.¹

De type Ad spermatogonia staan in voor het behoud van de stamcelpopulatie. Ze zijn in staat om te delen in ofwel 2 identieke type Ad spermatogonia, die niet rechtstreeks deelnemen aan de verdere spermatogenese, ofwel in 2 type Ap spermatogonia. De type Ap spermatogonia ondergaan mitose en produceren identieke celklonen die via cytoplasmatische bruggen met elkaar verbonden zijn. Door deze verbindingen verloopt de ontwikkeling gesynchroniseerd. Als deze mitotische delingen stoppen, differentiëren de type Ap spermatogonia in type B spermatogonia. Deze ondergaan mitose, wat leidt tot de productie van diploïde intermediaire cellen die men primaire spermatocyten noemt. Deze primaire spermatocyten liggen juist

binnen de laag spermatogonia en zijn nog steeds ingebed in het cytoplasma van de Sertoli cellen. Elke primaire spermatocyt verdubbelt zijn DNA en ondergaat vervolgens de eerste meiotische deling. Dit resulteert in de vorming van 2 haploïde secundaire spermatocyten. Deze blijven verbonden via cytoplasmatische bruggen, zodat de ontwikkeling nog steeds synchron verloopt.¹

Tijdens de 1^e meiotische deling worden er ook al moleculen geproduceerd die de spermatozoa later nodig zullen hebben, zoals bijvoorbeeld de protamines. Dit zijn kleine arginine- en lysine-rijke eiwitten die zorgen voor verplaatsing van de lysine-rijke nucleaire histonen. Hierdoor is er een hoge graad van compactie van het nucleair chromatine mogelijk, wat nodig is tijdens de laatste fasen van de spermatogenese.²



Figuur 1: Schematisch diagram van de spermatocytogenese (links) en de spermatidogenese (rechts).

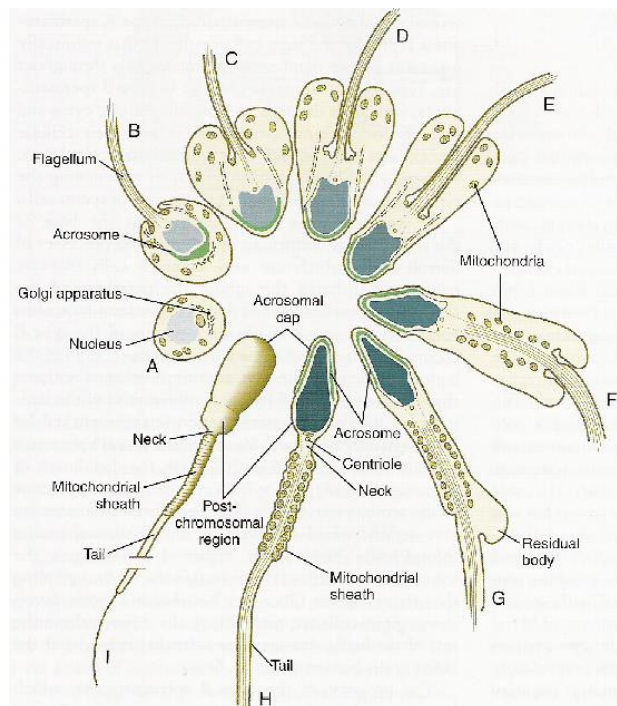
1.1.2 Spermatidogenese

Het resultaat van de 1^e meiotische deling zijn 2 secundaire spermatocyten. Deze starten onmiddellijk met de 2^e meiotische deling en produceren zo elk 2 onrijpe haploïde gameten die men spermaticiden noemt. Deze spermaticiden delen niet meer verder, maar ondergaan een reeks veranderingen die hen transformeren in zeer gespecialiseerde spermatozoa.²

1.1.3 Spermio-genese

Tijdens deze laatste fase gebeurt de verdere rijping van de spermaticiden in motiele spermatozoa. Met deze rijping gaan morfologische en cytoplasmatische veranderingen gepaard (Figuur 2). Vooreerst is er een grote reductie in de grootte van de nucleus en gebeurt

er een grote condensatie van het chromosomaal materiaal. Dit is geassocieerd met de verplaatsing van histonen door protamines en heeft tot doel stabilisatie van het DNA. Verder gebeurt er ook een reorganisatie van het cytoplasma. Het cytoplasma stroomt weg van de nucleus en het Golgi apparaat condenseert aan de apicale zijde van de nucleus en geeft zo ontstaan aan het acrosoom. Dit is een enzymgevulde structuur die later een belangrijke rol zal spelen in het fertilisatieproces. Aan de andere zijde van de nucleus groeit een flagellum uit het centriolair gebied. De mitochondriën worden in een spiraal rond het proximale gedeelte van het flagellum geschikt. Tijdens de spermiogenese wordt het plasmamembraan van de kop verdeeld in een aantal antigeen-verschillende moleculaire domeinen. Deze domeinen ondergaan verschillende veranderingen als de spermatozoa verder rijpen en nog later als de spermatozoa zich doorheen de vrouwelijke reproductieve tractus bewegen. Het overblijfsel van het cytoplasma of het residueel lichaam stroomt weg van de nucleus en wordt verwijderd langs de ontwikkelende staart van de spermatozoön. Deze lichaampjes worden hierna gefagocytiseerd door de Sertoli cellen.²



Figuur 2: Veranderingen die optreden tijdens de spermiogenese. De spermiogenese start met een spermatide (A) en eindigt met een rijpe spermatozoön (I).²

Het resultaat van de spermiogenese zijn rijpe spermatozoa die bestaan uit een kop die de nucleus en het acrosoom bevat, een middenstuk dat bestaat uit centriolen, het proximale deel van het flagellum en de mitochondriale helix, en uit een staart die bestaat uit een zeer

gespecialiseerd flagellum. Een rijpe spermatozoön is ongeveer 65 μm lang. De kop bedraagt ongeveer 5 μm , het middenstuk 10 μm en de staart 50 μm .²

Hoewel de spermatozoa, die zich nog steeds in de seminifere tubuli bevinden, rijp lijken volgens morfologische criteria, zijn ze praktisch onbeweeglijk. Ze worden vrijgezet in het lumen van de seminifere tubuli door de Sertoli cellen, en hierna worden ze via de testiculaire vloeistof getransporteerd naar de epididymis, waar ze opgeslagen blijven tot de ejaculatie. Tijdens dit transport ondergaan de spermatozoa een biochemische en nucleaire maturatie. Ze worden bedekt met een glycoproteïne laag en ondergaan nog enkele andere oppervlakte modificaties. Verdere biochemische maturatie en de toevoeging van fructose als externe energiebron, gebeuren tijdens de ejaculatie, wanneer de spermatozoa gemengd worden met secreties van de prostaatklier en de seminale vesikels. Het is de vloeistof van de seminale vesikels die rijk is aan de energiebron fructose. De prostaatvloeistof bevat citroenzuur, fosfatase en zink- en magnesiumionen.²

1.2 Capacitatie van de spermatozoa

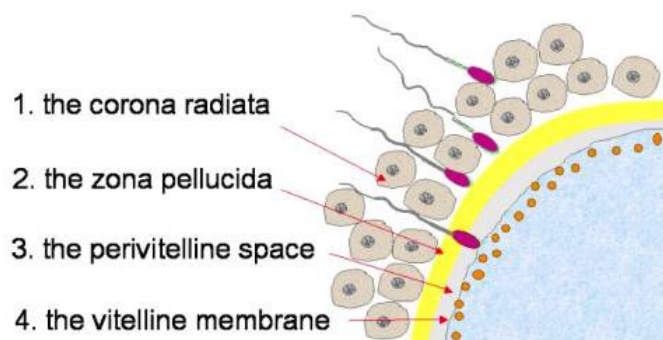
De capacitatie reactie bestaat uit een reeks functionele biochemische en biofysische modificaties die de geëjaculeerde spermatozoa klaarmaken voor de bevruchting van een eicel. Één van de functionele gevolgen van capacitatie is de ontwikkeling van een duidelijk bewegingspatroon dat men hyperactivatie noemt. Deze beweging wordt gekenmerkt door een uitgesproken staartbeweging, duidelijke laterale uitwijkingen van de kop en een niet lineaire voortbeweging. Een ander gevolg van de capacitatie reactie is dat de spermatozoa de mogelijkheid verkrijgen om de acrosoomreactie te ondergaan, in respons op fysiologische stimuli zoals het ZP3 eiwit. Dit ZP3 eiwit is een glycoproteïne van de zona pellucida en dient als spermareceptor. Het vermogen van spermatozoa om te reageren op deze ZP3 eiwitten van de zona pellucida neemt toe tijdens de capacitatie, en gaat gepaard met maximale respons op de plaats van de fertilisatie. Capacitatie wordt verder ook geassocieerd met modificaties in de verdeling van oppervlakte eiwitten van spermatozoa, veranderingen in membraaneigenschappen, veranderingen van enzymatische activiteiten en modulatie van de expressie van intracellulaire constituenten.³

De 3 belangrijkste moleculaire veranderingen die optreden zijn een verandering van de vloeibaarheid van het celmembraan van de spermatozoa, door een verandering in de lipidensamenstelling. Ook verdwijnen er bepaalde eiwitten en koolhydraten op het sperma oppervlak, die mogelijk de binding aan de zona pellucida zouden blokkeren. Als laatste

gebeurt er een fosforylatie van de eiwitten die betrokken zijn bij de binding van de spermatozoa aan de zona pellucida. Door deze fosforylatie worden de inactieve vormen van deze eiwitten omgezet in functionele eiwitten.⁴

1.3 Het bevruchtingsproces

In de ampulla van de eileider komen de spermatozoa in contact met de geövuleerde eicel. De eerste barrière die ze tegenkomen is de corona radiata en mogelijk ook enkele overblijfselen van de cumulus oophorus (Figuur 3). Dit is de buitenste laag van het eicelcomplex. De corona radiata is een cellulaire laag en bevat een intracellulaire matrix die bestaat uit eiwitten en een hoge concentratie koolhydraten, voornamelijk hyaluronzuur. De kop van de spermatozoön bevat hyaluronidase en dit is belangrijk voor de penetratie van de corona radiata. Ook de actieve zwembeweging van de spermatozoön speelt hierbij een significante rol.²



Figuur 3: De verschillende lagen die een eicel omgeven.

1.3.1 Vasthechting aan en penetratie van de zona pellucida

De zona pellucida is ongeveer 13 μm dik en bestaat hoofdzakelijk uit 3 glycoproteïnen, namelijk ZP1, ZP2 en ZP3. De ZP2 en ZP3 moleculen combineren en vormen een basiseenheid die polymeriseert in lange filamenten die met elkaar verbonden worden door overbruggingen van ZP1-moleculen.² De zona pellucida van de mens bevat nog een extra glycoproteïne, namelijk ZP4. ZP4 heeft een structurele rol en is samen met ZP3 ook betrokken bij het binden van spermatozoa aan de zona pellucida en bij de inductie van de acrosoomreactie.⁵ Doordat bepaalde moleculen op het oppervlak van de spermakop specifieke bindingsplaatsen vormen voor de ZP3 en ZP4 spermareceptoren op de zona pellucida, kunnen spermatozoa dus zeer hecht binden aan deze zona pellucida via het plasmamembraan van de spermakop. Na deze binding ondergaan de spermatozoa de

acrosoomreactie. Tijdens deze reactie fuseren delen van het buitenste acrosomale membraan met het overliggende plasmamembraan. Dit resulteert in de vrijzetting van de enzymatische inhoud van het acrosoom en in blootstelling van de enzymen die zich bevinden op het binnenste acrosomale membraan. Deze enzymen, en vooral het membraangebonden enzym acrosine, maken een doorgang doorheen de zona pellucida.^{1,3}

Enkel na vervollediging van de acrosoomreactie kan de spermatozoön beginnen met de penetratie van de zona pellucida. Dit gebeurt via een combinatie van mechanische voortbeweging door bewegingen van het flagellum en door digestie van een doorgang doorheen de ZP moleculen, door middel van de werking van de acrosomale enzymen.²

Zodra de spermatozoön doorheen de zona pellucida is gedrongen en zich in de perivitelline ruimte bevindt, kan het rechtstreeks contact maken met het plasmamembraan van de eicel.

1.3.2 Binding en fusie van spermatozoön en eicel

De binding vindt plaats wanneer het equatoriaal gebied van de spermakop contact maakt met de microvilli die de eicel omgeven. Tijdens de fusie versmelten de membranen van de spermatozoön en de eicel. Hierbij wordt het plasmamembraan van de spermatozoön geïncorporeerd in het plasmamembraan van de eicel, terwijl de functionele onderdelen van de spermatozoön (kop, middenstuk en staart) in de eicel wegzinken.² Na deze penetratie van de spermatozoön wordt de activatie van de eicel gestart, wat noodzakelijk is voor het begin van de embryonale ontwikkeling. Een vrijzetting van calcium uit interne opslagplaatsen is de oorzaak van deze activatie, en wordt veroorzaakt door “oocyte activating factor(s)” die vrijgezet worden door de spermatozoön.^{6,7} Deze Ca^{2+} stijging in het ooplasma gaat ook gepaard met een uitwisseling van extracellulair Na^+ en intracellulair H^+ . Dit leidt tot een stijging van de intracellulaire pH, wat resulteert in een hoger oxidatief metabolisme.²

1.3.3 Decondensatie van de nucleus van de spermatozoön

In een rijpe spermatozoön is het nucleaire chromatine zeer dicht verpakt door disulfidebruggen. Dit gebeurt via de protamine moleculen die een complex vormen met het DNA tijdens de spermatogenese. Als de spermakop in het cytoplasma van de eicel zinkt tijdens fertilisatie, stijgt de permeabiliteit van het nucleair membraan waardoor cytoplasmatische factoren in de eicel de nucleaire inhoud van de spermatozoön kunnen beïnvloeden. Het glutathion in het ooplasma bijvoorbeeld, reduceert de disulfidebruggen (-SS-) van de protamines in sulfhydrylgroepen (-SH-). Hierdoor gaan de protamines verloren, waardoor het chromatine zich gaat verspreiden in de nucleus, die vanaf nu pronucleus genoemd wordt.²

1.3.4 Vervollediging van de meiose en ontwikkeling van pronuclei

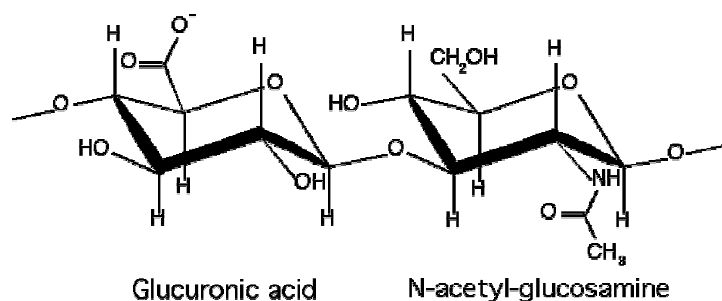
Na penetratie van de spermatozoön vervolledigt de nucleus van de eicel de meiotische rijping. Het resultaat hiervan is de vrijzetting van een 2^e poollichaampje in de perivitelline ruimte en de vorming van een vrouwelijke pronucleus. Deze ontstaat doordat er rond het vrouwelijk chromosomaal materiaal een pronucleair membraan gevormd wordt, dat grotendeels afkomstig is van het endoplasmatisch reticulum van de eicel.²

