

Summary &

Nederlandse Samenvatting

13



## Summary

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a virus that currently affects over 33 million men and women worldwide, most of them living in sub-Saharan Africa. For HIV-1-infected men and women who have access to antiretroviral therapy, the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in 1996 led to a spectacular increase in life expectancy and quality of life. Unfortunately, many men and women do not have access to HAART and for them HIV-1 infection will inevitably lead to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and death. In western society HIV-1 is nowadays considered to be a chronic disease and as a consequence quality of life is an important aspect for men and women with HIV-1. Many of them express the desire to father or mother a child. To decrease the risk of HIV-1 transmission in HIV-1-infected discordant couples with an HIV-1-infected man, assisted reproductive technologies have been introduced, including intra uterine insemination (IUI), in vitro fertilization (IVF) and intra cytoplasmic sperm injection (ICSI).

Data on the effects of HIV-1 infection and antiretroviral therapy on semen quality are scarce, which is unfortunate as semen quality is a key factor for reproductive success in IUI and IVF. Many antiretrovirals show good penetration in the male genital tract and may exert toxic effects on spermatozoa. One of these toxic effects could be mediated through effects on mitochondria within spermatozoa.

We therefore initiated studies on the effects of HIV-1 infection and antiretroviral treatment on semen quality. We also explored the anxiety and risk-taking behaviour of couples undergoing artificial reproductive technologies, as 100% safety of these technologies has not been proven as far as prevention of HIV-1 transmission is concerned.

CHAPTER 1 outlines the history of reproduction and HIV-1 infection and describes the objectives of this thesis.

CHAPTER 2 summarizes the literature on HIV-1 infection in the male and female genital tract, the effects of HIV-1 and HAART on male and female fertility and the various assisted reproductive technologies which may be used in HIV-1-infected men and women who wish to have offspring.



## Semen quality in HIV-1-infected men

CHAPTER 3 illustrates the effect of primary HIV-1 infection on semen quality. In a unique case of a semen donor who seroconverted for HIV-1, semen samples were available from before and after seroconversion.

Retrospectively, qualitative HIV-1 testing was performed on the cryopreserved semen samples to attempt to more accurately determine the time of acquisition of primary HIV-1 infection, and quantitative HIV-1 testing was performed to determine the concentration of HIV-1 RNA in semen during primary HIV-1 infection. Semen analyses were performed on all of these samples before cryopreservation, and semen parameters before and after HIV-1 infection were analyzed.

The qualitative HIV-1 test in semen was positive for the first time in November 2000, when the donor reported flu-like symptoms. The quantitative test revealed very low HIV-1 RNA concentrations from November until December 2000, and undetectable HIV-1 RNA concentrations thereafter. We therefore conclude that the primary HIV-1 infection occurred around the beginning of November 2000. Following HIV-1 infection, we observed a decrease in semen volume, and in the percentage of progressively motile spermatozoa and the percentage of spermatozoa with normal morphology.

To our knowledge, we are the first to describe semen parameters before and after acquiring HIV-1 infection in the same individual. In all other studies published, men were already HIV-1 infected by the time the first semen analysis was performed. As these observations were made in only a single person, no definitive conclusions can be drawn as to the generalisability of these findings.

CHAPTER 4 addresses the effects of ongoing asymptomatic HIV-1 infection on semen quality. In 2002 the indication for starting antiretroviral treatment in the Netherlands was set at a lower CD4 cell level as compared to in previous guidelines. To determine possible implications for fertility of this new policy, we studied the effect of ongoing HIV-1 infection on semen quality in a cohort of 55 men who were already HIV-1 infected at inclusion and not yet eligible to start antiretroviral therapy based on their relatively preserved CD4 cell counts.



All men underwent biannual blood and semen analyses. We used a repeated measurements mixed-effects model to examine the changes in semen parameters over time. During a mean

follow-up period of 77 weeks (interquartile range 39 to 111 weeks) mean CD4 cell counts declined statistically significantly from 480 to 400 cells/mm<sup>3</sup>, and the mean blood plasma HIV-1-RNA concentration increased statistically significantly from 4.1 to 4.3 log<sub>10</sub> copies/mL. Semen parameters remained stable during the entire follow-up period. Adjusted for age, FSH levels, the duration of sexual abstinence and smoking, the CD4 count was not statistically significantly associated with any of the investigated semen parameters, but, surprisingly, blood plasma HIV-1-RNA levels were positively associated with the concentration of spermatozoa.

From this study we conclude that prolonged exposure to asymptomatic, untreated HIV-1 infection does not affect semen quality in men with relatively preserved cellular immunity. These findings are not only reassuring for untreated men infected with HIV-1 who wish to father a child, but they also provide relevant background information for studies investigating the potential effect of antiretroviral therapy on semen quality (CHAPTER 5).

CHAPTER 5 presents the effects of HAART on semen quality. HAART is a combination of antiretroviral drugs that has to be taken for life by persons infected with HIV-1. Although these drugs effectively suppress HIV-1 and prolong life expectancy, serious concern has arisen about the long-term adverse effects of HAART, which include but are not limited to lipid metabolism abnormalities, insulin resistance, premature atherosclerosis, neuropathy and lipodystrophy.

