



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Seminal significance: the forgotten father in recurrent pregnancy loss

Fossé, N.A. du

Citation

Fossé, N. A. du. (2022, June 16). *Seminal significance: the forgotten father in recurrent pregnancy loss*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3421302>

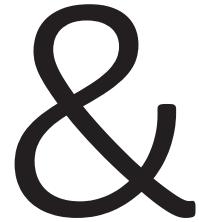
Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3421302>

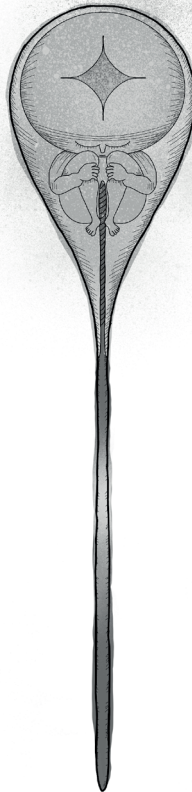
Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

APPENDICES



Nederlandse samenvatting
List of co-authors and their affiliations
List of publications
Curriculum Vitae
Dankwoord

NEDERLANDSE SAMENVATTING



De vergeten vader bij herhaalde miskramen

Herhaalde miskramen wordt gedefinieerd als het spontane verlies van tenminste twee zwangerschappen, optredend in de periode tussen de conceptie en het moment dat de foetus de termijn van levensvatbaarheid bereikt bij 24 weken amenorroeduur. Er zijn een aantal maternale aandoeningen geassocieerd met herhaalde miskramen, waaronder het antifosfolipidensyndroom, uterusanomalieën en aanwezigheid van anti-TPO-antilichamen gericht tegen de schildklier. De internationale klinische richtlijn van de Europese Vereniging voor Humane Reproductie en Embryologie (ESHRE) adviseert om diagnostiek te verrichten naar deze aandoeningen bij vrouwen met herhaalde miskramen. Het enige onderzoek dat bij de man (en tevens bij de vrouw) wordt ingezet, is een karyogram om te screenen voor gebalanceerde chromosomale translocaties, die eveneens een risicofactor voor herhaalde miskramen vormen. Naast de reeds genoemde maternale aandoeningen bestaan er een aantal andere maternale karakteristieken die het risico op (herhaalde) miskramen verhogen, waaronder een leeftijd boven de 35 jaar, obesitas of ernstig ondergewicht, roken en alcoholgebruik.

Ondanks het verrichten van uitgebreide diagnostiek, wordt bij minder dan 50% van de koppels met herhaalde miskramen een onderliggende aandoening gevonden. Voor koppels met onverklaarde herhaalde miskramen bestaan op dit moment geen bewezen effectieve therapieën. Dit draagt bij aan het verdriet en de frustratie die gepaard gaan met onverklaarde herhaalde miskramen. Koppels dragen de last van aanhoudende onzekerheid, terwijl klinici geen wetenschappelijk onderbouwde behandeling kunnen bieden. De psychische lijdensdruk ten gevolge van herhaalde miskramen is hoog. Uit eerder onderzoek blijkt dat zowel vrouwen als mannen een hoger risico lopen op het ontwikkelen van depressie en angststoornissen na het meemaken van herhaalde miskramen.

Het wetenschappelijk onderzoek naar herhaalde miskramen is van oudsher gericht op vrouwelijke factoren. Willen we meer inzicht verkrijgen in de pathofysiologie van herhaalde miskramen en de best mogelijke zorg leveren aan getroffen koppels, dan moeten we de vader niet vergeten. Lange tijd werd gedacht dat de totstandkoming van een zwangerschap het bewijs vormde voor normaal functionerende mannelijke geslachtscellen. Eventuele complicaties, waaronder een miskraam, werden zonder meer toegeschreven aan vrouwelijke afwijkingen. Aangezien de man echter de helft van het genetisch materiaal van het embryo aanlevert, lijkt het plausibel dat zijn invloed verder reikt dan alleen de conceptie. Een grondige evaluatie van paternale factoren vormt daarom een uitstekende kans om kennis over het ontstaan van herhaalde miskramen te vergroten.