In de ontwikkelende haploïde pronuclei treedt er DNA-replicatie op. Terwijl de mannelijke en vrouwelijke pronucleus elkaar naderen, vormt elk chromosoom 2 chromatiden. Bij contact van de 2 pronuclei worden de membranen afgebroken en worden de chromosomen gemengd terwijl ze zich organiseren rond een mitotische spoel.²

1.4 Hyaluronzuur

Hyaluronzuur (HA) of hyaluronan behoort tot de klasse van glycosaminoglycanen. Dit zijn lineaire polymeren van aaneengeschakelde disacchariden. De disacchariden samenstelling van hyaluronzuur bestaat uit D-glucuronzuur en N-acetylglucosamine, die met elkaar verbonden zijn via β -glycosidische bindingen (Figuur 4).⁸ Hyaluronzuur is het grootste glycosaminoglycaan, met een moleculair gewicht dat varieert van honderdduizend tot enkele miljoenen Dalton. Het vormt een onvertakte structuur en bevat vijftig tot verschillende duizenden disaccharide-eenheden.⁹

Hyaluronzuur wordt gesynthetiseerd door hyaluronsynthases, aan de cytoplasmatische zijde van het plasmamembraan van cellen doorheen het hele lichaam. Deze enzymen zijn integrale membraaneiwitten die niet enkel de polymerisatie katalyseren, maar die ook instaan voor het transport van hyaluronzuur naar de extracellulaire matrix.¹



Figuur 4: De structuur van hyaluronzuur. Hyaluronzuur is een lineair polymeer dat opgebouwd is uit aaneengeschakelde eenheden van N-acetylglucosamine en D-glucuronzuur. Deze eenheden zijn met elkaar verbonden via β -glycosidische bindingen.⁹

1.4.1 Hyaluronzuur in de cumulus oophorus

Tijdens de laatste fasen van de folliculogenese vormt een populatie van folliculaire granulosa cellen een zeer specifieke structuur in de periferie van de eicel, die de cumulus oophorus wordt genoemd. Deze structuur bestaat uit 3000 tot 5000 cumuluscellen die samengehouden worden door een extracellulaire matrix die ontstaat na de fysiologische stimulatie van de ovulatie door een toename van het luteïniserend hormoon (LH).¹⁰ Dit proces wordt mucificatie genoemd.¹¹ Tijdens de ovulatie wordt het cumulus-oocyte complex (COC) vrijgezet uit het follikel als een visceuze en elastische celmassa. De componenten van de extracellulaire matrix van het COC vergemakkelijken de opname van de eicel door de fimbria van de eierstokken. Ook induceert deze extracellulaire matrix veranderingen in de spermatozoa die voorafgaan aan het proces van fertilisatie.¹¹

Meerdere studies hebben aangetoond dat de matrix van deze cumulus oophorus rijk is aan hyaluronzuur. Salustri et al. hebben de synthese en accumulatie van hyaluronzuur en proteoglycanen in het cumulus-oocyte complex in muizen beschreven.¹¹ Talbot et al. hebben aangetoond dat de cumulus gevoelig is voor hyaluronidase, wat ook duidt op de aanwezigheid van hyaluronzuur in de cumulus.¹² Ook in 1984 was er al een studie die aantoonde dat specifieke hyaluronidases het COC dissociëren in individuele cellen.¹³

Spermatozoa produceren verschillende specifieke hyaluronzuur-bindende eiwitten. RHAMM, een receptor voor hyaluronzuur, is gelokaliseerd op het oppervlak van de staart, het middenstuk en de kop van spermatozoa. Kornovski et al. hebben aangetoond dat RHAMM een belangrijke rol speelt in de beweeglijkheid van spermatozoa.¹⁴ De aanwezigheid van een ander hyaluronzuur-bindend eiwit werd aangetoond door Ranganathan et al. HAMP, hyaluronzuur-bindend glycoproteïne, is gelokaliseerd in spermatozoa van verschillende soorten waaronder muizen, ratten en mensen. Het is belangrijk voor de vasthechting van de spermatozoa aan de eicel, voor de maturatie en beweeglijkheid van spermatozoa en het speelt een belangrijke rol in het fertilisatieproces.¹⁵ Een derde hyaluronzuur-bindend eiwit werd beschreven door Sabeur et al. Het PH-20 eiwit is een plasmamembraan-gebonden eiwit dat hyaluronidase werking vertoont in verschillende zoogdiersoorten, waaronder de mens. In acrosom intacte spermatozoa is dit eiwit gelokaliseerd op het plasmamembraan van de volledige kop, maar niet op het middenstuk of op de staart. Na de acrosomreactie is PH-20 ook terug te vinden op het binnenste acrosomale membraan.^{16,17} In een studie rond de hyaluronidase werking van PH-20 werd door Lin et al. aangetoond dat men in muizen al de cumuluscellen rondom een eicel kan verwijderen door toevoeging van gezuiverd, recombinant PH-20. Acrosom intacte spermatozoa die geïncubeerd werden met anti-PH-20

antilichamen, konden de cumuluslaag niet penetreren en konden dus ook de zona pellucida niet bereiken.¹⁸

Uit al deze onderzoeken blijkt dat de extracellulaire matrix van de cumulus oophorus hyaluronzuur bevat. Ook weet men dat er op het oppervlak van de spermatozoa hyaluronzuur-bindende eiwitten gelokaliseerd zijn, die een rol spelen in de functie van de spermatozoa. RHAMM en HABP zijn belangrijk voor de maturiteit en beweeglijkheid van de spermatozoa. Het hyaluronidase, PH-20, is betrokken bij de penetratie van de cumulus oophorus en speelt dus een belangrijke rol in het fertilisatieproces. Hieruit kan men afleiden dat hyaluronzuur en de verschillende receptoren hiervoor een belangrijke functie vervullen in het fertilisatieproces.

1.4.2 Hyaluronzuurbinding van menselijk sperma

Huszar et al. hebben aangetoond dat het enkel rijpe spermatozoa zijn die binden aan hyaluronzuur. Rijpe spermatozoa zijn spermatozoa die alle genomische en cytoplasmatische veranderingen die optreden tijdens de spermiogenese, vervolledigd hebben. Om de mate van maturiteit van de spermatozoa na te gaan, werden er verschillende parameters onderzocht zoals het behoud van het cytoplasma, de aanwezigheid van histonen en de integriteit van het acrosoom. Uit de resultaten van het onderzoek kon men afleiden dat alle HA-gebonden spermatozoa rijp waren. De niet-gebonden spermatozoa vertoonden cytoplasmatische en nucleaire eigenschappen van verminderde maturiteit. De acrosomale status van de gebonden spermatozoa was ofwel intact, ofwel licht gecapaciteerd en enkel levende spermatozoa waren in staat om te binden aan HA.¹⁹

De capaciteit om aan hyaluronzuur te binden is niet enkel een indicator voor de maturiteit van spermatozoa. Er is ook aangetoond dat spermatozoa die zichzelf vasthechten aan geïmmobiliseerd hyaluronzuur minder genomische afwijkingen hebben. Dit komt tot uiting als een 4- tot 6-voudige afname in de frequentie van chromosomale aneuploïdiën in HA-gebonden spermatozoa, in vergelijking met de spermatozoa in het totale spermastaal.²⁰ In een andere studie, waarin HA-binding vergeleken werd met de morfologie van sperma, vond men als resultaat dat deze 2 parameters met elkaar gerelateerd zijn. Een gebrek aan hyaluronzuur-bindende capaciteit voorspelt dus ook een slechte morfologie van de spermatozoa.²¹

Het efficiënte niveau van HA-binding is vastgelegd op 80%. Een staal waarin 80% of meer spermatozoa binden aan hyaluronzuur, wordt beschouwd als een spermastaal met een normale maturiteit en fysiologische werking. Als er minder dan 80% spermatozoa in een staal

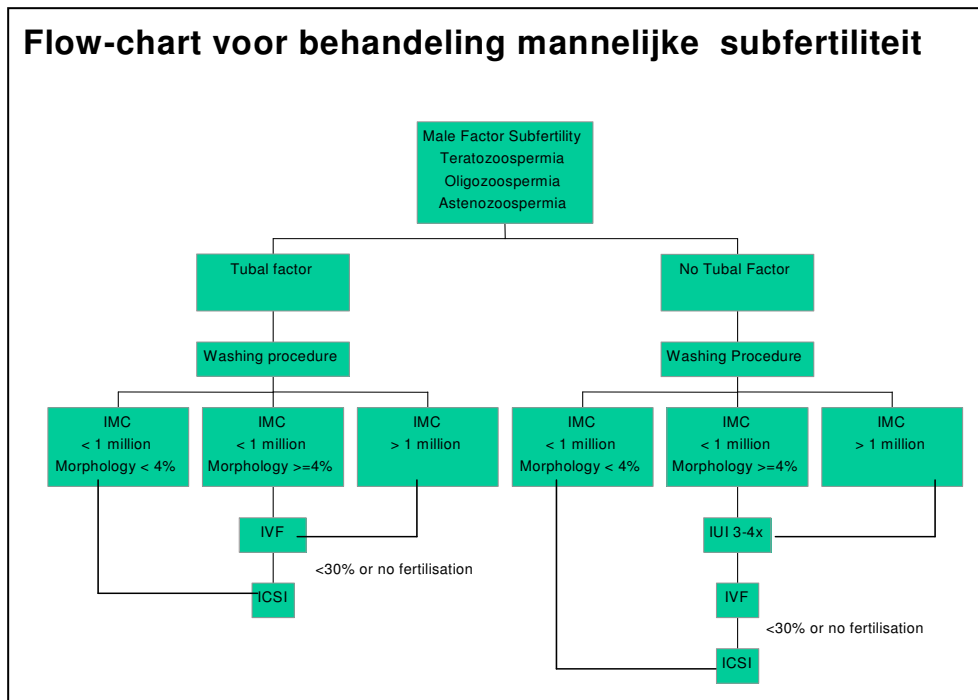
binden aan hyaluronzuur, wordt dit beschouwd als een staal met een verminderde maturiteit en fysiologische werking.²¹

1.5 ART-behandeling: IVF en ICSI

Voor een ART-behandeling (Assisted Reproductive Technology) worden door middel van een hormoonstimulatie bij de vrouw meerdere follikels met eicellen tegelijkertijd tot rijping gebracht. Wanneer de follikels groot genoeg zijn (15-25 mm) wordt er een inspuiting met hCG (humaan choriongonadotrofine) of zwangerschapshormoon gegeven. Dit zorgt ervoor dat de follikels verder uitrijpen en dat de eisprong ongeveer 36 uur later optreedt. Na deze 36 uur worden de follikels één voor één aangeprikt met een holle naald. Dit noemt men eicelcollectie of “pick-up”. Het follikelvocht wordt onmiddellijk onder een microscoop onderzocht in het IVF-laboratorium. Als een eicel gevonden wordt, wordt deze onmiddellijk in cultuurvloeistof geplaatst en vervolgens in de broedstoof. Op de dag van de pick-up wordt aan de man gevraagd om een vers spermastaal naar het laboratorium te brengen. Hieruit worden de meest beweeglijke en normale spermatozoa geconcentreerd.²²

Voor de klassieke IVF-methode (*in vitro* fertilisatie) worden 500 000 goed tot zeer beweeglijke spermacellen bij de eicellen gebracht. Wanneer er echter onvoldoende spermatozoa aanwezig zijn, wanneer hun beweeglijkheid niet voldoende is, of wanneer er teveel abnormale spermavormen in het staal aanwezig zijn, kan ICSI (intracytoplasmatische sperma injectie) toegepast worden. Bij deze behandeling wordt met behulp van een glazen buisje, één enkele spermacel opgepikt en in de eicel gebracht.²²

Bij het bepalen van de geschikte behandeling voor een paar met vruchtbaarheidsproblemen, wordt een vastgestelde procedure gevolgd (Figuur 5). Nadat er bij de man een verminderde vruchtbaarheid is vastgesteld (oligozoöpermie, asthenozoöpermie of teratozoöpermie), wordt nagegaan of er bij de vrouw tubaire infertiliteit vastgesteld kan worden. Dit betekent dat de eileiders vernauwd of verstopt zijn. Vervolgens is de gekozen behandeling afhankelijk van de concentratie, de beweeglijkheid en de morfologie van het sperma na opzuivering.²³



Figuur 5: Schema voor het bepalen van de geschikte behandeling voor paren met een vruchtbaarheidsprobleem. IMC = inseminating motile count (het totaal aantal goed beweeglijke spermatozoa na opzuivering); IVF = *in vitro* fertilisatie; ICSI = intracytoplasmatische sperma injectie; IUI = intra-uteriene inseminatie.²³

1.6 Proefopzet

Het doel van dit onderzoek is om na te gaan of er een verband aangetoond kan worden tussen de mate van HA-binding van spermatozoa en de uitkomst van een ART-behandeling. Aangezien men veronderstelt dat enkel rijpe spermatozoa met een goede morfologie en weinig genomische afwijkingen kunnen binden aan HA, is het nuttig om na te gaan of spermastalen met een grote mate van HA-binding ook betere resultaten geven met betrekking tot een ART-behandeling, in vergelijking met spermastalen met een lagere HA-binding. Als dit het geval zou zijn, kan HA-binding gebruikt worden als een diagnostische test voor sperma-analyse.

Het onderzoek wordt opgedeeld in drie studies. Een eerste studie is een voorbereidende, technische studie waarin de mogelijke invloed van het invriezen en ontdooien van zaadcellen op HA-binding van de spermatozoa wordt onderzocht. In de tweede studie wordt het verband tussen HA-binding en drie sperma parameters, namelijk concentratie, beweeglijkheid en morfologie, nagegaan. De derde studie is een prospectief gerandomiseerde studie waarin het mogelijke verband wordt gezocht tussen HA-binding en de uitkomst van een ART-behandeling.

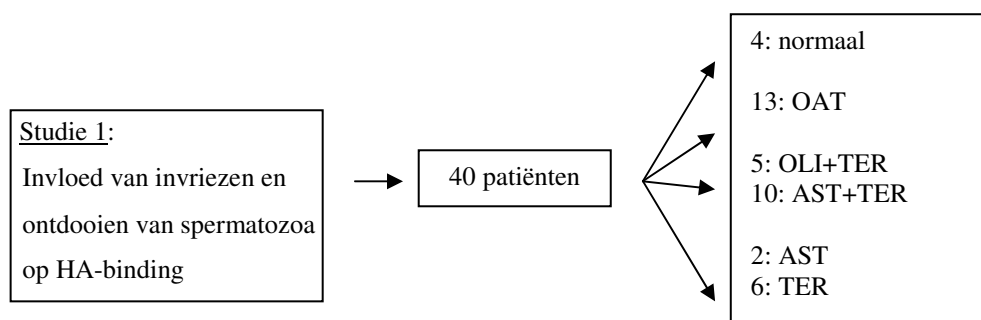
2. Materiaal en methoden

2.1 Patiëntenpopulatie

De patiënten die in deze studie opgenomen werden, zijn paren met een vruchtbaarheidsprobleem die zich aangemeld hebben op de dienst Fertiliteit van het Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL). Er werden enkel paren opgenomen waarbij een IVF en/of ICSI behandeling werd opgestart. Hieruit werden vervolgens de patiënten geselecteerd die een 1^e poging zouden ondergaan.