Most antiretroviral drugs show good penetration in the male genital tract and therefore may affect spermatogenesis. The possible effect of HAART on semen quality is of interest because semen quality is a key factor for reproductive success. We prospectively evaluated the effect of first-line HAART on semen quality in a cohort of 34 HIV-1-infected men who started HAART for the first time. The estimated duration of HIV-1 infection at inclusion varied between men. All men underwent blood and semen analyses before the start of antiretroviral therapy and at 4, 12, 24, 36 and 48 weeks thereafter. A repeated measurements procedure using a mixed-effects model was used to examine the effect of HAART on semen parameters. We used the same methodology as described in CHAPTER 4 and adjusted for the same confounders. The median period of follow-up was 48 weeks (interquartile range 33–52 weeks). Five patients used thymidine analogue-containing HAART, 23 used tenofovir-based HAART, and six used other regimens. At all time points the percentage of progressively motile spermatozoa was low according to WHO criteria, and decreased significantly from 28 to 17% during follow-up ( $P=0.02$ ). All other semen parameters were in the normal range and remained stable. The



strengths of our study are the longitudinal follow-up of patients and the fact that the results are not biased by previous use of HAART, as only two patients had used HAART in the past for a maximum of 8 weeks. Still, we only included 34 patients with limited follow-up, making it impossible to draw conclusions about the effects of longer exposure to HAART, and our study group was too small to distinguish the effects of different antiretroviral drug combinations. Also the mechanism by which the sperm motility was decreased remains to be resolved. Because we demonstrated in CHAPTER 4 that ongoing HIV-1 infection itself had no effect on semen parameters, we conclude that the decrease in the percentage of progressively motile spermatozoa is most likely caused by HAART.

## Pathophysiological studies

CHAPTER 6 focuses on the mitochondrial toxicity of HAART. Before we initiated this study, there were no longitudinal data on mitochondrial DNA (mtDNA) copy numbers in spermatozoa during HAART.

Both HIV-1 infection and HAART, the thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors zidovudine and stavudine in particular, have been associated with a reduction in the mtDNA copy numbers in different body tissues, including peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and adipocytes. The precise mechanism by which HIV-1 affects mtDNA is unknown. It is thought that HAART may affect mtDNA by inhibiting mtDNA polymerase gamma (pol- $\gamma$ ), the enzyme responsible for mtDNA replication. As spermatozoa contain abundant mitochondria that provide energy for their progressive motility, the reduction in sperm motility seen after HAART treatment in CHAPTER 5 could potentially be mediated through an effect on mtDNA copy number. We therefore explored possible mitochondrial toxicity of HAART on spermatozoa. MtDNA copy numbers were longitudinally determined using a quantitative real-time duplex nucleic acid-based amplification assay in the spermatozoa of a subgroup of ten patients who participated in the study on HAART and semen quality described in CHAPTER 5. MtDNA copy numbers were measured before, and at 4, 12, 24, 36 and 48 weeks after start of HAART.

In addition, in order to possibly gain some insight on the effect of HIV-1 infection by itself, we measured mtDNA copy numbers in the spermatozoa of the seroconverting semen donor described in CHAPTER 3 before and after seroconversion.



In the ten patients who started HAART, mtDNA copy numbers in spermatozoa increased significantly by  $0.45 \log_{10}$  copies/cell during the first 12 weeks of HAART ( $P=.001$ ), without

significant subsequent changes from 12 to 48 weeks ( $P=.34$ ). The proportion of progressively motile spermatozoa was not associated with mtDNA copy numbers ( $P=.39$ ). In the semen donor mtDNA copy numbers in spermatozoa declined by  $0.39 \log_{10}$  copies/cell following HIV-1 seroconversion ( $P=.014$ ).

We therefore conclude that commencing HAART is associated with an increase in the mtDNA copy number of spermatozoa. The data obtained from our single semen donor may suggest that this could represent a reversal of reduced mtDNA copy numbers induced by HIV-1 infection, similar to what had been observed in PBMCs, but obviously data from larger numbers of patients would be needed to confirm this.

A decrease in mitochondrial DNA content, illustrative for mitochondrial toxicity, was not detected after the start of HAART. However, our conclusions are limited by the fact that only two of our patients used a HAART regimen which included the thymidine analogue nucleoside reverse transcriptase inhibitor zidovudine, known to have a more pronounced potential for mitochondrial toxicity. Thus, any possible detrimental effect of thymidine analogues or other antiretroviral drugs on spermatozoal mtDNA copy numbers cannot be excluded from our study. The reduction in the percentage of progressively motile spermatozoa after the start of HAART which we describe in CHAPTER 5 is therefore likely to be mediated by mechanisms other than effects on mtDNA, which could include both mitochondrially- and non-mitochondrially-mediated effects.

CHAPTER 7 and CHAPTER 8 relate to the evaluation of drug concentrations of didanosine (ddl), tenofovir (TDF), and atazanavir (ATV) in seminal plasma. It has been suggested that the male genital tract is a sanctuary site for HIV-1, which is defined as an anatomical site that is highly impermeable to some antiretroviral drugs, and in which HIV-1 replication may continue in spite of suppressive systemic treatment. On the other hand, penetration of antiretroviral agents into the male genital tract may lead to toxic effects on spermatozoa.

Data on penetration in seminal plasma were not yet available for all antiretroviral drugs. Therefore, we evaluated seminal plasma concentrations of ddl when used alone or when combined with TDF, and seminal plasma concentrations of ATV.

Paired semen and blood samples were obtained at variable time points after drug intake from 30 HIV-1-infected patients using a ddl ( $n = 15$ ) or ddl + TDF ( $n = 15$ ) containing antiretroviral



regimen. Ddl and TDF concentrations were measured in seminal and blood plasma and semen quality was assessed.

Both ddl and TDF penetrated well into seminal plasma. Whereas blood plasma ddl concentrations dropped to near or below the lower limit of quantification of 0.017  $\mu\text{g}/\text{mL}$  9 hours after drug intake, the ddl concentration in seminal plasma remained detectable during the whole dosing interval with a median of 0.20 and 0.21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the ddl and ddl + TDF groups, respectively. Tenofovir was detectable during the whole dosing interval in both blood and seminal plasma, with a median concentration of 0.12 and 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The median seminal-to-blood-plasma ratio was 3.3. Semen quality was within the normal range according to the criteria of the World Health Organization, except for the percentage of progressively motile spermatozoa, which was low in both groups of patients.

A study with the same design was repeated for the HIV protease inhibitor ATV, one of the more recently introduced protease inhibitors. ATV was detected in seminal plasma in 15 out of 15 HIV-infected men taking an ATV-containing regimen. However, drug penetration was limited and variable, and the median seminal/blood plasma ratio was only 0.1.

