

Dit proefschrift beoogt meer inzicht te bieden in het samenspel van genetische factoren en omgevingsinvloeden die de kans op het krijgen van twee-eiige (DZ) meerlingen vergroten. In hoofdstuk 1 en 2 worden de basis van dit proefschrift en de dataverzameling uitvoerig beschreven. In hoofdstuk 3 wordt een uitgebreid overzicht gegeven van de eerdere onderzoeken naar de epidemiologie, de genetica en de endocrinologie van de DZ tweelingzwangerschap. Zowel de meest recente onderzoeken als het onderzoek dat in het verleden gedaan is, komen hierbij aan bod.

In hoofdstuk 4 tot en met 6 worden drie studies besproken die gebaseerd zijn op een schriftelijke vragenlijst die door moeders van meerlingen is ingevuld. Ten slotte beschrijft hoofdstuk 7 een onderzoek naar de haalbaarheid van het verzamelen van biologisch materiaal en interviewgegevens in een groep moeders van tweelingen, die een zus hebben die ook moeder van een tweeling is.

In dit hoofdstuk zal ik eerst de onderzoeken, waarover in dit proefschrift gerapporteerd wordt, samenvatten en bediscussiëren. Omdat deze onderzoeken merendeels berusten op gegevens die zijn verzameld met een schriftelijke vragenlijst, zal ik hiervan de methodologie bespreken.

Tot slot geef ik een beknopt overzicht van het onderzoek dat tot op heden is gedaan naar de genetica van het krijgen van DZ tweelingen en bespreek ik de implicaties voor de toekomst. In dit kader bespreek ik ook de dataverzameling van het Nederlandse deel van de studie “Genetics of DZ twinning”.

Samenvatting en discussie

In hoofdstuk 4 wordt met een grootschalig vragenlijstonderzoek getoetst of moeders van meerlingen bereid zijn om vragen te beantwoorden over eventuele vruchtbaarheidsbehandelingen voorafgaand aan de conceptie van hun tweeling. Hiervoor zijn eerder verkregen vragenlijstgegevens gebruikt, waarbij we keken naar het aantal keren dat de vraag niet beantwoord is. We vinden dat maar een klein groepje moeders geen antwoord geeft op de vraag naar de wijze waarop de tweelingzwangerschap is ontstaan. De hoeveelheid missende gegevens voor deze vraag is vergelijkbaar met de hoeveelheid missende gegevens voor andere, neutralere, vragen zoals vragen over lichaamslengte. Daarnaast is gevonden dat moeders die een vruchtbaarheidsbehandeling bij de conceptie van hun tweeling ondergingen, net zo vaak de vragenlijst terugstuurden als moeders bij wie de tweelingzwangerschap op natuurlijke wijze tot stand kwam. Tot slot blijkt dat de vraag over het ontstaan van de tweelingzwangerschap betrouwbaar beantwoord wordt. Bij een subgroep van 80 moeders zijn de antwoorden die zij op de vragenlijst hebben gegeven, vergeleken met ziekenhuisgegevens. Deze uitkomsten tonen aan dat de vragenlijst een realistisch beeld geeft over het gebruik van vruchtbaarheidsbehandelingen bij de conceptie van de tweeling en daarom waarschijnlijk ook van andere, minder gevoelige, kwesties.

In hoofdstuk 5 wordt gekeken naar specifieke aspecten van fertiliteit en het familiaal voorkomen van tweelingen bij moeders van spontane eeneiige (MZ) tweelingen en DZ tweelingen en moeders van MZ of DZ tweelingen die geboren zijn na een vruchtbaarheidsbehandeling (artificiële technieken: ART). Uit dit onderzoek blijkt dat er in de families van moeders van spontane DZ tweelingen significant vaker andere vrouwelijke familieleden met DZ tweelingen voorkomen dan in families van moeders met MZ tweelingen en moeders van ART tweelingen. Moeders van spontane DZ en MZ tweelingen blijken uit een even groot gezin te komen; ze hebben ongeveer evenveel broers en zussen. Moeders van ART tweelingen blijken daarentegen uit kleinere gezinnen te komen. Uit dit onderzoek blijkt ook dat moeders van spontane DZ tweelingen sneller zwanger zijn van hun tweeling dan moeders van MZ tweelingen. We vinden geen verschil in het familiaal voorkomen van DZ tweelingen tussen moeders die hun spontane DZ

tweeling op jonge leeftijd hebben gekregen (jonger dan 36) en moeders die hun spontane DZ tweeling op oudere leeftijd hebben gekregen (36 of ouder). De mechanismen die ten grondslag liggen aan het krijgen van een spontane DZ of een ART DZ tweeling zijn dus duidelijk verschillend van aard. Aangezien in de familie van moeders van ART DZ tweelingen niet vaker DZ tweelingen voorkomen, is bij deze moeders geen sprake van een genetische aanleg, terwijl deze aanleg wel zichtbaar is voor moeders van spontane DZ tweelingen. Het is dus belangrijk om in genetisch onderzoek deze groepen van elkaar te onderscheiden.