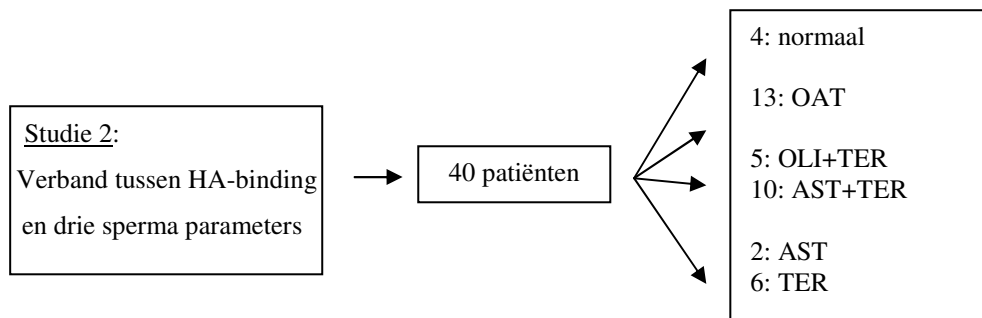
De mannelijke patiënten werden ingedeeld in groepen op basis van de kwaliteit van hun spermastaal. Deze kwaliteit wordt vastgesteld via 3 parameters, namelijk concentratie, beweeglijkheid en morfologie van de spermatozoa in het staal. Volgens Ombelet et al. is een concentratie van 34×10^6 spermatozoa/ml of meer een geschikte referentiewaarde voor normaal sperma. Als een patiënt sperma met een lagere concentratie heeft, noemt men dit oligozoöpermie. De referentiewaarde voor de beweeglijkheid van een spermastaal is 45% of meer beweeglijke spermatozoa. Als een staal niet aan deze voorwaarde voldoet, wordt dit asthenozoöpermie genoemd. De referentiewaarde voor morfologie is vastgelegd op 10% of meer normale vormen. Bij een staal dat lager scoort, spreekt men van teratozoöpermie.²³

Voor de eerste studie, met betrekking tot de invloed van invriezen en ontdooien op HA-binding, werden 40 patiënten opgenomen (Figuur 6). Van deze 40 patiënten hadden er 4 normale spermawaarden, 13 patiënten hadden OAT (oligoasthenoteratozoöpermie), 15 patiënten hadden een combinatie van 2 afwijkende parameters en 8 patiënten hadden spermastalen met 1 afwijkende parameter.



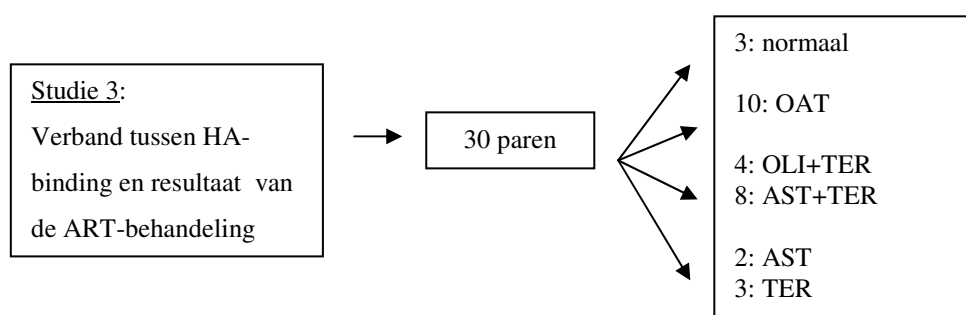
Figuur 6: Aantal patiënten die werden opgenomen in de eerste studie. OLI = oligozoöpermie (spermaconcentratie lager dan de referentiewaarde); AST = asthenozoöpermie (beweeglijkheid lager dan de referentiewaarde); TER = teratozoöpermie (morfologie slechter dan de referentiewaarde); OAT = oligoasthenoteratozoöpermie (alle drie de parameters zijn slechter dan de referentiewaarden).

Voor de tweede studie, waarin het verband wordt nagegaan tussen HA-binding en de concentratie, beweeglijkheid en morfologie van de spermatozoa, werden spermastalen van dezelfde 40 patiënten gebruikt (Figuur 7).



Figuur 7: Aantal patiënten die werden opgenomen in de tweede studie. OLI = oligozoöspermie (spermaconcentratie lager dan de referentiewaarde); AST = asthenozoöspermie (beweeglijkheid lager dan de referentiewaarde); TER = teratozoöspermie (morfologie slechter dan de referentiewaarde); OAT = oligoasthenoteratozoöspermie (alle drie de parameters zijn slechter dan de referentiewaarden).

In de derde studie, waarin een mogelijk verband wordt gezocht tussen de HA-binding en de uitkomst van een ART-behandeling, werden 30 paren opgenomen (Figuur 8). Er werd gestart met de 40 patiënten van studie 1 en 2, maar hiervan konden er 10 niet meegenomen worden in deze studie. De redenen hiervoor zijn dat deze patiënten gestopt zijn omwille van een gefaalde stimulatie, of naar een andere behandeling zijn overgegaan. Van de 30 overblijvende patiënten hadden 3 mannen normale spermastalen, 10 mannen hadden OAT, 12 hadden een combinatie van 2 afwijkende parameters en 5 mannen hadden een spermastaal met 1 afwijkende parameter.



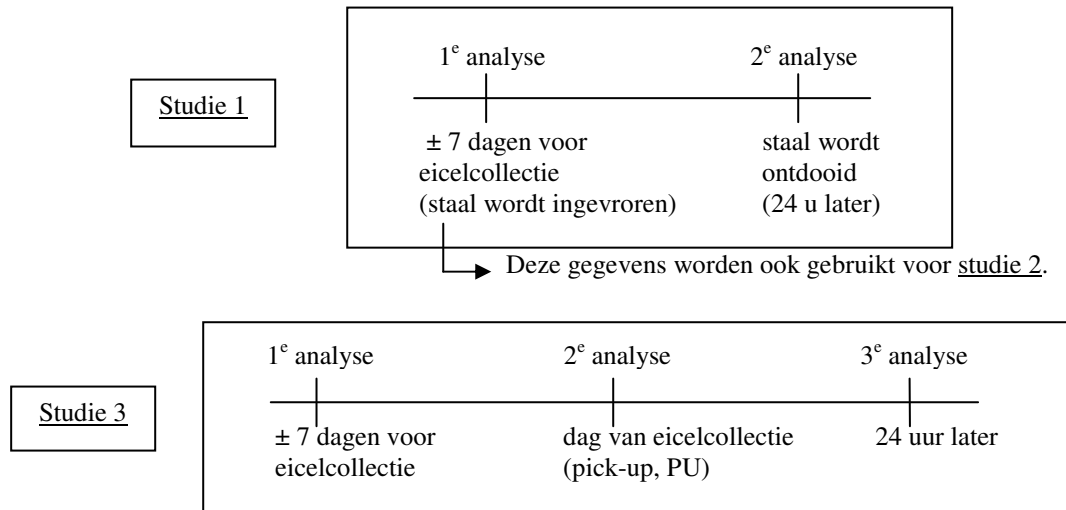
Figuur 8: Aantal paren die werden opgenomen in de tweede studie. OLI = oligozoöspermie (spermaconcentratie lager dan de referentiewaarde); AST = asthenozoöspermie (beweeglijkheid lager dan de referentiewaarde); TER = teratozoöspermie (morfologie slechter dan de referentiewaarde); OAT = oligoasthenoteratozoöspermie (alle drie de parameters zijn slechter dan de referentiewaarden).

2.2 Staalname

De stalen werden geproduceerd door masturbatie, na een abstinentieperiode van 2 tot 3 dagen. Tijdens het transport werden de spermastalen op lichaamstemperatuur bewaard. In het laboratorium werden de stalen onmiddellijk op een rotor geplaatst voor homogenisatie en op kamertemperatuur bewaard tot aan de analyse, die binnen het uur gebeurde. De mannen waren niet ziek of vertoonden geen koorts en namen ook geen medicatie gedurende 2 weken voor het onderzoek.

2.3 Organisatie van het onderzoek

Ongeveer 5 tot 7 dagen vóór de eicelcollectie brengt de patiënt een spermastaal binnen. Dit staal wordt geanalyseerd en vervolgens ingevroren, in functie van de eerste studie. Een dag later wordt dit staal ontdooid en opnieuw geanalyseerd. Voor de tweede studie worden de gegevens van de eerste analyse van de spermastalen van de eerste studie gebruikt. Voor de derde studie gebeurt de volgende analyse met het verse staal dat geproduceerd wordt op de dag van de eicelcollectie. Dit staal wordt dan tenslotte nog eens geanalyseerd na capacitatie, 24 uur later (Figuur 9).



Figuur 9: Tijdstippen waarop de analyses van de spermastalen gebeuren. Tijdstippen waarop de analyses gebeuren tijdens de eerste en tweede studie (boven) en tijdens de derde studie (onder).

2.4 Onderzochte parameters van het spermastaal

Om de kwaliteit van het spermastaal te beoordelen worden er vijf parameters onderzocht die behoren tot het standaard spermaonderzoek. Tot deze parameters behoren volume, viscositeit, beweeglijkheid, concentratie en morfologie. Het volume en de viscositeit worden

macroscopisch nagegaan, voor de andere drie parameters gebruikt men microscopische technieken.

2.4.1 Volume

Het grootste deel van het volume bestaat uit secreties van de prostaat en de seminale vesikels. Het volume van het epididymale vocht, dat de spermatozoa bevat, is eerder beperkt. De referentiewaarde voor een normaal volume is ongeveer 2,0 ml.²⁴ Een kleiner volume kan een indicatie zijn voor een tekort aan prostaatvocht of vocht van de seminale vesikels. Aangezien deze secreties een belangrijke functie bezitten in verband met de beweeglijkheid en voeding van de spermatozoa, is het mogelijk dat een tekort hieraan ongunstig is voor een natuurlijke bevruchting.²⁵

2.4.2 Viscositeit

Vers geëjaculeerd sperma vormt een semi-vaste gel door de aanwezigheid van semenogeline, een eiwit dat overvloedig aangemaakt wordt in de seminale vesikels. Na ejaculatie wordt dit eiwit afgebroken door het PSA protease (prostaat-specifiek antigeen), wat resulteert in de vervloeiing van het spermastaal.²⁶ De viscositeit van het staal wordt gemeten na de vervloeiing, door het sperma op te zuigen met een pipet en het daarna terug in de beker te pipetteren. Als hierbij lange draden gevormd worden, wijst dit op een hoge viscositeit wat kan interfereren bij de bepaling van de beweeglijkheid en concentratie van het staal.²⁴

2.4.3 Beweglijkheid

Om de beweeglijkheid van de spermatozoa in het spermastaal na te gaan, brengt men 15 µl van het staal aan op een draagglaasje en men bekijkt dit onder een microscoop op vergroting 40X. Men telt vervolgens 100 spermatozoa en geeft hen een gradering 'a', 'b', 'c' of 'd'. De gradering 'a' staat voor een snelle, progressieve beweeglijkheid van meer dan 25 µm per seconde, of minstens tweemaal de koplengte per seconde. Gradering 'b' betekent een trage, progressieve beweeglijkheid. Een niet-progressieve beweeglijkheid van minder dan 5 µm per seconde krijgt een gradering 'c'. Onbeweeglijkheid tenslotte wordt aangeduid met gradering 'd'.²⁴

2.4.4 Concentratie

De vierde parameter die onderzocht wordt is de concentratie van de spermatozoa in het spermastaal. Dit gebeurt met behulp van een Neubauer telkamer. Tijdens het tellen van de beweeglijkheid van het staal, maakt men een schatting van het aantal spermatozoa in één veld. Deze schatting wordt gebruikt om de nodige verdunning van het staal te bepalen (Tabel 1). Van elk staal worden 2 verdunningen gemaakt, ter controle. Vervolgens wordt het dekglasje aangebracht op de telkamer en worden de 2 kamers geladen met ongeveer 10 µl staal, gebruik makend van de twee aparte verdunningen. Hierna laat men de telkamer een aantal minuten rusten zodat de spermatozoa kunnen sedimenteren. Gedurende deze tijd wordt de telkamer in een vochtige kamer geplaatst om uitdroging te voorkomen. Vervolgens telt men het aantal spermatozoa in het centrale rooster van de telkamer. Dit bestaat uit 25 grote vierkanten die elk opgebouwd zijn uit 16 kleinere vierkanten. Voor stalen die minder dan 10 spermatozoa in het eerste grote vierkant bevatten, telt men alle 25 vierkanten; voor stalen die 10 tot 40 spermatozoa bevatten telt men 10 grote vierkanten; voor stalen die meer dan 40 spermatozoa bevatten in het eerste grote vierkant telt men slechts 5 grote vierkanten. Dit doet men ook in de 2^e kamer. Om de concentratie te berekenen, neemt men het gemiddelde van de 2 tellingen en dit vermenigvuldigt men met de juiste omzettingsfactor (Tabel 1).²⁴

Tabel 1: In de tabel is weergegeven welke verdunningen er gemaakt moeten worden en welke omzettingsfactor men moet gebruiken om de concentratie te berekenen.²⁴

# spermatozoa per veld	Verdunning (µl staal + µl water)	Omzettingsfactoren		
		# getelde grote vierkanten		
		5	10	25
<15	1:5 (50+200)	0,25	0,125	0,05
15-40	1:10 (50+450)	0,5	0,25	0,1
40-200	1:20 (50+950)	1	0,5	0,2
>200	1:50 (50+2450)	2,5	1,25	0,5

2.4.5 Morfologie

De laatste parameter die onderzocht wordt is de morfologie van de spermatozoa. Hiertoe maakt men van elk staal 2 uitstrijkjes die vervolgens gekleurd worden met de Papanicolaou-kleuring. Om het staal te wassen, wordt EBSS (Earle's balanced salt solution) toegevoegd en vervolgens wordt er 5 minuten gecentrifugeerd bij 343g. Hierna wordt het supernatans afgegoten. Om goed te kunnen tellen zorgt men best voor een concentratie van ongeveer 40×10^6 spermatozoa/ml, wat overeenkomt met 40 spermatozoa per beeld. Indien nodig moet

het gewassen staal dus verdund worden. Om het uitstrijkje te maken brengt men 20 µl van het staal aan op een draagglasje. Met een dekglasje spreidt men vervolgens het staal uit over het oppervlak. Nadat men het draagglasje heeft laten drogen, kan men de Papanicolaou-kleuring uitvoeren. De 3 kleurstoffen die hierbij gebruikt worden zijn Harris's haematoxyline, Orange G6 en Polychromatisch EA50 (Merck, Duitsland). De Papanicolaou-kleuring geeft een goede kleuring van de spermatozoa en andere cellen. Het kleurt de acrosomale en post-acrosomale gebieden van de kop, de cytoplasmatische druppel, het middenstuk en de staart. De kop wordt lichtblauw gekleurd in het acrosomale gebied en donkerblauw in het post-acrosomale gebied. Het middenstuk vertoont een rode kleur, en de staart kleurt ook blauw of roodachtig. De cytoplasmatische druppels die zich meestal achter de kop en rond het middenstuk bevinden, krijgen een groene kleur met de Papanicolaou-kleuring.²⁴ Per uitstrijkje worden er 100 spermatozoa geteld en beoordeeld op hun morfologie. Deze telling gebeurt bij een vergroting van 100X en met behulp van immersie-olie. Na telling van de 2 uitstrijkjes, neemt men hiervan het gemiddelde.