We conclude that both ddl and TDF penetrate well into seminal plasma, and ATV only to a limited extent. Thus, in patients taking these drugs, the male genital tract is not likely to represent a sanctuary site. Good penetration of antiretroviral drugs in the male genital tract prevents the selection and transmission of drug-resistant HIV strains, albeit at the cost of potentially toxic effects.

CHAPTER 9 focuses on the presence of HIV-1-susceptible cells in semen. In an HIV-1-sanctuary site viral replication may continue in spite of HAART treatment. A prerequisite for this to occur not only is the absence of adequate local drug concentrations, but also the presence of cells which are susceptible to HIV-1 infection. In the male genital tract (MGT) concentrations of several antiretroviral drugs are low, but whether HIV-1-susceptible cells are present is currently unknown. We therefore evaluated the presence of HIV-1-susceptible cells in semen and blood of HIV-1-infected men using HAART, HIV-1-infected therapy-naïve men and HIV-negative men.

Seminal lymphocytes and blood lymphocytes were stained with monoclonal antibodies against CD45, HLA-DR and CD38, and analyzed using flow cytometry. CD45+ cells expressing





both HLA-DR and CD38, i.e. CD45+HLA-DR+CD38+ cells, were considered to be susceptible to HIV-1 infection.

CD45+HLA-DR+CD38+ cells were detected in semen of all men, but the absolute number of these cells was extremely low and much lower than in blood. The percentages of CD45+HLA-DR+CD38+ cells in semen were 14%, 16% and 11% for HIV-1 positive men on HAART, untreated HIV-1-positive men and HIV-negative men, respectively ( $P=.48$ , ANOVA). The corresponding percentages of CD45+HLA-DR+CD38+ cells in blood were 17%, 25% and 10%, respectively ( $P<.0001$ , ANOVA). Although in most patients the percentage of CD45+HLA-DR+CD38+ cells appeared to be lower in semen than in blood, this difference was not statistically significant.

Semen thus contains cells susceptible to HIV-1, but whether these cells are present at sites in the MGT that are exposed to inadequate drug levels and whether the number of these cells is sufficiently high to be clinically relevant with respect to the selection or development of drug-resistant strains remains to be determined.

## **Reproduction in discordant couples with an HIV-1-infected man**

CHAPTER 10 evaluates the effectiveness of our protocol for IUI with processed semen. In the first part of this chapter we describe our first experiences from March 2003 until October 2004 with the treatment protocol in the Academic Medical Centre in Amsterdam for HIV-1-discordant couples in whom the man is HIV-1-infected. All couples requested assisted reproductive technologies to reduce the risk of HIV-1 transmission in order to achieve safe pregnancy.

After a standardized fertility screen the decision whether or not to start treatment was taken by a multidisciplinary team. During IUI mild ovarian hyperstimulation took place with recombinant follicle-stimulating hormone. On the day of IUI the semen was produced and processed, which is a four-step procedure that includes centrifugation, density centrifugation, a swim-up and concentration of the spermatozoa. During semen processing the spermatozoa are separated from all other semen components, because the spermatozoa themselves are probably not HIV-1 infected. Only when HIV-1-RNA tests in half of the spermatozoal fraction were negative, IUI was performed with the remaining part of the spermatozoal fraction.



Twenty discordant couples underwent 76 IUI cycles. Insemination was performed in 50 cycles (66%) and cancelled in 26 cycles (34%), 11 times because of too many follicles (risk for a multiple pregnancy), three times because of inappropriate timing of ovulation (no possibilities for virological testing in the weekend), three times because of not enough spermatozoa after processing, twice because of a positive HIV-1-RNA test of the spermatozoal fraction, and seven times because of other reasons.

Ten out of 20 women (50%) had a clinical pregnancy (i.e. a pregnancy visible on ultrasound), eight women had an ongoing pregnancy (i.e. a viable pregnancy on ultrasound at 12 weeks gestation). The clinical and ongoing pregnancy rates per started cycle were 13% and 11% respectively. Seven babies were born and none of the mothers or babies seroconverted for HIV-1 during the study period.

In the second part of this chapter, the appendix, we give an update of the IUI data until December 2007.

In total, over the first five years 50 HIV-1-discordant couples entered the IUI program after the initial screening. These 50 couples underwent 233 IUI cycles. In 152 cycles (65%) IUI was performed, in 81 cycles (35%) the insemination was cancelled, 40 times before ovulation and 41 times after ovulation.

Twenty-three women became pregnant (46%), 19 of these women had an ongoing pregnancy (38%) of whom 15 were singletons and 4 were twin pregnancies. Clinical pregnancy and ongoing pregnancy rates were 11% and 8%, respectively, per IUI cycle, and 17% and 13%, respectively, per insemination.

In addition, nine couples returned for a second child. Five of them had an ongoing pregnancy (56%). Clinical and ongoing pregnancy rates were 19% and 16%, respectively, per IUI cycle, and 25% and 21%, respectively, per insemination.

So far 28 children have been born. Within this observation period, no seroconversions of the mothers or their offspring have been observed. Unfortunately, the results of the IUI treatment are not constant over time. The percentage of IUI cancellation varied from 22% to 44% during the first five years. The percentage of clinical and ongoing pregnancies for first children were reasonable and steady during the first three years, but in 2006 and 2007 ongoing pregnancy rates dropped to 4–6% per cycle. There are two possible explanations



for the decreased pregnancy rates. First, in 2006 we started including men with lower semen qualities, and second, after the 4<sup>th</sup> IUI cycle no pregnancies were achieved, and over the years the distribution of IUI cycles became more unfavourable. Based upon these data we will start to offer a lower number of IUI cycles and we may also have to rethink the semen quality criteria, and/or start with IVF sooner.