Biologische achtergrond: het semen

Om meer te weten te komen over rol van de man ten aanzien van herhaalde miskramen, is het essentieel om in te zoomen op de substantie die daadwerkelijk de mannelijke bijdrage vormt: het semen. Het semen bestaat uit de spermatozoa (de spermacellen) en het seminaal plasma (de acellulaire vloeistoffractie). Volwassen spermatozoa zijn in hoog-gedifferentieerde cellen bestaande uit een staart, middenstuk en een kop. De kop bevat het paternale genetisch materiaal, dat ligt opgeslagen in DNA-moleculen. De voornaamste functie van spermatozoa is het transporteren van het haploïde paternale genoom naar het vrouwelijke voortplantingsstelsel. Het paternale DNA is verpakt in proteïnen; het complex van DNA en proteïnen wordt chromatine genoemd. Goede bescherming van het sperma-DNA is cruciaal omdat de DNA-reparatie capaciteit van spermatozoa beperkt is in vergelijking met andere lichaamscellen.

Het seminaal plasma is een combinatie van secreties geproduceerd door de mannelijke accessoire geslachtsklieren. Naast dat het seminaal plasma dient als een beschermend en voedend medium voor de spermatozoa, bevat het ook een verscheidenheid aan bioactieve signaalmoleculen: cytokines, chemokines, prostaglandines en andere immunologische factoren. Er wordt onderscheid gemaakt tussen pro-inflammatoire, immuunregulatorie en groeifactoren. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat deze bestanddelen van het seminaal plasma na ejaculatie kunnen interacteren met het maternale immuunsysteem.

Conventionele semenanalyse zoals uitgevoerd volgens de WHO richtlijnen is gericht op het volume van het ejaculaat en de concentratie en motiliteit van de spermatozoa. Er bestaat echter geen duidelijke associatie tussen deze semenparameters en herhaalde miskramen. Daarom hebben recente studies binnen het veld van herhaalde miskramen zich gericht op andere semenfactoren; voornamelijk genetische defecten. Er zijn aanwijzingen dat sperma DNA schade een belangrijke rol speelt bij herhaalde miskramen. Twee biologische theorieën met betrekking tot een potentiële mannelijke bijdrage aan herhaalde miskramen dienen als basis voor dit proefschrift. De eerste theorie is gefocust op sperma DNA fragmentatie en de tweede hypothese betreft verstoorde maternale immuunregulatie als gevolg van een disbalans in de samenstelling van het seminaal plasma.

Verhoogde levels van sperma DNA fragmentatie

Sperma DNA schade kan veroorzaakt worden via meerdere mechanismen, tijdens verschillende stadia van productie en transport van de spermatozoa. Een mechanisme dat vermoedelijk een grote rol speelt is het optreden van oxidatieve stress ten gevolge van een overmaat aan reactieve oxygen species (ROS). Een overmaat aan ROS kan leiden tot breuken in de DNA-strengen van het sperma: DNA fragmentatie. Verschillende



factoren kunnen leiden tot (over)productie van ROS, waaronder veroudering, obesitas, roken, excessief alcoholgebruik, de aanwezigheid van varicocele en verschillende milieuverontreinigende stoffen. Spermatozoa met bovenmatige oxidatieve DNA schade zijn soms wel in staat tot bevruchting, maar kunnen mogelijk tot een miskraam leiden in het blastocyst stadium of later in het vroeg-foetale stadium. Twee systematische reviews en meta-analyses lieten een significante associatie zien tussen verhoogde waarden van sperma DNA fragmentatie en herhaalde miskramen.

