

OXIDATIEVE EN EPIGENETISCHE VERANDERINGEN VAN HET DNA LEIDEND TOT VRUCHTBAARHEIDSTOORNISSEN EN DE IMPLICATIES VOOR GEASSISTEERDE REPRODUCTIE

DECLER WIM, AMEYE ALICE, BALDUYCK JONAS, COMHAIRE FRANK

DEEL I: INLEIDING

1. OORZAKEN VAN FERTILITEITSTOORNISSEN

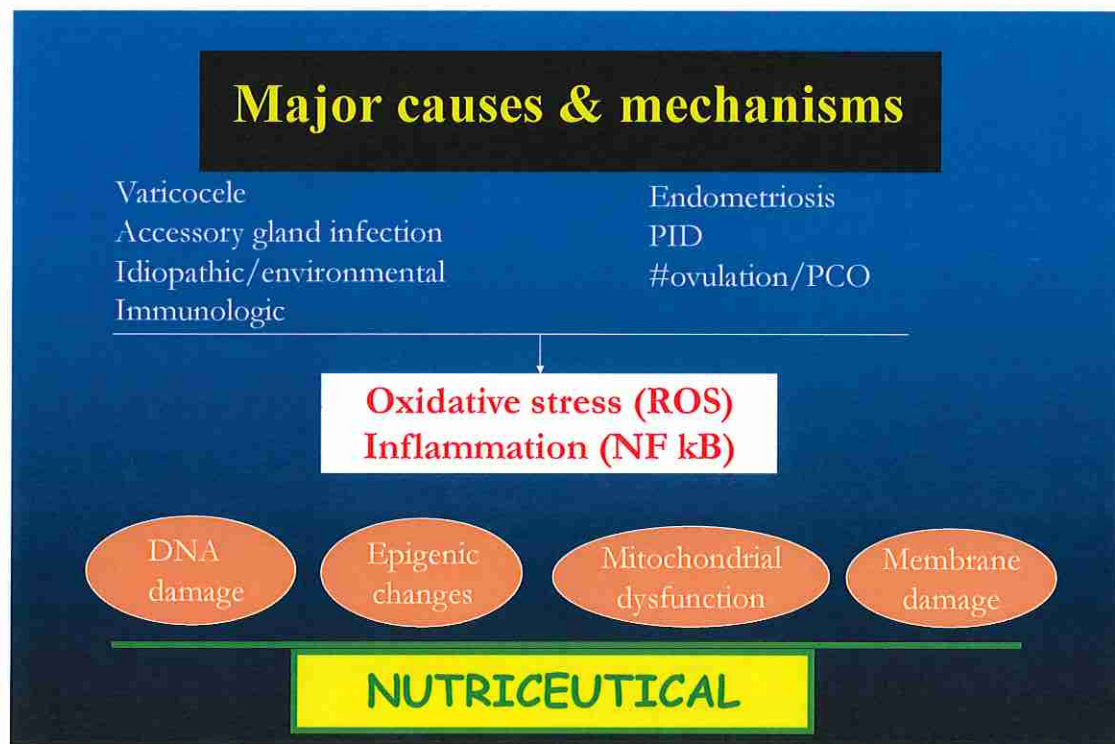
De oorzaken en mechanismen van fertiliteitsstoornissen zijn grotendeels gekend. Bij de vrouw gaat het hoofdzakelijk om de volgende aandoeningen (figuur 1):

- ovulatiestoornis, zoals bijvoorbeeld het polycystisch ovarieel syndroom (PCOS)
- infectieuze en inflammatoire factoren, zoals beschadiging of afsluiting van de eileiders (PID)
- endometriose met het ontstaan van eilanden van baarmoederweefsel in de buikholte, buiten de baarmoeder.

Deze laatste groep kan worden ingedeeld in, enerzijds, patiënten die mechanische fertiliteitsstoornissen ontwikkelen ten gevolge van belangrijke vergroeiingen en, anderzijds, patiënten met een chronische ontstekingsstoestand in de buikholte, de eierstokken (ovaria) en eileiders.

Bij de man zijn de voornaamste oorzaken:

- varicocele, een soort spatader rond de teelballen
- infectie van de accessorische geslachtsklieren, namelijk de prostaat, de zaadblaasjes en/of de epididymides (bijballen).
- immunologische stoornissen door de aanmaak van antistoffen tegen de eigen zaadcellen
- zogenaamd idiopathische sperma deficiëntie, die meestal het gevolg is van externe factoren zoals hormoon-verstorende en toxische stoffen in het milieu.

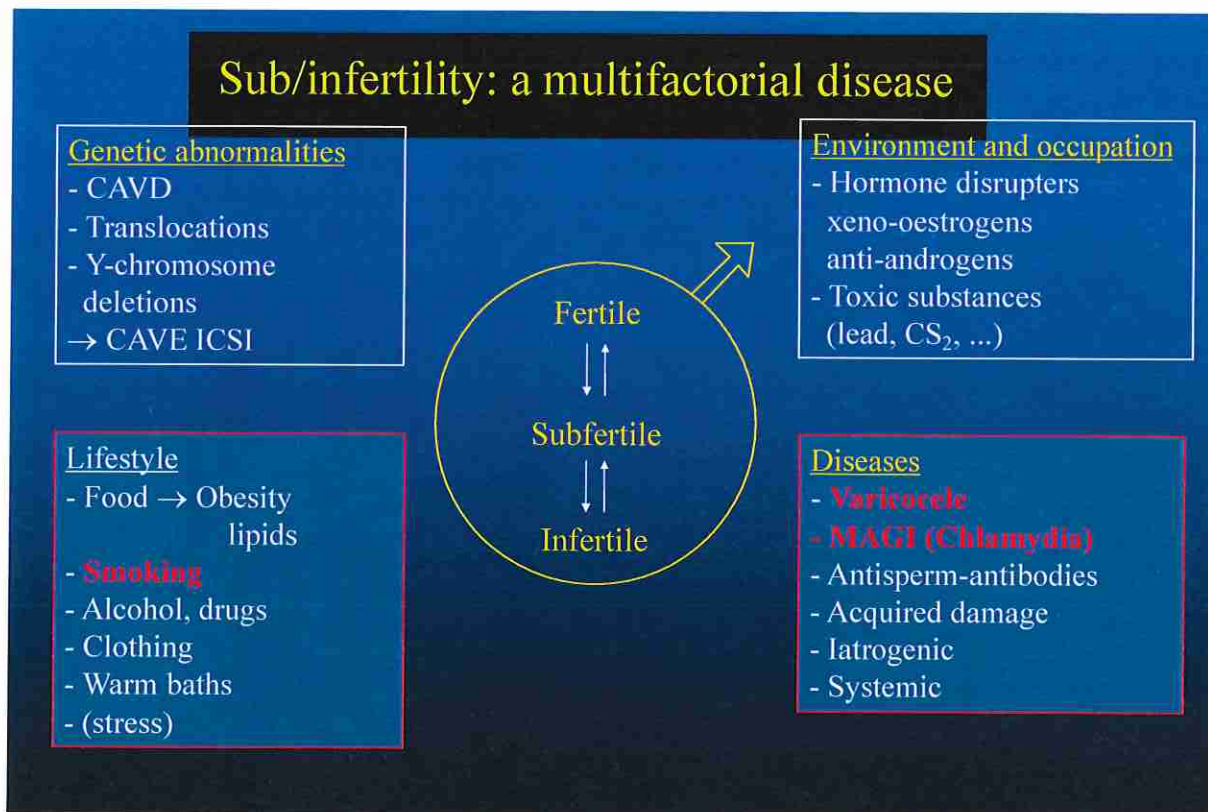


Figuur 1

De voornaamste oorzaken van en de mechanismen die bij het ontstaan van infertiliteit betrokken zijn.

2. OXIDATIEVE STRESS

De gemeenschappelijke pathologische mechanismen die aan de basis liggen van de gestoorde vruchtbaarheid van zowel de man als van de vrouw, zijn oxidatieve overbelasting en ontsteking (figuur 1). Deze hebben een effect op zowel het genetisch materiaal zelf (het DNA van het genoom), als op de wijze waarop het DNA tot "expressie" komt (via de epigenetica), als op de werking van de mitochondria, als op de celwand (celmembraan).



Figuur 2

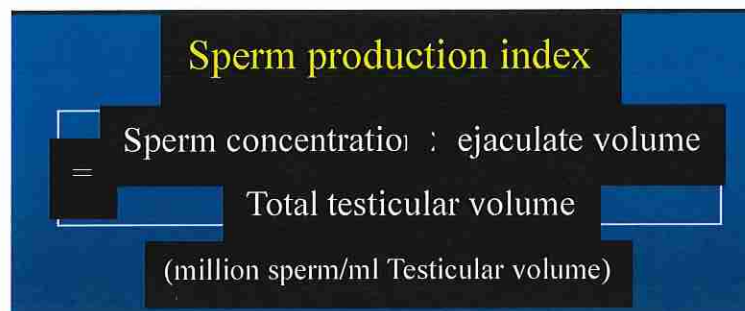
Meerdere factoren werken samen in bij de overgang van vruchtbaar, naar verminderd vruchtbaar tot onvruchtbaar, en kunnen elkaar versterken.

Verminderde vruchtbaarheid (subfertiliteit) en onvruchtbaarheid (infertiliteit of steriliteit) ontstaan meestal als gevolg van het elkaar versterkende effect (synergie of synergisme) van meerdere factoren (figuur 2). Infertiliteit kan het gevolg zijn van een aangeboren defect zoals een chromosoom afwijkingen. Typische voorbeelden zijn afwijkingen van het aantal chromosomen zoals de aanwezigheid van een extra chromosoom bij de man met Klinefelter syndroom (47 XXY), of het ontbreken van een chromosoom bij het Turner syndroom bij de vrouw (45 XO). Een ander voorbeeld is aangeboren (congenitale) afwezigheid van de zaadleiters (vasa deferentia; CAVD). Deze afwijking gaat soms gepaard met de "taai slijm ziekte" (mucoviscidose). Bij die patiënten is er wel aanmaak van spermatozoa in de testes, en kan de techniek van Intra Cytoplasmatische Sperma Injectie (ICSI) worden toegepast gebruik makend van spermatozoa die via chirurgie worden bekomen uit de teelballen (testiculaire sperma extractie; TESE). Deze methode mag evenwel niet zonder meer toegepast worden wegens het risico van de overerving en de genetische afwijking naar het nageslacht. Een "informed consent" van de toekomstige

ouders is noodzakelijk. De techniek van pre-implantatie genetische diagnose (PGD) laat gelukkig toe om enkel die embryo's te selecteren die geen genetisch defect vertonen, waardoor de behandeling veilig voor de nakomeling(en) kan gebeuren.

Mannelijke infertiliteit is echter meestal verworven. In de overgrote meerderheid van deze gevallen is de slechte spermakwaliteit het gevolg van de aanwezigheid van een varicocele. Deze moet steeds worden opgespoord, en kan perfect worden behandeld zonder operatie, waarna de vruchtbaarheid zich vaak herstelt. De zogenaamd onverklaarde of "idiopathische" sperma deficiëntie ontstaat door de ongunstige invloed van uitwendige factoren met als voornaamste: onevenwichtige voeding, ongezonde levenswijze, belangrijke stress, en giftige of hormoonverstorende chemische stoffen in het milieu (figuur 2). Een overtuigend voorbeeld hiervan is de ongunstige invloed van roken, of het gebruik van bepaalde "genotmiddelen" (drugs, alcohol) op het bevruchtend vermogen van de zaadcellen.

Om de kwaliteit van de spermaproductie te beoordelen heeft Comhaire het begrip "spermatozoa-productie-index" ingevoerd, die als maatstaf dient van de capaciteit van de teelballen om zaadcellen te produceren. Voor het berekenen van deze index wordt de concentratie van de spermatozoa vermenigvuldigd met het ejaculatievolume, en dit getal wordt gedeeld door het testiculaire volume (figuur 3). Bij fertiele mannen bedraagt de spermaconcentratie gemiddeld 66,8 miljoen per ml, en het ejaculaat volume gemiddeld 2,96 ml. Per ejaculaat zijn dus nagenoeg 200 miljoen zaadcellen aanwezig die worden geproduceerd door de testes met een normaal volume van 40 ml. De normale sperma-productie-index bedraagt dus grofweg 5 miljoen per ml (of gram) testisweefsel.



The diagram shows the formula for the Sperm production index (SPI) on a blue background. The title 'Sperm production index' is in yellow. The formula is presented as a fraction: the numerator is 'Sperm concentration : ejaculate volume' and the denominator is 'Total testicular volume'. An equals sign is placed to the left of the fraction. Below the denominator, the units '(million sperm/ml Testicular volume)' are specified.

$$\text{Sperm production index} = \frac{\text{Sperm concentration : ejaculate volume}}{\text{Total testicular volume}}$$

(million sperm/ml Testicular volume)

Figuur 3

De formule voor het berekenen van de sperma productie index (SPI) volgens Comhaire.

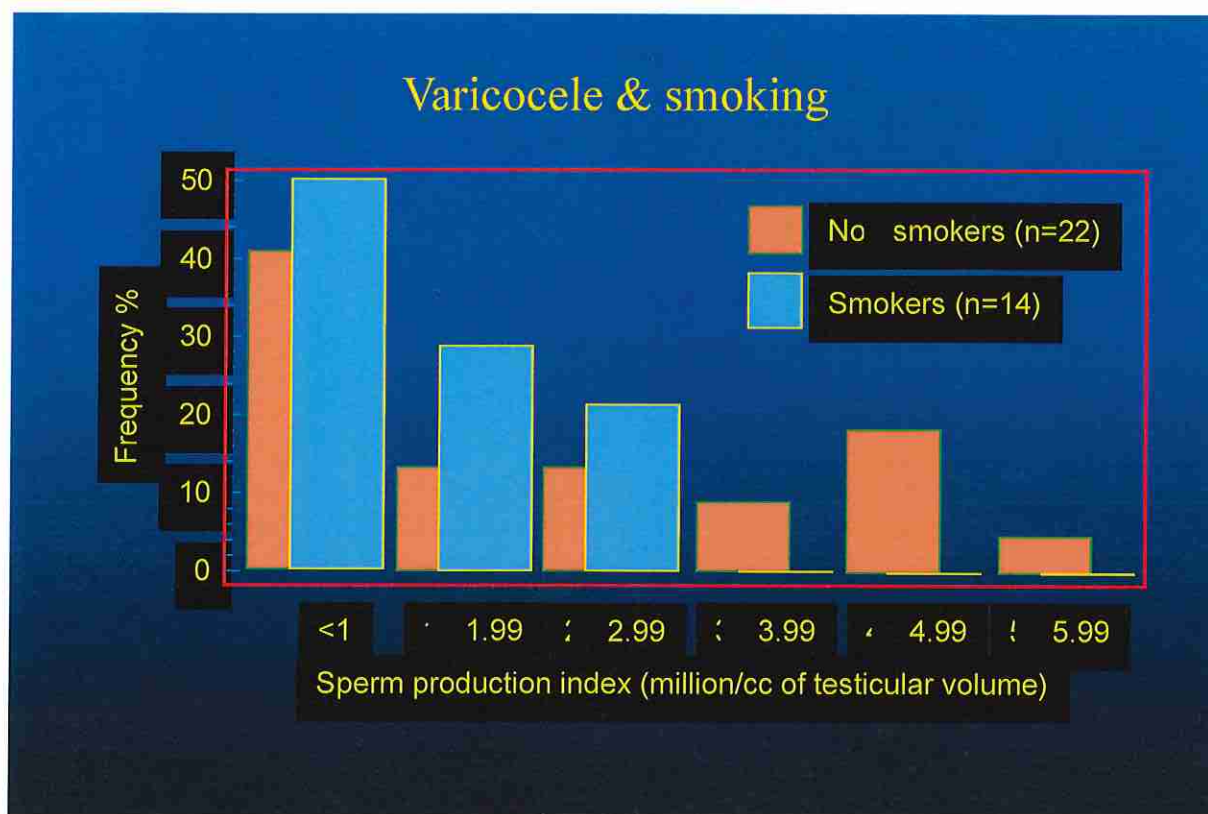
Voorbeelden van elkaar versterkende ongunstige factoren.

