

Titel**Andrologi****Forfattere**

Elisabeth Carlsen
Jimmi Elers
Jens Fedder (tovholder)
Ulrik Kesmodel
Mette Petri Lauritsen
Rita Jakubcionyte Laursen
Linda Magnusson Melsen
Anne Sofie S.S. Rex
Sinor Soltanizadeh
Freja Rikke Sørensen

Korrespondance

Jens Fedder, Jens.Fedder@rsyd.dk & fedder@dadlnet.dk

Status

Denne guideline bygger på den tidligere andrologiguide fra 2014, der igen var dannet ved sammenlægning af tidligere guidelines om henholdsvis udredning og behandling af mandlig infertilitet, som blev godkendt i 2006.

Den oprindelige guideline var ikke egnet til GRADE-metodens PICO-spørgsmål, men da vi gennemtiden har fået flere positive tilbagemeldinger fra DFS' medlemmer på den "mere "lærebogsagtige" form, har vi valgt at lade den gamle tekst stå. Vi har i stedet indsat de nye PICO-spørgsmål, hvor vi vurderer, at de bedst passer ind i den tidligere guideline, som på sigt helt kan erstattes af den nye model med PICO-spørgsmål. Selvom det er fristende at lave smårevisioner af den tidligere gældende guideline, har vi undladt at gøre dette, til det kan gøres efter de nye principper. Enkelte afsnit er taget ud af den gamle version, idet de er blevet erstattet af nye PICO-besvarelser. De nyindsatte PICO-spørgsmål er placeret i en separat ramme og med egen referenceliste.

Første udkast til aktuel version:	09.12.2022
Diskuteret på DFS, dato:	10.03.2023
Korrigeret udkast, dato:	11.03.2023
Endelig guideline, dato:	12.03.2023
Guideline skal revideres seneste dato:	01.03.2028

Indholdsfortegnelse

Indledning og definitioner	2
Oxford-kriterier og referenceværdier for sæd	3
Litteratursøgning til den gamle version	4
Resume af kliniske rekommandationer i den gamle version	4
Årsager til mandlig infertilitet	6
Livsstilsfaktorer (gammel version)	7
Udredning af mandlig infertilitet	10
PICO om DNA-fragmentering i spermatozoer	11
PICO om abstinensid	17
Behandling af mandlig infertilitet	23
Eliminering af miljø- og livstilsfaktorer	24
Medicinsk behandling	24
PICO om behandling med antioxidanter	26
PICO om behandling med D-vitamin	28
Behandling af ejakulatorisk dysfunktion	30
PICO om behandling af varicocele	32
Behandling af obstruktiv azoospermi	34
Behandling af non-obstruktiv azoospermi	35
Bilag 1 Flowchart	37
Referencer (gammel version)	38

Indledning

Omkring 15 % af alle par er ufrivilligt barnløse, og i halvdelen af tilfældene er årsagen helt eller delvist en mandlig faktor. Meget tyder på, at mænds sædkvalitet er blevet forringet inden for de seneste årtier, og man må derfor forvente, at antallet af infertile eller subfertile mænd øges.

Selv om undersøgelsen af manden i mange tilfælde ikke vil resultere i et behandlingsforslag til forbedring af sædkvaliteten, er det vigtigt at stille diagnosen hos de mænd, hvor der er mulighed for enten medicinsk eller operativ behandling. Det er endvidere vigtigt at identificere de mænd, hvor der er genetiske årsager til infertiliteten samt de mænd, hvor der er tegn på testikelkræft eller øget risiko for forstadier til testikelkræft (CIS).

Definitioner

Sædkvaliteten kan vurderes ud fra WHO's retningslinjer som illustreret i Tabel 1. WHO's referenceværdier angiver den nedre 5 % percentil hos fertile mænd, dvs. at 95 % af fertile mænd vil have værdier, der ligger over de anførte referenceværdier.