Verstoring van maternale immuunregulatie ten gevolge van afwijkingen in seminaal plasma

Een voorwaarde voor een succesvolle zwangerschap is dat het maternale immuunsysteem een embryo tolereert dat voor de helft lichaamsvreemd is. Ondanks vele studies die zich hierop gericht hebben, blijft het voor een groot deel onduidelijk hoe het half-lichaamsvreemde embryo (en later de foetus) ontsnapt aan 'afstoting' door het maternale immuunsysteem. Meerdere dierstudies en humane studies hebben gesuggereerd dat seminaal plasma in staat is om het maternale immuunsysteem te moduleren en bijdraagt aan de inductie van een suppressief milieu dat gunstig is voor het tot stand komen en behouden van zwangerschap. De hypothese is dat paternale antigenen die aanwezig zijn in het seminaal plasma resulteren in activatie en expansie van suppressieve regulatoire T-cellen. Er dient een balans te zijn tussen pro-inflammatoire en immuunregulatoire signaalmoleculen in het seminaal plasma. Van pro-inflammatoire factoren wordt gedacht dat ze leiden tot initiële inflammatoire effecten zoals het rekruteren van lymfocyten en antigeen-presenterende cellen, die noodzakelijk zijn om een immuunrespons te ontwikkelen ten aanzien van paternale antigenen in het seminaal plasma. Daarentegen wordt een seminaal plasma profiel met een overmaat aan pro-inflammatoire markers juist geassocieerd met infertiliteit en zwangerschapscomplicaties. Een belangrijke regulatoire factor in het seminaal plasma lijkt TGF- β te zijn. TGF- β heeft een krachtig effect op proliferatie en differentiatie van verschillende immuuncellen en samen met andere tolerantie-inducerende moleculen in het seminaal plasma, zoals PGE₂, sHLA-G en IL-10, wordt het beschouwd als essentieel voor het bewerkstelligen van een maternale immuunomgeving die bevorderlijk is voor zwangerschap. Er is nog weinig bekend over de relatie tussen seminaal plasma expressieprofielen en herhaalde miskramen. Ook moet nog onderzocht worden of de samenstelling van het seminaal plasma gerelateerd is aan leefstijl- en omgevingsfactoren.

Dit proefschrift

In **hoofdstuk 2** laten we de resultaten van een systematische review en meta-analyse zien bestaande uit epidemiologische studies die de associatie tussen paternale leeftijd en het risico op een miskraam onderzochten. Op basis van gepoolde data van tien beschikbare studies werd een significant verhoogd risico op een miskraam gevonden

vanaf een paternale leeftijd ≥ 40 jaar. Het risico was het hoogst in de leeftijdscategorie ≥ 45 jaar.

Hoofdstuk 3 bevat een overzicht van beschikbare literatuur over de relatie tussen paternale leefstijlfactoren in de preconceptieperiode en het risico op een miskraam. We richtten ons op paternaal roken, alcoholconsumptie en BMI. Een meta-analyse van acht studies liet zien dat het risico op een miskraam significant verhoogd is als een man ≥ 10 sigaretten per dag rookt in de preconceptieperiode. Het risico was het hoogst bij het van roken ≥ 20 sigaretten per dag. Het was niet mogelijk om een conclusie te trekken wat betreft het risico geassocieerd met paternaal alcoholgebruik, omdat weinig studies beschikbaar waren die tevens zeer heterogeen waren en een meta-analyse niet kon worden uitgevoerd. Er werd geen enkele studie gevonden die de relatie tussen paternaal BMI en het risico op een miskraam onderzocht.

Alle studies die geïnccludeerd werden in de twee systematische reviews werden kritisch beoordeeld op het risico op bias. Voor de associatie tussen paternale factoren en het risico op een miskraam vormen maternale factoren een belangrijke bron van potentiële confounding. Als hier niet adequaat voor gecorrigeerd wordt, kan dit leiden tot incorrecte interpretatie van paternale effecten. Om deze reden werden in de meta-analyses alleen studies geïnccludeerd die tenminste corrigeerden voor maternale leeftijd (in **hoofdstuk 2**) en maternaal rookgedrag (in **hoofdstuk 3**). Andere vormen van bias die een rol speelden in de geïnccludeerde studies waren informatiebias en selectiebias. Onze kritische beoordeling van methodologische aspecten liet zien dat verschillende studiedesigns elk hun eigen voor- en nadelen hebben met betrekking tot het risico op bias. Al met al waren de studies van goede kwaliteit en lieten ze een duidelijke associatie zien tussen het risico op een miskraam en respectievelijk paternale leeftijd en paternaal roken. Op basis van deze observationele studies is het niet mogelijk om causale effecten te bewijzen. Dat de gevonden associaties toch causale relaties betreffen, wordt echter wel waarschijnlijker door de eerder besproken biologische theorieën.