Bij de processen van zogenaamde "synergie" spelen de reactieve zuurstofradicalen (reactive oxygen species; ROS) een zeer belangrijke rol. De ROS zijn chemische moleculen die zuurstof bevatten (zoals het welbekende waterstofperoxide, H_2O_2) en die giftig zijn door het beschadigen van de celkern en het DNA, en van de celwand, de membraan. Deze groep omvat ook de oxidatieve stikstofderivaten.

Deze oxidatieve stoffen zijn uiterst belangrijk wegens hun schadelijke effecten op de cellen van de voortplantingsorganen (eicellen en zaadcellen, de gameten genoemd), zelfs al hebben sommige van deze oxidatieve agentia slechts zeer korte levensduur van enkele duizendsten van een seconde.

2.1 ROKEN

Comhaire en medewerkers hebben vastgesteld dat roken een duidelijk ongunstig effect uitoefent op de spermaproductie bij mannen met een varicocele (figuur 4). Terwijl bij bijna een derde van de niet-rokers met een varicocele een bevredigende spermaproductie index aanwezig is (kolommen aan de rechterzijde), wordt bij de rokers met een varicocele uitsluitend een spermaproductie-index (SPI) van minder dan 3 miljoen per ml testisweefsel vastgesteld (kolommen aan de linkerzijde). Uit dit voorbeeld blijkt het ongunstig synergistisch effect van roken bij personen van wie de testisfunctie reeds in het gedrang kwam door de aanwezigheid van een varicocele.



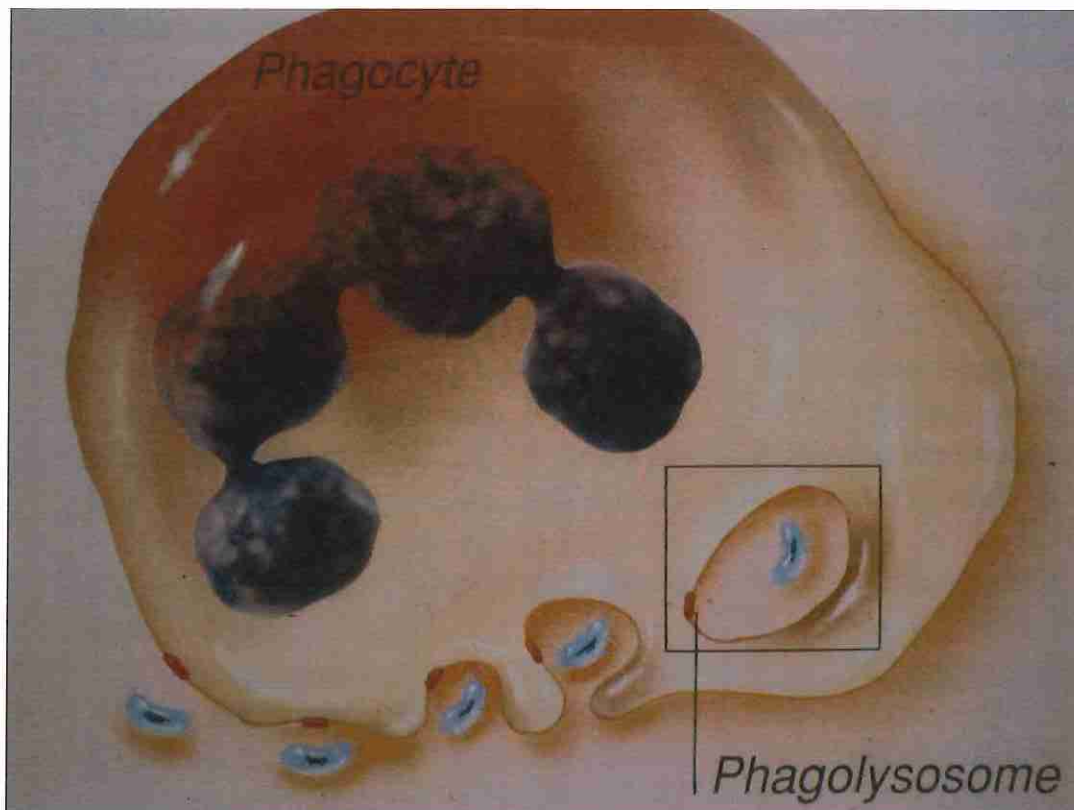
Figuur 4

De sperma productie index (SPI) is berekend bij verminderd vruchtbare mannen met een varicocele waarvan een aantal rokers waren (Smokers, blauwe kolommen) en een aantal niet-rokers (Non-smokers, oranje kolommen). Lagere waarden van de SPI wijzen op sterkere afname van de capaciteit van de teelballen om spermatozoa te produceren.

2.2 INFECTIE

Een verhoogd aantal witte bloedcellen in een zaadstaal kan wijzen op een infectie/ontsteking van zogenaamde accessoire geslachtsklieren, namelijk de prostaat, de zaadblaasjes en/of de bijballen. Dit leidt tot een versterking van het ongunstig effect dat wordt teweeggebracht door bijvoorbeeld een varicocele of door externe factoren zoals ongezonde voeding of toxische stoffen in het milieu.

Het mechanisme dat aan de grondslag hiervan ligt, speelt zich af op celniveau. Bij een ontstekingsproces zal een bepaalde groep van witte bloedcellen (de granulocyten of ettercellen) de bacterie of het virus aanvallen, en opslorpen via een proces dat fagocytose wordt genoemd. In de witte bloedcellen worden dan vrije zuurstofradicalen (ROS) geproduceerd, waaronder het waterstofperoxide, in kleine blaasjes: de fagolysosomen (figuur 5). De ROS vernietigen de bacterie.

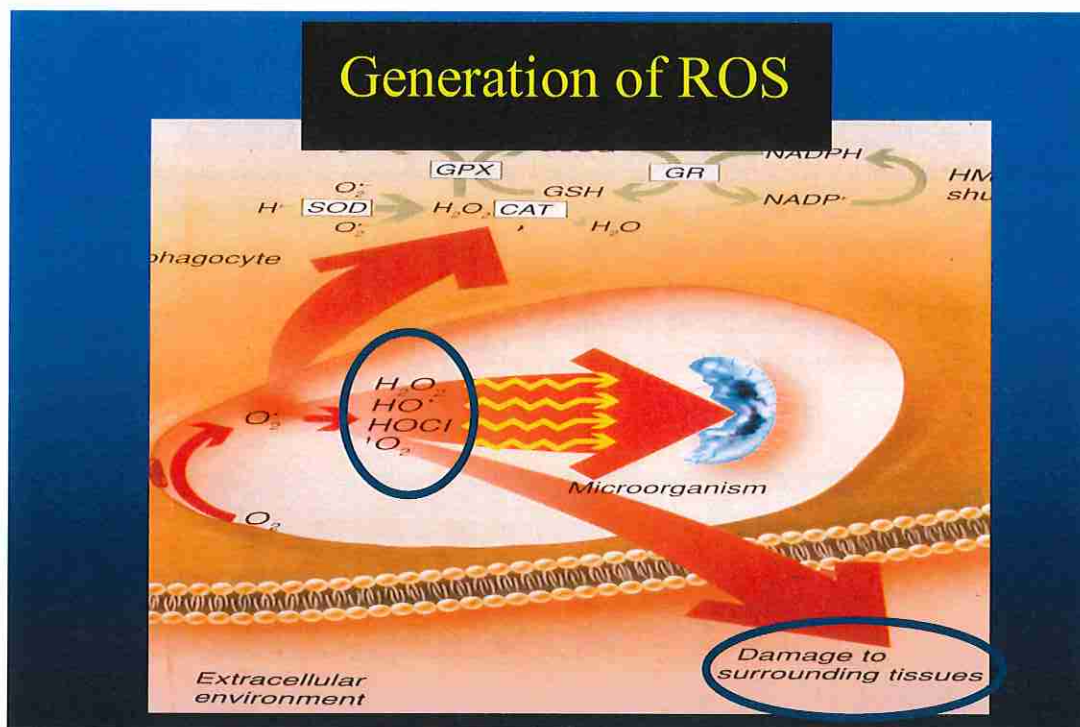


Figuur 5

De witte bloedcel slurpt de bacterie op, en vernietigt die in de fagolysosoom.

Een deel van de zuurstofradicalen lekt evenwel doorheen de celwand van de witte bloedcel, en komt aldus buiten de cel terecht in het zaadvocht (figuur 6). Daar tasten de ROS de spermatozoa aan waardoor die niet meer in staat zijn om de eicel te bevruchten.

Dit is ook duidelijk aantoonbaar in het microscopisch beeld van een spermastaal in geval van infectie. Na peroxidase-kleuring kleurt de witte bloedcel duidelijk aan (bruin) wat wijst op de aanwezigheid van ROS, terwijl de peroxidase-negatieve voorlopers van de spermatozoa (de spermatocyten en spermatiden) roze tegenkleuren (figuur 7).



Figuur 6

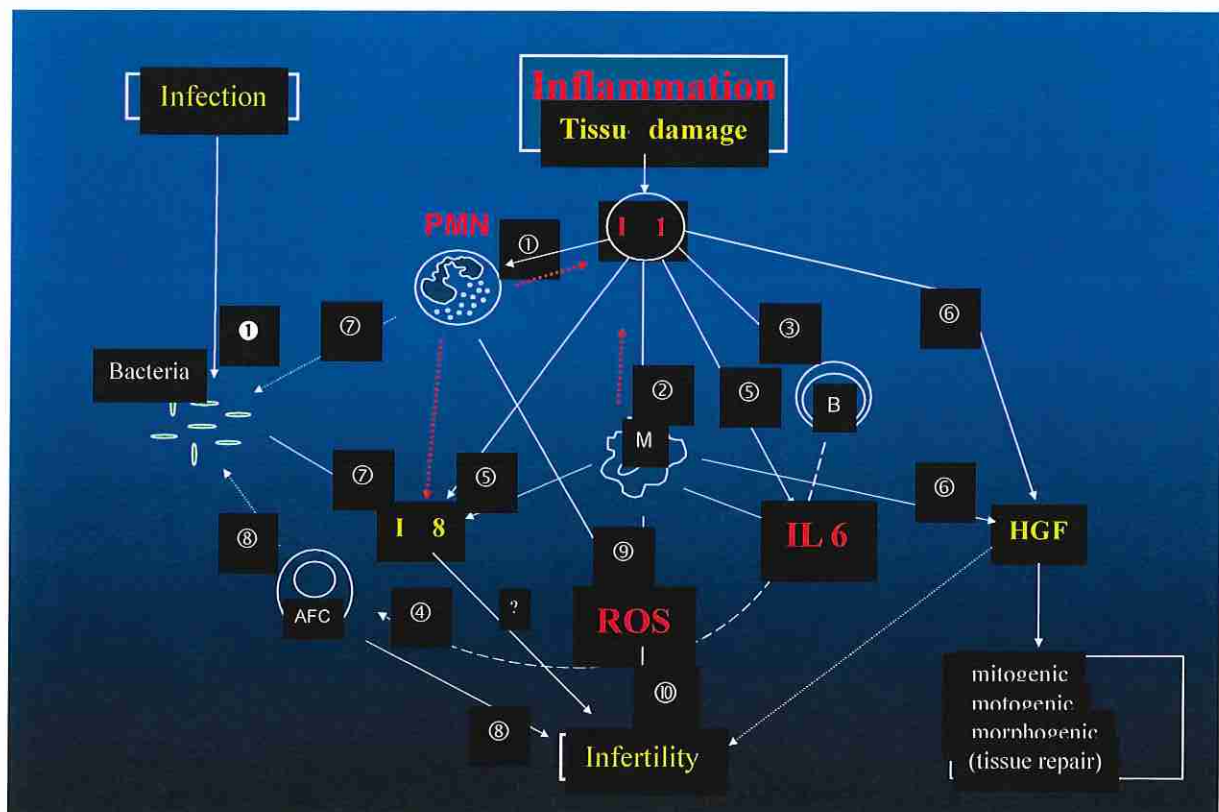
In de fagolysosoom wordt de bacterie vernietigt door de ROS, maar een deel hiervan lekt doorheen de celwand naar buiten de cel in het omgevend weefsel en de zaadcellen.



Figuur 7

De witte bloedcellen die ROS bevatten worden bruin gekleurd, terwijl de andere ronde cellen, die voorlopers zijn van de productie van de zaadcellen, roze kleuren.

De complexe mechanismen die betrokken zijn bij het schadelijk effect van infectie/ontsteking op de vruchtbaarheid van de spermatozoa zijn afgebeeld in figuur 8. Bij patiënten met een infectie treedt een ontstekingsreactie op die de polymorfo-nucleaire (PMN) witte bloedcellen activeert. Deze cellen vallen de bacteriën aan en vernietigen ze door fagocytose. Hierbij komt het interleukine 1 (IL-1) vrij. Deze ontstekingsstof activeert andere groepen van witte bloedcellen, namelijk de macrofagen en de B-lymfocyten, die op hun beurt respectievelijk de ontstekingsstoffen Interleukine 1 (IL-1) en Interleukine 6 (IL-6) vrijstellen. Via deze weg enerzijds, en rechtstreeks door de PMN anderzijds worden vrije zuurstofradicalen (ROS) aangemaakt. Deze zuurstofradicalen hebben dan een schadelijk effect op het DNA en op de celwand van de spermatozoa en ze remmen de aanmaak van energie in de mitochondriën. Mede daardoor vermindert de beweeglijkheid van de zaadcellen en kunnen die de eicel niet bereiken en bevruchten.