In hoofdstuk 6 wordt gekeken of moeders van spontane MZ en DZ tweelingen van elkaar verschillen met betrekking tot lengte, 'body-mass index' (BMI, lichaamsmassa-index) en rookgedrag voor de tweelingzwangerschap. Hierbij wordt rekening gehouden met factoren als leeftijd, graviditeit (het aantal zwangerschappen voor de tweelingzwangerschap) en opleidingsniveau. Uit de resultaten blijkt dat de kans op het krijgen van spontane DZ tweelingen geassocieerd wordt met langer zijn, het hebben van een hogere BMI en roken. Eerdere studies tonen ook een verband aan tussen roken en het krijgen van DZ tweelingen en tussen lengte en BMI en het krijgen van DZ tweelingen. Deze studie heeft als additionele waarde dat wij getoetst hebben of dit verband beïnvloed wordt door sociaal economische status gedefinieerd als opleidingsniveau. Uit de resultaten blijkt dat de sociaal economische status van de moeder geen invloed heeft op de associatie tussen lichaamslengte, BMI en DZ tweelingen, en roken en DZ tweelingen. Leeftijd en graviditeit blijken wel significant geassocieerd met het krijgen van DZ tweelingen; de kans op het krijgen van een DZ tweeling neemt toe met de leeftijd en met het aantal zwangerschappen. Het is interessant om te zien dat factoren die doorgaans geassocieerd worden met verminderde vruchtbaarheid zoals roken en overgewicht ook geassocieerd zijn met 'super' vruchtbaarheid (het krijgen van tweelingen). De vraag is natuurlijk hoe dit kan. Een mogelijkheid is dat vrouwen die de genetische aanleg hebben voor het krijgen van tweelingen zo vruchtbaar zijn dat zij geen hinder ondervinden van factoren die normaal gesproken de vruchtbaarheid verminderen. Vrouwen die deze genetische aanleg missen, zijn wel verminderd vruchtbaar als ze bijvoorbeeld roken. Onder rokende vrouwen die geen aanleg hebben voor het krijgen van DZ tweelingen vermindert het aantal eenlingzwangerschappen en MZ tweelingzwangerschappen, terwijl het aantal zwangerschappen onder rokende vrouwen met een genetische aanleg voor DZ tweelingen niet vermindert.

Hoofdstuk 7 beschrijft een studie naar de haalbaarheid van het verzamelen van bloed- en urinemonsters bij een groep moeders die een zus hebben die ook moeder van een tweeling is en bij hun familieleden. Het doel van dit onderzoek was om te bepalen of het verzamelen van biologische monsters via een vast protocol tijdens een huisbezoek binnen heel Nederland haalbaar is en of de kwaliteit van de monsters na transport goed blijft. De deelnemers werden tussen 7 uur en 10 uur 's ochtends thuis of op hun werk bezocht. Vrouwen met een natuurlijke menstruele cyclus werden op dag 2 tot 4 van hun cyclus geprikt en wanneer zij de pil gebruiken werden zij in de pilvrije week geprikt. Tevens werden alle moeders van tweelingen ook telefonisch geïnterviewd. Dit interview duurde ongeveer 20 tot 30 minuten. Uit deze studie blijkt dat het mogelijk is om op een efficiënte manier bloed- en urinemonsters te verzamelen. Het transport van het bloed naar het laboratorium is niet nadelig voor de kwaliteit van het bloed, cholesterol, RNA met en zonder toediening van een activerende stof, lymfocyten en andere parameters.

Voor en nadelen van de vragenlijst

De drie studies, beschreven in de hoofdstukken 4, 5 en 6 zijn gebaseerd op een 2 pagina's tellende vragenlijst. De vragenlijst is in april 2005 verstuurd naar alle moeders van meerlingen (N=33.528)

geregistreerd bij het Nederlands Tweelingen Register (NTR). In de vragenlijst werden vragen gesteld over het familiaal voorkomen van meerlingen en over het aantal broers en zussen van de moeder van de tweeling. Ook werd het geboortegewicht van de moeder en de vader van de tweeling gevraagd. Daarnaast werd de leeftijd bij menarche, het aantal zwangerschappen, miskramen, en het aantal geboren kinderen (meerlingen, eenlingen) uitgevraagd. Ook werden vragen gesteld met betrekking tot het tot stand komen van de tweelingzwangerschap en het gebruik van de anticonceptiepil. Lengte en gewicht op het moment van invullen van de vragenlijst en gewicht voor en op het einde van de tweelingzwangerschap werden gevraagd. Ten slotte werd gevraagd of de moeder rookte en foliumzuur gebruikte voor en tijdens de tweelingzwangerschap.