CHAPTER 11 examines which risks HIV-1-discordant couples are willing to accept in order to conceive, and also reports anxiety for HIV-1 transmission amongst these couples. Before the writing of this thesis, no data existed on any anxiety couples undergoing IUI with processed semen may experience about getting infected by IUI, and no data existed on the magnitude of HIV-1-transmission risks these couples are willing to take to achieve pregnancy in an assisted reproductive technology program.

We therefore evaluated anxiety for HIV-1 transmission and the willingness to undergo assisted reproductive technologies in 50 HIV-1-discordant couples of whom the man was HIV-1-infected. We used the State-Trait Anxiety Inventory to assess anxiety. A hypothetical transmission risk of HIV-1 to the woman was systematically increased from 0.5% to 3%, to assess the willingness to undergo assisted reproductive technologies. For each patient, we sought to obtain the transmission risk at which they would switch from “choose assisted reproductive technologies” to an “unacceptable HIV-1-transmission risk by assisted reproductive technologies”.

State anxiety, reflecting existent anxiety, was significantly increased in both men and women compared with the reference value for the normal population ( $P < .001$ ). Median state anxiety scores were 46.0 (IQR 44.8–48.0) and 45.0 (IQR 44.0–47.0) for men and women, respectively. Trait anxiety, reflecting background anxiety, was in the normal range for both men and women compared with the reference value for the normal population, median 34.5 (IQR 25.8–40.3) and 31.0 (IQR 26.0–35.8), respectively. Trade-offs did not differ significantly between men and women ( $P = .58$ ). An HIV-1-transmission rate of 1% was acceptable to 50% of couples. In approximately 50% of couples, the initial willingness to undergo treatment changed into a decline when the HIV-1 transmission risk increased above 1%. Still, a 3% HIV-1 transmission rate was accepted by 32% of men and 37% of women.

Our data show that, although the risk of HIV-1 transmission to the woman can be expected to be reduced to almost nil by IUI with processed semen, the fear for HIV-1 transmission among these couples was not proportionally reduced, and anxiety was still present among



these couples. A remarkable finding is that almost 30% of couples accepted the costs and burden of assisted reproductive technologies at HIV-1-transmission rates of 3%, which is higher than the estimated risk during successful HAART.

In general, we conclude that risk assessment by patients is primarily determined by emotions and not by facts and we advise physicians to be aware of this ambiguity in their counselling.



## Nederlandse samenvatting

Drieëndertig miljoen mannen en vrouwen zijn op dit moment geïnfecteerd met het humane immuundeficiëntie virus type 1 (HIV-1). De meesten van hen wonen in Zuidelijk Afrika. Voor degenen die toegang hebben tot antiretrovirale middelen, heeft de komst van highly active antiretroviral therapy (HAART), ook wel cocktailtherapie genoemd, in 1996 geleid tot een spectaculaire stijging van de levensverwachting en van de kwaliteit van leven. Echter voor diegenen die verstoken zijn van HAART leidt een infectie met HIV-1 nog steeds tot acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) en uiteindelijk de dood.

In het westen wordt HIV-1 tegenwoordig als een chronische ziekte beschouwd en vanuit dat perspectief is kwaliteit van leven belangrijk. Steeds meer mannen en vrouwen geven te kennen een gezin te willen stichten. Geassisteerde voortplantingstechnieken kunnen in het geval van een HIV-1-discordant paar met een HIV-1-positieve man het risico op HIV-1 transmissie naar de HIV-negatieve partner verminderen. Geassisteerde voortplantingstechnieken die voor deze indicatie worden toegepast zijn intra uteriene inseminatie (IUI), in vitro fertilisatie (IVF) and intra cytoplasmatische sperma injectie (ICSI).

Over het effect van HIV-1 infectie en antiretrovirale middelen op semen kwaliteit is nog niet veel bekend. Omdat semen kwaliteit mede bepaalt of een zwangerschap tot stand kan komen, hetzij een spontane zwangerschap, hetzij een zwangerschap na IUI of IVF, wilden wij hier meer over te weten komen. Het is namelijk niet onmogelijk dat antiretrovirale middelen schadelijke effecten op spermatozoa kunnen hebben, omdat de meeste antiretrovirale middelen goed doordringen in de tractus genitilis van de man. Mogelijke effecten van het virus zelf op spermatozoa zouden kunnen worden veroorzaakt door schade aan mitochondria, de energie leveranciers van een cel.

Dit onderzoek heeft als doel het effect van HIV-1 en HAART op semen kwaliteit te beschrijven. Daarnaast hebben we ook gekeken naar angst en risico perceptie van discordante paren met een HIV-1-positieve man die behandeld worden met geassisteerde voortplantingstechnieken, omdat deze technieken nog niet 100% bewezen veilig zijn wat betreft preventie van HIV-1 transmissie.

In HOOFDSTUK 1 wordt enige achtergrondkennis van AIDS en de ontdekking van het HIV-1 virus gegeven en wordt de doelstelling van dit proefschrift beschreven.



In HOOFDSTUK 2 wordt een overzicht van de literatuur over HIV-1 in de tractus genitalis van man en vrouw gegeven en wordt het effect van HIV-1 en HAART op de vruchtbaarheid van mannen en vrouwen beschreven. Ook worden de verschillende methoden van geassisteerde voortplanting die toegepast kunnen worden bij mannen en vrouwen die zich willen voortplanten toegelicht.

## **Semen kwaliteit van mannen die geïnfecteerd zijn met HIV-1**

In HOOFDSTUK 3 wordt het effect van een acute HIV-1 infectie op semen kwaliteit beschreven. Van een semen donor die geïnfecteerd werd met HIV-1 waren diepgevroren semen monsters beschikbaar voor en na infectie. Het moment van acute HIV-1 infectie werd achteraf nauwkeurig vastgesteld door HIV testen uit te voeren op het diepgevroren semen. Daarnaast werden kwantitatieve HIV-1-RNA testen uitgevoerd om de concentratie van het HIV-1 RNA te bepalen in de semen monsters. Omdat van alle semen monsters een semen analyse beschikbaar was voor het invriezen, konden de semen parameters voor, tijdens en na een acute HIV-1 infectie worden vergeleken.