Figuur 8

Het complexe mechanisme dat verantwoordelijk is voor de beschadiging van de spermatozoa en onvruchtbaarheid in geval van infectie en ontsteking.

2.3 OXIDATIEVE STRESS BIJ IDIOPATHISCHE INFERTILITEIT

Bij een beperkt deel van de patiënten met infertiliteit en een abnormale sperma analyse wordt geen duidelijke oorzaak gevonden voor de afwijking. In dat geval spreekt men van idiopathische infertiliteit. Het gaat dus om een uitsluitingsdiagnose die enkel mag worden gesteld na een gedegen klinisch en biologisch onderzoek. Bij deze aandoening speelt de synergie tussen diverse externe invloeden een rol, soms samen met minder belangrijke andere factoren. Bij zeldzame patiënten worden immers mineure genetische afwijkingen vastgesteld, waarvan de betekenis echter twijfelachtig is. Vaak zijn het de eenzijdige en onevenwichtige voeding, emotionele of professionele stress, het overdreven gebruik van genotmiddelen als drugs en alcohol, maar ook obesitas of sedentaire levenswijze, werken bij hoge temperatuur, banale infectie met koorts (zoals een "gewone" griep), etc. die een ongunstige invloed uitoefenen op het bevruchtend vermogen van de spermatozoa.

De teams van Skakkebaek in Denemarken, en van Scharpe in het Verenigd Koninkrijk, en ook de groep rond Comhaire in Vlaanderen, hebben het belang aangetoond van hormoon-ontregelende stoffen in het milieu. Het gaat hier voornamelijk over chemische stoffen met een effect dat lijkt op dat van vrouwelijk hormoon, en die xeno-oestrogenen worden genoemd. Voorbeelden hiervan zijn het oude diëthyl-stilboestrol (DES-hormoon), het verboden pesticide DDT, de bisfenolen en phtalaten in plastics, de poly gechloreerde bisfenolen (PCB'S) in transformatoren, en de alkyl fenolen die als bewaarmiddelen worden toegevoegd aan cosmetica, maar ook aanwezig zijn in kledingstukken gemaakt uit natuurlijke vezels zoals katoen, wol of zijde. In Vlaanderen speelden enkele decennia geleden de dioxines een belangrijke rol als xeno-oestrogeen. De hoeveelheid ervan in de bodem en de lucht is echter sterk afgenomen dankzij ingrijpende maatregelen, wat tot een gedeeltelijk herstel van de spermakwaliteit in de bevolking heeft geleid.

Een onderzoek in stad Antwerpen en de landelijke gemeente Peer heeft aangetoond dat in Peer zowel de gemiddeld spermaconcentratie als het gehalte mannelijk hormoon in het bloed lager was dan in Antwerpen. Dit bleek het gevolg te zijn van het illegaal gebruik van DDT in de velden rondom Peer. Ook te vermelden dat de hoeveelheid vrouwelijk hormoonachtige stoffen in het oppervlaktewater van de boven-Schelde te Oudenaarde vergelijkbaar was met de concentratie van vrouwelijk hormoon in het bloed van een zwangere vrouw. Dit ten gevolge van extensief gebruik van meststoffen op de grotendeels organische drainagegebieden aan de boven-Schelde.

Er zijn ook voorbeelden uit het dierenrijk. Een anekdote in dit verband: in vrij rurale, praktisch niet-industriële streken waar landbouwers veel pesticiden gebruikten, werd er een opvallende verandering in de palingpopulatie gezien, die voor een groot deel hermafrodit werden als gevolg van de xeno-oestrogeen-effecten veroorzaakt door de toen gebruikte zogenaamde "gewas beschermers". Die werden vooral aangewend in de maïsteelt (het Atrazine), en zijn nu verboden.

Een ander voorbeeld hiervan is de infertiliteit bij cheeta's in Afrika. Na het massaal besproeien van beplanting in Afrika met insecticiden, werd na verloop van tijd een drastische daling van de populatie cheeta's gezien. Dit was te wijten aan hun consumptie van dieren die de insecticiden hadden ingenomen via de voeding. Door accumulatie van de insecticiden en de daaruit voortvloeiende schade door zuurstofradicalen, daalde de natuurlijke fertiliteit van de cheeta's. Uiteindelijk werd de situatie dermate ernstig, dat er ICSI-programma's moest worden opgestart om het overleven van de soort in stand te houden.

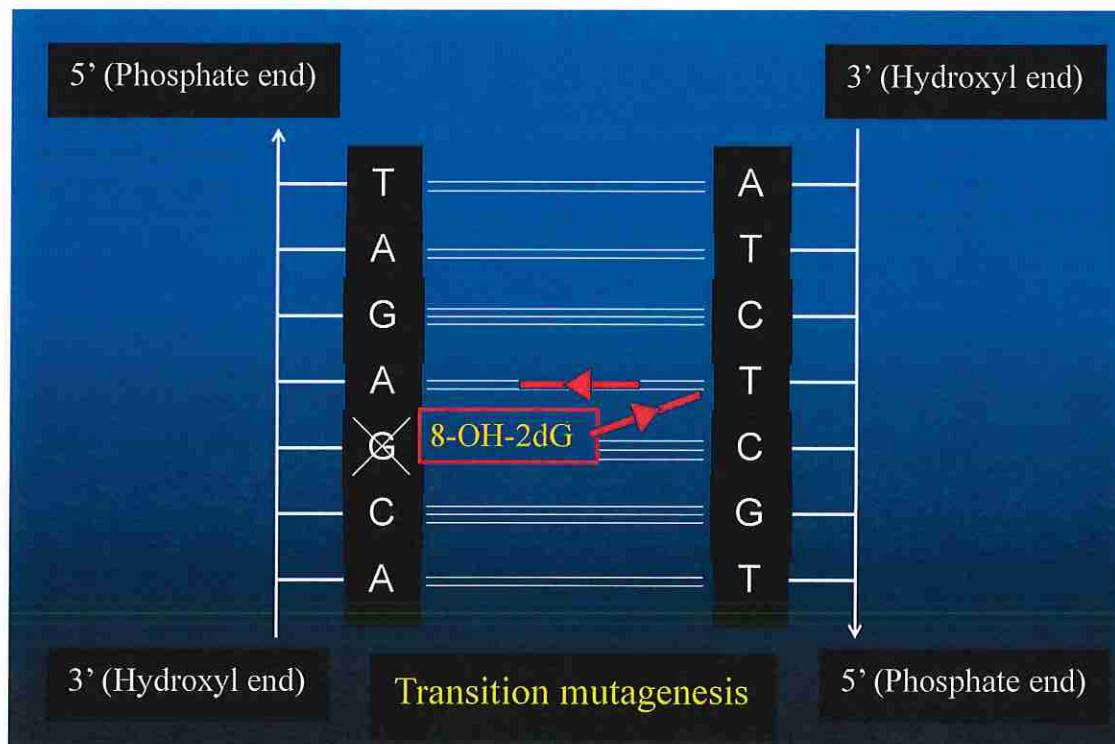
DEEL II: BESCHADIGING DOOR ROS

De oxidatieve processen hebben een specifieke schadelijke invloed op verschillende delen van de cel. Hierna worden de belangrijkste aspecten van de volgende celorganellen besproken: de celkern en het DNA, de celmembraan en de mitochondriën.

1. CELKERN EN DNA

DNA bestaat uit een dubbele helix. Deze dubbele helix is opgebouwd uit di-nucleotiden, waarbij verbindingen gemaakt worden tussen respectievelijk adenine met thymine (ApT), en cytosine met guanine (CpG). Deze nucleotiden zijn opgehangen aan een soort van ruggengraat, gevormd uit groepen van fosfaat deoxyribose. De helix bestaat dus uit 2 strengen die in omgekeerde richting aan elkaar gekoppeld zijn.

Deze DNA-keten kan echter beschadigd raken door vrije zuurstofradicalen (ROS) via een oxidatief proces. Het nucleotide guanine zal hierdoor worden geoxideerd tot het 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OH-2dG, figuur 9). Bij de celdeling en de heropbouw van het DNA in de dochtercellen bindt het 8-OH-2dG niet aan het cytosine, wat het normaal zou moeten doen, maar wel aan het thymine. Hierdoor ontstaat een oxidatieve transitie-mutatie, wat een soort puntmutatie is die kanker kan verwekken en tot stoornissen bij de celdeling kan leiden, wat uiteraard zijn implicaties heeft op de embryologie.



Figuur 9

Het geoxideerde Guanine (G) bindt in de dochtercellen die ontstaan na de celdeling, niet met het Cytosine (C) maar met Thymine (T) wat resulteert in een mutatie van het DNA.

In normale omstandigheden worden dergelijke kleine foutjes van het DNA gecorrigeerd door het “repair”-eiwit P53, dat de helix controleert en het gemuteerde stukje door het correcte dinucleotide kan vervangen. Indien echter teveel mutaties in de DNA-helix zijn opgetreden, als gevolg van belangrijke oxidatieve overbelasting, kan het P53-eiwit niet meer alles corrigeren en ontstaat er een definitieve beschadiging van het DNA, die voortgezet wordt in alle daaropvolgende celdelingen.

Onderzoek door Loft et al. in 2003 heeft aangetoond dat een hogere concentratie 8-OH-2dG gepaard gaat met lagere zwangerschapskans bij spontane bevruchting. Tijdens IVF behandeling, waarbij de zogenaamde Intra Cytoplasmatisch Sperma Injectie (ICSI) wordt toegepast, kunnen zaadcellen met oxidatief beschadigd DNA worden ingebracht in de eicel. Dit verklaart allicht de wat hogere kans op miskraam en mogelijk ook groter risico op kanker bij IVF nakomelingen.

Door het toedienen van een voedingssupplement met krachtig anti-oxidatief effect aan de man, kan de DNA schade van de spermatozoa in belangrijke mate worden voorkomen.

Anderzijds hebben wij aangetoond dat een duidelijk verhoogde concentratie 8-OH-2dG in de urine aanwezig was bij vrouwen die werden behandeld met IVF, in vergelijking met de referentiepopulatie. Dit bewijst de verhoogde oxidatieve DNA schade, die zich allicht ook voordoet ter hoogte van de eicellen.

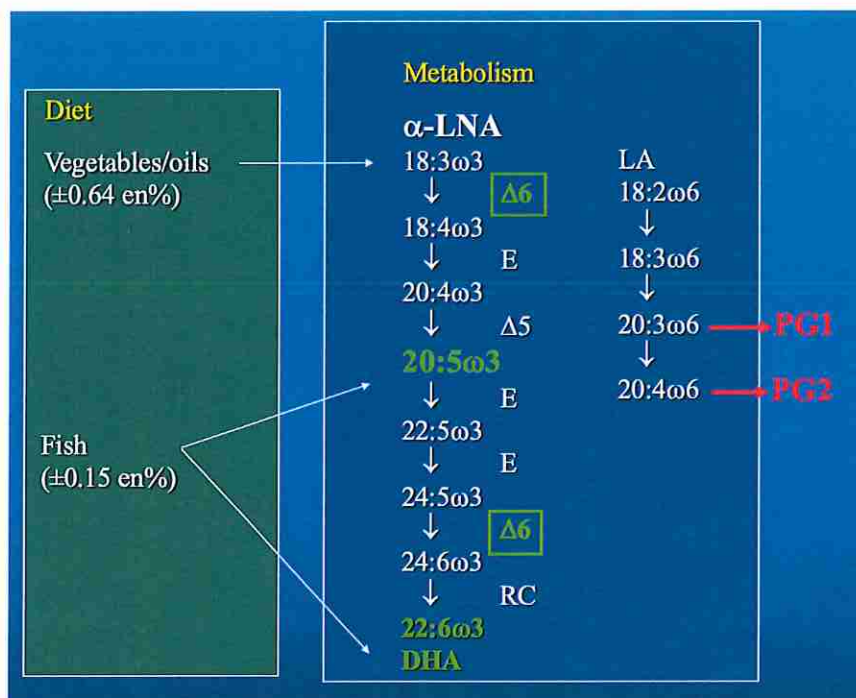
2.1 CELMEMBRAAN EN VETZUREN

De zuurstofradicalen werken evenzeer in op de celwand, de celmembraan. Een normale celmembraan bestaat uit een dubbele laag fosfolipiden die als een soort van ritssluiting in elkaar haken. De twee lagen zijn met elkaar verbonden door de vetzuren bestaande uit lange poly-onverzadigde koolstof ketens. Langere omega-3 vetzuren met veel dubbele bindingen, zoals het docosahexaeenzuur (DHA) en het eicosapentaeenzuur (EPA) maken de celmembraan soepel. Wanneer deze vetzuren beschadigd raken door zuurstofradicalen, vermindert de "souplesse" en fluïditeit van de membraan, en verandert tevens de drie-dimensionele structuur. Bij zaad- en eicellen is fluïditeit van de membraan van groot belang om het samensmelten en de bevruchting te bewerkstelligen. Bij beschadiging van de membraan kan er dus geen bevruchting plaatsvinden.

Zoals hierboven vermeld veroorzaakt oxidatieve overbelasting schade en mutaties aan het DNA, maar die zaadcellen kunnen niet met de eicel versmelten omdat de celmembranen eveneens aangetast zijn. Bij patiënten die ICSI ondergaan gebeurt dit wel, ICSI wordt immers toegepast wanneer er geen spontane versmelting van de celmembranen plaatsvindt. Via injectie van de zaadcel in de eicel (ICSI) wordt het probleem van het versmelten van de celmembranen omzeild, maar wordt er dus wel mogelijk beschadigd DNA van de abnormale zaadcel in de eicel ingebracht. Dit kan verstrekende gevolgen hebben voor de nakomeling. Dit aspect komt later nog ter sprake wanneer het gaat om epigenetische DNA-veranderingen.

De vetzuren zijn zeer belangrijk voor de normale werking van de cel wegens hun rol als bestanddeel van de celmembraan.

De kenmerken van de vetzuren worden uitgedrukt via een soort formule. Het eerste cijfer wijst op het aantal koolstofatomen. Een hoger cijfer geeft aan dat het vetzuur uit een langere keten bestaat van koolstofatomen. Het tweede cijfer toont aan hoeveel dubbele bindingen er zijn, en het derde cijfer beschrijft de plaats van de laatste dubbele binding in de vetzuurketen ten opzichte van het einde van de keten.



Figuur 10

In deze figuur wordt het metabolisme afgebeeld waardoor de vetzuren met een korte keten worden omgezet in vetzuren met een lange keten en talrijkere dubbele bindingen.