Tabel 2 viser den anvendte terminologi til beskrivelse af sædkvaliteten, som vi blive anvendt i det følgende.

Evidensniveauer og styrkegraderinger af anbefalinger, baseret på Oxford 2009

Definition af OXFORD-kriterier indsættes her (evt. copy paste fra guideline om overvægt?)!

Tabel 1: Referenceværdier fra WHO laboratory manual [1], opdateret med værdier fra WHO-manualen fra 2012 (6. udgave).

Parameter	Referenceværdi
Volumen	$\geq 1,4$ ml
pH	$\geq 7,2$
Spermatozokonzentration	≥ 16 mill/ml
Total antal spermatozoer	≥ 39 mill
Motilitet	≥ 42 % motile (grad a+b) eller ≥ 30 % progressivt motile (grad a) 1 time efter ejakulation
Morfologi	≥ 4 % normale former*
Vitale spermatozoer	≥ 54 %
Leukocytter	< 1 mill/ml

* Morfologi vurderes på basis af strikte kriterier [2]

Tabel 2: Terminologi ved beskrivelse af sædkvaliteten

Begreb	Definition
Aspermi	Intet ejakulat
Azoospermi	Ingen sædceller i ejakulatet
Oligozoospermi	Nedsat antal sædceller i ejakulatet
Asthenozoospermi	Nedsat bevægelighed af sædcellerne
Teratozoospermi	Nedsat andel morfologisk normale sædceller

Afgrænsning af emnet

Denne guideline omhandler dels 1) årsager til mandlig infertilitet og rekommandationer for udredning ved nedsat sædkvalitet dels 2) anbefalinger for behandling ved mandlig infertilitet.

Litteratursøgning (gammel version)

Der er i gennemgangen primært anvendt:

- PubMed
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [1]
- De eksisterende britiske guidelines: "Fertility. Assessment and treatment for people with fertility problems". Clinical Guidelines, February 2004, National Institute for Clinical Excellence, RCOG Press
<http://www.rcog.org.uk/guidelines.asp?PageID=108&GuidelineID=64>.

Resume af kliniske rekommandationer

Hvilke mænd bør tilbydes udredning (se flowchart bilag 1): Mænd med azoospermi eller svær oligozoospermi med spermatozokonzentration < 1 mill/ml i råsæden.	D
Mænd med faldende sædkvalitet over flere prøver (kan være udtryk for CIS)	√
Mænd med oligozoospermi (<15 mill/ml i råsæden) med anamnese med retentio testis.	C
Mænd med nedsat sædkvalitet bør spørges om urogenitale symptomer	√
Anamnesen hos den infertile mand bør indeholde oplysninger om retentio testis, fertilitet i tidligere forhold, urogenitale infektioner, scrotale traumer eller operationer, parotitis, orchitis, kroniske sygdomme samt ejakulationsforstyrrelser. Endvidere må det opklares, om manden indtager medicin, som kan påvirke dannelsen af sædceller, eller om der er andre væsentlige toksiske eller arbejdsmiljømæssige ekspositioner.	D