2.5 Hyaluronan-binding assay (HBA test)

De HA-binding van de spermatozoa wordt onderzocht door middel van de HBA test. Deze assay classificeert spermatozoa als rijp, gebaseerd op de proportie van beweeglijke spermatozoa in het staal die kunnen binden aan de hyaluronzuurlaag. Deze capaciteit om te binden wordt slechts laat tijdens de spermatogenese verworven en duidt op een succesvolle vervollediging van de spermiogenische gebeurtenissen.

2.5.1 Uitvoering van de test

Het staal waarmee de test moet worden uitgevoerd, moet geproduceerd worden door masturbatie na een abstinentie periode van 2 tot 3 dagen. Het staal moet opgevangen worden in een steriele, droge beker en moet gedurende 30 minuten op kamertemperatuur bewaard worden zodat het kan vervloeien. De test moet uitgevoerd worden binnen de 3 uur na productie van het staal. Ook de test zelf moet op kamertemperatuur (20-30°C) uitgevoerd worden. De test wordt uitgevoerd met de HBA testglasjes van BIOCOAT (Fort Washington, PA, USA) (Figuur 10). Een testglasje bestaat uit 2 kamers, A en B, die bedekt zijn met een laag hyaluronzuur. Het staal wordt opgemengd en er wordt 10 µl in het midden van de kamer gepipetteerd (zie pijl). Vervolgens wordt het CELL-VU dekglasje, dat voorzien is van een

rooster met 100 vakjes, voorzichtig over de kamer geplaatst, zodat de vorming van luchtbellen vermeden wordt.



Figuur 10: Het HBA testglaasje (links) met een CELL-VU dekglasje (rechts). Een testglaasje bevat 2 kamers (A en B) die bedekt zijn met een hyaluronzuurlaag. Het dekglasje bevat een rooster met 100 vierkantjes.

Vervolgens laat men het HBA testglaasje gedurende 10 minuten rusten op kamertemperatuur. Hierna telt men het aantal gebonden, beweeglijke spermatozoa en het aantal ongebonden, beweeglijke spermatozoa in hetzelfde aantal vakjes. De gebonden spermatozoa zijn gemakkelijk te onderscheiden van de ongebonden spermatozoa door hun bewegende staarten met koppen die geen progressieve beweging maken (Figuur 11). Deze staartbeweging differentieert ook de gebonden, beweeglijke spermatozoa van de niet-beweeglijke spermatozoa die geen staartbeweging vertonen. Beweeglijke spermatozoa die niet gebonden zijn aan hyaluronzuur zwemmen vrij rond.



Figuur 11: Onderscheid tussen gebonden, motiele spermatozoa en vrije, motiele spermatozoa.

De gebonden spermatozoa kan men herkennen door hun bewegende staarten, en koppen die geen progressieve beweging maken. De niet-gebonden spermatozoa zwemmen vrij rond.

Het percentage hyaluronzuur-bindende spermatozoa kan nu met de volgende formule berekend worden:

$$\% \text{ gebonden} = 100 \times \frac{\text{aantal gebonden beweeglijke spermatozoa}}{\text{totaal aantal beweeglijke spermatozoa}}$$

2.5.2 Precisie van de test

De precisie van deze test is gerelateerd aan het aantal spermatozoa dat geteld kan worden. Als het totale aantal gebonden en ongebonden beweeglijke spermatozoa tussen 100 en 200 ligt, is de variatiecoëfficiënt van het resultaat ongeveer 5%. Wanneer er minder spermatozoa geteld kunnen worden, resulteert dit in hogere varianties. De resultaten zijn aanvaardbaar als er minstens 30 totale motiele spermatozoa geteld kunnen worden.²¹

2.5.3 Interpretatie van de resultaten

Volgens Huszar et al. is het niet nodig dat alle spermatozoa in staat zijn om te binden aan HA, om de fertiliteit van een staal te kunnen voorspellen. De proportie van spermatozoa die kunnen binden moet een efficiënt niveau bereiken om een goede kans op bevruchting te maken, maar binding boven dit niveau leidt waarschijnlijk niet tot verbetering van de fertiliteit. Gebaseerd op correlaties met de morfologie van normale spermatozoa, is de grenswaarde van HA-binding die onderscheid maakt tussen hogere en lagere verwachting van fertiliteit geschat op ongeveer 80%.²¹

Tabel 2: Interpretatie van de resultaten van de HBA test. Een spermastaal waarbij 80% of meer spermatozoa aan HA binden, wordt beschouwd als sperma met een normale maturiteit en fysiologische werking. Een staal waarbij de binding aan HA lager is dan 80% wordt beschouwd als een staal met verminderde maturiteit en fysiologische werking.²¹

HBA score (% binding)	Interpretatie
≥ 80% binding	Normale maturiteit en fysiologische werking
< 80% binding	Verminderde maturiteit en fysiologische werking

2.6 Het invriezen van sperma

Het vers spermastaal wordt op kamertemperatuur bewaard zodat het kan vervloeien. Hierna moet het invriezen zo vlug mogelijk gebeuren. Eerst worden de rietjes (High Security cotton-plugged straws, 0.3ml, Cryo Bio system, Frankrijk), waarin het sperma zal worden ingevroren, klaargezet. Elk rietje wordt voorzien van een gekleurd identificatiestrookje waarop de naam en de geboortedatum van de patiënt worden genoteerd. Per patiënt worden er 2 rietjes ingevroren. Het is belangrijk dat er een evengrote hoeveelheid cryoprotectant aan het staal wordt toegevoegd, en dat deze toevoeging langzaam gebeurt. Dit betekent dat men voor

het vullen van 2 rietjes 0,4 ml sperma en 0,4 ml cryoprotectant (Sperm Cryoprotect, Nidacon International, Zweden) nodig heeft. Dit cryoprotectant is een geelachtige, steriele zoutoplossing die glycerol en HSA (humaan serum albumine) bevat, en die optimaal is voor het invriezen van sperma. De laatste stap is het vullen van de rietjes. Met behulp van een spuit wordt het sperma opgezogen. De rietjes worden dan afgesloten door de uiteindes dicht te smelten. Om de rietjes in te vriezen in vloeibare stikstof worden ze in canisters geplaatst, die ook voorzien worden van de naam en geboortedatum van de patiënt en de kleur van het identificatiestrookje. Het afkoelen moet geleidelijk gebeuren. Eerst worden de canisters met de rietjes gedurende één uur in een koelkast op 4°C geplaatst. Vervolgens worden ze gedurende 30 minuten boven vloeibare stikstof geplaatst. Hierna mogen ze in een stikstofvat bewaard worden op -196°C. Sperma kan op deze manier gedurende vele jaren bewaard worden.

2.7 Het ontdooien van sperma

De 2 rietjes die per patiënt ingevroren werden, worden uit de stikstofvaten gehaald en ontsmet met incidine (Ecolab, Minnesota). Voor elk spermastaal wordt een falconbuis gevuld met 9 ml EBSS (Earle's balanced salt solution) en 1 ml HSA (humaan serum albumine; Vitrolife, Zweden). De rietjes worden aan beide zijden opengeknipt met een steriele schaar en de inhoud wordt overgebracht in de falconbuis. Vervolgens worden de stalen gedurende 10 minuten gecentrifugeerd aan 343g. Hierna wordt het supernatans afgegoten, zodat men het gewassen sperma overhoudt.

2.8 Het opzuiveren van een spermastaal voor de IVF en/of ICSI behandeling

Op de dag van de eicelcollectie, moet de man een vers spermastaal produceren dat gebruikt zal worden voor de ART-behandeling. Om deze behandeling uit te voeren, moet het staal eerst opgezuiverd worden. Het sperma wordt op een P90-P70-P40 gradiënt (Percoll 90%, 70% en 40%, Sigma-Aldrich, België) gezet en vervolgens 20 minuten gecentrifugeerd op 343g. Percoll is een medium dat geschikt is als dichtheidsgradiënt voor de centrifugatie van cellen. Het bestaat uit colloïdale silica partikels die bedekt zijn met PVP (polyvinylpyrrolidone). Deze PVP laag maakt Percoll volledig non-toxisch, zodat het geschikt is om te gebruiken voor biologische materialen.

Na deze centrifugatie moet het staal nog tweemaal gewassen worden. Het pellet op de bodem van de buis wordt opgezogen en in 10 ml G-SPERM (Vitrolife, Zweden) gepipetteerd. Dit is een wasmedium, gesupplementeerd met HSA. Hierna wordt er 10 minuten gecentrifugeerd op 343g. Het supernatans wordt afgegoten en er wordt opnieuw 10 ml G-SPERM, gesupplementeerd met HSA, toegevoegd. Vervolgens wordt er opnieuw 10 minuten gecentrifugeerd op 343g. Als laatste stap wordt het supernatans weer verwijderd en wordt G-FERT PLUS (Vitrolife, Zweden) toegevoegd, waarin het pellet geresuspendeerd wordt. Hierna wordt het staal in de broedstoof geplaatst (36,5°C) tot aan de IVF en/of ICSI behandeling. Het resterende staal, dat overblijft na de inseminatie, wordt in een gesloten buisje op kamertemperatuur bewaard zodat het 24 uur later voor een laatste keer geanalyseerd kan worden.

2.9 Parameters voor het beoordelen van bevruchting

Tijdens de pick-up wordt het follikelvocht onderzocht in het laboratorium op de aanwezigheid van eicellen. Deze eicellen worden ook onmiddellijk microscopisch onderzocht om de rijpheid na te gaan. Enkel de rijpe eicellen (metafase II, MII) worden gebruikt voor inseminatie met sperma. Vervolgens wordt de IVF en/of ICSI behandeling (Figuur 5) uitgevoerd met het opgezuiverde sperma. Na 24 uur wordt dan de bevruchting gecontroleerd. Dit wordt weergegeven in het aantal pronucleï dat men in elke eicel kan waarnemen. Bij een normale bevruchting is dit aantal twee, één mannelijke pronucleus en één vrouwelijke pronucleus (2PN). Dit aantal kan ook afwijkend zijn, bijvoorbeeld 1, 3 of meer, en dit wordt dan weergegeven als XPN.

Vanaf de tweede dag na de bevruchting wordt de kwaliteit van het embryo bepaald. Een grade A embryo heeft regelmatige cellen en geen fragmentatie of granulariteit. Een embryo met cellen die minder regelmatig gevormd zijn en minder dan 15% fragmentatie, wordt een grade B embryo genoemd. Embryo's die nog meer gefragmenteerd zijn en die vacuolen bevatten, worden grade C en D genoemd. In deze studie wordt enkel bijgehouden hoeveel goede embryo's (grade A en B) er gevormd zijn. Deze beoordeling van de kwaliteit gebeurt ook op dag 3. Vanaf de vierde dag na de bevruchting spreekt men van een morula. Een volledig gecompacteerd embryo met intercellulaire verbindingen wordt grade A genoemd. Een gecompacteerd embryo, waarbij niet alle cellen (<15%) geïncubeerd zijn in de morula, noemt men grade B. Op de vijfde dag ontstaat er dan een blastocyst.

Na de terugplaatsing van één of meerdere embryo's, duurt het 12 dagen vooraleer men kan vaststellen of het embryo zich ingenesteld heeft. Dit gebeurt door een bloedonderzoek waarbij men de waarde van hCG (humaan choriongonadotrofine), het zwangerschapshormoon, nagaat.

2.10 Statistische analyse

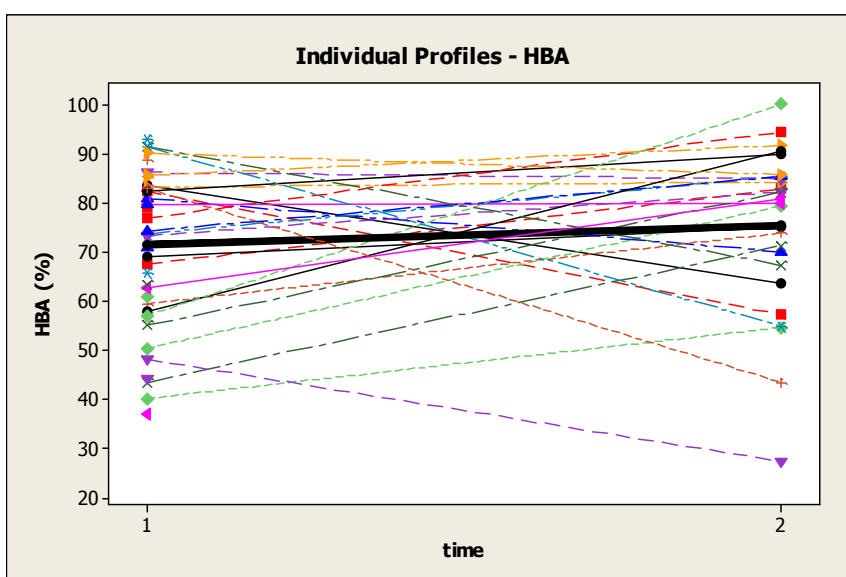
Voor de statistische analyse van de resultaten van de eerste studie wordt gebruik gemaakt van Pearson correlatiecoëfficiënten en de gepaarde t-test. De resultaten van de tweede studie worden geanalyseerd met lineair gemengde modellen en Pearson correlatiecoëfficiënten. Voor de derde studie wordt gebruik gemaakt van logistische regressie en de Chi-kwadraat test. Als de p-waarde kleiner is dan 0,05 worden de resultaten als significant beschouwd.

3. Resultaten

Het doel van deze studie is om na te gaan of de HBA test gebruikt kan worden als een diagnostische test voor de analyse van sperma. Eerst wordt de invloed van het invriezen en ontdooien van een spermastaal op de HA-binding onderzocht. Vervolgens wordt er een mogelijk verband gezocht tussen de HA-binding van spermatozoa en de drie belangrijkste sperma parameters, namelijk concentratie, beweeglijkheid en morfologie. Als laatste wordt het verband gezocht tussen HA-binding en de uitkomst van de IVF en/of ICSI behandeling.

3.1 Invloed van invriezen en ontdooien op de HA-binding

Om na te gaan of het invriezen van een spermastaal invloed heeft op de HA-binding van de spermatozoa, werden de spermastalen van 40 patiënten gebruikt. De verse stalen werden geanalyseerd en vervolgens ingevroren en weer ontdooid, waarna de tweede analyse gebeurde. Voor de statistische analyse werd gebruik gemaakt van Pearson correlatiecoëfficiënten en de gepaarde t-test.