Een belangrijk vetzuur is het alfa-linoleenzuur, een vrij kort vetzuur van de omega 3-groep (de laatste dubbele binding bevindt zich op 3 koolstofatomen van het einde van het vetzuurstaartje) en 18 koolstofatomen met 3 dubbele bindingen, dat wordt opgenomen via de voeding, voornamelijk in plantaardige oliën, zoals lijnzaadolie ook vlaszaadolie genoemd (figuur 10). Met behulp van het elongase wordt deze vetzuurketen verlengd tot 20 koolstofatomen en 5 dubbele bindingen, het 'eicosapentaeenzuur' (EPA), dat bijvoorbeeld aanwezig is in visolie. Na inwerking door nogmaals het elongase en het desaturase, dat een extra dubbele binding toevoegt, ontstaat het 22:6 omega 3-vetzuur, het 'docosahexaeenzuur' (DHA), dat eveneens aanwezig is in visolie en in krillolie.

De vetzuren die belangrijk zijn voor de kwaliteit en fluïditeit van de membraan zijn de poly-onverzadigde omega 3-vetzuren EPA en vooral DHA. Daarentegen veroorzaken omega 6-vetzuren, waarvan de laatste dubbele binding op 6^e laatste plaats verwijderd is van de "staart" van de molecule, een activatie van ontstekingsfactoren, namelijk de prostaglandines 1 en 2 (PG1 en PG2). Het enzym dat daarbij een doorslaggevende rol speelt is het cyclo-oxygenase (COX).

De onderzoekers van de groep van Comhaire hebben een duidelijk relatie aangetoond tussen de hoeveelheid van de poly-onverzadigde omega-3 vetzuren met een lange keten in de celmembraan, en het bevruchtend vermogen van de spermatozoa. Bij idiopathische andrologische steriliteitsproblematiek, en bij patiënten met een varicocele of een infectie wordt een beduidende vermindering vastgesteld van de lange vetzuren DHA en EPA in de membraan. Dit heeft een slechte fluïditeit van de membranen tot gevolg, wat leidt tot een verminderde fusie-capaciteit van de membranen bij de eicel bevruchting.

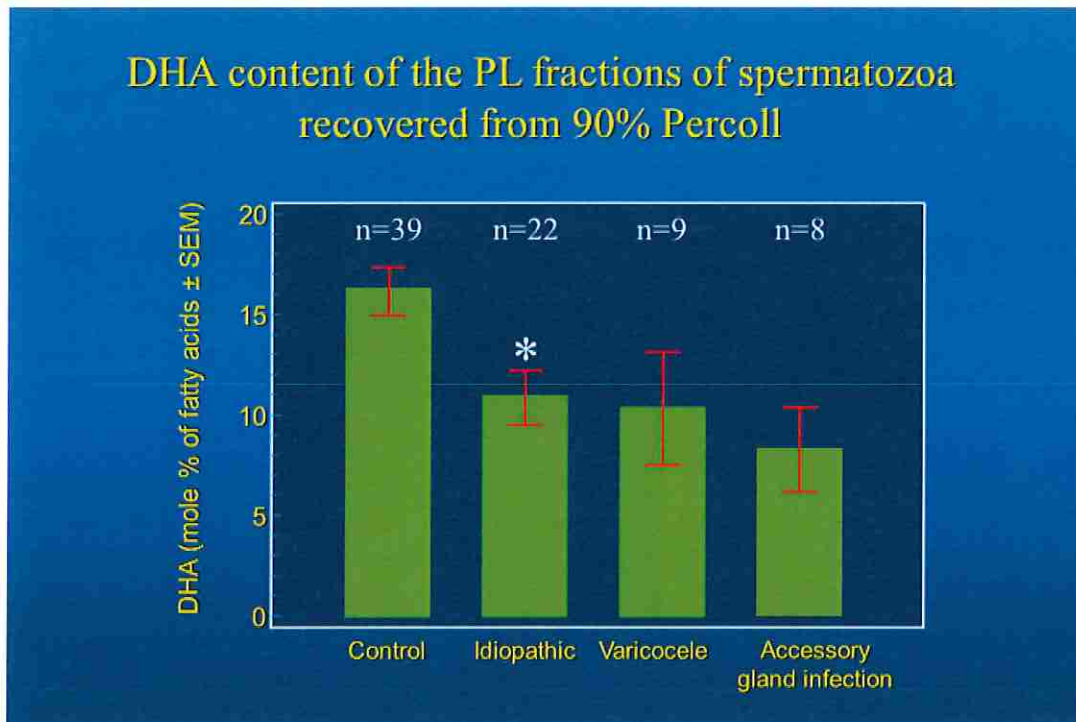
Bij vruchtbare mannen met een normale spermakwaliteit wordt trouwens een hogere consumptie van omega 3-vetzuren in de voeding genoteerd, wat wijst op de belangrijke invloed van de voeding op de vruchtbaarheid.

Bij de man heeft echter enkel de opname van alfa-linoleenzuur (omega3-vetzuur van plantaardige oorsprong met korte keten) in de voeding een effect op de zaadcelkwaliteit, met name de beweeglijkheid van de spermatozoa. Dit heeft te maken met het feit dat de omega 3-vetzuren met lange ketens (DHA, EPA) niet doorheen de bloed-testis-barrière raken wegens hun groot moleculair gewicht, en dus niet beschikbaar zijn tijdens de aanmaak van spermatozoa in de zaadvormende buisjes. Bij de man kunnen enkel de korte vetzuren (bijvoorbeeld uit lijnzaadolie) doorheen de bloed-testis-barrière passeren, waarna de enzymen elongase en reductase de verdere synthese tot de lange vetzuurketens bewerkstelligen, die de fluïditeit van de membraan bevorderen.

Samenvattend kan dus gesteld worden dat vrije zuurstofradicalen een drievoudig ongunstig effect hebben op het membraan van de zaadcellen:

1. Beschadigen van de onverzadigde lange vetzuurketens
2. Vermindering van de fluïditeit van de celmembraan door afname van de proportie aan lange onverzadigde vetzuren van de omega-3 groep
3. Verminderde capaciteit van de zaadcelmembraan om te versmelten met de eicelmembraan, en dus geringer bevruchtend vermogen.

In figuur 11 wordt geïllustreerd dat bij mannen bij wie er een infectie of een varicocele aanwezig is een beduidende lagere hoeveelheid van het docosahexaëenzuur (DHA) in de celmembraan aanwezig is. Dit is ook het geval bij de zaadcellen van mannen met zogenaamd onverklaarde sperma deficiëntie. Daardoor zijn de zaadcellen in mindere mate in staat om een bevruchting van de eicel te realiseren.



Figuur 11

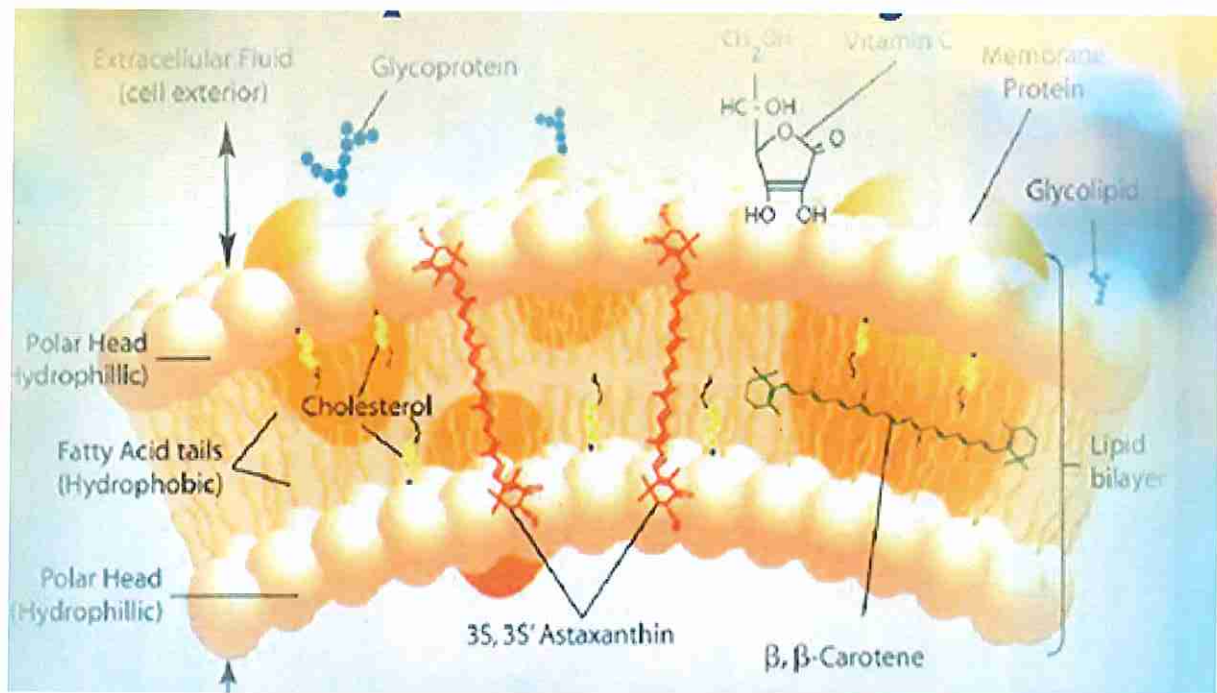
De relatieve hoeveelheid van de docosahexaëenzuur (DHA) in de membraan van de spermatozoa van vruchtbare mannen (controle groep), en van mannen met verminderde vruchtbaarheid door varicocele of infectie, of met idiopathische infertiliteit.

2.2 ASTAXANTHINE

Het astaxanthine is een carotenoïde. Dit is een vitamine A-achtige substantie die in de natuur aanwezig is, meer bepaald in de *Micrococcus pluvialis*. De *Micrococcus* is een microscopisch kleine alg die leeft in koud water en de roze kleur geeft aan de zalm en aan de schaal van gekookte kreeft en garnalen (*ongekookte kreeft is grijs omdat het astaxanthine gebonden is aan een eiwit in de schaal van de kreeft. Bij het koken komt de astaxanthine vrij, wat de rode kleur geeft*).

Astaxanthine is een krachtig antioxidans, dat tevens ontsteking tegengaat. In tegenstelling tot vitamine A heeft astaxanthine geen nevenwerkingen en mag het ook tijdens de zwangerschap worden ingenomen. Immers de astaxanthine molecule ligt dwars over de celmembraan en gaat een zeer sterke binding van de twee lagen celmembraan organiseren (figuur 12). Op die manier kan astaxanthine de twee aan elkaar gekoppelde ketens van vetzuren versterken. Het vitamine A (Beta-caroteen) is geen goed alternatief omdat deze molecule tussen

de twee fosfolipiden-lagen in gaat liggen. Dit verklaart meteen de giftigheid en teratogeniciteit (risico op misvorming van de foetus) van hoge dosissen vitamine A.



Figuur 12

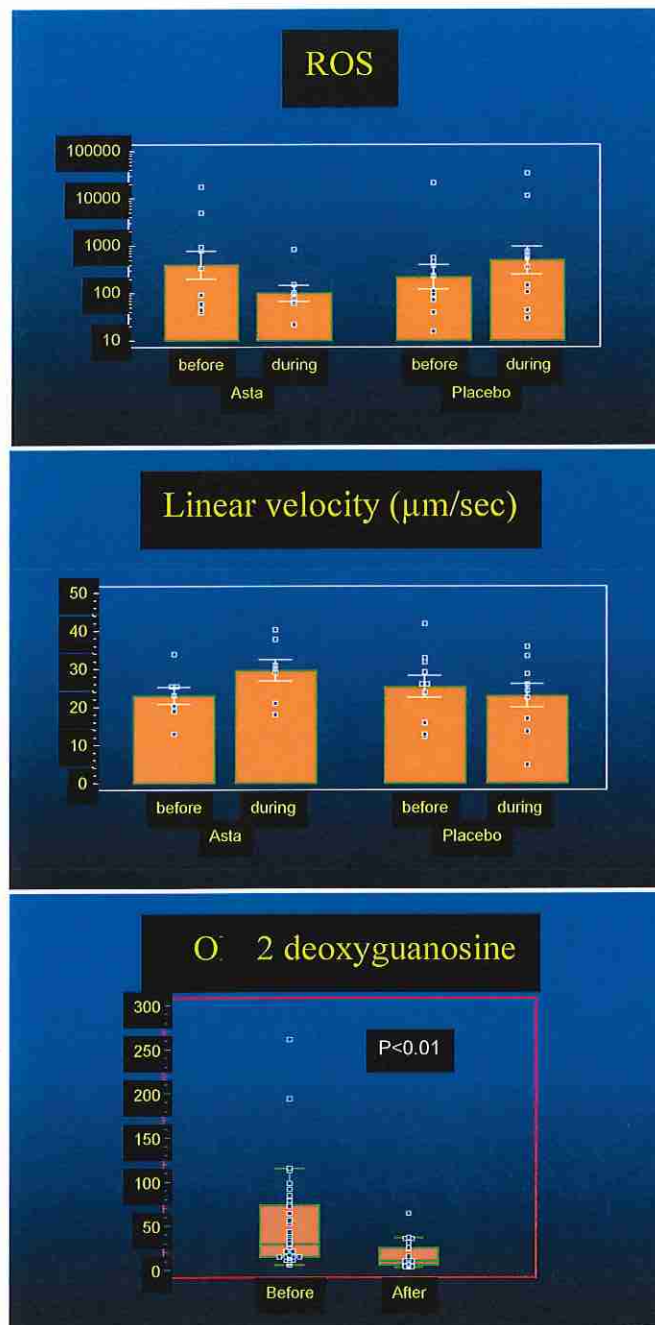
De dubbele laag van fosfolipiden, die de cel membraan vormen, zijn aan elkaar geritst door de vetzuur ketens. Het Astaxanthine ligt dwars op de membraan, terwijl het vitamine A (beta-caroteen) in de lengte tussen de twee lagen is gelegen.

In een dubbel-blinde, placebo-gecontroleerde en gerandomiseerde studie verricht door de groep van Comhaire, werd astaxanthine gedurende drie maanden toegediend aan een groep infertiele mannen en een neppil (placebo) aan een tweede groep. Deze studie onderzocht aldus het effect van astaxanthine in vergelijking met placebo op de belasting van het sperma door zuurstofradicalen (ROS) (figuur 13).

In de groep mannen behandeld met astaxanthine, werd een zeer belangrijke afname van het gehalte van vrije zuurstofradicalen gezien. Het bovenste paneel van de figuur stelt het gehalte ROS voor in een logaritmische schaal. Voor elke trede hoger stijgt de waarde met een factor 10. Bij de groep van patiënten die behandeld werd met astaxanthine daalt het gehalte aan vrije zuurstofradicalen in belangrijke en statistische significante mate. Bij de placebogroep was er geen significant verschil. In tegendeel, er was zelfs een lichte stijging.