Achteraf was HIV-1 voor het eerst aantoonbaar in het semen monster van november 2000. De donor rapporteerde destijds griepachtige verschijnselen. De concentratie van het HIV-1 RNA was erg laag van november tot december 2000, daarna was het niet meer meetbaar. Op basis van deze gegevens hebben wij geconcludeerd dat de acute HIV-1 infectie in november 2000 moet hebben plaatsgevonden.

Na infectie met HIV-1 nam het semen volume, het percentage progressief motiele spermatozoa en het percentage spermatozoa met een normale morfologie af.

Voor zover bekend zijn wij de eersten die het effect van een acute HIV-1 infectie op semen kwaliteit beschrijven. In alle andere tot dan toe bekende onderzoeken waren mannen al met HIV-1 geïnfecteerd voordat de eerste semen analyse werd verricht. Doordat dit onderzoek slechts betrekking heeft op een man, weten we niet of deze uitkomsten generaliseerbaar zijn voor grote groepen en kunnen we geen definitieve conclusies trekken.

In HOOFDSTUK 4 wordt het effect van een onbehandelde asymptomatische HIV-1 infectie op semen kwaliteit behandeld. In de HIV-1 behandel richtlijnen van 2002 werd vastgelegd anti-retrovirale therapie bij een lager aantal CD4 positieve lymfocyten te starten dan in vorige richtlijnen. Om het effect van het uitstellen van behandeling op semen kwaliteit te onder-



zoeken werd in een cohort van 55 mannen met HIV-1 onderzocht of de duur van de HIV-1 infectie gevolgen had voor de semen kwaliteit. Alle mannen waren al HIV-1 geïnfecteerd voordat zij deelnamen aan het onderzoek en werden nog niet behandeld met antiretrovirale middelen vanwege hun relatief goede afweer, gemeten aan het CD4 cel aantal.

Bij alle mannen werd halfjaarlijks bloed- en semen onderzoek verricht. Een repeated measurements mixed-effects model werd gebruikt om de veranderingen in de semen parameters over de tijd te berekenen.

Gedurende een gemiddelde follow-up van 77 weken (interquartile range 39 tot 111 weken) daalde het gemiddelde aantal CD4 cellen statistisch significant van 480 naar 400 cellen/mm<sup>3</sup>, de gemiddelde HIV-1-RNA concentratie in het bloed plasma steeg statistisch significant van 4.1 naar 4.3 log<sub>10</sub> kopieën/mL. Gedurende deze periode bleven de semen parameters stabiel. Na correctie voor leeftijd, FSH spiegels, onthoudingsduur en roken was het aantal CD4 cellen niet statistisch significant geassocieerd met enige semen parameter, maar verrassend genoeg was HIV-1-RNA in het bloed plasma positief geassocieerd met de concentratie spermatozoa in het ejaculaat.

Uit dit onderzoek concluderen we dat langere blootstelling aan asymptomatische, onbehandelde HIV-1 infectie geen invloed heeft op semen kwaliteit bij mannen met relatief goede cellulaire immuniteit. Deze uitkomst is niet alleen geruststellend voor onbehandelde HIV-1 geïnfecteerde mannen met kinderwens maar levert ook belangrijke achtergrond informatie voor onderzoeken naar het effect van HAART op semen kwaliteit (HOOFDSTUK 5).

In HOOFDSTUK 5 wordt het effect van HAART op semen kwaliteit weergegeven. HAART is een combinatie van antiretrovirale middelen die door HIV-1-geïnfecteerde mensen levenslang moet worden ingenomen. Deze medicijnen kunnen het virus effectief onderdrukken en zo levensverlengend werken, maar zijn niet zonder gevolgen voor de lange termijn; afwijkingen in het vet- metabolisme, insuline resistentie, premature atherosclerose, neuropathieën en lipodystrofie kunnen op den duur ontstaan.

De meeste antiretrovirale middelen kunnen goed in de tractus genitalis van de man doordringen en kunnen zo de spermatogenese beïnvloeden. Het is belangrijk te weten of HAART effect heeft op de semen kwaliteit omdat semen kwaliteit de kans op succesvolle voortplanting beïnvloedt. Van 34 mannen die voor het eerst met antiretrovirale middelen startten werd prospectief de semen kwaliteit onderzocht. De duur van de infectie voor het starten van HAART



verschilde tussen de mannen. Bij alle mannen werd voor het starten van HAART bloed- en semen onderzoek verricht en 4, 12, 24, 36 en 48 weken daarna. Een repeated measurements mixed-effects model werd gebruikt om het effect van HAART op semen kwaliteit te berekenen, waarbij gebruik werd gemaakt van dezelfde methodiek als in HOOFDSTUK 4. De gemiddelde follow-up periode was 48 weken (interquartile range 33–52 weken). Vijf patiënten gebruikten HAART met thymidine analogen als bestanddeel, 23 HAART met tenofovir en zes gebruikten een andere combinatie.

Het percentage progressief motiele spermatozoa, afgemeten aan de WHO normen, was op alle tijdstippen laag en daalde tijdens de follow-up statistisch significant van 28% naar 17% ( $P=0.02$ ). Alle andere semen parameters waren binnen de normale waarden en bleven stabiel. De sterke punten van dit onderzoek zijn de longitudinale follow-up en het feit dat onze resultaten niet zijn vertekend door eerder HAART gebruik van de patiënten. Slechts twee mannen hadden in het verleden HAART gebruikt, allebei slechts voor een periode van maximaal acht weken. Omdat de follow-up slechts 48 weken besloeg en slechts 34 mannen deelnamen kunnen we geen uitspraak doen over de gevolgen van nog langduriger blootstelling van spermatozoa aan HAART. Door dit kleine aantal patiënten kunnen we dan ook geen uitspraak doen over welke HAART samenstelling het meest schadelijk is en welk mechanisme verantwoordelijk is voor de afname in beweeglijkheid van de spermatozoa. Omdat een HIV-1 infectie zelf geen effect had op semen parameters, zoals we in HOOFDSTUK 4 lieten zien, concluderen we dat de afname in progressief motiele spermatozoa waarschijnlijk veroorzaakt wordt door HAART.