Den andrologiske udredning bør inkludere en objektiv undersøgelse med en vurdering af kropsproportioner, kropsbehåring og specielt pubesbehåring, samt eventuel forekomst af gynækomasti. Testes' lejrning, størrelse og konsistens vurderes, og der undersøges for forekomst af varicocele eller hernie.	D
Testisvolumen kan bestemmes enten med orkidometer eller ultralydscanning.	B
Findes der et varicocele , bør graden af dette beskrives af hensyn til evt. behandlingsindikation	C
Sædanalysen kan foregå efter WHO-kriterier.	D
Ved lavt sædvolumen eller anamnese med aftagende ejakulatmængde eller anejakulation bør der foretages transrektal ultralydscanning af sædvejene (TRUS) med henblik på obstruerende processer samt undersøges for retrograd ejakulation.	√
Der er ikke belæg for at undersøge for spermaantistoffer , da ingen af de tilgængelige analyser har bevist klinisk værdi	D
*Hormonbestemmelser bør indgå i udredningen af mandlig infertilitet. Der bør foretages bestemmelse af FSH, LH, testosteron, SHBG, frit androgen index eller frit testosteron samt om muligt inhibin B.	B
Mænd med hypogonadotrop hypogonadisme bør henvises til nærmere udredning og eventuel behandling på specialafdeling	√
Ved lave FSH- og LH-værdier bør der foretages bestemmelse af serum prolaktin.	D
TSH bør bestemmes ved lav LH trods nedsat testosteron og ved nedsat SHBG samt klinisk mistanke om myxødem	D
Der er ikke indikation for rutinemæssig bestemmelse af TSH	D
Da testiscancer og forstadier dertil (CIS) forekommer hyppigere hos infertile mænd end i normalbefolkningen, anbefales ultralydscanning af testes (scrotum) hos mænd med azoospermi eller svær oligozoospermi med < 1 mill/ml, eller hvor sædkvaliteten er markant faldende samt hos mænd med tidligere retentio testis.	D
Ultralydscanning af testes bør foretages af en person, som har erfaring med dette.	√
Der bør foretages karyotypebestemmelse og undersøgelse for mikrodeletioner på Y kromosomet hos mænd med non-obstruktiv azoospermi eller ved svær oligozoospermi med spermatozokonzentration <1 mill/ml	D
Testisbiopsi med henblik på diagnosticering af carcinoma in situ anbefales ved anamnese med retentio testis og oligo- eller azoospermi hos mænd med atrofiske testes og/eller ultrasoniske forandringer (f.eks uregelmæssigt testisparenchym eller mikrolithiasis). Testisbiopsi bør sædvanligvis udføres bilateralt.	D
Ved azoospermi og mistanke om obstruktion, bør der foretages undersøgelse for cystisk fibrose (CF)-mutationer . Hvis der påvises en CF-mutation hos manden, bør uxor også undersøges. Hvis begge er bærere af en CF-mutation, bør der tilbydes præimplantationsgenetisk diagnostik (PGD), hvis mandens sædceller anvendes.	D
Hvis der ved udredningen findes en årsag til infertiliteten , bør den om muligt behandles forud for evt. fertilitetsbehandling	√

- **Relevant information om prøvetagning kan findes i analysefortegnelsen, og referenceværdier defineres af det laboratorium, som udfører analysen.**

Årsager til mandlig infertilitet

Årsagerne til mandlig infertilitet kan opdeles i fire hovedgrupper (tabel 3)

- 1) ophævet eller hæmmet spermatogenese,
- 2) obstruktion af sædudførselsvejene,
- 3) ejakulationsforstyrrelser
- 4) andre årsager, der igen kan underinddeles afhængig af ætiologien

Hæmmet spermatogenese. Mange tilfælde af nedsat sædkvalitet skyldes formentlig en medfødt, nedsat funktion af testiklerne som led i testikulær dysgenese syndrom (TDS), der i sværere tilfælde også kan være associeret med retentio testis, hypospadi, CIS eller cancer testis [3] (*Evidensniveau 4*). Risikoen for CIS er 1,1 % hos infertile mænd [4] (*Evidensniveau 2b*) og højere (standardiseret incidens rate 1,6) end hos fertile mænd [5] (*Evidensniveau 2a*). Ved retentio testis er risikoen for CIS 2-3 % [6,7] (*Evidensniveau 2a*).