Het paneel in het midden van figuur 13 toont het effect van de behandeling op de rechtlijnige snelheid van het vooruit bewegen van de spermatozoa bij patiënten die astaxanthine kregen. Er is een duidelijke toename van de bewegingssnelheid, wat niet het geval is bij de controle groep die placebo had genomen.

Het onderste paneel beeldt af hoeveel geoxideerd DNA aanwezig is in de kopjes van de spermatozoa. Samen met de vermindering van de hoeveelheid zuurstofradicalen, is er een zeer belangrijke afname van het geoxideerd DNA. Het gaat bij dit onderzoek om zeer nauwkeurige doseringen van extreem lage waarden, maar deze bevindingen zijn achteraf herhaaldelijk bevestigd in andere studies.



Figuur 13

Het effect van behandeling van de infertiele mannen met ofwel astaxanthine, ofwel placebo op het gehalte aan zuurstof radicalen (ROS) in het ejaculaat, en op de rechtlijnige snelheid van voortbewegen van de zaadcellen. Het onderste paneel toont de hoeveelheid geoxideerd DNA in de zaadcellen voor en na inname van astaxanthine.

Deze resultaten leveren een belangrijk argument aan om elk paar dat IVF dient te ondergaan omwille van een "mannelijke factor" (des te meer wanneer ICSI moet worden toegepast) vooraf te behandelen met een voedingssupplement dat astaxanthine bevat. Zodoende kan het gehalte van beschadigd DNA sterk worden verlaagd, wat niet alleen de succeskans van de IVF behandeling verhoogt, maar tevens het gezondheidsrisico voor de nakomelingen reduceert.

Deze DNA-beschadiging kan ook verklaren waarom er bij bepaalde paren geen bevruchting van de eicellen optreedt, alhoewel daarvoor geen duidelijke oorzaak kan worden aangetoond. Daarnaast leidt de oxidatieve DNA-beschadiging ertoe dat er iets meer miskramen voorkomen bij vrouwen die zwanger zijn geworden na IVF-behandeling. Het is ook, onder andere, de oxidatieve DNA-beschadiging die verklaart dat er een lichte maar significante toename van kankerziekten is bij kinderen die zijn ontstaan na IVF behandeling.

Dit onderwerp wordt in een volgend hoofdstuk verder uitgediept.

3. MITOCHONDRIËN

Na de afwijkingen van het DNA en van de celmembraan, worden hieronder aspecten van de beweeglijkheid van zaadcellen besproken. Hiervoor moet energie worden geproduceerd, wat plaatsvindt in de mitochondriën.

3.1 MITOCHONDRIËN

De beweeglijkheid van de zaadcellen en de celdelingscapaciteit van de eicellen wordt bepaald door de productie van het adenosine trifosfaat (ATP) in de mitochondriën. Het ATP ontstaat door een metabool proces uit glucose. De mitochondriën bevinden zich bij de zaadcel in het middenstuk. Het ATP wordt overgedragen naar het staartstuk via hele fijne buisjes, de microtubuli. De myofibrillen bevatten een samentrekkend eiwit, het dyneïne, dat ervoor zorgt dat het staartje (flagella) een schroefvormige en zwepende beweging maakt die de zaadcel vooruit stuwt. De zuurstofradicalen verstoren echter deze functie door het metabole proces dat glucose en fructose omzet in ATP te belemmeren.

3.2 VOEDINGSSUPPLEMENTEN

Het (acetyl-I)-carnitine speelt een belangrijke rol in het transport van de poly-onverzadigde vetzuren uit het cytoplasma in de mitochondriën. In de aanwezigheid van een overmaat aan ROS ter hoogte van de mitochondriën wordt het metabolisme verstoord, vermindert de aanmaak van energie als ATP, en neemt de beweeglijkheid van de spermatozoa af. Dit wordt astenozoospermie genoemd. Het is mogelijk dit proces te herstellen door extra brandstof toe te voegen aan de mitochondriën onder de vorm van lange-keten-vetzuren als voedingssupplement.

Om het transport van deze vetzuren naar de mitochondriën te bevorderen moet daaraan het carnitine of het acetyl-I-carnitine worden toegevoegd. Het carnitine bindt met de vetzuren, en op die manier worden de vetzuren doorheen de membraan rond de mitochondriën vervoerd. De vetzuren komen samen met het Coënzym A terecht in de citroenzuur cyclus, ook wel de Krebs cyclus genoemd, waar het ATP wordt gegenereerd.

Als derde belangrijk element voor het bevorderen van de energieproductie komt het er op aan de zuurstofradicalen te onderscheppen die ontstaan tijdens de cyclus van Krebs, wat gebeurt met behulp van een specifiek antioxidans: het Ubiquinone Q10. Dit Q10 is dus nuttig als cellulair antioxidans, vooral voor het elimineren oxidatieproducten die tijdens het metabolisme in de cyclus van Krebs worden vrijgesteld. De mitochondriën fungeren als een soort verbrandingsoventjes waarbij energie wordt aangemaakt, maar tevens verbrandingsgassen vrijkomen. Wil men het vuur verder laten branden, en de verdere werking van de mitochondriën optimaal houden, dan moeten de "verbrandingsgassen", in dit geval de ROS, worden weggevangen. Inderdaad bij opstapeling van zuurstofradicalen, zullen de mitochondriën stoppen met energieproductie en stuk gaan. Het Q10 werkt hoofdzakelijk ter hoogte van de mitochondriën en moet steeds worden toegevoegd wanneer de vetzuren en carnitine worden toegediend. Zo niet valt de energieproductie door de mitochondriën stil. Het Q10 wordt in zijn antioxidante werking ondersteund door het astaxanthine, en door de anthocyanodines, die aanwezig zijn in het extract van de schors van de dennenboom (*Pinus maritima*), en die tevens in het voedingssupplement worden verwerkt.

4. VOEDINGSSUPPLEMENTEN

Op basis van vorige gegevens komen we tot een samengesteld voedingssupplement waarmee de ROS en oxidatieve schade kunnen worden bestreden.

Het lijkt echter aangeraden om ook andere substanties aan de formulering van het voedingssupplement toe te voegen. Zoals hierboven vermeld zijn de lange vetzuurketens (DHA en EPA) bij de man niet in staat de bloed-testis-barrière te doorkruisen. Anderzijds weten we dat deze poly-onverzadigde vetzuren belangrijk zijn voor de membraan samenstelling die bepalend is voor het bevruchtend vermogen van de spermatozoa. De oplossing bestaat er in korte omega-3 vetzuurketens (lijnzaadolie rijk aan alfa-linoleenzuur) toe te dienen, maar tegelijk de omzetting hiervan tot lange vetzuurketens te bevorderen. Om een betere synthese van lange vetzuurketens te bewerkstelligen worden vitamine B6 en zink toegevoegd. Deze substanties werken als co-factoren en versterken de werking van de enzymen elongase en desaturase. De twee laatsten zijn trouwens overvloedig aanwezig in testisweefsel.

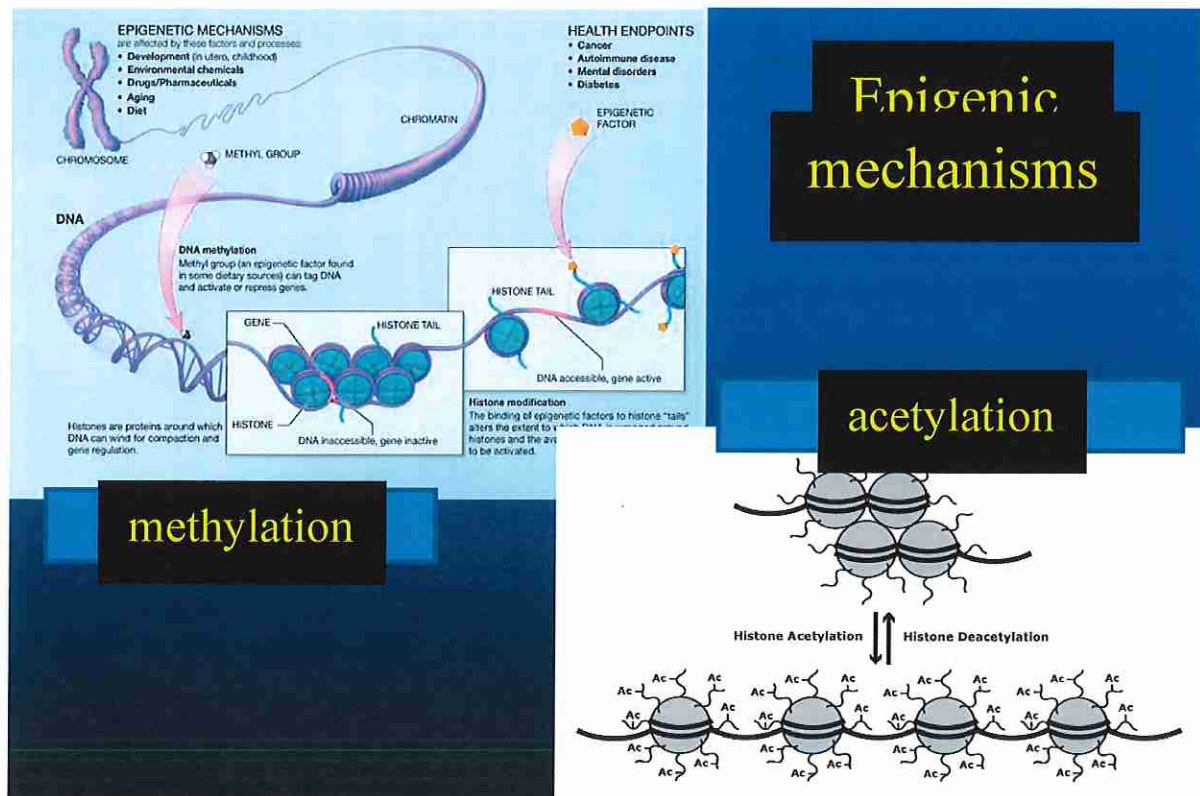
Stoffel en collega's publiceerden in 2008 dat de aanmaak van spermatozoa stopte bij ratten die genetisch waren gemanipuleerd zodat ze geen desaturase konden produceren. De spermatogenese viel stil bij een voorloper stadium van de spermatogenese, wat "maturation arrest" wordt genoemd. Deze zelfde afwijking wordt een zeldzame keer bij onvruchtbare mannen vastgesteld, bij wie geen zaadcellen aanwezig zijn in het ejaculaat (azoospermie). Dit proefondervindelijk onderzoek bevestigt het belang van de processen van desaturatie en elongatie van de vetzuren voor een normale spermaproductie.

DEEL III: EPIGENETICA

1. ALGEMEEN

Slechts 1,5 à 2% van het DNA komt bij volwassen personen “tot expressie”. Het overgrote deel, dat bijvoorbeeld nodig was voor de embryonale ontwikkeling, is niet actief en is opgerold in een soort van bolletjes rondom eiwitten die histonen worden genoemd. De leer van de activering en de desactivering van de opgerolde fragmenten DNA in histonen noemt men de epigenetica. Het tot expressie komen van bepaalde stukken DNA, al naar gelang de levensfase en de gezondheidstoestand, beïnvloedt talrijke gezondheids- en ziekte processen en wordt hoofdzakelijk bepaald door externe factoren.

In figuur 14 worden histonen afgebeeld met daaromheen gewikkeld het DNA van de genen. Het rode streepje stelt een klein fragment voor van het DNA dat niet actief is (en dus niet tot expressie komt) omdat het opgerold zit rond in het histon. Onder bepaalde invloeden kan methylering of acetylering ervoor zorgen dat de histonen een beetje uit elkaar verschuiven. Het rode stukje DNA komt dan vrij te liggen en kan tot expressie komen.



Figuur 14

Het basisprincipe van de epigenetica is afgebeeld. Links boven is een chromosoom, dat bestaat uit strengen van DNA die gegroepeerd zijn in genen. De dubbele helix van het DNA is opgerold rond de histonen. Wanneer die dicht tegen elkaar aan liggen zal een fragmentje van het DNA (in het rood) niet tot expressie komen (dus geen werking uitoefenen). Wijken de histonen uit elkaar dan kan dat zelfde fragment wel “open” komen te liggen en een effect uitlokken. Het uiteen wijken van de histonen wordt bepaald door externe factoren die inwerken via methylatie of acetylatie.

Sommige fragmenten van het genetische DNA zijn nodig voor de foetale en embryonale ontwikkeling. Bijvoorbeeld heeft een foetus in het begin van de ontwikkeling een soort van kieuwen. Op dat moment is een bepaald fragment van het DNA actief. Een tijdje later ontrollen andere histonen die andere fragmenten van het DNA tot expressie laten komen om er voor te zorgen dat de kieuwen terug verdwijnen. De genen die verantwoordelijk zijn voor deze ontwikkeling, respectievelijk het verdwijnen van de kieuwen, moeten daarna worden gedesactiveerd. Een zeldzame keer gebeurt dit niet zoals het moet en kan een rest van de kieuwen blijven bestaan bij een volwassen persoon, wat aanleiding geeft tot het ontstaan van cysten in de hals.

2. ROL VAN EPIGENETICA

Het begrijpen van de mechanismen van de epigenetica heeft een fundamenteel nieuw inzicht verschaft, waarbij voor het eerst duidelijk is geworden waarom -bijvoorbeeld- identieke tweelingen verschillende genetisch overdraagbare ziekten kunnen ontwikkelen, afhankelijk van de epigenetische expressie, en niet uitsluitend omwille van het genoom zelf. Immers het genoom is bij beide personen identiek.

Zowel in het tijdschrift "Newsweek" als in "Time magazine", twee belangrijke internationale vulgariserende tijdschriften, is men op deze thematiek dieper ingegaan. In Newsweek heeft men beschreven hoe een aantal belangrijke ziektebeelden (suikerziekte, obesitas, kanker, hart- en vaatziekten) mogelijk hun oorsprong vinden in gestoorde epigenetica tijdens de foetale ontwikkeling in de baarmoeder, en wel afhankelijk van de levensgewoonte en -vooral- de voeding van de moeder zijn.

In Time ging men zelfs nog een stap verder, waarbij kon worden aangetoond dat de epigenetische effecten tot twee generaties ver kunnen optreden. Een voorbeeld hiervan is een vrouw die rookt tijdens de zwangerschap. Dit kan epigenetische veranderingen bij haar dochter, als foetus, uitlokken. Omdat de vrouwelijke foetus op dat moment al volop eicellen aanmaakt, kan het DNA van deze eicellen al epigenetisch veranderd zijn. Dit kan leiden tot gezondheidsproblemen bij de kleinkinderen van de oma die rookte tijdens de zwangerschap.

Onderzoek bij ratten heeft aangetoond dat methylatie en demethylatie belangrijk zijn in het epigenetisch proces. Deze activering/desactivering van, dit proces wordt sterk beïnvloed door externe factoren zoals levenswijze, voeding, stress, medicatie, etc. Bijvoorbeeld heeft men bij de ratten kunnen aantonen dat blootstelling aan stress tijdens de dracht aanleiding kan geven tot, onder andere, stoornissen in het gedrag van de nakomelingen.