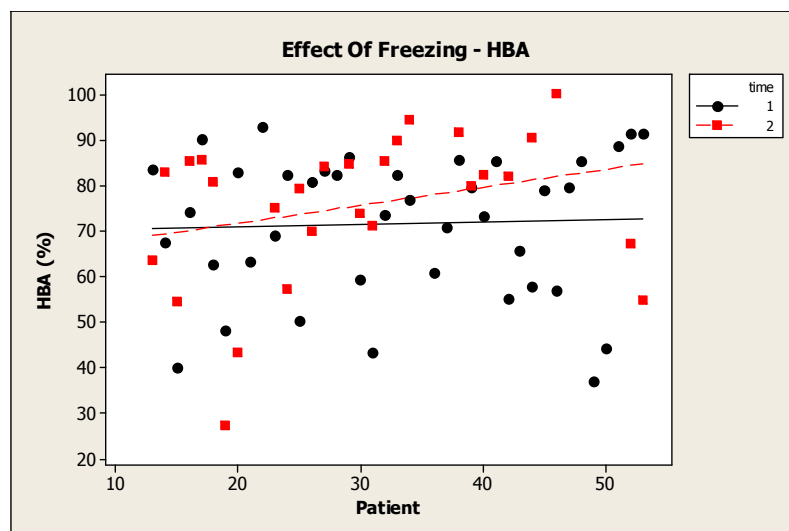
Figuur 12: HA-binding van de spermastalen voor en na invriezen. In de figuur is de HA-binding van de spermastalen voor en na invriezen weergegeven. In de x-as zijn de tijdstippen weergegeven (1 = voor invriezen, 2 = na invriezen). In de y-as is de HA-binding in percentages weergegeven.

In figuur 12 zijn de individuele profielen van de HA-binding voor en na invriezen weergegeven voor de totale patiëntenpopulatie, samen met het gemiddelde profiel (zwarte

lijn). Het gemiddelde bindingspercentage is ongeveer 71% voor invriezen en 76% na invriezen. Hieruit kan al afgeleid worden dat het invriezen en ontdooien van sperma geen grote invloed heeft op de HA-binding.

De correlatiecoëfficiënt voor de HA-binding voor en na invriezen is 0,117. De p-waarde is 0,561 en dus niet significant verschillend. Hieruit kan men besluiten dat invriezen en ontdooien van sperma geen significante invloed heeft op de HA-binding.

Het verschil tussen de gemiddelde waarden van de HA-binding voor invriezen en na invriezen is -0,041 (p-waarde = 0,327). Uit deze niet-significante p-waarde van de gepaarde t-test kan afgeleid worden dat het invriezen en ontdooien geen invloed heeft op de HA-binding van een spermastaal. Dit is ook af te leiden uit figuur 13. Hierin zijn de afzonderlijke waarden van de HA-binding voor en na invriezen weergegeven per patiënt. De gemiddelden van de HA-binding voor en na invriezen, weergegeven door de zwarte en rode lijn, liggen dicht bij elkaar en verhouden zich dus ongeveer hetzelfde.



Figuur 13: De invloed van invriezen en ontdooien van sperma op de HA-binding. In de figuur zijn de afzonderlijke gegevens van de HA-binding voor en na invriezen weergegeven per patiënt. De HA-binding in percentages is weergegeven in de y-as.

3.2 Verband tussen HA-binding en de drie sperma parameters

Het doel van deze analyse is om na te gaan of er een mogelijk verband bestaat tussen de HA-binding van de spermatozoa en de concentratie, beweeglijkheid en morfologie van de spermatozoa in een spermastaal. Hiervoor werden de spermastalen van 40 patiënten geanalyseerd. Omdat volgens Huszar et al. het efficiënte niveau van hyaluronzuurbinding van spermatozoa 80% bedraagt, wordt de patiëntenpopulatie onderverdeeld in 2 groepen.²¹ De

eerste groep bestaat uit de patiënten met een HA-binding kleiner dan 80%. De tweede groep bevat de patiënten waarbij 80% of meer spermatozoa binden aan hyaluronzuur. Voor de statistische analyse werd gebruik gemaakt van lineair gemengde modellen en Pearson correlatiecoëfficiënten.

3.2.1 Verband tussen HA-binding en concentratie

In tabel 3 zijn de gemiddelde waarden van de concentratie en HA-binding weergegeven voor de totale patiëntenpopulatie, ingedeeld op basis van de kwaliteit van de spermastalen. In tabel 4 is de totale populatie opgedeeld in 2 groepen, op basis van de HA-binding. Er werd enkel een statistische analyse uitgevoerd voor de totale patiëntenpopulatie, de patiënten met een HA-binding kleiner dan 80% en de patiënten met een HA-binding van 80% of meer.

Tabel 3: Samenvattende tabel met de gemiddelde concentratie en HA-binding van de totale patiëntenpopulatie, ingedeeld op basis van de kwaliteit van de spermastalen.

	Aantal patiënten	Gemiddelde concentratie	Gemiddelde HA-binding (%)
NORM	4	83.19	61
OAT	13	20.91	72
OLI+TER	5	22.75	76
AST+TER	10	62.85	75
AST	2	78.00	71
TER	6	128.42	69

Tabel 4: Samenvattende tabel met de gemiddelde concentratie en HA-binding, weergegeven voor de drie onderzochte patiëntengroepen.

	Aantal patiënten	Gemiddelde concentratie	Gemiddelde HA-binding (%)
Totale patiëntenpopulatie	40	56.83	72
HA-binding <80%	24	68.13	62
HA-binding ≥80%	16	39.89	86

In tabel 5 zijn de Pearson correlatiecoëfficiënten weergegeven. De correlatiewaarde voor de totale patiëntenpopulatie is -0,253 en de p-waarde is 0,039. Er werd een dus negatieve significante correlatie gevonden: hoe hoger de HA-binding is, hoe lager de concentratie is, en omgekeerd. Dit kan ook afgeleid worden uit tabel 4, waar de patiëntengroep met een binding van 80% of meer de laagste gemiddelde concentratie heeft. Voor de patiëntengroep met een HA-binding van minder dan 80% is de correlatiewaarde -0,269 en de p-waarde is 0,204. Voor de groep patiënten met een HA-binding van 80% of meer is de correlatiewaarde 0,106 met

een p-waarde van 0,600. In deze twee groepen kan er dus geen significant verband tussen HA-binding en concentratie aangetoond worden.

Tabel 5: Pearson correlatiecoëfficiënten voor het verband tussen HA-binding en concentratie, weergegeven voor de totale patiëntenpopulatie, de patiëntengroep met een HA-binding van minder dan 80% en de patiënten met een binding van 80% of meer.

	Correlatie p-waarde	
Totale patiëntenpopulatie	-0.253	0.039*
HA-binding < 80%	-0.269	0.204
HA-binding ≥ 80%	0.106	0.600

Significante waarden worden aangeduid met een asterisk (*).

3.2.2 Verband tussen HA-binding en beweeglijkheid

In onderstaande tabel 6 zijn de waarden van de gemiddelde beweeglijkheid en de gemiddelde HA-binding weergegeven voor de totale patiëntenpopulatie, ingedeeld op basis van de kwaliteit van de spermastalen. In tabel 7 zijn de gemiddelde beweeglijkheid en de gemiddelde HA-binding weergegeven voor de drie onderzochte patiëntengroepen. De statistische analyse werd opnieuw enkel uitgevoerd voor deze drie groepen.

Tabel 6: Samenvattende tabel met de gemiddelde beweeglijkheid, ingedeeld in 4 klassen, en HA-binding van de totale patiëntenpopulatie, ingedeeld op basis van de kwaliteit van de spermastalen.

	Aantal patiënten	Gemiddelde beweeglijkheid				Gemiddelde HA-binding (%)
		A	B	C	D	
NORM	4	16	46	3	35	61
OAT	13	5	23	5	67	72
OLI+TER	5	18	37	4	41	76
AST+TER	10	6	22	4	68	75
AST	2	4	20	5	71	71
TER	6	15	37	4	44	69

Tabel 7: Samenvattende tabel met de gemiddelde beweeglijkheid, ingedeeld in 4 klassen, en HA-binding van de drie onderzochte patiëntengroepen.

	Aantal patiënten	Gemiddelde beweeglijkheid (%)				Gemiddelde HA-binding (%)
		A	B	C	D	
Totale patiëntenpopulatie	40	9	29	4	58	72
HA-binding < 80%	24	9	29	4	58	62
HA-binding ≥ 80%	16	9	29	5	57	86

De correlatiewaarden tussen HA-binding en de 4 klassen van beweeglijkheid voor de drie onderzochte patiëntengroepen zijn weergegeven in tabel 8. In de totale patiëntenpopulatie bestaat er voor klasse A en B een negatieve correlatie tussen HA-binding en beweeglijkheid, respectievelijk -0,143 en -0,117. De p-waarden van deze correlatiecoëfficiënten zijn 0,247 en 0,346. Voor klasse C, dit zijn de niet-progressieve spermatozoa, is er een positieve correlatiewaarde van 0,228 en een p-waarde van 0,063. Voor klasse D is de correlatie coëfficiënt 0,114. Hierbij is er ook een niet-significante p-waarde van 0,357 gevonden. Dit betekent dat er in de totale patiëntenpopulatie geen significant verband bestaat tussen HA-binding en de beweeglijkheid van spermatozoa.

Als we de totale patiëntenpopulatie onderverdelen in twee groepen, gebaseerd op de HA-binding, bekomen we voor de patiëntengroep met een binding van minder dan 80% ook enkel niet-significante p-waarden (Tabel 8). De correlatiewaarde voor klasse A is 0,021 (p-waarde = 0,924), die voor klasse B is -0,256 (p-waarde = 0,227), voor klasse C is dit 0,038 (p-waarde = 0,859) en voor klasse D is dit 0,171 (p-waarde = 0,424). Voor de patiëntengroep met een binding van 80% of meer vinden we ook enkel niet-significante p-waarden (Tabel 8). De correlatiewaarden voor klasse A is 0,091 (p-waarde = 0,653), die voor klasse B is 0,250 (p-waarde = 0,208), voor klasse C bekomen is dit 0,339 (p-waarde = 0,084) en voor klasse D bekomen we een negatieve correlatie van -0,257 (p-waarde = 0,196). Hieruit kan afgeleid worden dat er ook in deze twee groepen geen verband bestaat tussen HA-binding en beweeglijkheid van de spermatozoa.

Tabel 8: Pearson correlatiecoëfficiënten voor het verband tussen HA-binding en beweeglijkheid, weergegeven voor de totale patiëntenpopulatie en voor de patiëntengroepen ingedeeld op basis van HA-binding.

		Beweeglijkheid	Correlatie	p-waarde
Totale patiënten populatie	A		-0.143	0.247
	B		-0.117	0.346
	C		0.228	0.063
	D		0.114	0.357
HA-binding < 80%	A		0.021	0.924
	B		-0.256	0.227
	C		0.038	0.859
	D		0.171	0.424
HA-binding ≥ 80%	A		0.091	0.653
	B		0.250	0.208
	C		0.339	0.084
	D		-0.257	0.196

3.2.3 Verband tussen HA-binding en morfologie

Als laatste werd ook het verband tussen HA-binding en morfologie gezocht. In tabel 9 staan de gemiddelden van de gegevens over morfologie en HA-binding van de totale patiëntenpopulatie, ingedeeld op basis van de kwaliteit van het sperma. Deze totale populatie werd ook opgesplitst in twee groepen op basis van HA-binding, en deze gegevens staan in tabel 10.

Tabel 9: Samenvattende tabel met de gemiddelde morfologie en HA-binding van de totale patiëntenpopulatie, ingedeeld op basis van de spermakwaliteit. Voor de patiënten met asthenozoöspermie (AST) zijn geen gegevens over de morfologie bekend.

	Aantal patiënten	Gemiddelde morfologie^a	Gemiddelde HA-binding (%)
NORM	4	18	61
OAT	13	3	72
OLI+TER	5	7	76
AST+TER	10	4	75
AST	2	/	71
TER	6	4	69

^agemiddelde morfologie = het percentage spermatozoa met een normale vorm.

Tabel 10: Samenvattende tabel met de gemiddelde morfologie en HA-binding van de drie patiëntengroepen, ingedeeld op basis van HA-binding.

	Aantal patiënten	Gemiddelde morfologie^a	Gemiddelde HA-binding (%)
Totale patiëntenpopulatie	40	5.0	72
HA-binding < 80%	24	6.2	62
HA-binding ≥ 80%	16	4.3	86

^agemiddelde morfologie = het percentage spermatozoa met een normale vorm.

In tabel 11 zijn de Pearson correlatiecoëfficiënten weergegeven voor de totale patiëntenpopulatie en voor de twee patiëntengroepen die ingedeeld zijn op basis van HA-binding. De correlatiewaarde voor HA-binding en morfologie in de totale populatie is -0,033. De p-waarde is 0,821. Dit is een zeer lage correlatie, en bovendien niet-significant. Er kan dus geen verband vastgesteld worden tussen de HA-binding en de morfologie van een spermastaal in de totale patiëntenpopulatie. Voor de patiëntengroep met een HA-binding van minder dan 80% is de correlatiecoëfficiënt 0,113 en de p-waarde is 0,646. Voor de patiëntengroep met een HA-binding van 80% of meer is de correlatiewaarde -0,057 en de p-waarde 0,805. Ook in deze twee groepen kan dus geen verband aangetoond worden tussen HA-binding en morfologie van de spermatozoa.

Tabel 11: Pearson correlatiecoëfficiënten voor het verband tussen HA-binding en morfologie, weergegeven voor de drie onderzochte patiëntengroepen.

	Correlatie	p-waarde
Totale patiëntenpopulatie	-0.033	0.821
HA-binding < 80%	0.113	0.646
HA-binding \geq 80%	-0.057	0.805

3.3 Verband tussen HA-binding en de uitkomst van de ART-behandeling

In dit deel van de studie werden 30 paren met een vruchtbaarheidsprobleem opgenomen, die een eerste IVF en/of ICSI behandeling zouden ondergaan. Het doel is om na te gaan of er eerst en vooral een verband aangetoond kan worden tussen de HA-binding van spermatozoa en het bevruchtend vermogen van het sperma. Vervolgens wordt onderzocht of er een verband bestaat tussen de HA-binding en de kwaliteit van de ontwikkelende embryo's. Als laatste wordt dan bepaald of het uiteindelijke resultaat, het al dan niet bekomen van een zwangerschap, gerelateerd kan worden aan de HA-binding.

3.3.1 Verband tussen HA-binding en het bevruchtend vermogen van sperma

Het bevruchtend vermogen van een spermastaal wordt bepaald aan de hand van het aantal normaal bevruchte eicellen, bekomen door een IVF of ICSI behandeling. De gegevens van de totale patiëntenpopulatie, ingedeeld op basis van de spermakwaliteit, zijn hieronder weergegeven in een samenvattende tabel (Tabel 12).

Tabel 12: Samenvattende tabel met gegevens over het aantal eicellen, het bevruchtend vermogen van de spermastalen en de HA-binding van de totale patiëntenpopulatie.