## Pathofysiologische onderzoeken

In HOOFDSTUK 6 wordt de mitochondriale toxiciteit van HAART op spermatozoa besproken. Van zowel HIV-1 als HAART en dan vooral de thymidine analogen reverse transcriptase remmers zidovudine en stavudine, is bekend dat hun gebruik kan leiden tot een verlaging van het aantal mtDNA kopieën in verschillende cellen in het menselijke lichaam, zoals lymfocyten, monocytten en adipocyten. Hoe HIV-1 het mitochondriale DNA beïnvloedt is onbekend. Van HAART wordt gedacht dat het mitochondriaal DNA beïnvloedt door remming van het mitochondriale DNA replicatie enzym mtDNA polymerase gamma (pol- $\gamma$ ). Tot nu toe ontbraken longitudinale gegevens over het aantal mitochondriale DNA (mtDNA) kopieën in spermatozoa.





Mitochondria in spermatozoa leveren energie voor de beweeglijkheid van de spermatozoa. De afname in het percentage progressief motiele spermatozoa na het starten van HAART dat beschreven werd in HOOFDSTUK 5 zou dus veroorzaakt kunnen worden door een effect op het aantal mitochondriale DNA kopieën in spermatozoa. Het doel van dit onderzoek was dan ook mogelijk toxische effecten van HAART op mitochondriaal DNA in spermatozoa te onderzoeken. Hiertoe werd het aantal mtDNA kopieën longitudinaal bepaald met behulp van een kwantitatieve “real-time duplex nucleic-acid based amplification” test in spermatozoa bij een deel van de patiënten die deelnamen aan het onderzoek naar het effect van HAART op spermatozoa dat in HOOFDSTUK 5 beschreven werd. Het aantal mtDNA kopieën werd gemeten voor en 4, 12, 24, 36 en 48 weken na het starten van HAART.

Tenslotte werd het aantal mtDNA kopieën in de spermatozoa van de donor die serconverteerde voor HIV-1 gemeten, om inzicht te krijgen in een eventueel effect van een HIV-1 infectie zelf op mtDNA in spermatozoa.

In het cohort van tien patiënten die startten met HAART werd een statistisch significante toename gezien van het aantal mtDNA kopieën met  $0.45 \log_{10}$  kopieën/cel tijdens de eerste twaalf weken behandeling met HAART, terwijl het aantal mtDNA kopieën stabiel bleef van 12 tot 48 weken ( $P=.34$ ). Het aantal progressief motiele spermatozoa was niet geassocieerd met het aantal mtDNA kopieën ( $P=.39$ ). Het aantal mtDNA kopieën in de spermatozoa van de semen donor daalde met  $0.39 \log_{10}$  kopieën/cel na infectie met HIV-1 ( $P=.014$ ).

De conclusie is dat het starten van HAART leidt tot een toename van het aantal mtDNA kopieën in spermatozoa. Mogelijk betreft dit herstel van door HIV-1 infectie zelf gereduceerde mtDNA kopie aantallen, zoals eerder ook in andere lichaamscellen werd waargenomen, maar meer gegevens van grotere patiënten aantallen zijn nodig om dit te bevestigen.

Een afname van de hoeveelheid mtDNA, illustratief voor toxische effecten van HAART op mitochondria, werd niet waargenomen. De conclusies van ons onderzoek kunnen slechts beperkt zijn omdat slechts twee patiënten HAART gebruikten met nucleoside reverse transcriptase remmers van het type thymidine analogen, medicijnen met potentieel een sterkere toxisch effect op mitochondria. Op basis van dit onderzoek kan niet worden uitgesloten dat thymidine analogen of andere antiretrovirale middelen schade aanrichten aan het mtDNA. Het is echter waarschijnlijker dat de afname in het percentage progressief motiele spermatozoa na het starten van HAART dat beschreven is in HOOFDSTUK 5 wordt veroorzaakt door andere mechanismen.



In HOOFDSTUK 7 en HOOFDSTUK 8 worden de concentraties van didanosine (ddl), tenofovir (TDF), en atazanavir (ATV) in seminaal plasma beschreven. Van de tractus genitalis van de man wordt enerzijds gedacht dat het een "sanctuary site" is; een anatomisch afgegrensd gebied waarin antiretrovirale middelen niet of nauwelijks kunnen doordringen en waarin de vermenigvuldiging van het HIV-1 virus plaats kan vinden ondanks HAART. Anderzijds kan juist penetratie van antiretrovirale middelen in de mannelijke tractus genitalis leiden tot toxische effecten op spermatozoa.

Wij bepaalden concentraties van enkele antiretrovirale middelen in het seminaal plasma, omdat deze gegevens ontbraken van de nucleoside analoog didanosine (ddl), alleen of gecombineerd met de nucleotide analoog tenofovir (TDF) en de protease remmer atazanavir (ATV).

Van 30 HIV-1-geïnfecteerde mannen werden gepaarde semen- en bloed monsters verkregen op verschillende tijdstippen na inname van medicatie. Vijftien mannen gebruikten een ddl en 15 mannen gebruikten ddl + TDF als onderdeel van HAART. De concentratie ddl en TDF werd gemeten in seminaal- en bloedplasma en semen analyses werden verricht.

De penetratie van ddl en TDF was goed in seminaal plasma. Terwijl ddl concentraties negen uur na inname daalden tot onder de detectie limiet van 0.017  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in bloedplasma, bleef de ddl concentratie in seminaal plasma detecteerbaar op alle tijdstippen met een mediaan van respectievelijk 0.20 en 0.21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in de ddl en ddl + TDF groepen. Tenofovir was op alle tijdstippen detecteerbaar in seminaal- en bloedplasma met een mediane concentratie van respectievelijk 0.12 en 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De gemiddelde seminaal plasma/bloedplasma ratio 3.3. De semen kwaliteit was binnen de norm gesteld door de WHO, alleen het percentage progressief motiele spermatozoa was laag in de ddl en ddl + TDF groep.