Het is opvallend dat zelfs bepaalde wetenschappers, die nooit hebben aanvaard dat er risico's voor de nakomelingen kunnen zijn aan een behandeling met IVF, respectievelijk ICSI, recent hebben toegegeven dat er wel degelijk gezondheidsproblemen kunnen optreden. Zo ziet men bijvoorbeeld bij zonen, die ontstaan zijn via IVF, en vooral bij ICSI-procedures, vaker dan normaal fertiliteitsstoornissen vertonen. Dat is uiteraard het geval voor afwijkingen die genetisch verbonden zijn met het Y-chromosoom, die direct over geërfd worden. Maar het is eveneens het geval bij de paren die geen aantoonbare chromosoom afwijking vertonen, bij wie een aandoening bij de nakomeling enkel kan worden verklaard door epigenetische overdracht.

Samengevat kan men stellen dat epigenetica niet gelijk te stellen is aan zuiver erfelijke aanleg (genetica), maar wel dat de epigenetische aanleg er voor zorgt dat een gedeelte van het genoom tot expressie komt via mechanismen van methylatie en demethylatie, alsook acetylatie. Epigenetische factoren zijn niet aangeboren, maar kunnen wel erfelijk worden overgedragen, en is sterk afhankelijk van externe factoren zoals levenswijze, voeding, toxische stoffen, medicatie, en van de ontwikkelingsfase waarin het lichaam zich bevindt.

3. EPIGENETISCHE DISRUPTIE

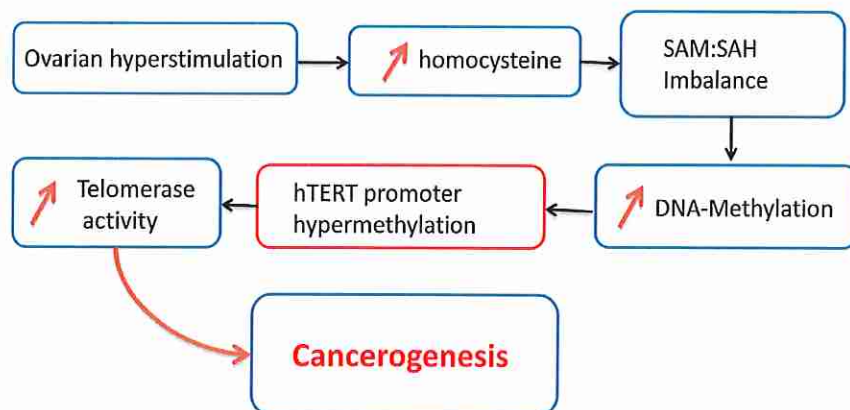
3.1 ALGEMEEN

Epigenetische ontregeling is niet alleen tijdens de embryonale en foetale ontwikkeling bijzonder belangrijk, maar ook tijdens het levenslange proces van aanmaak van nieuwe zaadcellen, zoals blijkt uit de publicatie van de groep van Holger Heyn. Zij toonden aan dat sommige vormen van mannelijke infertiliteit geassocieerd zijn met epigenetische hyper-methylatie van bepaalde DNA-segmenten.

De directe aanleiding van ons eigen onderzoek hieromtrent was de publicatie van Bengt Källen, een Zweedse kinderarts, die een relatieve toename met ongeveer 39% van het aantal kankers had vastgesteld bij een groep van 26 692 kinderen geboren na IVF behandeling tussen 1982 en 2005. De voornaamste vormen van kanker waren: leukemie, kanker van het centraal zenuwstelsel (retinoblastomen en hersentumoren), en levertumoren (hepatocarcinomen). Het gaat in absolute cijfers weliswaar om kleine aantallen zieke kinderen, maar relatief betekent de significante stijging van bijna 40%, die ondertussen in andere studies werd bevestigd, een ernstig probleem.

3.2 KANKER

De hypothese van het ontstaansmechanisme van deze kankers bij de IVF-kinderen is als volgt: de ovariële stimulatie, die wordt toegepast om tegelijk meerdere eicellen te doen ontwikkelen, leidt tot een toename van het gehalte van het homocysteïne in het bloed en in de folliculaire vloeistof waarin de eicellen ontwikkelen. Dat is ook door andere onderzoekers reeds beschreven. Deze verhoging veroorzaakt een onevenwicht tussen het S-adenosylmethionine (SAME) en het S-adenosyl-L-homocysteïne (SAH) (figuur 15). Door dit onevenwicht ontstaat een verandering in de methylatie van het DNA wegens de activering van het enzym DNA-methyltransferase. De toegenomen DNA-methylatie doet zich (ook) voor op een specifiek DNA gebied, namelijk ter hoogte van het human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT). Hierdoor verhoogt de activiteit van het telomerase, waardoor de lengte van de telomeren toeneemt, wat kan leiden tot kanker.

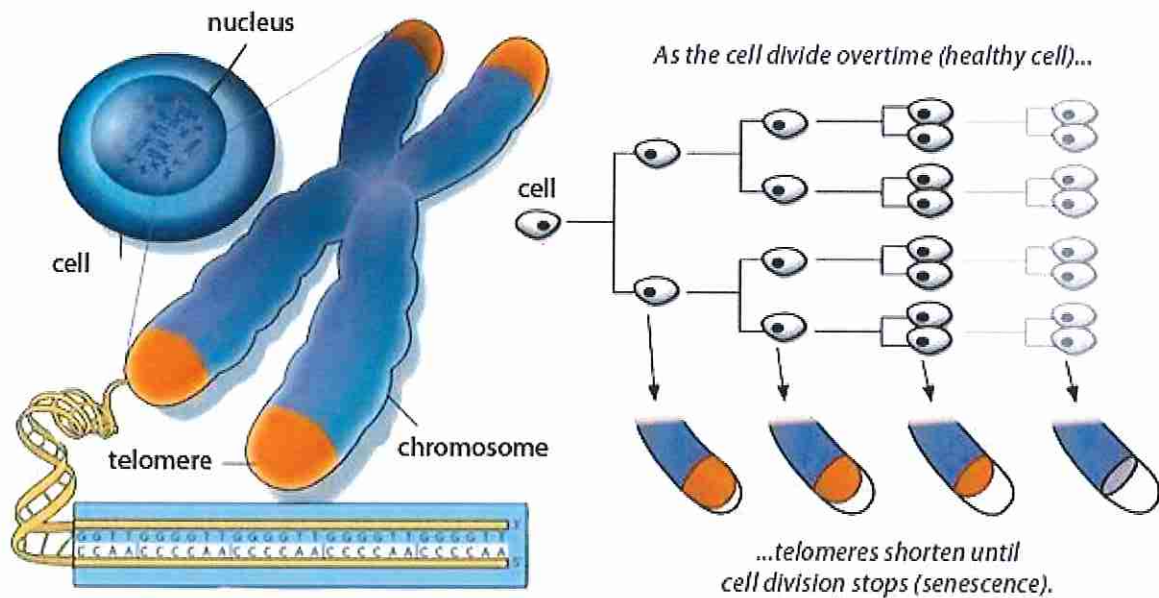


Figuur 15

Schematische voorstelling van het traject waarbij de (over)-stimulatie van de ovaria aanleiding kan geven tot het ontstaan van kanker.

3.3 TELOMEREN

De telomeren zijn gelegen aan beide uiteinden van de chromosomen, en vormen als het ware een soort van buffer ter bescherming van de chromosomen tijdens de celdelingen. Bij elke celdeling verkorten de telomeren (figuur 16). Wanneer de telomeren te kort worden, kunnen ze hun beschermende functie niet meer vervullen, raken de chromosomen beschadigd, kan de cel niet meer delen en sterft. Het is dus van belang dat de telomeren de juiste lengte behouden na elke deling. Hiervoor zorgt het telomerase, een enzym dat instaat voor het herstel en de regeling van de lengte van de telomeren.



Figuur 16

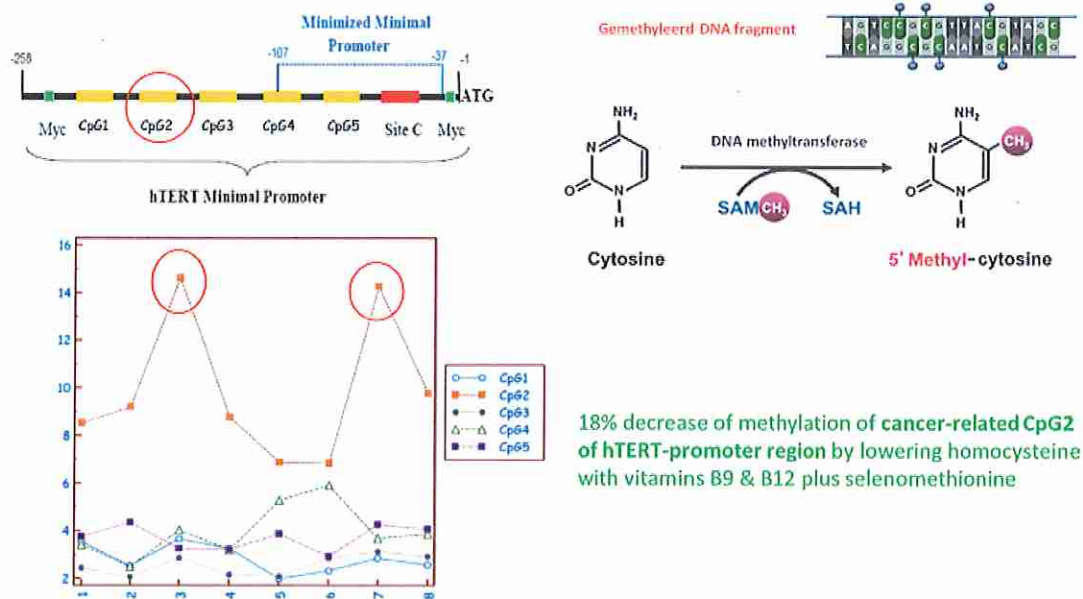
Aan de beide uiteinden van de chromosoom bevinden zich de telomeren. Bij elke celdeling verkorten de telomeren tot de celdeling stopt wanneer de ervan te gering wordt.

De activiteit van telomerase wordt geregeld door een regulator (een soort schuifschakelaar) die er voor zorgt dat de telomeer ofwel verlengt (anabool of opbouwend proces) of wordt ingekort (katabool of afbrekend proces). Het telomerase bestaat dus uit twee stukken: het anabole stuk en het katabole stuk, en die twee moeten voortdurend in evenwicht zijn met elkaar. Het katabole deel wordt geregeld door een klein DNA fragment: de hTERT (Human Telomerase reverse transcriptase). Wanneer de activiteit van de hTERT vermindert, neemt de katabole werking van het telomerase af, het anabool gedeelte krijgt de bovenhand waardoor de telomeren langer worden. Als gevolg blijven de cellen ongeremd delen, waardoor de groei van kanker optreedt.

De hTERT regio is een heel klein fragment DNA dat zich precies naast de telomeer bevindt. Het bestaat uit 5 slechts dinucleotiden met telkens dezelfde samenstelling: cytosine en guanine die aan elkaar zijn gekoppeld door een fosfaat-groep (afgebeeld als: CpG). Voor ons onderzoek heeft Prof. Wim Vanden Berghe van de Universiteit Antwerpen de mate van methylatie van de 5 afzonderlijke dinucleotiden van het hTERT nauwkeurig gemeten.

De analyse van de methylatie hTERT werd eerst uitgevoerd in een groep van kankercellen. Bij de kankercellen is er zeer hoge graad van methylatie van de hTERT aanwezig (positieve controlegroep). Elkeen van de 5 dinucleotiden was, zoals verwacht, voor meer dan 90% gemethyleerd. De rem op de telomerase was dus inderdaad helemaal weggevallen, wat tot verlenging van de telomeren had geleid als oorzaak van het ontstaan van de kanker.

Daarna werden cellen uit de follikelvloeistof bekomen tijdens de eicel-“pluk” van IVF-patiënten onderzocht. In de meeste stalen was het gehalte van gemethyleerde dinucleotiden eerder laag. Evenwel was de graad van methylatie van het tweede dinucleotide (CpG2) in 2 van de 8 stalen ongeveer 15%, wat de grenswaarde is waarbij het risico op kanker toeneemt (figuur 17). Dit laatste werd aangetoond in een studie over hepatocarcinomen, waarbij men eveneens had vastgesteld dat de methylatie van – inderdaad – juist het dinucleotide 2 rond of boven de 15% lag.



Figuur 17

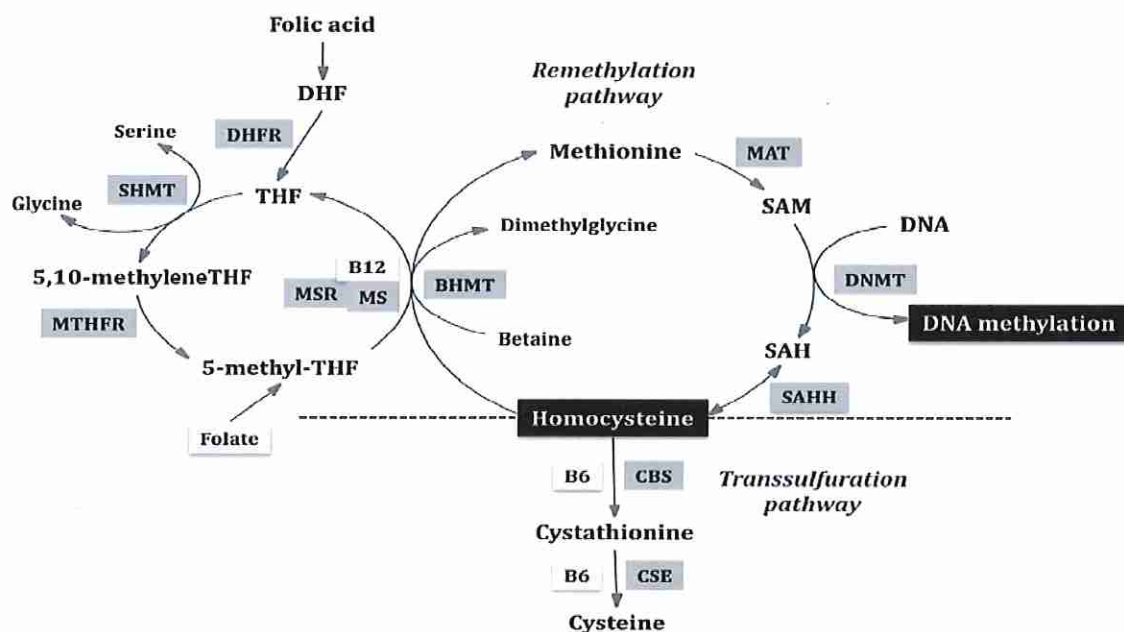
Bovenaan links is het hTERT afgebeeld met de 5 dinucleotiden (CpG). Daaronder de graad van methylatie van de diverse nucleotiden, in folliculaire cellen. Het tweede dinucleotide (CpG2) is verhoogd in 2 van de 8 stalen.