	Aantal patiënten	Gem # eicellen ^a	Gem # MII eicellen ^b	Aantal en percentage 2PN ^c	Aantal en percentage XPN ^d	HA-binding ^e (%)
NORM	3	6.3	5.7	4/17 (24%)	1/17 (6%)	83
OAT	10	7.4	6.9	37/69 (54%)	14/69 (20%)	72
OLI+TER	4	5.8	5.3	14/21 (67%)	0/21 (0%)	68
AST+TER	8	6.0	4.8	28/38 (74%)	4/38 (11%)	84
AST	2	8.5	7.0	8/14 (57%)	2/14 (14%)	76
TER	3	4.7	3.7	8/11 (73%)	0/11 (0%)	85
TOTAAL ^f	30	195	170 (87%)	99/170 (58%)	21/170 (12%)	77

^aGem # eicellen = het gemiddeld aantal eicellen per patiënt, weergegeven voor elke patiëntengroep;

^bGem # MII eicellen = het gemiddeld aantal metafase II eicellen per patiënt, weergegeven voor elke patiëntengroep;

^cAantal en percentage 2PN = het aantal normaal bevruchte eicellen per totaal aantal

bevruchte eicellen; ^dAantal en percentage XPN = het aantal abnormaal bevruchte eicellen per totaal aantal bevruchte eicellen. ^eHA-binding = gemiddelde van de HA-binding op de dag van pick-up, weergegeven in percentage en per patiëntengroep. ^fTOTAAL = het totaal aantal eicellen, MII eicellen, 2PN en XPN in de volledige patiëntenpopulatie.

In de patiëntengroep met normale spermawaarden werden er bij de vrouwen gemiddeld 6 eicellen weggenomen, die allemaal metafase II eicellen waren. Na inseminatie met het sperma, waren er 4 van de 17 eicellen normaal bevrucht, wat overeenkomt met 24%. 1 van de 17 eicellen (6%) was abnormaal bevrucht. De gemiddelde HA-binding in deze groep was 83%. In de groep met OAT patiënten werden er gemiddeld 7 eicellen weggenomen, die ook allemaal rijp waren. Na inseminatie waren 37 van de 69 eicellen (54%) normaal bevrucht, en 14 (20%) hadden een abnormale bevruchting ondergaan. In deze groep was de gemiddelde HA-binding 72%. In de OLI+TER groep konden gemiddeld 6 eicellen weggenomen worden, waarvan er gemiddeld 5 rijp waren. Van de in totaal 21 bevruchte eicellen waren er 14 normaal bevrucht (67%). In deze groep kwamen geen abnormale bevruchtingen voor en de gemiddelde HA-binding was 68%. In de AST+TER groep werden ook gemiddeld 6 eicellen weggenomen, waarvan er 5 metafase II waren. 28 van de 38 eicellen (74%) waren normaal bevrucht, 4 van de 38 (11%) waren abnormaal. De gemiddelde HA-binding in deze groep was 84%. In de AST groep kon men gemiddeld 9 eicellen wegnemen, en hiervan waren er 7 rijp. 8 van de 14 eicellen (57%) ondergingen een normale bevruchting en 2 van de 14 (14%) een abnormale. In deze groep was de gemiddelde HA-binding 76%. In de laatste groep nam men gemiddeld 5 eicellen weg, waarvan 4 rijp waren. Van de in totaal 11 eicellen waren er 8 normaal bevrucht (73%) en kon er geen enkele abnormale bevruchting aangetroffen worden. De gemiddelde HA-binding in deze laatste groep was 85%.

Ook in deze studie werd de totale populatie onderverdeeld in twee groepen, op basis van de HA-binding van de spermatozoa. De gegevens over deze twee patiëntengroepen zijn weergegeven in tabel 13.

Tabel 13: Samenvattende tabel met gegevens over het aantal eicellen, het bevruchtend vermogen van de spermastalen en de HA-binding van de totale patiëntenpopulatie en van de twee patiëntengroepen.

	Aantal patiënten	Gem # eicellen ^a	Gem # MII eicellen ^b	Aantal en percentage 2PN ^c	Aantal en percentage XPN ^d	HA-binding ^e (%)
Totale patiëntenpopulatie	30	6.5	5.7	99/170 (58%)	21/170 (12%)	77
HA-binding < 80%	17	6.8	6.2	61/105 (58%)	9/105 (9%)	70
HA-binding ≥ 80%	13	6.2	5.0	38/65 (58%)	12/65 (18%)	87

^aGem # eicellen = het gemiddeld aantal eicellen per patiënt, weergegeven voor elke patiëntengroep; ^bGem # MII eicellen = het gemiddeld aantal metafase II eicellen per patiënt, weergegeven voor elke patiëntengroep; ^cAantal en percentage 2PN = het aantal normaal bevruchte eicellen per totaal aantal bevruchte eicellen; ^dAantal en percentage XPN = het aantal abnormaal bevruchte eicellen per totaal aantal bevruchte eicellen. ^eHA-binding = gemiddelde van de HA-binding op de dag van pick-up, weergegeven in percentage en per patiëntengroep.

In totaal werden er bij de 30 patiënten die in deze studie opgenomen werden, gemiddeld 6,5 eicellen weggenomen waarvan er ook 5,7 metafase II waren. Na inseminatie met sperma zijn 99 van de in totaal 170 eicellen normaal bevrucht, wat iets meer dan de helft is. Van deze 170 eicellen waren er 21 (12%) abnormaal bevrucht. De gemiddelde HA-binding van alle patiënten op de dag van pick-up was 77%. In de patiëntengroep met een HA-binding van minder dan 80% werden er in totaal gemiddeld 6,8 eicellen weggenomen, waarvan er 6,2 rijp waren. Van de in totaal 105 bevruchte eicellen in deze groep waren er 61 (58%) normaal bevrucht en 9 (9%) waren abnormaal bevrucht. De gemiddelde HA-binding op de dag van pick-up in deze groep was 70%. In de patiëntengroep met een HA-binding van 80% of meer werden er gemiddeld 6,2 eicellen weggenomen, waarvan er gemiddeld 5 rijp waren. In totaal werden in deze groep 65 eicellen bevrucht en hiervan waren er 38 (58%) normaal bevrucht en 12 (18%) abnormaal. De gemiddelde HA-binding was hier 87%.

Voor de analyse van deze gegevens werd algemene lineaire regressie gebruikt. De proporties van normale en abnormale bevruchtingen (2PN en XPN) werden gebruikt als covariaten, met HA-binding op de dag van pick-up als respons. De nulhypothese is dat de estimate gelijk is aan 0, wat betekent dat er geen verband is tussen HA-binding en 2PN of XPN. Als de p-waarde kleiner is dan 0,05 wordt het resultaat als significant beschouwd en kan de nulhypothese verworpen worden. De gegevens werden per behandeling, IVF of ICSI, apart geanalyseerd en zijn weergegeven in de volgende tabellen (Tabel 14 en 15).

Tabel 14: Resultaten van de lineaire regressie voor het verband tussen HA-binding en het bevruchtend vermogen van sperma in een IVF behandeling, weergegeven voor de 3 onderzochte patiëntengroepen.

	Variabele	Estimate	t-waarde	p-waarde
Totale populatie	Intercept	0.7904	16.20	<.0001
	2PN	0.0076	0.05	0.9583
	XPN	0.1438	0.48	0.6390
HA-binding < 80%	Intercept	0.7657	8.02	0.0002
	2PN	-0.2880	-0.84	0.4331
	XPN	0.3977	0.41	0.6932
HA-binding \geq 80%	Intercept	0.8583	57.31	<.0001
	2PN	0.0465	1.21	0.2624
	XPN	-0.0421	-0.55	0.5977

Tabel 15: Resultaten van de lineaire regressie voor het verband tussen HA-binding en het bevruchtend vermogen van sperma in een ICSI behandeling, weergegeven voor de 3 onderzochte patiëntengroepen.

	Variabele	Estimate	t-waarde	p-waarde
Totale populatie	Intercept	0.8011	16.62	<.0001
	2PN	-0.0913	-0.78	0.4441
	XPN	-0.0105	-0.07	0.9457
HA-binding < 80%	Intercept	0.6395	6.96	<.0001
	2PN	0.1666	0.76	0.4584
	XPN	-0.1348	-0.65	0.5232
HA-binding \geq 80%	Intercept	0.8584	54.15	<.0001
	2PN	0.0510	1.23	0.2514
	XPN	-0.0208	-0.35	0.7370

Uit deze resultaten blijkt dat er voor geen van de covarianten significante resultaten bekomen werden. Bij de IVF behandeling (Tabel 14) is de verkregen estimate voor een normale bevruchting (2PN) in de totale patiëntenpopulatie 0,0076 (p-waarde = 0,9583). Voor een abnormale bevruchting (XPN) is de verkregen estimate 0,1438 (p-waarde = 0,6390). Deze waarden zijn ongeveer gelijk aan 0 en de p-waarden zijn niet-significant. De nulhypothese kan dus niet verworpen worden, wat betekent dat er geen verband bestaat tussen de HA-binding en het bevruchtend vermogen van het sperma bij een IVF behandeling. Ook als de patiënten in twee groepen onderverdeeld worden, vinden we geen significante waarden. De verkregen estimate voor een normale bevruchting in de <80% groep is -0,2880 met als p-waarde 0,4331. Voor een abnormale bevruchting is de estimate 0,3977 (p-waarde = 0,6932). In deze groep bestaat dus ook geen verband tussen HA-binding en het bevruchtend vermogen van sperma. In de \geq 80% groep zijn de estimates en p-waarden voor een normale en abnormale bevruchting respectievelijk 0,0465 (p-waarde = 0,2624) en -0,0421 (p-waarde =

0,5977). Ook hier kan dus geen significant verband aangetoond worden tussen HA-binding van spermatozoa en het bevruchtend vermogen van sperma.

Bij de ICSI behandeling (Tabel 15) zijn de bekomen waarden voor een normale en abnormale bevruchting in de totale patiëntenpopulatie respectievelijk -0,0913 (p-waarde = 0,4441) en -0,0105 (p-waarde = 0,9457). Er kan dus geen significant verband vastgesteld worden tussen HA-binding van de spermatozoa en het bevruchtend vermogen van het spermastaal bij een ICSI behandeling. In de <80% zijn de verkregen waarden voor een normale en abnormale bevruchting respectievelijk 0,1666 (p-waarde = 0,4548) en -0,1348 (p-waarde = 0,5232). Deze niet-significante waarden betekenen dat er geen verband aangetoond kan worden tussen HA-binding en bevruchtend vermogen van sperma in de groep patiënten met een HA-binding van minder dan 80%. Hetzelfde kan besloten worden uit de resultaten voor de ≥80% groep. Hier zijn de verkregen waarden 0,0510 (p-waarde = 0,2514) voor een normale bevruchting en -0,0208 (p-waarde = 0,7370) voor een abnormale bevruchting.

3.3.2 Verband tussen HA-binding en de kwaliteit van de embryo's

De kwaliteit van een embryo wordt bepaald op basis van de vorm van de cellen en of er al dan niet fragmentatie of granulariteit aanwezig is. Later in de bevruchting kijkt men naar de compactie van het embryo en naar de aanwezigheid van intercellulaire verbindingen. Hieronder volgt een samenvattende tabel met gegevens over de kwaliteit van de embryo's van de totale patiëntenpopulatie (Tabel 16).

Tabel 16: Samenvattende tabel met gegevens over de kwaliteit van de embryo's per dag en de gemiddelde HA-binding (%) voor de totale patiëntenpopulatie, ingedeeld op basis van de spermakwaliteit.

	Aantal patiënten	# grade A en B embryo's ^a (dag 2)	# grade A en B embryo's ^a (dag 3)	# grade A en B embryo's ^a (dag 4)	# grade A en B embryo's ^a (dag 5)	HA-binding ^b (%)
NORM	3	4/4 (100%)	4/4 (80%)	-	-	83
OAT	10	30/37 (81%)	22/37 (59%)	4/37 (11%)	-	72
OLI+TER	4	11/14 (79%)	10/14 (71%)	-	-	68
AST+TER	8	22/28 (79%)	21/28 (75%)	6/28 (21%)	1/28 (4%)	84
AST	2	8/8 (100%)	5/8 (63%)	-	-	76
TER	3	7/8 (88%)	8/8 (100%)	1/8 (13%)	-	85
TOTAAL	30	82/99 (83%)	70/99 (71%)	11/73 (15%)	1/28 (4%)	77

^a# grade A en B embryo's = het totaal aantal goede embryo's (grade A en grade B) per totaal aantal bevruchte eicellen. ^bHA-binding = de gemiddelde HA-binding op de dag van PU, uitgedrukt in percentage.

In de groep patiënten met normale spermawaarden werden er in totaal 4 eicellen bevrucht. Op dag 2 na de inseminatie waren al deze embryo's van goede kwaliteit (grade A en grade B) en dit bleef ook zo op dag 3. De gemiddelde HA-binding in deze groep was 83%. In de OAT groep werden er in totaal 37 eicellen bevrucht. Hieruit groeiden 30 embryo's van goede kwaliteit op dag 2. Op dag 3 bleven hier nog 22 van over, en op dag 4 waren er nog 4 embryo's van goede kwaliteit. In deze groep was de gemiddelde HA-binding 72%. In de OLI+TER groep werden er in totaal 14 eicellen bevrucht. Uit deze eicellen ontstonden 11 embryo's van goede kwaliteit op dag 2. Op dag 3 bleven er hier nog 10 van over. De gemiddelde HA-binding was 68%. In de groep met AST+TER patiënten werden 28 eicellen in totaal bevrucht. Op dag 2 waren hieruit 22 grade A en grade B embryo's ontstaan. Op dag 3 bleven er nog 21 over en op dag 4 evolueerde dit naar 6 embryo's van goede kwaliteit. Op dag 5 bleef er nog één embryo van goede kwaliteit over in deze groep. De gemiddelde HA-binding was 84%. In de AST groep werden 8 eicellen bevrucht, waaruit 8 embryo's van goede kwaliteit ontstonden op dag 2. Hiervan bleven er op dag 3 nog 5 over. In deze groep was de gemiddelde HA-binding 76%. In de TER groep tenslotte werden 8 eicellen bevrucht, waaruit 7 goede embryo's ontstonden. Op dag 3 kon men 8 grade A en grade B embryo's aantreffen. Hiervan bleef er 1 over op dag 4. De gemiddelde HA-binding was 85%. Deze gegevens zijn ook weergegeven voor de patiëntengroepen met een HA-binding kleiner dan 80% en een HA-binding van 80% of meer (Tabel 17).

Tabel 17: Samenvattende tabel met gegevens over de kwaliteit van de embryo's per dag en de gemiddelde HA-binding (%) voor de totale patiëntenpopulatie en voor de patiëntengroepen, ingedeeld op basis van HA-binding.

	Aantal patiënten	# grade A en B embryo's ^a (dag 2)	# grade A en B embryo's ^a (dag 3)	# grade A en B embryo's ^a (dag 4)	# grade A en B embryo's ^a (dag 5)	HA-binding ^b (%)
Totale populatie	30	82/99 (83%)	70/99 (71%)	11/99 (11%)	1/99 (1%)	77
HA-binding < 80%	17	51/61 (84%)	42/61 (69%)	5/61 (8%)	-	70
HA-binding ≥ 80%	13	31/38 (82%)	28/38 (74%)	6/38 (16%)	1/38 (3%)	87

^a# grade A en B embryo's = het totaal aantal goede embryo's (grade A en grade B) per totaal aantal bevruchte eicellen. ^bHA-binding = de gemiddelde HA-binding op de dag van PU, uitgedrukt in percentage.