Een onderzoek met dezelfde opzet werd verricht voor atazanavir, een van de nieuwere protease remmers. Atazanavir werd aangetoond in seminaal plasma van alle 15 mannen die atazanavir gebruikten als onderdeel van hun HAART regime. De concentratie was echter laag en varieerde van persoon tot persoon, met een mediane seminaal plasma/bloed plasma ratio van 0.1.

Concluderend is de penetratie van zowel didanosine als tenofovir in seminaal plasma goed, atazanavir penetreert ook in seminaal plasma maar in lage concentraties. De tractus genitalis van de man is voor deze medicijnen dus geen "sanctuary site". Penetratie van antiretrovirale



middelen in de tractus genitalis van de man voorkomt selectie en transmissie van resistente HIV-1 stammen, maar toxische effecten van deze middelen zijn niet uitgesloten.

In HOOFDSTUK 9 wordt de aanwezigheid van cellen in semen die gevoelig zijn voor HIV-1 beschreven. Ondanks de aanwezigheid van HAART kan HIV-1 repliceren in een "HIV-1 sanctuary site". Niet alleen de afwezigheid van antiretrovirale middelen in een "sanctuary site", maar ook de aanwezigheid van cellen die gevoelig zijn voor HIV-1 zijn voorwaarden voor HIV-1 replicatie. De concentratie van verschillende antiretrovirale middelen is laag in de tractus genitalis van de man, maar de aanwezigheid van HIV-1 gevoelige cellen is onbekend. Wij evalueerden de aanwezigheid van HIV-1 gevoelige cellen in semen en bloed in een cohort studie waarin HIV-1 geïnfecteerde mannen met HAART, HIV-1 geïnfecteerde mannen zonder HAART en HIV-negatieve mannen deelnamen.

Na kleuring van lymfocyten in semen en in bloed met monoklonale antistoffen tegen CD45, HLA-DR en CD38 werden de aanwezige lymfocyten geanalyseerd met behulp van flow-cytometrie. CD45+ cellen die zowel HLA-DR en CD38 tot expressie brachten, de CD45+HLA-DR+CD38+ cellen, werden als target cellen voor HIV-1 beschouwd.

CD45+HLA-DR+CD38+ cellen konden worden gedetecteerd in het semen van alle mannen, maar het absolute aantal van deze cellen was laag en veel lager dan in bloed. Het percentage CD45+HLA-DR+CD38+ cellen in semen was respectievelijk 14%, 16% and 11% voor HIV-1 positieve mannen met HAART, onbehandelde HIV-1-positieve mannen en HIV-negatieve mannen ( $P=0.48$ , ANOVA). In het bloed waren deze percentages respectievelijk 17%, 25% en 10% ( $P<0.0001$ , ANOVA). Hoewel bij de meeste patiënten het percentage CD45+HLA-DR+CD38+ cellen lager was in semen dan in bloed was dit verschil niet statistisch significant.

Semen bevat cellen die gevoelig zijn voor HIV-1, maar of deze cellen aanwezig zijn op plekken in de tractus genitalis van de man waar tegelijkertijd onvoldoende penetratie is van antiretrovirale middelen en/of het aantal van deze cellen klinisch relevant is met betrekking tot de selectie van resistente HIV-1 stammen moet nog worden uitgezocht.

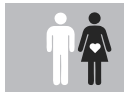


## Voortplanting in discordante paren met een HIV-1-geïnfecteerde man

In HOOFDSTUK 10 worden de eerste ervaringen met het IUI protocol in het Academisch Medisch Centrum voor HIV-1-discordante paren met een HIV-1-geïnfecteerde man beschreven en wordt de effectiviteit van deze behandeling geëvalueerd. Alle paren ondergingen IUI met HIV-1 spermabewerking van maart 2003 tot oktober 2004 met als doel het risico van HIV-1 transmissie te verkleinen en veilig zwanger te kunnen worden. Na een oriënterend fertiliteits onderzoek werd door een multidisciplinair team de beslissing genomen wel of geen IUI te verrichten. Bij een positieve beslissing vond milde ovariële hyperstimulatie met recombinant follikel stimulerend hormoon (FSH) plaats. Op de dag van de IUI werd het semen geproduceerd en vond een HIV-1 spermabewerking plaats. Het doel van de HIV-1 spermabewerking is het isoleren van spermatozoa uit semen, omdat spermatozoa zelf waarschijnlijk niet met HIV-1 geïnfecteerd zijn. Deze bewerking bestaat uit vier stappen (1) centrifugatie, (2) dichtheids centrifugatie, (3) opzwellen en (4) concentratie van de spermatozoa. De IUI werd alleen verricht als de HIV-1-RNA testen in tenminste de helft van de fractie spermatozoa negatief was. De IUI werd verricht met de andere helft van de spermatozoa fractie.

Twintig discordante paren ondergingen 76 IUI cycli. In 50 cycli werd een inseminatie verricht (66%). In 26 cycli ging de inseminatie niet door (34%); 11 keer omdat er teveel follikels waren (risico op meerlingzwangerschap), drie keer omdat de ovulatie in het weekend viel (geen mogelijkheid om HIV-1-RNA testen te doen), drie keer omdat er na HIV-1-sperma bewerking niet genoeg spermatozoa waren voor IUI, twee keer omdat de HIV-1-RNA test positief was na HIV-1-spermabewerking en zeven keer vanwege uiteenlopende redenen. Tien van de 20 vrouwen (50%) werden klinisch zwanger, gedefinieerd als een zwangerschapsring bij echoscopisch onderzoek en acht vrouwen waren doorgaand zwanger, gedefinieerd als een vitale zwangerschap bij 12 weken amenorroe. Het percentage klinische en doorgaande zwangerschappen per gestarte cyclus was respectievelijk 13% en 11%. Zeven kinderen werden geboren en geen van de moeders of baby's seroconverteerde voor HIV-1 tijdens de onderzoeksperiode.