De beperkte resultaten van ons eerste onderzoek bevestigen en verklaren de bevindingen van de hierboven vermelde Zweedse studie, en eveneens van meerdere andere studies, zoals die waarbij Canadese onderzoekers goedaardige en kwaadaardige hersentumoren van kinderen hebben vergeleken, en hebben vastgesteld dat er in de groep van kwaadaardige hersentumoren een belangrijk verhoogde methylatie van de hTERT-regio aanwezig was.

In een recente tweede studie hebben we kunnen aantonen (ter perse) dat het toedienen van een specifiek voedingssupplement voorafgaande aan de eicel-“pluk” de epigenetische afwijkingen van de folliculaire cellen, en de daaraan verbonden eicellen, in belangrijke mate kan corrigeren. Dit laat toe te veronderstellen, en te hopen, dat ook het verhoogde risico op kwaadaardige aandoeningen bij de IVF-kinderen aldus kan worden voorkomen.

3.4 VOEDINGSSUPPLEMENTEN

Om de hypermethylering van de hTERT-regio te voorkomen werden de vitamines B6, B9 en B12 toegevoegd aan het voedingssupplement. Deze vitamines verlagen immers de homocysteïne-concentratie. In figuur 18 die het 'One Carbon Metabolism' voorstelt, ziet men dat de toediening van de B-vitaminen tot een verminderde aanmaak van homocysteïne aanleiding geeft, en de omzetting ervan naar het onschadelijke Cysteïne bevordert. Een andere denkpiste bestaat in het toevoegen van selenium onder de vorm van het goed resorbeerbare selenomethionine. Ook dit kan helpen om het evenwicht in het 'One Carbon Metabolism' te herstellen waardoor het activiteit van het DNA-methyl transferase (DNMT) afneemt, en de hyper-methylering van de hTERT wordt tegengegaan.



Figuur 18

Het "one carbon metabolism" bepaalt de graad van activiteit van het DNA-methyltransferase (DNMT) dat verantwoordelijk is voor de graad van methylering van het DNA (in onze studie het hTERT). De belangrijke rol van de vitamines B6, B9 (folaat) en het (seleno)methionine is goed te herkennen.

Tenslotte moet worden vermeld dat bij vele aandoeningen van de man en van de vrouw met een vruchtbaarheidsprobleem chronische ontsteking een rol speelt. Hierbij is de activiteit van het cyclo-oxygenase (COX) enzym verhoogd, met toename van de inflammatoire prostaglandines (zie hierboven). Tevens speelt bij ontsteking de nucleaire factor kappa B (NFkB) een belangrijke rol. Dit proteïne wordt geactiveerd door inflammatie en heeft een direct ongunstig effect op het DNA in de celkern. Om die reden is een anti-inflammatoire substantie toegevoegd aan het voedingssupplement, namelijk het extract van de schors van de dennenboom (*Pinus maritima*, pine bark extract). Dit extract bevat anthocynidinen met een krachtig ontstekingswerend (anti-inflammatoir) effect, onder andere door het remmen van de COX activiteit. Tevens inhibeert het de invloed van de NFkB op het DNA, en ontplooit dit extract een anti-oxidante werking.

Op basis van de hierboven beschreven argumentatie komen we tot volgende mogelijke samenstelling. Dit is geen absoluut verhaal, maar kan gebruikt worden als richtlijn voor een anti-oxidatieve behandeling.

Lepidium meyenii (Maca)	250 mg
Pycnogenol®	100 mg
Acetyl-carnitine	100 mg
Carnitine	100 mg
Co-enzyme Q10	25 mg
Astaxanthin	8 mg
Zinc (-chelate)	7.5 mg
Vitamin B6	3 mg
Folic acid	0.2 mg
Vitamin B12	1.5 µg

CONCLUSIE

Oxidatieve processen hebben een schadelijk effect op de celkern en het DNA, op de celmembraan en op de mitochondriën, terwijl allerlei externe factoren de epigenetische expressie van het DNA kunnen verstoren.

Eén van de meest verontrustende gevolgen is de toename van de kankerincidentie bij kinderen die zijn ontstaan na behandeling met behulp van IVF, al of niet met daarbij ICSI. Alhoewel het in absolute waarden gaat het over een klein aantal kinderen, is de relatieve toename echter te groot om naast zich neer te leggen. De oorzaak van het verhoogde risico op diverse vormen van kanker is gelegen bij de oxidatieve schade en de abnormale epigenetische methylering van het DNA van de gameten, die wordt vastgesteld bij infertiele mannen en vrouwen. Het blijkt mogelijk om deze ongunstige effecten, die worden bevorderd door de ovariële stimulatie voor IVF, te neutraliseren. Het toedienen van specifieke voedingssupplementen samengesteld uit vitaminen, plantextracten,

mineralen en aminozuren, kan die afwijkinge corrigeren, en zal leiden tot een afname van het risico op kanker en -mogelijk- andere ziekten bij de IVF-kinderen. Tevens blijkt de succeskans van fertiliteitsbehandeling toe te nemen.

Recent hebben wij een artikel gepubliceerd over de kosten/baten analyse. Hierbij is berekend dat de toediening van specifieke voedingssupplementen een duidelijk gunstig effect sorteerden in de verschillende fases van de vruchtbaarheidsbehandeling (bevruchtingsfase, fusie van de celmembranen, de DNA-fase, de epigenetische fase, tot en met de "life-birth"-ratio), en aldus tot een significante vermindering van de kostprijs per bevalling.

De kosten-baten balans is bijzonder gunstig en dit ondanks het feit dat de voedingssupplementen (in België) meestal niet terugbetaald worden door de ziekteverzekering, en dus een bijkomende uitgave betekenen voor de patiënten. Deze lichte toename van de kostprijs is evenwel te relativiseren in vergelijking met de kost van een IVF behandeling, die weliswaar wordt terugbetaald. Een behandeling met voedingssupplement kost rond de 65€ per cyclus, wat niet opweegt tegenover de feitelijke kostprijs van bijna 4 000€ voor een (extra) IVF-cyclus.

Bedanking

De figuren zijn aangeleverd door prof. em. Frank Comhaire MD. PhD. en mogen enkel worden gereproduceerd na diens schriftelijke toestemming (frank@comhaire.com).

Literatuur

Adamopoulos DA, Pappa A, Billa E, Nicopoulou S, Koukkou E, Michopoulos J. Effectiveness of combined tamoxifen citrate and testosterone undecanoate treatment in men with idiopathic oligozoospermia. *Fertil Steril* 2003; 80: 914-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)01123-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(03)01123-3)

Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(5):641-50.

Aitken RJ and Sawyer D. The human spermatozoon - not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol*. 2003;518:85-98.

Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, et al. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(4):495-504.

Aitken RJ, Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 367-81.

Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 727-33.

Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, et al. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28(1-2):1-10.

Alshatwi AA, Shafi G. Effect of dietary nutrients on DNA methylation and imprinting. In: Tatarinova T, Kerton O (Eds), *DNA Methylation – from Genomics to Technology 2012*; InTech, Shanghai, China.

Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, et al. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3341-5.
<http://dx.doi.org/10.1210/jc.81.9.3341>

Andersson AM. Inhibin B in the assessment of seminiferous tubular function. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 2000; 14: 389-97.

Arhin SK, Zhao Y, Lu XS et al. Effect of micronutrient supplementation on IVF outcomes: a systematic review of the literature. *Reprod Biomed Online*. 2017;35:715-722.

Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol* 2011; 60: 796-808.

Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol* 2011; 60: 796-808.

Baker HW, Brindle J, Irvine DS, Aitken RJ. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril* 1996; 65: 411-9.

Berker B, Kaya C, Aytac R, Satioglu H. Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 2009; 2: 2293-2302.

Bernard C. Lectures on the phenomena common to animals and plants. Trans Hoff HE, Guillemin R, Guillemin L, Springfield (IL): Charles C Thomas. 1974.

Bernard D, Christophe A, Delanghe J, Langlois M, de Buyzere M, Comhaire F. The effect of supplementation with an antioxidant preparation on LDL-oxidation is determined by haptoglobin polymorphism. *Redox Rep* 2003; 8: 41-6.

Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 1998; 352: 1172-7.

Boxmeer JC, Steegers-Theunissen RP, Lindemans J, et al. Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Hum Reprod*. 2008;23(11):2570-6.

Brenner CA, Wolny YM, Adler RR, Cohen J. Alternative splicing of the telomerase catalytic subunit in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod* 1999;5: 845-850.

Buckett WM, Chian RC, Holzer H, Dean N, Usher R, Tan SL. Obstetric outcomes and congenital abnormalities after in vitro maturation, in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 885-91.

Bush A, Cole P, Hariri M, et al. Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care. *Eur Respir J* 1998; 12: 982-8.

Canali R, Comitato R, Schonlau F, et al. The anti-inflammatory pharmacology of Pycnogenol in humans involves COX-2 and 5-LOX mRNA expression in leukocytes. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(10):1145-9.

Castelo-Branco P, Choufani S, Mack S, et al. Methylation of the TERT promotor and risk stratification of childhood brain tumours: an integrative genomic and molecular study. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):534-42.

Chaumontet C, Bex V, Veran F, Martel P. The vitamin E analog tocopherol succinate strongly inhibits gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells (IAR203). *J Nutr Biochem* 2008; 19: 263-8.

Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 864-80.

Comhaire F, Declerck W. Comparing the effectiveness of infertility treatments by numbers needed to treat (NNT). *Andrologia* 2012;44: 401-404.

Comhaire F, Declerck W. Quantifying the effectiveness and cost-efficiency of food supplementation with antioxidants for male infertility. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 361-2.

Comhaire F, Declerck WAE, Declerck K, Vandenberghe W. Investigation of adverse cancer related DNA methylation variation in the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in follicular fluid cells of women subjected to ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF). *Journal of fertilization: In vitro – IVF – worldwide, reproductive medicine, genetics & stem cell biology*. 2015; 3 (4): 1000161-100065.

Comhaire F, Kunnen M, Nahoum C. Radiological anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. *Int J Androl* 1981; 4: 379-87.

Comhaire F, Mahmoud A. Rationale: Understanding normal anatomy and function: Endocrine regulation. In Schill WB, Comhaire F, Hargreave T, Eds. *Andrology for the Clinician*. 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 2006; pp. 288-91.

Comhaire F, Monteyne R, Kunnen M. The value of scrotal thermography as compared with selective retrograde venography of the internal spermatic vein for the diagnosis of "subclinical" varicocele. *Fertil Steril* 1976; 27: 694-8.

Comhaire F, Simons M, Kunnen M, Vermeulen L. Testicular arterial perfusion in varicocele: the role of rapid sequence scintigraphy with technetium in varicocele evaluation. *J Urol* 1983; 130: 923-6.

Comhaire F, Vermeulen A. Plasma testosterone in patients with varicocele and sexual inadequacy. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40: 824-9.

Comhaire F, Vermeulen A. Varicocele sterility: cortisol and catecholamines. *Fertil Steril* 1974; 25: 88-95.

Comhaire F. Treatment of oligospermia with tamoxifen. *Int J Fertil* 1976; 21: 232-8.

Comhaire FH and Mahmoud A. An update on treatments and interventions for male infertility, and the role of nutraceutical food supplementation. *J Pharm. Nutr. Sci.* 2013;3:1-16.

Comhaire FH and Mahmoud A. The role of food supplements in the treatment of the infertile man. *Reprod Biomed Online* 2003;7(4):385-91.

Comhaire FH, Christophe AB, Zalata AA, et al. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;63(3):159-65.

Comhaire FH, de Kretser D, Farley TM, Rowe PJ. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. World Health Organization Task Force on the Diagnosis and Treatment of Infertility. *Int J Androl* 1987; (Suppl 7): 1-53.

Comhaire FH, Declerck WAE, Declerck K, et al. Investigation of Adverse Cancer Related DNA Methylation Variation in the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Promotor in Follicular Fluid Cells of Women Subjected to Ovarian Stimulation for In Vitro Fertilization (IVF). *JFIV Reprod Med Genet*. 2015.

Comhaire FH, El Gareem Y, Mahmoud A, et al. Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian J Androl* 2005;7(3):257-62.

Comhaire FH, Mahmoud AM, Schoonjans F. Sperm quality, birth rates and the environment in Flanders (Belgium). *Reprod Toxicol* 2007;23(2):133-7.

Comhaire FH, Vandenberghe W, Decler WAE. External factors affecting fertility, and how to correct their impact. Facts, views & vision: issues in obstetrics, gynaecology and reproductive health. 2018; 9: 217-221.

Comhaire FH, Vermeulen L, Monsieur L, et al. Determination of adenosine triphosphate in human semen to estimate the fertilizing potential and to quantify sperm antibodies. J Biolumin Chemilumin 1989;4(1):399-405.

Comhaire FH, Vermeulen L, Pieters O. Study of the accuracy of physical and biochemical markers in semen to detect infectious dysfunction of the accessory sex glands. J Androl 1989; 10: 50-3.

Comhaire FH. Comparison of three nutraceutical food supplements for the treatment of infertility. Br J Phar Res 2015;5: 173-180.

Comhaire FH. Concentration of pefloxacin in split ejaculates of patients with chronic male accessory gland infection. J Urol 1987; 138: 828-30.

Conti MA and Adelstein RS. Nonmuscle myosin II moves in new directions. J Cell Sci. 2008;1:121(Pt 1):11-8.
Da Broi MG, Jordao-Jr AA, Ferriani RA, Navarro PA. oocyte oxidative DNA damage may be involved in minimal/mild endometriosis-related infertility. Mol Reprod Dev 2018; 85(2): 128-136.

Dalgaard MD, Weinhold N, Edsgard D, et al. A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. J Med Genet 2012; 49: 58-65.
Davis CD, Uthus EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. Exp Biol Med (Maywood) 2004;229: 988-995.

Depuydt C, Zalata A, Christophe A, Mahmoud A, Comhaire F. Mechanisms of sperm deficiency in male accessory gland infection. Andrologia 1998; 30(Suppl 1): 29-33.

Depuydt CE, Bosman E, Zalata A, et al. The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection. J Androl. 1996;17(6):699-707.

Depuydt CE, Bosmans E, Zalata A, Schoonjans F, Comhaire FH. The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection. J Androl 1996; 17: 699-707.

DeVilbiss EA, Magnusson C, Gardner RM, et al. Antenatal nutritional supplementation and autism spectrum disorder in the Stockholm youth cohort: population based cohort study. BMJ. 2017;Oct 4:359.j4273.