In **hoofdstuk 4** wordt het studieprotocol gepresenteerd van het REMI III project. Dit project beslaat zowel een case-control studie als een cohortstudie, gericht op de rol van paternale factoren in etiologie en prognose van herhaalde miskramen. Een deel van de doelen van het REMI III project zijn reeds behaald en de resultaten zijn weergegeven in dit proefschrift. Andere doelen zijn het onderwerp van lopend onderzoek.

Een brandende vraag van veel koppels met herhaalde miskramen heeft betrekking op hun prognose: wat is de kans op een succesvolle zwangerschap in de toekomst? Om koppels van goed onderbouwde informatie te voorzien over hun vooruitzichten kan een predictiemodel uitkomst bieden. Van de huidige, gedateerde predictiemodellen zijn

zowel de accuraatheid van de voorspellingen als validatieprocedures niet beschreven dan wel niet uitgevoerd. Bovendien zijn deze predictiemodellen gebaseerd op slechts twee predictoren: de maternale leeftijd en het aantal miskramen in de voorgeschiedenis. In **hoofdstuk 5** verkenden we of het voorspellen van de kans op een doorgaande zwangerschap voorbij 24 weken amenorroeduur bij stellen met onverklaarde herhaalde miskramen nauwkeuriger wordt als meer kandidaatpredictoren in beschouwing worden genomen, waaronder ook paternale variabelen. We laten zien dat het voorspellen van deze uitkomst accurater wordt als de volgende additionele predictoren worden toegevoegd aan het model (naast maternale leeftijd en het aantal miskramen in de voorgeschiedenis): paternale leeftijd, maternaal en paternaal BMI, maternale rookstatus en eerdere IVF/ICSI behandeling. Het discriminatief vermogen van het model uitgedrukt in de *area under the curve* (AUC) was 0.63, vergeleken met een AUC van 0.57 voor een model op basis van alleen de twee conventionele predictoren. Dat ook paternale variabelen deel uitmaken van de nieuw geïdentificeerde predictoren is een belangrijke bevinding voor zowel patiënten als clinici. Echter moet benadrukt worden dat het voorspellend vermogen van het model nog steeds beperkt is. Om een betrouwbaarder model te ontwikkelen dat in de klinische praktijk gebruikt kan worden, moet nog meer werk verricht worden. Het toevoegen van veelbelovende biomarkers zoals sperma DNA fragmentatie zou de prestaties van het model kunnen verhogen. Tegelijkertijd moeten we ons realiseren dat zwangerschapsuitkomst zeer complex is om te voorspellen, zoals tevens geïllustreerd wordt door de resultaten van andere predictiestudies binnen de reproductieve geneeskunde.

In **hoofdstuk 6 en 7** onderzochten we de rol van seminaal plasma in relatie tot herhaalde miskramen. In **hoofdstuk 6** voerden we een clusteranalyse uit op seminaal plasma samples van mannen uit koppels met herhaalde miskramen (hierna genoemd: herhaalde miskramen-mannen). We identificeerden twee verschillende expressieprofielen in het seminaal plasma. Eén subgroep van herhaalde miskramen-mannen had relatief hoge waarden van pro-inflammatoire cytokines in het seminaal plasma. Mannen in deze subgroep waren significant ouder en hadden relatief ongunstigere leefstijlkenmerken wat betreft rookgedrag, alcoholconsumptie en overgewicht. Herhaalde miskramen-mannen in de andere subgroep hadden een seminaal plasma profiel dat meer overeenkwam met een controlegroep van mannen wiens partners gezonde zwangerschappen hadden. In **hoofdstuk 7** gebruikten we een *in vitro* model om het effect van seminaal plasma op genexpressie van T-cellen en monocytten te onderzoeken. Immuncellen van een anonieme vrouwelijke bloeddonor werden geïncubeerd met seminaal plasma van herhaalde miskramen-mannen en mannen uit een controlegroep wiens partners gezonde zwangerschappen hadden. We toonden aan dat seminaal plasma een direct effect heeft op T-cellen en monocytten, passend bij differentiatie richting een meer immuunregulatorisch fenotype. Daarnaast vonden we in deze studie een aantal opmerkelijke verschillen in