In de totale patiëntenpopulatie waren er op dag twee 82 (83%) embryo's van goede kwaliteit ontstaan uit de 99 normaal bevruchte eicellen. Op dag 3 evolueerde dit naar 70 (71%) embryo's van goede kwaliteit, en op dag 4 naar 11 (11%) goede embryo's. Op dag 5 bleef er tenslotte nog één embryo van goede kwaliteit over. De gemiddelde HA-binding op de dag van pick-up in de totale patiëntenpopulatie was 77%. In de groep <80% waren er op dag twee 51 (84%) embryo's van goede kwaliteit ontstaan uit de in totaal 61 normaal bevruchte eicellen. Dit evolueerde naar 42 (69%) embryo's van goede kwaliteit op dag 3 en 5 (8%) embryo's van goede kwaliteit op dag 4. De gemiddelde HA-binding in deze groep was 70%. In de laatste groep, $\geq 80\%$, ontstonden er 31 (82%) goede embryo's uit de in totaal 38 normaal bevruchte eicellen. Op dag 3 bleven er hier 28 (74%) van over, en op dag 4 waren er nog 6 (16%) goede embryo's. Op dag 5 bleef er uiteindelijk nog 1 (3%) embryo van goede kwaliteit over. De gemiddelde HA-binding in deze groep was 87%.

Voor dit deel van de analyse werd de HA-binding op de dag van pick-up in 2 klassen ingedeeld, namelijk $<0,8$ en $\geq 0,8$. De gegevens van deze 2 klassen worden geanalyseerd aan de hand van contingency tables met de Chi-kwadraat test. In tabel 18 zijn de resultaten weergegeven van het verband tussen HA-binding en het bekomen van een grade A embryo, in tabel 19 die van het verband tussen HA-binding en het bekomen van een goed embryo (grade A of grade B). Deze test wordt telkens apart uitgevoerd, voor elke dag en elke behandeling. Omdat er maar 1 patiënt is waarbij de embryo's in cultuur werden gehouden tot de vijfde dag van de ontwikkeling, is het niet mogelijk om de Chi-kwadraat test hiervoor uit te voeren. Deze gegevens zijn dan ook niet meegenomen in de analyse.

Tabel 18: Resultaten van de Chi-kwadraat test voor het verband tussen HA-binding en het bekomen van een grade A embryo.

Dag	Behandeling	p-waarde
Dag 2	IVF	0.437
Dag 2	ICSI	0.991
Dag 3	IVF	0.437
Dag 3	ICSI	0.970
Dag 4	IVF	0.571

Voor dag 2 zijn de resulterende p-waarden voor IVF en ICSI respectievelijk 0,437 en 0,991. Voor dag 3 is de p-waarde voor IVF 0,437 en de p-waarde voor ICSI is 0,970. Bij de 30 patiënten die in deze studie zijn opgenomen, is er geen enkele waarbij op dag 4 een grade A embryo bekomen werd met een ICSI behandeling. In tabel 18 is dus ook enkel de p-waarde

voor de IVF behandeling weergegeven. Deze p-waarde is 0,571. Bij geen enkele test werd dus een significante p-waarde bekomen. Er kan dus geen verband vastgesteld worden tussen de HA-binding en het bekomen van een grade A embryo, voor geen van de twee behandelingen

Tabel 19: Resultaten van de Chi-kwadraat test voor het verband tussen HA-binding en het bekomen van een goed embryo (grade A of B).

Dag	Behandeling	p-waarde
Dag 2	IVF	0.563
Dag 2	ICSI	1.000
Dag 3	IVF	0.218
Dag 3	ICSI	1.000
Dag 4	IVF	0.629
Dag 4	ICSI	1.000

De p-waarden voor dag 2 zijn 0,563 en 1,000 voor respectievelijk IVF en ICSI. Voor dag 3 zijn de 2 bekomen p-waarden 0,218 en 1,000. Op dag 4 is de p-waarde voor de IVF behandeling 0,629. De p-waarde voor de ICSI behandeling is 1,000. Hier is ook geen enkele p-waarde significant, dus er kan ook geen verband vastgesteld worden tussen de HA-binding en het bekomen van een goed embryo, wat wil zeggen een grade A of grade B embryo.

3.3.3 Verband tussen HA-binding en het uiteindelijke resultaat van een ART-behandeling

12 dagen na de terugplaatsing van één of meerdere embryo's, kan men nagaan of er een zwangerschap bekomen is. Dit gebeurt met behulp van een bloedonderzoek, waarbij men hCG, het zwangerschapshormoon, meet.

Hieronder is een samenvattende tabel weergegeven van de totale patiëntenpopulatie met het aantal zwangere en niet zwangere patiënten en de gegevens van de HA-binding (Tabel 20).

Tabel 20: Samenvattende tabel van het aantal bekomen zwangerschappen in de totale populatie.

Uiteindelijk resultaat	Aantal patiënten	Gem. aantal ET ^a	Beschrijvende statistiek				
			Gemiddelde van de HA-binding (%)	Standaard afwijking (%)	Mediaan (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Zwanger	5	1	81	7.1	79.6	75.0	92.5
Niet zwanger	20	1	75	14.0	77.1	31.7	92.1

^aGem. aantal ET = Het gemiddeld aantal embryo's dat werd teruggeplaatst per patiënt.

Bij 5 patiënten werd er geen embryo teruggeplaatst omdat er geen ontwikkeling van de bevruchte eicel was opgetreden. Deze patiënten werden dan ook niet opgenomen in dit deel

van de analyse. Er waren 5 zwangere patiënten, waarbij gemiddeld 1 embryo werd teruggeplaatst. Het gemiddelde van de HA-binding in deze groep was 81% met een standaardafwijking van 7,1%. Bij de overige 20 patiënten, waarbij er ook gemiddeld 1 embryo werd teruggeplaatst, werd geen zwangerschap bekomen. Het gemiddelde van de HA-binding bedroeg 75% met een standaardafwijking van 14%.

In tabel 21 en 22 staan deze gegevens ook weergegeven, maar dan voor de aparte patiëntengroepen, ingedeeld op basis van de HA-binding.

Tabel 21: Samenvattende tabel van het aantal bekomen zwangerschappen in de patiëntengroep met een HA-binding kleiner dan 80%.

Beschrijvende statistiek							
Uiteindelijk resultaat	Aantal patiënten	Gem. aantal ET ^a	Gemiddelde van de HA-binding (%)	Standaard afwijking (%)	Mediaan (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Zwanger	3	1	77	2.4	76.0	75.0	79.6
Niet zwanger	12	1	67	13.1	71.2	31.7	78.7

^aGem. aantal ET = Het gemiddeld aantal embryo's dat werd teruggeplaatst per patiënt.

In de groep patiënten met een HA-binding kleiner dan 80% werden er 3 zwangerschappen bekomen (Tabel 21). Bij deze patiënten werd gemiddeld één embryo teruggeplaatst en het gemiddelde van de HA-binding in deze groep was 77% met een standaardafwijking van 2,4%. In deze groep waren 2 patiënten waarbij geen terugplaatsing van een embryo kon plaatsvinden omdat de bevruchte eicel niet verder gedeeld was. Deze patiënten worden dus ook niet meer opgenomen in de statistische analyse. Bij de overige 12 patiënten in deze groep werd geen zwangerschap bekomen. De gemiddelde HA-binding in deze groep was 67% met een standaardafwijking van 13,1%.

Tabel 22: Samenvattende tabel van het aantal bekomen zwangerschappen in de patiëntengroep met een HA-binding van 80% of meer.

Beschrijvende statistiek							
Uiteindelijk resultaat	Aantal patiënten	Gem. aantal ET ^a	Gemiddelde van de HA-binding (%)	Standaard afwijking (%)	Mediaan (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Zwanger	2	1	88	6.4	88.0	83.5	92.5
Niet zwanger	8	1	87	2.8	85.7	83.9	92.1

^aGem. aantal ET = Het gemiddeld aantal embryo's dat werd teruggeplaatst per patiënt.

In de patiëntengroep met een HA-binding van 80% of meer werden 2 patiënten zwanger (Tabel 22). Bij deze patiënten werd gemiddeld één embryo teruggeplaatst. De gemiddelde

HA-binding in deze groep was 88% met een standaardafwijking van 6,4%. Bij 3 patiënten kon geen embryo worden teruggeplaatst omdat er geen deling van de bevruchte eicellen was opgetreden. Deze patiënten worden dus niet meegenomen in de verdere analyse. De overige 8 patiënten in deze groep werden niet zwanger. Hier was er een gemiddelde HA-binding van 87% met een standaardafwijking van 2,8%.

Deze gegevens werden verder geanalyseerd met behulp van logistische regressie en de resultaten voor de totale patiëntenpopulatie staan weergegeven in tabel 23. De bekomen p-waarden zijn niet significant. De nulhypothese dat er geen verband bestaat tussen HA-binding en het uiteindelijke resultaat van de ART-behandeling, kan dus niet verworpen worden.

Tabel 23: Resultaten van de logistische regressie voor het verband tussen HA-binding en het al dan niet bekomen van een zwangerschap, weergegeven voor de totale patiëntenpopulatie.

Testing Global Null Hypothesis: BETA=0			
Test	Chi-kwadraat	DF	p-waarde
Likelihood Ratio	1.2458	1	0.2644
Score	0.9815	1	0.3218
Wald	0.9497	1	0.3298

Het resultaat van de statistische analyse voor de patiëntengroepen, ingedeeld op basis van de HA-binding staan weergegeven in tabel 24 en 25. Ook hier werden bij beide groepen geen significante resultaten gevonden. Er kan dus geen verband aangetoond worden tussen HA-binding en het al dan niet bekomen van een zwangerschap, zowel voor patiënten met een HA-binding kleiner dan 80% als voor patiënten met een HA-binding van 80% of meer.

Tabel 24: Resultaten van de logistische regressie voor het verband tussen HA-binding en het al dan niet bekomen van een zwangerschap, weergegeven voor de patiëntengroep met een HA-binding kleiner dan 80%.

Testing Global Null Hypothesis: BETA=0			
Test	Chi-kwadraat	DF	p-waarde
Likelihood Ratio	3.4989	1	0.0614
Score	1.5264	1	0.2167
Wald	1.2996	1	0.2543

Tabel 25: Resultaten van de logistische regressie voor het verband tussen HA-binding en het al dan niet bekomen van een zwangerschap, weergegeven voor de patiëntengroep met een HA-binding van 80% of meer.

Testing Global Null Hypothesis: BETA=0			
Test	Chi-kwadraat	DF	p-waarde
Likelihood Ratio	0.3695	1	0.5433
Score	0.3891	1	0.5328
Wald	0.3726	1	0.5416

3.4 HA-binding van verschillende spermastalen van dezelfde patiënt op verschillende tijdstippen

Per patiënt gebeurden de metingen van de HA-binding op 2 verse spermastalen, en op 4 tijdstippen. Het eerste verse staal werd ongeveer 7 dagen voor de eicelcollectie geanalyseerd. Dit staal werd vervolgens ingevroren en de volgende dag ontdooid, waarna de tweede analyse van dit staal gebeurde. Vervolgens werd het verse staal dat op de dag van de eicelcollectie geproduceerd werd, geanalyseerd. Dit zelfde staal werd 24 uur later voor een tweede keer geanalyseerd. Om de intra-variantie van de HA-binding in een patiënt te analyseren, werd een lineair gemengd model gebruikt.

Tabel 26: Resultaten van het lineair gemengd model.

Effecten	REML	p-waarde
	(S.E model based ; S.E. Robust)	
Intercept	0.595 (0.165; 0.181)	0.001
Staal	0.078 (0.135; 0.149)	0.565

In tabel 26 is het resultaat weergegeven van de analyse van de HA-binding van verschillende spermastalen van dezelfde patiënt op verschillende tijdstippen. De p-waarde van het “effect” van het staal is 0,565. Deze waarde is niet-significant wat betekent dat er geen intra-variantie, en dus geen verschil is in de HA-binding van verschillende stalen van dezelfde patiënt op verschillende tijdstippen.

Tabel 27: Samenvattende tabel van alle resultaten.

Studie 1: Invloed van invriezen en ontdooien					
Invloed op de HA-binding		Geen significante invloed		p = 0.327	
Studie 2: Verband tussen HA-binding en sperma parameters					
<i>Concentratie</i>		Significant verband (negatief)		p = 0.039*	
- Totale populatie		Geen significant verband		p = 0.204	
- HA-binding <80%		Geen significant verband		p = 0.600	
- HA-binding ≥80%					
<i>Beweeglijkheid (A, B, C en D)</i>		Geen significant verband		p = 0.247/0.346/0.063/0.357	
- Totale populatie		Geen significant verband		p = 0.924/0.227/0.859/0.424	
- HA-binding <80%		Geen significant verband		p = 0.653/0.208/0.084/0.196	
- HA-binding ≥80%					
<i>Morfologie</i>		Geen significant verband		p = 0.821	
- Totale populatie		Geen significant verband		p = 0.646	
- HA-binding <80%		Geen significant verband		p = 0.805	
- HA-binding ≥80%					
Studie 3: Verband tussen HA-binding en de ART-behandeling					
<i>Bevruchtend vermogen</i>					
- Totale populatie	# 2PN	IVF	Geen significant verband	p = 0.9583	
		ICSI	Geen significant verband	p = 0.4441	
	# XPN	IVF	Geen significant verband	p = 0.6390	
		ICSI	Geen significant verband	p = 0.9457	
- HA-binding <80%	# 2PN	IVF	Geen significant verband	p = 0.4331	
		ICSI	Geen significant verband	p = 0.4584	
	# XPN	IVF	Geen significant verband	p = 0.6932	
		ICSI	Geen significant verband	p = 0.5232	
- HA-binding ≥80%	# 2PN	IVF	Geen significant verband	p = 0.2624	
		ICSI	Geen significant verband	p = 0.2514	
	# XPN	IVF	Geen significant verband	p = 0.5977	
		ICSI	Geen significant verband	p = 0.7370	
<i>Kwaliteit van de embryo's → Grade A</i>					
- Totale populatie	Dag 2	IVF	Geen significant verband	p = 0.437	
		ICSI	Geen significant verband	p = 0.991	
	Dag 3	IVF	Geen significant verband	p = 0.437	
		ICSI	Geen significant verband	p = 0.970	
	Dag 4	IVF	Geen significant verband	p = 0.571	
<i>Kwaliteit van de embryo's → Grade A en B</i>					
- Totale populatie	Dag 2	IVF	Geen significant verband	p = 0.563	
		ICSI	Geen significant verband	p = 1.000	
	Dag 3	IVF	Geen significant verband	p = 0.218	
		ICSI	Geen significant verband	p = 1.000	
	Dag 4	IVF	Geen significant verband	p = 0.629	
		ICSI	Geen significant verband	p = 1.000	

Significante waarden worden aangeduid met een asterisk (*).

Tabel 27 (vervolg).