Dhooge W, Eertmans F, Comhaire F. Estrogen receptor based in vitro assays for the evaluation of endocrine disrupters. Folia Histochem Cytobiol 2001; 39(Suppl 2): 44-5.

Dhooge W, Larebeke NV, Comhaire F, Kaufman JM. Reproductive parameters of community-dwelling men from two regions in Flanders are associated with the consumption of self-grown vegetables. J Androl 2007; 28: 836-46.

Downs SM. A gap-junction-mediated signal, rather than an external paracrine factor, predominates during meiotic induction in isolated mouse oocytes. Zygote. 2001;9:71-82.

Duleba AJ, Dokras A. Is PCOS an inflammatory process? Fertil Steril 2012; 97: 7-12.

DuPlessis SS, Makker K, Desai NR, Agarwal A. Impact of oxidative stress on IVF. Expert Review of Obstetrics and Gynecology 2008; 3: 539-54. <http://dx.doi.org/10.1586/17474108.3.4.539>

Eertmans F, Dhooge W, Stuyvaert S, Comhaire F. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. Toxicol In vitro 2003; 17: 515-24.

Everaert K, Mahmoud A, Depuydt C, Maeyaert M, Comhaire F. Chronic prostatitis and male accessory gland infection—is there an impact on male infertility (diagnosis and therapy)? Andrologia 2003; 35: 325-30.

Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 2003;78:203-216.

Fernando S, Rombauts L. Melatonin: shedding light on infertility?—A review of the recent literature. *J Ovarian Res* 2014; Oct 21;7:98. Doi:10.1186/s13048-014-0098-y

Fiala ES, Staretz ME, Pandya GA, El-Bayoumy K, Hamilton SR. Inhibition of DNA cytosine methyltransferase by chemopreventive selenium compounds, determined by an improved assay for DNA cytosine methyltransferase and DNA cytosine methylation. *Carcinogenesis* 1998;19: 597-604.

French DB, Desai NR, Agarwal A. Varicocele repair: does it still have a role in infertility treatment? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20: 269-74.

French DB, Sabanegh E. Advances in microsurgery and assisted reproduction for management of male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)* 2009; 1: 381-9.

Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Volume One: Laboratory Perspectives 2012; Fourth Edition, CRC Press.

Garrido-Maraver J, Cordero MD, Oropesa-Avila M, et al. Coenzyme Q10 Therapy. *Mol Syndromol* 2014;5(3-4):187-197.

Gat Y, Zukerman Z, Chakraborty J, Gornish M. Varicocele, hypoxia and male infertility. Fluid Mechanics analysis of the impaired testicular venous drainage system. *Hum Reprod* 2005; 20: 2614-9.

Ghanem H, Shaeer O, El Segini A. Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2010; 93: 2232-5.

Giwerzman A, Lindstedt L, Larsson M, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 2010; 33(1): e221-7.

Gonzales GF, Cordova A, Gonzales C, Chung A, Vega K, Villena A. *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian J Androl* 2001; 3: 301-3.

Guilleret I, Yan P, Grange F, et al. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *IJC* 2002;101(4):335-341.

Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 2008; 90: 247-57.

Hammarberg K, Baker HW, Fisher JR. Men's experiences of infertility and infertility treatment 5 years after diagnosis of male factor infertility: a retrospective cohort study. *Hum Reprod* 2010; 25: 2815-20.
Hara MR, Kovacs JJ, Whalen EJ, et al. A stress response pathway regulates DNA damage through 32-adrenoreceptors and 3-arrestin-1. *Nature* 2011; [10368].

Hargreave T. Congenital disorders and male infertility. In Schill WB, Comhaire F, Hargreave T, Eds. *Andrology for the Clinician*. 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2006; pp. 63-6.

Hargreave TB. Debate on the pros and cons of varicocele treatment—in favour of varicocele treatment. *Hum Reprod* 1995; 10(Suppl 1): 151-7.

Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials 1'2'3. *Am J Clin Nutr* 2005;82:806-812.

Hoyo C, Murtha AP, Schildkraut JM, et al. Methylation variation at IGF2 differentially methylated regions and maternal folic acid use before and during pregnancy. *Epigenetics* 2011;6(7):928-36.

Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M. Increased testicular 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with varicocele. *BJU Int* 2007; 100: 863-6.

Jager S, Kremer J, van Slochteren-Draaisma T. Presence of sperm agglutinating antibodies in infertile men and inhibition of in vitro sperm penetration into cervical mucus. *Int J Androl* 1979; 2: 117-30.

Jenkins TG, Carrell DT. The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction* 2012; 143: 727-34.

Källén AJ, Finnström OO, Lindam AP, Nilsson EM, Nygren KG, et al. Is there an increased risk for drug treated attention deficit/hyperactivity disorder in children born after in vitro fertilization? *Eur J Paediatr Neurol* 2011;15: 247-253.

Källén B, Finnström O, Lindam A, et al. Cancer risk in children and young adults conceived by in vitro fertilization. *Pediatrics* 2010;126(2):270-6.

Kalmbach KH, Fontes Antunes DM, Dracxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, et al. Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril* 2013;99: 23-29.

Katari S, Turan N, Bibikova M, et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 3769-78.

Keefe DL, Liu L, Marquard K. Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci* 2007;64: 139-143.

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Imoto I, et al. Plasma total homocysteine is associated with DNA methylation in patients with schizophrenia. *Epigenetics* 2013;8: 584-590.

Ko EY, Sabanegh ES, Jr. The role of over-the-counter supplements for the treatment of male infertility--fact or fiction? *J Androl* 2012; 33: 292-308.

Kralikova M, Melounova J, Crha I, Matejovicova M, Zakova J, et al. Intraindividual variability of homocysteine and related thiols concentrations in follicular fluid. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28: 863-868.

Krause W, Muller HH, Schafer H, Weidner W. Does treatment of varicocele improve male fertility? results of the 'Deutsche Varikozelenstudie', a multicentre study of 14 collaborating centres. *Andrologia* 2002; 34: 164-71. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0272.2002.00494.x>

Krishna SM, Dear A, Craig JM, Norman PE, Golledge J. The potential role of homocysteine mediated DNA methylation and associated epigenetic changes in abdominal aortic aneurysm formation. *Atherosclerosis* 2013;228: 295- 305.

Laupacis A, Sackett DL, Roberts RS. An assessment of clinically useful measures of the consequences of treatment. *N Engl J Med* 1988; 318: 1728-33.

Lee HS. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. *Nutrients* 2015;17:9492-9507.

Lenzi A, Sgrò P, Salacone P, et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2004;81(6):1578-84.

Lipinski B. Is it oxidative or free radical stress and why does it matter? *Oxid Antioxid Med Sci* 2012; 1: 5-9.
Liu L, Bailey SM, Okuka M, Muñoz P, Li C, et al. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 2007;9: 1436-1441.

Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J Androl* 2011; 13: 690-7.

Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwasser B. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. *Fertil Steril* 1995; 63: 120-4.

Mahmoud AM, Comhaire FH, Depuydt CE. The clinical and biologic significance of serum inhibins in subfertile men. *Reprod Toxicol* 1998; 12: 591-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0890-6238\(98\)00042-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0890-6238(98)00042-2)

Mahmoud AM, Goemaere S, El Garem Y, Van Pottelbergh I, Comhaire FH, Kaufman JM. Testicular volume in relation to hormonal indices of gonadal function in community-dwelling elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 179-84.

Mahmoud AM, Tuytens CL, Comhaire FH. Clinical and biological aspects of male immune infertility: a case-controlled study of 86 cases. *Andrologia* 1996; 28: 191-6.

Mandaviya PR, Stolk L, Heil SG3. Homocysteine and DNA methylation: a review of animal and human literature. *Mol Genet Metab* 2014;113: 243-252.

McCullough LE, Miller EE, Mendez MA, et al. Maternal B vitamins: effects on offspring weight and DNA methylation at genomically imprinted domains. *Clin Epigenetics*. 2016;8:8.

McDonald SD, Murphy K, Beyene J, Ohlsson A. Perinatal outcomes of singleton pregnancies achieved by in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 2005; 27: 449-59.

Meares EM, Stamey TA. Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *Invest Urol* 1968; 5: 492- 518.

Michael T, Lin MT, Beal F. Review Article Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;443:787-795.

Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, et al. Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *Lancet* 2003;361: 309-310.

Morag B, Rubinstein ZJ, Madgar I, Lunenfeld B. The role of spermatic venography after surgical high ligation of the left spermatic veins: diagnosis and percutaneous occlusion. *Urol Radiol* 1985; 7: 32-4.

Murthy K, Wadsworth P. Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis. *Curr Biol* 2005; 15: 724-31.

Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Abshagen K, Behre HM. Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod* 1998; 13: 2147-50.

Nilsson S, Edvinsson A, Nilsson B. Improvement of semen and pregnancy rate after ligation and division of the internal spermatic vein: fact or fiction? *Br J Urol* 1979; 51: 591-6.

Ocal P, Ersoylu B, Cepni I, et al. The association between homocysteine in the follicular fluid with embryo quality and pregnancy rate in assisted reproductive techniques. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(4):299-304.

Ozturk S, Sozen B, Demir N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. *Mol Hum Reprod* 2014;20: 15-30.

Pacchiarotti A, Mohamed MA, Micara G, Linari A, Tranquilli D, et al. The possible role of hyperhomocysteinemia on IVF outcome. *J Assis Reprod Genet* 2007; 24: 459-462.

Painter RC, Grooten IJ, van der Post JA, Mol BW, Vrijkotte TGM, et al. Subfertility and assisted reproduction techniques are associated with poorer cardiometabolic profiles in childhood. *Reprod Biomed online* 2015;30: 258-267.

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
- Panossian A, Wikman G. Evidence-based efficacy of adaptogens in fatigue, and molecular mechanisms related to their stress-protective activity. *Curr Clin Pharmacol* 2009; 4: 198-219.
- Petridou ET, Sargentanis TN, Panagopoulou P, et al. In vitro fertilization and risk of childhood leukemia in Greece and Sweden. *Pediatr Blood Cancer* 2012;58(6):930-6.
- Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T, De Jong FH, Weber RF. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3110-4.
- Pilsner JR, Hall MN, Liu X, Ahsan H, Ilievski V, et al. Associations of plasma selenium with arsenic and genomic methylation of leukocyte DNA in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2011;119: 113-118.
- Ragin C, Minor A, Agudo A, et al. Pooled analysis of studies on DNA adducts and dietary vitamins. *Mutat Res* 2010; 705: 77-82.
- Reefhuis J, Honein MA, Schieve LA, Correa A, Hobbs CA, Rasmussen SA. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Hum Reprod* 2009; 24: 360-6.
- Retterstol K, Haugen TB, Tran TN, Christophersen BO. Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. *Reproduction* 2001; 121: 881-7.
- Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum Reprod* 1999; 14: 1028-33.
- Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press 2000.
- Ruiz-Luna AC, Salazar S, Aspajo NJ, Rubio J, Gasco M, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) increases litter size in normal adult female mice. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 16.
- Saether T, Tran TN, Rootwelt H, Christophersen BO, Haugen TB. Expression and regulation of delta5-desaturase, delta6-desaturase, stearyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearyl-CoA desaturase 2 in rat testis. *Biol Reprod* 2003; 69: 117-24.
- Sekhon LH, Gupta S, Kim Y, et al. Female infertility and Antioxidants. *Curr Womens Health Rev* 2010;6:84-95.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993; 341: 1392-5. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90953-E](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(93)90953-E)
- Shin KH, Kang MK, Dicterow E, Park NH. Hypermethylation of the hTERT promoter inhibits the expression of telomerase activity in normal oral fibroblasts and senescent normal oral keratinocytes. *Br J Cancer* 2003; 89: 1473-1478.
- Shiraishi K, Takihara H, Matsuyama H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. *World J Urol* 2010; 28: 359-64.
- Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; CD007411.
- Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, et al. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;12:CD007411.

- Speckmann B and Grune T. Epigenetic effects of selenium and their implications for health. *J Epigenetics* 2015;10:179-190.
- Stoffel W, Holz B, Jenke B, et al. Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 2008; 27: 2281-92.
- Terquem A, Dadoune JP. Morphological findings in varicocele: an ultrastructural study of 30 bilateral testicular biopsies. *Int J Androl* 1981; 4: 515-31.
- Tobi EW, Slieker RC, Stein AD, Suchiman HE, Slagboom PE, et al. Early gestation as the critical time-window for changes in the prenatal environment to affect the adult human blood methylome. *Int J Epidemiol* 2015;44: 1211-1223.
- Torano EG, Garcia MG, Fernandez-Moreno JL, et al. The impact of external factors on the epigenome: In Utero and over lifetime. *Biomed Res Int.* 2016; 201:2568635. doi:10.1155/2016/2568635.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009;27:120-139.
- Vandekerckhove P, Lilford R, Vail A, Hughes E. Clomiphene or tamoxifen for idiopathic oligo/asthenospermia. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD000151.
- Venkatesh S, Deecaraman M, Kumar R, Shamsi MB, Dada R. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129: 127-37.
- Vermeulen A, Comhaire F. Hormonal effects of an antiestrogen, tamoxifen, in normal and oligospermic men. *Fertil Steril* 1978; 29: 320-7.
- Wang W, Chen H, Li R, Ouyang N, Chen J, et al. Telomerase activity is more significant for predicting the outcome of IVF treatment than telomere length in granulosa cells. *Reproduction* 2014;147: 649-657.
- Weijer C, Grimshaw JM, Taljaard M, et al. Ethical issues posed by cluster randomized trials in health research. *Trials* 2011; 12: 100. <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6215-12-100>
- Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect* 2006;114:A160-A167.
- WHO. A double-blind trial of clomiphene citrate for the treatment of idiopathic male infertility. World Health Organization. *Int J Androl* 1992; 15: 299-307.
- Williams CL, Bunch KJ, Stiller CA et al. Cancer risk among children born after assisted conception. *N Engl J Med* 2013;369:1819-1827.
- Xiang N, Zhao R, Song G, Zhong W Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2008;29: 2175-2181.
- Zaini A, Jennings MG, Baker HW. Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men? *Int J Androl* 1985; 8: 427-35. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.1985.tb00856.x>
- Zalata A, Hafez T, Van Hoecke MJ, Comhaire F. Evaluation of beta-endorphin and interleukin-6 in seminal plasma of patients with certain andrological diseases. *Hum Reprod* 1995; 10: 3161-5.
- Zalata AA, Ahmed AH, Allamaneni SS, Comhaire FH, Agarwal A. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl* 2004; 6: 313-8.
- Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, et al. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Mol Hum Reprod.* 1998;4(2):111-8.

Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonjans F, Comhaire FH. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int J Androl* 1998; 21: 154-62.

Zhang H, Weng X, Ye J, et al. Promotor hypermethylation of TERT is associated with hepatocellular carcinoma in the Han Chinese population. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2005;39(5):600-9.