In het tweede deel van dit hoofdstuk, de appendix, geven we het totaal aan IUI cycli tot december 2007. Gedurende de eerste vijf jaar werden 50 HIV-1 discordante paren behandeld met IUI. Deze 50 paren ondergingen 233 IUI cycli. In 152 cycli (65%) werd IUI verricht, in 81 cycli (35%) kon de inseminatie niet doorgaan; 40 keer voor de ovulatie en 41 keer na de ovulatie. Drieëntwintig vrouwen werden zwanger (46%), 19 van deze vrouwen waren



doorgaand zwanger (38%); 15 van een eenling en vier van een tweeling. Het percentage klinische en doorgaande zwangerschappen was respectievelijk 11% en 8% per IUI cyclus en 17% en 13% per inseminatie.

Negen paren kwamen terug voor een tweede kind. Vijf vrouwen werden doorgaand zwanger (56%). Het percentage klinische en doorgaande zwangerschappen in deze groep was respectievelijk 19% en 16% per IUI cyclus en 25% en 21% per inseminatie.

Tot op heden zijn er in totaal 28 kinderen geboren. Geen van de moeders of baby's seroconverteerde voor HIV-1 tijdens de gehele onderzoeksperiode.

Helaas waren de resultaten van de IUI behandeling niet constant tijdens de onderzoeksperiode. De percentages van afgebroken IUI cycli varieerden van 22% tot 44% tijdens de eerste vijf jaar. Daarnaast daalde het percentage doorgaande zwangerschappen tot 4–6% per IUI cyclus in 2006 en 2007. Er zijn twee mogelijke verklaringen voor deze afname. Ten eerste werden vanaf 2006 mannen toegelaten met slechtere semen parameters. Ten tweede werd niemand meer zwanger na IUI cyclus vier en steeg gedurende de laatste jaren het percentage paren dat met IUI cyclus vier tot en met negen bezig was. De zwangerschapspercentages nopen tot het herevalueren van de inclusie criteria, maar het is denkbaar dat een minder IUI cycli zullen worden aangeboden en wellicht zullen de semen kwaliteit criteria weer aangescherpt worden. Tenslotte zal ook eerder een IVF behandeling moeten worden overwogen.

In HOOFDSTUK 11 wordt het risico dat HIV-1-discordante paren bereid zijn te nemen om zwanger te worden behandeld en wordt ook de angst die deze paren mogelijk ondervinden tijdens een behandeling geëvalueerd. Voor het verschijnen van dit proefschrift waren er geen gegevens over de angst die paren mogelijk ondervinden om HIV-1 geïnficeerd te raken tijdens HIV-IUI behandeling en data over het risico dat deze paren bereid zijn te nemen om zwanger te worden met behulp van geassisteerde voortplantingstechnieken ontbraken.

Daarom onderzochten we de aanwezigheid van angst bij 50 HIV-1 discordante paren met een HIV-1-geïnficeerde man en onderzochten we het risico dat deze paren willen nemen tijdens een behandeling voor het starten van een geassisteerde voortplantingsbehandeling. De State-Trait Anxiety Inventory (STAI) werd gebruikt om angst te beoordelen. Daarnaast werd gekeken bij welk hypothetisch HIV-1-transmissie risico percentage oplopend van 0.5% tot 3% paren nog bereid waren geassisteerde voortplanting te ondergaan. Voor elke patiënt



werd beschreven bij welk percentage de “bereidheid om geassisteerde voortplantingstechnieken te ondergaan” veranderde in “een te hoog risico op HIV-1 infectie met geassisteerde voortplantingstechnieken”.

State anxiety, dat situatiespecifieke angst weergeeft, was significant verhoogd bij zowel mannen als vrouwen in vergelijking tot de referentie waarden in de normale populatie ( $P < .001$ ). De mediane state anxiety scores waren respectievelijk 46.0 (IQR 44.8–48.0) en 45.0 (IQR 44.0–47.0), voor mannen en vrouwen. De mediane trait anxiety, angst die niet situatie gebonden is maar meer beschouwd kan worden als een karaktertrek, was in de normale range voor zowel mannen als vrouwen in vergelijking tot de referentie waarden in de normale populatie, respectievelijk 34.5 (IQR 25.8–40.3) en 31.0 (IQR 26.0–35.8). Het risico dat paren bereid waren te nemen om geassisteerde voortplantingstechnieken te ondergaan verschilde niet significant tussen mannen en vrouwen ( $P = .58$ ). Vijftig procent van de paren beschouwde een HIV-1-transmissie risico van 1% als acceptabel bij geassisteerde voortplantingstechnieken, maar bij een HIV-1-transmissie percentage boven de 1% veranderde de helft van deze paren dit positieve oordeel in een negatief oordeel. Maar zelfs bij 32% van de mannen en 37% van de vrouwen was een HIV-1 transmissie risico van 3% bij geassisteerde voortplanting acceptabel.

Onze gegevens tonen aan dat, hoewel de kans op HIV-1 transmissie door geassisteerde voortplantingstechnieken tot ongeveer nul kan worden gereduceerd, de angst voor HIV-1 transmissie bij deze paren niet tot nul kan worden teruggebracht. Daarnaast accepteren ongeveer 30% van de paren HIV-1-transmissie risico's bij geassisteerde voortplantingstechnieken die hoger zijn dan het geschatte risico op HIV-1 transmissie bij HAART gebruik tijdens onbeschermd coïtus.

Wij concluderen dat het schatten van risico's niet gebeurt op basis van feiten maar op gevoel. Wij adviseren behandelend artsen dan ook rekening te houden met deze tweeslachtigheid bij het voorlichten van deze paren.