Met dit vragenlijstonderzoek hebben we binnen een relatief korte tijd veel moeders van tweelingen kunnen bereiken. Sommige moeders die bij ons ingeschreven staan zijn passief geregistreerd, dit betekent dat zij nooit eerder aan vragenlijstonderzoek bij het NTR hebben meegedaan. Hoewel iemand actief kan beslissen niet mee te doen aan vragenlijstonderzoek lijkt het aannemelijk dat de adressen van een aantal van deze moeders niet correct zijn. Van de groep actief geregistreerde moeders (N=25.620), zijn 17.683 (69.0%) vragenlijsten geretourneerd. Daarnaast zijn er ook nog 1.674 (21.2%) vragenlijsten teruggestuurd door passief geregistreerde moeders. In totaal werden 19.357 (57.7%) vragenlijsten geretourneerd.

Zoals aangegeven wordt deze studie uitgevoerd binnen het kader van het NTR. Van alle moeders die ingeschreven staan, zijn al gegevens aanwezig. In het minste geval betreffen dit inschrijvingsdata maar meestal zijn ook gegevens uit eerdere (vragenlijst)onderzoeken beschikbaar. Hierdoor is het mogelijk om een non-respons onderzoek te doen. We toetsen in hoofdstuk 6 of moeders die de vragenlijst wel hadden teruggestuurd op een aantal eigenschappen, zoals roken, lengte en opleidingsniveau, verschillen van moeders die de vragenlijst niet terugstuurden. De resultaten van dit onderzoek wijzen op een kleine response bias. Echter deze bias is gelijk in moeders van MZ en DZ tweelingen, en het is dus zeer onwaarschijnlijk dat deze bias van significante invloed is op de studies waarin we moeders van MZ en DZ tweelingen met elkaar vergelijken.

De vragenlijst is in eerste instantie verstuurd om tweelingmoeders te kunnen selecteren die ook nog een zus hebben die moeder is van een tweeling. Dit is gedaan in het kader van de studie "Genetics of DZ twinning". Moeders van een tweeling, die aangeven dat hun zus ook een tweeling heeft, worden voor dit onderzoek uitgenodigd. Moeders worden ook uitgenodigd voor de studie als zij aangeven dat hun eigen moeder en hun tante (zus van moeder) een tweeling hebben. Om deze reden zijn de vragen naar het familiaal voorkomen van tweelingen in de vragenlijst vrij uitvoerig en nemen relatief veel ruimte in beslag. Een consequentie hiervan is dat sommige andere vragen door ruimtegebrek mogelijk minder ideaal uitgevraagd zijn.

Tot slot moet opgemerkt worden dat deze vragenlijst is verstuurd naar moeders van meerlingen en de resultaten uit de studies beschreven in dit proefschrift betreffen vergelijkingen tussen groepen van meerlingmoeders, zoals de vergelijking tussen spontane DZ moeders en spontane MZ moeders. Men zou kunnen beargumenteren dat eenlingmoeders een betere vergelijkingsgroep vormen dan bijvoorbeeld MZ tweelingmoeders. De algemene opvatting navolgend gaan wij er van uit dat het krijgen van een MZ tweeling een random gebeurtenis is. Deze gebeurtenis wordt niet beïnvloed door genetische en/of omgevingsfactoren en kan dus iedere vrouw overkomen. MZ tweelingmoeders zijn daarom een even goede vergelijkingsgroep als eenlingmoeders. In feite, omdat MZ tweelingmoeders ook een meerlingzwangerschap hebben doorgemaakt, zou men kunnen beargumenteren dat MZ tweelingmoeders

juist een betere vergelijkingsgroep vormen als het gaat om het onderzoeken van de genetische invloeden voor het krijgen van DZ tweelingen.