Obstruktion: Ved obstruktiv azoospermi kan der ikke påvises spermatozoer i ejakulatet, men der kan være normal spermatogenese. Tilstanden skyldes en aflukning af sædvejene, som enten er erhvervet eller medfødt. Den hyppigste årsag til denne aflukning er vaskotomi udført i forbindelse med ønske om sterilisation, men sequelae efter infektioner (Chlamydia trachomatis), traumer eller operationer kan også forårsage aflukning af sædvejene [8] (*Evidens 3*). Genetiske faktorer kan spille en rolle [9,10], idet mænd som bærer genet for cystisk fibrose, ofte mangler hele eller dele af duktus deferens, epididymis og/eller vesiculae seminales. Endelig kan kronisk prostatitis, forkalkninger eller cyster i prostata eller vesikula seminales medføre delvis eller fuldstændig obstruktion af ductuli ejaculatorii og dermed aflukning af sædvejene [11].

Ejakulationsforstyrrelser. Den normale ejakulation består af seminal emission og projektil ejakulation. Ved den seminale emission bringes sædcellerne fra epididymis gennem duktus deferens til urethra posterior, hvor sædvæsken tilblendes. Ved den projektile ejakulation bringes sædceller og sædvæske (ejakulatet) fra urethra posterior til meatus urethrae (antegrad ejakulation). Den seminale emission kontrolleres overvejende af det sympatiske nervesystem (Th11-L2), mens den projektile fase kontrolleres af somatiske og parasympatiske nervesystem (S2-S4) [12] (*Evidens 2a, 2b, 3*).

Ejakulatorisk dysfunktion eller forstyrrelser i den normale ejakulation skyldes hovedsagligt neurogene skader opstået i forbindelse med rygmarvsskader, dissemineret sklerose, diabetes eller operationer. Disse neurogene skader forårsager enten retrograd ejakulation, hvor sædceller ender i urinblæren, eller – i sværere tilfælde – en total mangel på ejakulation, såkaldt anejakulation.

Den største gruppe af mænd med ejakulatorisk dysfunktion og samtidigt fertilitetsønske udgøres af de traumatisk rygmarvsskadede med tetraplegi eller paraplegi (RS). Omkring 95 %

af disse mænd er ikke i stand til at blive biologiske fædre på naturlig vis [12]. Hovedårsagen hertil er manglende evne til at frembringe antegrad ejakulation ved seksuel stimulation. Herudover findes sædkvaliteten nedsat specielt med hensyn til sædcellernes motilitet uden at årsagen til dette er kendt [12]. Ejakulatorisk dysfunktion kan også skyldes en psykologisk blokering [13].

Varicocele: Et varicocele er et anatomisk klinisk syndrom karakteriseret ved varikøs omdannelse af venerne i plexus pampiniformis i forbindelse med venøs reflux, formentlig pga. defekte veneklapper. De fleste varicoceler er venstresidige. Varicoceler opstår oftest i puberteten og ses hos ca. 15 % af den voksne mandlige befolkning. Mulige symptomer omfatter ubehag og tyngdefornemmelse fra pågældende skrotalhalvdel og muligvis nedsat sædkvalitet. Således er forekomsten af varicoceler forhøjet hos infertile mænd, idet den er ca. 20-40 % hos mænd med primær infertilitet og op til 80 % hos mænd med sekundær infertilitet [14] (Evidens 3). Sædkvaliteten hos patienter med varicocele og infertilitet er karakteriseret ved nedsat sædcellekonzentration og- motilitet samt et øget antal morfologisk abnorme sædceller [15,16] (Evidens 2b). Der kan også hos nogle patienter påvises degenerative testisforandringer med påvirket Leydigcellefunktion [15,16]. Imidlertid er flertallet af mænd med et klinisk varicocele fertile, og det vides ikke, hvordan et varicocele præcist kan påvirke sædkvaliteten. Disse forhold medfører betydelig uklarhed i forståelsen af sammenhængen mellem varicoceler, nedsat sædkvalitet og infertilitet. Dog antages varicocele størrelsen (graden) at spille en rolle ned hensyn til sædkvaliteten, idet de største varicoceler (grad II og III) medfører de største sædkvalitetsforringelser [17,18] (Evidens 2b).