stimulatorische capaciteit van seminaal plasma van herhaalde miskramen-mannen en seminaal plasma van mannen uit de controlegroep. De resultaten suggereren dat de immunoregulatorische capaciteit van seminaal plasma afwijkend kan zijn in het geval van herhaalde miskramen. Toekomstig onderzoek moet de interacties tussen seminaal plasma en de maternale immuunomgeving in fysiologische omstandigheden en bij herhaalde miskramen in meer detail in kaart gaan brengen.

Er is toenemend bewijs dat seminaal plasma een rol speelt in het bewerkstelligen van aanpassingen in het maternale immuunsysteem die van belang zijn voor een succesvolle zwangerschap. Als hier verstoringen in optreden, bijvoorbeeld door een afwijkende samenstelling van het seminaal plasma, draagt dit mogelijk bij aan het ontstaan van een miskraam. Uiteindelijk zouden we hier op in kunnen spelen bij het ontwikkelen van nieuwe therapieën voor koppels met herhaalde miskramen, bijvoorbeeld door het toedienen van specifieke factoren uit het seminaal plasma of substanties met vergelijkbare effecten die een maternale suppressieve immuunrespons bevorderen. Echter moeten we ons niet uitsluitend richten op het seminaal plasma. Een andere stap is het ontrafelen van de interacties tussen de samenstelling van het seminaal plasma en de mate van sperma DNA fragmentatie. Sperma DNA fragmentatie lijkt een belangrijke factor te zijn in relatie tot herhaalde miskramen. Een hindernis die echter overwonnen dient te worden is het betrouwbaar en gestandaardiseerd kunnen meten van sperma DNA fragmentatie. Op dit moment zijn er vele testen en protocollen in omloop en is het nog niet geheel duidelijk wat de beste methode is. Onze en andere studies wijzen erop dat zowel de samenstelling van het seminaal plasma als de mate van sperma DNA fragmentatie geassocieerd zijn met leefstijlfactoren. Het effect van mannelijke leefstijlinterventies op deze semenfactoren en ook op zwangerschapsuitkomst moet dan ook zeker een onderwerp van toekomstig onderzoek zijn. Daarnaast is suppletie van antioxidanten een potentieel effectieve methode om sperma DNA schade veroorzaakt door oxidatieve stress te behandelen.

Naast meer inzicht te verkrijgen in de pathogenese van herhaalde miskramen en het vinden van nieuwe therapieën, moeten we ons ook inzetten om passende ondersteunende zorg te bieden aan patiënten. In **hoofdstuk 8** brachten we voorkeuren voor ondersteunende zorg in kaart van zowel mannen als vrouwen getroffen door herhaalde miskramen. Binnen het medisch domein waren de voorkeuren grotendeels gelijk. Opvallend was dat vrouwen meer belang hechtten aan 'soft skills' van de zorgverlener. Mannen wensten minder steun van familie en vrienden. Hoewel de exacte redenen voor de verschillen in voorkeuren tussen mannen en vrouwen onzeker blijven, zijn er een aantal mogelijke verklaringen op basis van eerdere onderzoeken. Vergeleken met vrouwen zijn mannen minder geneigd hun gevoelens te uiten en support voor zichzelf te zoeken na herhaalde miskramen. Veel mannen geven aan sterk en positief te

willen blijven ter ondersteuning van hun partner. Als zorgverleners is het van belang dat we ook aandacht besteden aan de behoeften van de mannelijke partners, zeker omdat onderzoek heeft uitgewezen dat zij eveneens een hoge psychische lijdensdruk ervaren als gevolg van herhaalde miskramen. Toekomstige studies, bijvoorbeeld interviews en focusgroeponderzoek, moeten de behoeften van deze mannen verder exploreren en richting geven aan het ontwikkelen van nieuwe interventies specifiek gericht op het ondersteunen van mannen.