<i>Uiteindelijk resultaat (zwanger/niet zwanger)</i>		
- Totale populatie	Geen significant verband	p = 0.2644
- HA-binding <80%	Geen significant verband	p = 0.0614
- HA-binding ≥80%	Geen significant verband	p = 0.5433

HA-binding van verschillende spermastalen van dezelfde patiënt op verschillende tijdstippen		
- Totale populatie	Geen intra-variantie	p = 0.565

Significante p-waarden zijn aangeduid met een asterisk (*).

4. Discussie

Hyaluronzuur is een belangrijke component van de extracellulaire matrix en is ook gesitueerd in de cumulus oophorus rondom de eicel. Deze structuur bestaat uit ongeveer 3000 cumuluscellen die samengehouden worden door een extracellulaire matrix, waarin dit hyaluronzuur bevat zit.¹⁰ Hyaluronzuur is echter ook aanwezig in de zona pellucida en in de perivitelline ruimte.²⁷ Om een eicel te bevruchten, moeten spermatozoa zich doorheen deze barrières rondom de eicel bewegen. Hiervoor beschikken ze over specifieke hyaluronzuurbindende eiwitten, waaronder PH-20. Dit is een bifunctioneel eiwit dat enerzijds een hyaluronidase werking heeft om de cumuluslaag te penetreren, en dat anderzijds betrokken is bij het binden aan de zona pellucida.²⁸ Huszar et al. hebben aangetoond dat enkel rijpe spermatozoa, die alle spermiogenische veranderingen vervolledigd hebben, beschikken over deze receptoren om te kunnen binden aan hyaluronzuur.¹⁹ Bovendien zou deze bindingscapaciteit van spermatozoa ook voorspellen dat deze spermatozoa minder genomische afwijkingen en een betere morfologie hebben.^{20,21}

De conventionele analyse van sperma, waarbij de concentratie, beweeglijkheid en morfologie onderzocht worden, wordt over de hele wereld gebruikt als een fundamentele indicator voor de mannelijke vruchtbaarheid. Maar deze resultaten geven niet altijd accurate diagnostische of prognostische informatie over de menselijke fertiliteit, zowel *in vivo* als *in vitro*. Mannen worden als onvruchtbaar gediagnosticeerd als hun sperma geen spermatozoa, enkel onbeweeglijke spermatozoa, of spermatozoa met algemene morfologisch structurele defecten bevat. Met deze conventionele analyses kunnen de andere aspecten van de functie van sperma echter niet gedetecteerd worden. Tot deze andere aspecten behoren nucleaire rijpheid, de normale structuur van het DNA en de mogelijkheid van spermatozoa om te fuseren met een eicel. Om ook deze aspecten te kunnen beoordelen, zijn er een aantal specifieke sperma testen ontwikkeld zoals de sperma-zona pellucida binding²⁹, de zona pellucida-geïnduceerde acrosoomreactie³⁰ en testen voor de nucleaire rijpheid en DNA schade³¹. Deze technieken zijn echter tijdrovend en vereisen dure apparatuur en meestal ook voldoende hoeveelheden biologisch materiaal, zoals eicellen, wat meestal niet voor handen is.³²

Recent is er een eenvoudige test, de sperma-hyaluronan binding assay (HBA), ontwikkeld als een commerciële diagnostische kit voor het bepalen van de binding van sperma aan hyaluronzuur. Deze test is gebaseerd op het feit dat hyaluronzuur selectief bindt aan rijpe spermatozoa met intacte acrosomen en een betere morfologie.¹⁹ Er wordt verondersteld dat de HBA test een nuttige, additionele test is voor de conventionele sperma-analyse om de

klinische diagnose van mannelijke onvruchtbaarheid te verbeteren en om te helpen bij de klinische toewijzing van patiënten voor een behandeling met ofwel IVF, ofwel ICSI. Er zijn echter nog niet veel onderzoeken gebeurd naar de klinische waarde van deze test en of deze test het bevruchtend vermogen van sperma kan voorspellen.

Dit onderzoek was dus bedoeld om na te gaan of de mate waarin spermatozoa binden aan hyaluronzuur een beeld geeft over het resultaat van een IVF en/of ICSI behandeling. Eerst werd onderzocht of het invriezen en ontdooien van sperma invloed heeft op de HA-binding. Vervolgens werd onderzocht of er een verband bestaat tussen HA-binding en de concentratie, de beweeglijkheid en de morfologie van spermatozoa. Als laatste werd het verband tussen HA-binding en het bevruchtend vermogen van het sperma, de kwaliteit van de embryo's en het uiteindelijke resultaat van de behandeling gezocht.

De eerste conclusie van dit onderzoek is dat het invriezen en ontdooien van een spermastaal geen invloed heeft op de HA-binding van de spermatozoa. Dit is een positieve uitkomst, want dit betekent dat het invriezen van een spermastaal geen invloed heeft op de hyaluronzuur-receptoren op de spermakop. Het gebruik van ingevroren spermastalen voor een IVF en/of ICSI behandeling, zou dus dezelfde kans op bevruchting moeten geven als het gebruik van verse spermastalen.

Wat de studie rond het verband tussen HA-binding en sperma parameters betreft, leverde deze enkel een significant resultaat op voor het verband tussen HA-binding en concentratie in de totale populatie. Na statistische analyse vonden we een negatief verband, wat betekent dat een hogere HA-binding gepaard gaat met een lagere concentratie van spermatozoa, en omgekeerd. Als we de patiëntenpopulatie onderverdeelden op basis van de HA-binding van de spermatozoa, kon er in deze twee groepen geen verband meer aangetoond worden tussen de HA-binding en de concentratie. Voor het verband tussen HA-binding en beweeglijkheid werden uitsluitend niet-significante resultaten gevonden voor de totale patiëntenpopulatie, en dit voor alle vier de klassen waarin beweeglijkheid werd onderverdeeld. Hetzelfde geldt wanneer we de populatie onderverdelen in een patiëntengroep met een HA-binding kleiner dan 80% en een groep met een HA-binding van 80% of meer. Ook voor het verband tussen HA-binding en morfologie werd een niet-significant resultaat bekomen, zowel voor de totale populatie als voor de patiëntengroepen ingedeeld op basis van HA-binding. Deze resultaten zijn in tegenstelling met eerder onderzoek, uitgevoerd door Ye et al. In hun studie waren 195 patiënten opgenomen die een eerste conventionele IVF behandeling zouden ondergaan. De meeste paren ondergingen een standaard IVF behandeling, en degene met ernstige oligozoöpermie of ernstige asthenozoöpermie werden behandeld met ICSI. Er werden 20

patiënten, waarbij minder dan 3 rijpe eicellen geïnsemineerd werden, uitgesloten uit de studie. In de uiteindelijke statistische analyse werden dus 175 patiënten opgenomen waarbij meer dan 3 rijpe eicellen bevrucht werden. De concentratie, beweeglijkheid en morfologie van de spermatozoa werden beoordeeld via de richtlijnen van de WHO en de HA-binding met de HBA test van BIOCOAT. Uit hun resultaten konden ze concluderen dat HA-binding wel significant gecorreleerd is met zowel de totale, als de progressieve beweeglijkheid van spermatozoa. Verder bleek dat de HA-binding ook gecorreleerd is met de normale morfologie van sperma. De HA-binding weerspiegelt dus de kwaliteit van het sperma, zoals die beoordeeld wordt met conventionele sperma-analyse. Ye et al. besluiten dus dat de HBA test geen additionele informatie geeft over het bevruchtend vermogen van sperma.³² Er zijn een aantal verschillen tussen ons onderzoek en dat van Ye et al., die de tegengestelde resultaten kunnen verklaren. Onze studie beschikte slechts over een beperkte patiëntenpopulatie. In studie 2 waren 40 patiënten opgenomen, wat beduidend minder is dan de 175 patiënten uit het onderzoek van Ye et al. Verder werden er andere referentiewaarden gebruikt om de kwaliteit van de spermastalen te beoordelen. Ons onderzoek steunde op de statistisch bewezen referentiewaarden van Ombelet et al.²³ In het onderzoek van Ye et al. gebeurde de beoordeling van de kwaliteit volgens de referentiewaarden, vastgesteld door de WHO.²⁴ Er werden ook andere criteria gesteld voor de selectie van patiënten. In het onderzoek van Ye et al. werden enkel patiënten opgenomen waarbij meer dan 3 rijpe eicellen geïnsemineerd werden, terwijl dit in ons onderzoek geen voorwaarde was.

In studie 3 werd HA-binding en het bevruchtend vermogen van sperma, de kwaliteit van de embryo's en het al dan niet bekomen van een zwangerschap onderzocht. Uit de resultaten van de totale patiëntenpopulatie kan geen verband afgeleid worden tussen HA-binding en het bevruchtend vermogen van sperma, de kwaliteit van de bekomen embryo's en het al dan niet bekomen van een zwangerschap. Als we de populatie opdelen in 2 groepen, gebaseerd op de HA-binding van de spermatozoa, bekomen we ook allemaal niet-significante resultaten. We kunnen dus besluiten dat er geen verband bestaat tussen HA-binding en het bevruchtend vermogen van sperma, de kwaliteit van de bekomen embryo's en het al dan niet bekomen van een zwangerschap, zowel voor patiënten met een HA-binding kleiner dan 80% als voor patiënten met een HA-binding van 80% of meer. Gelijkaardig onderzoek werd ook uitgevoerd door Ye et al. en de resultaten van dat onderzoek zijn tegenstrijdig met onze resultaten.³² Er werden 175 patiënten opgenomen in de studie, waarbij meer dan 3 rijpe eicellen werden bevrucht via IVF. Bij deze 175 patiënten werden gemiddeld 9 rijpe eicellen bevrucht, en de proportie normale bevruchtelingen was 69%. Een normale bevruchting werd

gedefinieerd als 2PN (2 pronucleï). Alle eicellen met een abnormale bevruchting (XPN) werden niet meegenomen in de statistische analyse. Er werd een onderscheid gemaakt tussen de patiënten waarbij de proportie normale bevruchtingen kleiner en groter was dan 50%. Er waren 37 patiënten (21%) waarbij deze proportie kleiner was dan 50%, bij de overige 138 patiënten (79%) was deze proportie groter dan 50%. Er was een statistisch significant verschil in HA-binding tussen deze 2 populaties, maar dit was slechts zeer klein. Na analyse met multivariate logistische regressie bleek dat enkel normale sperma morfologie en HA-binding significant gerelateerd waren aan het bevruchtend vermogen, wat in tegenstelling is met onze resultaten. In vergelijking met de morfologie van sperma was HA-binding echter minder significant. Patiënten met een normale morfologie van $\leq 5\%$ hadden een zeer klein bevruchtend vermogen, in vergelijking met de patiënten met een normale morfologie van $> 5\%$. Op basis van HA-binding was er geen onderscheid te maken tussen patiënten met een klein en een groot bevruchtend vermogen. Het besluit van Ye et al. is dat de HBA test weinig klinische waarde heeft in de routine sperma-analyse voor de diagnose en de behandeling van mannelijke onvruchtbaarheid.³²

We kunnen besluiten dat de HBA test een niet moeilijke, handige test is om de binding van spermatozoa aan hyaluronzuur te onderzoeken, en die ook gebruikt kan worden bij ingevroren spermastalen. Uit onze studie blijkt echter dat de HBA test geen voorspellende waarde heeft, met betrekking tot het resultaat van een IVF en/of ICSI behandeling. Deze studie beschikte echter maar over een beperkte patiëntenpopulatie, waardoor verder onderzoek met meer patiënten nodig is.

Literatuurlijst

1. Gartner LP, Hiatt JL. Male reproductive system. Color textbook of histology. Philadelphia: WB Saunders Company;2001.
2. Carlson BM. Human embryology and developmental biology. Philadelphia: Mosby; 2004.
3. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front. Biosci.* 1996;189-205.
4. Gilbert SF. Developmental biology. Sunderland: Sinauer Associates;1994.
5. Patrat C, Auer J, Fauque P, Leandri RL, Jouannet P, Serres C. Zona pellucida from fertilised human oocytes induces a voltage-dependent calcium influx and the acrosome reaction in spermatozoa, but cannot be penetrated by sperm. *Dev. Biol.* 2006;6:59-69.
6. Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1994;9:511-8.
7. Palermo GD, Avrech OM, Colombero LT, Wu H, Wolny YM, Fissore RA et al. Human sperm cytosolic factor triggers Ca^{2+} oscillations and overcomes activation failure of mammalian oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 1997;3:367-74.
8. Vines CA, Li MW, Deng X, Yudin AI, Cherr GN. Identification of a hyaluronic acid (HA) binding domain in the PH-20 protein that may function in cell signaling. *Mol. Reprod. Dev.* 2001;60:542-52.
9. M. Onken. What is hyaluronic acid? 2001.
URL: <http://www.madsci.org/posts/archives/apr2001/986571103.Bc.r.html>
10. Zhuo L, Kimata K. Cumulus oophorus extracellular matrix: Its construction and regulation. *Cell Struct. Funct.* 2001;26:189-196.
11. Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J. Biol. Chem.* 1989;264,13840-7.
12. Talbot P, DiCarlantonio G. Ultrastructure of opossum oocyte investing coats and their sensitivity to trypsin and hyaluronidase. *Dev. Biol.* 1984;103:159-67.
13. Talbot P. Hyaluronidase dissolves a component in the hamster zona pellucida. *J. Exp. Zool.* 1984;229:309-16.
14. Kornovski BS, McCoshen J, Kredentser J, Turley E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil. Steril.* 1994;61:935-40.

15. Ranganathan S, Ganguly AK, Datta K. Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Mol. Reprod. Dev.* 1994;38:69-76.
16. Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Primakoff P, Li MW, Overstreet JW. The PH-20 protein in human spermatozoa. *J. Androl.* 1997;18:151-8.
17. Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol. Reprod.* 1996;55:80-86.
18. Ying L, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J. Cell Biol.* 1994;125:1157-63.
19. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability and unreacted acrosomal status. *Fertil. Steril.* 2003;79:1616-24.
20. Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2006;18:260-7.
21. HBA: Sperm-Hyaluronan binding assay. Product instructions. 2005.
22. Zorgprogramma Reproductieve Geneeskunde ZOL Genk: *In vitro* fertilisatie en intracytoplasmatische sperma injectie. 2004.
URL: <http://www.fertility.be>
23. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum. Reprod.* 1997;12:987-93.
24. World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
25. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum. Reprod.* 2002;17:2904-11.
26. Robert M, Gagnon C. Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 1999;55:944-60.
27. Vandevoort CA, Cherr GN, Overstreet JW. Hyaluronic acid enhances the zona pellucida-induced acrosome reaction of macaque sperm. *J. Androl.* 1997;18:1-5.

28. Myles DG, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface protein PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol. Reprod.* 1997;56:320-7.
29. Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Kruger TF, Rosenwaks Z, Hogen GD. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil. Steril.* 1988;49:688-97.
30. Bastiaan HS, Windt ML, Menkveld R, Kruger TF, Oehninger S, Franken DR. Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 2003;79:49-55.
31. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil. Steril.* 2004;81:1289-95.
32. Ye H, Huang G, Gao Y, Liu de Y. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional *in vitro* fertilization. *Hum. Reprod.* 2006;21:1545-50.

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, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

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

Studie van de hyaluronzuurbinding van menselijk sperma

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

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

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik 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 mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

Eva Creemers

Datum: **18.06.2007**