Livsstilsfaktorer, herunder overvægt og indtagelse af nydelsesstoffer samt eksogene faktorer, spiller også en rolle for mandlig infertilitet. Mht. sammenhæng mellem mænds sædkvalitet og livsstilsfaktorer som overvægt, rygning og alkohol henvises til selvstændige DFS-guidelines, der dækker disse emner. Vi har indtil bibeholdt den gamle tekst om anabole steroider, da dette emne ikke dækkes af selvstændige guidelines.

Anabole steroider: (anabolic-androgenic steroids: AAS) er testosteron og analoge syntetiske derivater heraf med androgen-anabol effekt. Via negativ feedback på hypothalamus-hypofyseaksen hæmmes GnRH-produktionen og herved FSH og LH. LH stimulerer den intratestikulære testosteronproduktion i Leydig-cellerne. Testosteronkoncentrationen i testes er normalt 25-100 gange så høj som i serum, og denne høje koncentration er nødvendig for normal spermatogenese. Den eksogene tilførsel af AAS hæmmer således dannelsen af den intratestikulære testosteron og derved spermatogenesisen med reduceret testisvolumen og infertilitet til følge. Der ses således ofte azoo – eller oligozoospermi samt ændret morfologi [28](1). S-testosteron kan være lav, uændret eller høj, FSH og LH er lav.

Der er ofte tale om en reversibel tilstand afhængig af varigheden af misbruget. Allerede 3-4 mdr. efter ophør kan spermatogenesisen være normaliseret, men der kan også gå op til 3-5 år [29-31](Evidens 5). Såfremt der ikke ses reversibilitet efter 6 måneder kan man forsøge behandling med HCG, HMG, FSH, testosteron eller clomifencitrat [29], men dette er en specialistopgave. Det anbefales at kontrollere hormonstatus 6 måneder efter ophør med forbrug af anabole steroider, og hvis denne ikke er normaliseret, er behandling indiceret via

specialafdeling. Såfremt hormonstatus er normaliseret, anbefales ny sædprøve for at vurdere spermatogenesisen [32,33] (Evidens 3a)

Arbejds miljøfaktorer: Visse arbejdsmiljø- og miljømæssige faktorer menes at have potentielle skadelige effekt på spermatogenesisen [34] (Evidens 3a). Et af de mest kendte veldokumenterede eksempler på arbejdsmiljøinduceret infertilitet er pesticidet Dibromochloropropan (DBCP), som blev benyttet på fx. banan- og ananasplantager på Costa Rica. Man observerede flere tilfælde af infertilitet blandt mænd, der arbejdede med disse pesticider [35,36] (Evidens 2b+3a). Andre eksempler på arbejdsmiljøpåvirkning er Glycol ether (organiske opløsningsmidler) [37] og tungmetaller som bly, cadmium og kviksølv, metalstøv fra svejsning og carbon disulfid [38,39] (Evidens 3a). Varme påvirker spermatogenesisen [40] (Evidens 3a), og det er vist, at svejsere kan få reversibel nedsat sædkvalitet [41] (Evidens 3b). Betydningen af siddende arbejdsstilling [42], brug af mobiltelefon [43] og brug af bærbar computer i skødet er ikke afklaret [44], dog anbefales det at sidde med let adspredte ben og med computeren så kort tid som muligt i skødet [45] (Evidens 2c).

Et case-controlstudie med 92 fertile og 73 subfertile mænd belyste forskellige risikofaktorer for oligozoospermi. Odds-ratioen for de mest markante risikofaktorer var: 8,4 for pesticider, 2,8 for svejsning (ikke sign), 15,4 hvis man var blevet behandlet med antibiotika indenfor de sidste 3 måneder, 6,2 ved samtidige gastrointestinale problemer, 2,3 ved indtag af frugt <3/>4 ugentligt og 1,9 ved manglende indtag af grønt dagligt og 8,4 hvis der var et kvindeligt fertilitetsproblem i familien. I denne undersøgelse fandtes ikke øget risiko ved udsættelse for maling eller varme [46] (Evidens 3b).