Conclusie en toekomstperspectieven

Op basis van de studies gepresenteerd in dit proefschrift, kan geconcludeerd worden dat een uitsluitend op vrouwen gerichte aanpak bij herhaalde miskramen onterecht is: de mannelijke partner verdient dringend onze aandacht. We hebben de rol van de man in herhaalde miskramen vanuit verschillende perspectieven onderzocht. Zowel epidemiologische als biologische bevindingen onderstrepen een significante bijdrage van de man aan etiologie en prognose van herhaalde miskramen.

In het geval van een frustrerende, gecompliceerde en slecht begrepen aandoening als herhaalde miskramen kan er een neiging bestaan om therapieën aan te bieden die niet bewezen effectief zijn. De druk hiertoe kan extra toenemen doordat het beleid ten aanzien van het voorschrijven van (experimentele) behandelingen substantieel verschilt tussen verschillende landen en zelfs varieert op lokaal niveau. Echter, in plaats van (buiten klinische trials) experimentele behandelingen voor te schrijven met onbekende voor- en nadelen, moeten we ons focussen op het verder ontrafelen van onderliggende mechanismen, het tot stand brengen van hoogkwalitatief bewijs voor gerichte behandelingen en het bieden van uitstekende patiëntcounseling en ondersteunende zorg.

Het meer betrekken van de man, zowel in het wetenschappelijk onderzoek als in de kliniek, kan een sleutel vormen tot een lang gewenste doorbraak in herhaalde miskramen. Het is aannemelijk dat we met relatief simpele interventies gericht op de mannelijke partner, de uitkomsten voor koppels met herhaalde miskramen aanzienlijk kunnen verbeteren. Er is voldoende wetenschappelijk bewijs om te gaan starten met leefstijlinterventiestudies voor mannen (bijvoorbeeld stoppen met roken, afvallen). Voor alle toekomstige studies binnen dit veld pleiten we voor een gecombineerde aanpak van epidemiologisch en basaal-wetenschappelijk onderzoek. De link moet altijd gelegd worden tussen de interventie, de samenstelling van het semen en klinische uitkomsten. Daarnaast moeten we vol inzetten op het uitbreiden van kennis over interacties tussen het seminaal plasma en de maternale lokale immuunomgeving. Voordat we kunnen starten met specifieke immunotherapieën, zijn er eerst meer in vitro en in vivo studies vereist, om erachter te komen welke semenfactoren nu echt het verschil kunnen maken in een succesvolle

zwangerschap en hoe we daar nieuwe therapieën op kunnen baseren. Nieuwe inzichten binnen dit onderzoeksveld zijn ook van belang voor andere onderzoeksgebieden; een beter begrip van de maternale immuunadaptatie tijdens zwangerschap kan ook bijdragen aan vooruitgang binnen de transplantatie-immunologie.

Behalve samenwerking tussen verschillende disciplines, verdient het ook de aanbeveling om internationaal een uniforme definitie te hanteren van herhaalde miskramen en moeten we nationaal en internationaal meer de krachten bundelen om stappen te kunnen maken binnen het onderzoek naar herhaalde miskramen. Het zou waardevol zijn als grootschalige prospectieve studies worden opgezet die zowel klinische data als biologisch materiaal van beide partners met herhaalde miskramen verzamelen en analyseren.

Miskramen zijn lange tijd een taboeonderwerp geweest. De laatste jaren hebben een aantal bekende vrouwen publiekelijk gesproken over hun miskramen en de media-aandacht die daarop volgde heeft bijgedragen aan groeiende erkenning en het meer bespreekbaar maken van dit onderwerp. Naast het doorbreken van het taboe rondom miskramen is het ook de hoogste tijd om af te rekenen met de misvatting dat miskramen zonder meer een maternale origine hebben. Dit proefschrift benadrukt dat (herhaalde) miskramen ook het resultaat kunnen zijn van paternale factoren. Dit moet aan koppels met herhaalde miskramen worden vermeld in de klinische setting en ook worden uitgedragen aan het algemene publiek. Het is de hoogste tijd om over te schakelen van een vrouw-gerichte naar een koppel-gerichte aanpak bij herhaalde miskramen.