Implicaties voor de toekomst

De zoektocht naar genen die geassocieerd worden met het krijgen van DZ tweelingen

Bij schapen is de genetische basis voor het krijgen van meerlingen voor een groot deel in kaart gebracht. In drie verschillende genen zijn mutaties gevonden die tot een hogere meerlingfrequentie leiden. Twee van deze genen betreffen de nauw gerelateerde groeifactoren, BMP15 (bone morphogenetic protein 15) en GDF9 (growth differentiation factor-9). Het derde gen is een receptor (BMPRII, bone morphogenetic protein type II receptor). Deze genen komen allemaal tot expressie in de eierstokken en hebben invloed op de reactie van individuele follikels op externe hormoonsignalen. Er is onderzocht of deze genen bij mensen ook een rol spelen bij het krijgen van tweelingen. Er zijn een aantal families gevonden waarin vrouwen deze varianten dragen. Deze vrouwen lijken twee keer zoveel kans te hebben om een tweeling te krijgen dan andere vrouwen. De frequentie van deze varianten is echter zo laag (minder dan 4% voor alle varianten) dat de bijdrage van deze varianten aan de totale incidentie van DZ tweelingen klein is. In onderzoeken zijn ook associaties gevonden tussen andere kandidaatgenen, zoals FMRI (fragile X mental retardation 1), FSHR (follicle stimulating hormone receptor) en Pi (protease inhibitor locus) en het krijgen van DZ tweelingen. Deze bevindingen zijn echter niet gerepliceerd in recente onderzoeken.

Er blijken dus geen sterke associaties te zijn tussen de groeifactoren BMP15 en GDF9 en het krijgen van DZ tweelingen bij de mens, ook al zijn deze genen bij de mens wel gerelateerd aan de vruchtbaarheid. Meerdere recente onderzoeken naar vrouwen met een vroege menopauze (premature ovarian failure) hebben uitgewezen dat sommige van deze vrouwen ook mutaties van zowel GDF9 als BMP15 dragen. Opnieuw is echter de frequentie van deze genvarianten in vrouwen met vervroegde overgang laag. Het is tot dusver niet bekend of dezelfde mutaties zowel verantwoordelijk zijn voor een verhoogde kans op tweelingen als voor de vervroegde overgang.

Uit bovenstaande bevindingen kan geconcludeerd worden dat de genen die worden geassocieerd met het krijgen van DZ tweelingen, bij mensen moeilijker te lokaliseren zijn dan in eerste instantie werd gedacht. De zoektocht naar kandidaatgenen heeft ons enig inzicht gegeven, maar nadere studie is nodig. Een interessante focus is daarbij het onderzoek naar de aard van de relatie tussen vervroegde overgang en het krijgen van DZ tweelingen. Deze onderzoeken zullen ons inzicht geven in de sleutelprocessen van vrouwelijke vruchtbaarheid.

In samenwerking met het Queensland Institute of Medical Research (QIMR) in Australië hebben wij een grote groep moeders van tweelingen gerekruteerd voor de studie 'Genetics of DZ twinning'. Moeders van DZ tweelingen met een zus die ook moeder is van een DZ tweeling en hun beide ouders worden gevraagd om mee te doen aan het project. Meedoen houdt in dat een bloed- en een urinemonster wordt afgenomen bij de deelnemers en daarnaast nemen de moeders van tweelingen ook deel aan een telefonisch interview. In het Nederlandse deel van deze studie is bloed verzameld voor DNA, RNA en hormoonconcentraties zoals LH, FSH en inhibine A en B. Om koppelingsonderzoek met endocriene parameters te kunnen doen is het bloed bij vruchtbare vrouwen op de 2^e tot 4^e dag van de menstruele cyclus verzameld. Wanneer vrouwen de anticonceptiepillen gebruiken is in de pilvrije week geprikt. Op het moment dat genome-wide markers beschikbaar zullen zijn, kunnen we ook andere parameters gebruiken

voor zusterpaar koppelingsonderzoek. Het gaat hierbij om variabelen die verkregen zijn tijdens het interview (zoals lengte en gewicht) en parameters uit plasma (zoals cholesterol en glucose).

Op dit moment wordt er bij 523 personen uit 125 families koppelingsonderzoek gedaan. Het doel van dit project is om uiteindelijk koppelingsonderzoek uit te voeren voor het DZ tweelingen fenotype door middel van een 10cM genome scan (400 markers) in 500 Nederlandse families en in 500 Australische families.

De vraag waarom vrouwen DZ tweelingen krijgen blijkt niet eenvoudig te beantwoorden. Het spontaan krijgen van een DZ tweeling wordt beïnvloed door omgevingsfactoren, eigenschappen van de moeder en genetische aanleg. De onderzoeken die in dit proefschrift staan beschreven laten zien dat naast leeftijd en graviditeit ook overgewicht, lengte en rookgedrag van invloed zijn op het krijgen van DZ tweelingen. Hoewel deze factoren een significante rol spelen is hun gezamenlijke effect echter niet erg groot. Genetische factoren spelen ook een belangrijke rol en kunnen in samenwerking met omgevingsfactoren het risico op het krijgen van DZ tweelingen vergroten. Meer onderzoek naar de genetische basis van het krijgen van DZ tweelingen is nodig om dit complexe fenomeen te ontrafelen.