Tabel 3: Årsager til mandlig infertilitet

Hovedgruppe	Subgrupper	
Ophævet eller hæmmet spermatogenese	Hypogonadotrop hypogonadisme	Hypofyseadenomer/tumorer (f.eks. prolaktinom) Kallmann's syndrom Hæmokromatose
	Testikulær dysgenese syndrom (TDS)	Hæmmet spermatogenese Spermatogenic arrest Sertoli cell only syndrome Retentio testis Carcinoma in situ testis Cancer testis
	Genetiske faktorer	Klinefelter syndrom (oftest karyotypen 47,XXY) Autosomale translokationer Androgenreceptorgenmutationer Mikrodeletioner på Y-kromosomet
	Erhvervede årsager	Traumer Orchitis
	Exogene faktorer	Medikamentelle (f.eks. salazopyrin, cytostatica, klorokinofosfat, anabole steroider) Stråling
Obstruktion	Sequelae til epididymitis	Chlamydia, gonorrhoea eller andre urogenitale infektioner
	Sequelae til tidligere operationer	Vasektomi, rekonstruktive indgreb, operationer i det lille bækken
	Sequelae til traumer	f.eks trafikuheld, skud og tortur
	Kongenit aplasi af vas deferens eller øvrige fraførende sædveje	Cystisk fibrose eller cystisk fibrose genmutationer
Ejakulationsforstyrrelser	Retrograd ejakulation	Neuropati bl.a. ved diabetes mellitus Sequelae til operationer på blærehalsen og i det lille bækken i øvrigt
	Anejakulation	Neuropati
Andre årsager	Varicocele Immunologiske	Dannelse af antistoffer efter tidligere infektioner, traumer eller operationer

Udredning af mandlig infertilitet

Udredningen af den infertile mand inkluderer optagelse af relevant anamnese og objektiv undersøgelse og sædanalyser samt afhængig af disse ultralydskanning af skrotum samt blodprøver. Herefter kan der være behov for supplerende diagnostiske undersøgelser.

Den nedre grænse for, hvornår en mand bør have foretaget supplerende undersøgelser ud over anamnese og objektiv undersøgelse, er dog arbitrær og afhænger af, om der er andre faktorer, der styrker indikationen for yderligere undersøgelse (se flowchart, bilag 1).

Anamnesen skal indeholde oplysninger om tidligere retentio testis, pubertetsudvikling, urogenitale operationer eller traumer, operationer i det lille bækken, urogenitale infektioner, tidligere fertilitet, parotitis med orchitis samt kroniske sygdomme og disses behandlinger. Der udspørges om eventuelle seksuelle dysfunktioner herunder ejakulationsforstyrrelser samt om medicinforbrug inklusive forbrug af anabole steroider og eventuelle toksiske ekspositioner herunder tobak og alkohol.

Objektiv undersøgelse inkluderer vurdering af kropsproportioner, kropsbehåring og specielt pubesbehåring, samt eventuel forekomst af gynækomasti. Ved undersøgelse af genitalia vurderes testiklernes lejring, størrelse og konsistens samt forekomst af evt. hydrocele, spermatocele, varicocele eller hernie.

Varicocele kan være ledsaget af samsidig mindsket testikelstørrelse. Findes der et varicocele, bør det beskrives, idet man benytter følgende gradinddeling, som har betydning for beslutning om behandling. Varicocelet bedømmes med patienten i stående stilling. Grad 1: Kun palpabelt ved Valsalva manøvre; Grad 2: Palpabelt uden Valsalva manøvre; Grad 3: Synligt.

Testes størrelse bestemmes med et orkidometer (et instrument med modeller af testis i forskellige størrelser), eller ved ultralydundersøgelse. De fleste mænd med normal sædkvalitet har testes med volumen større end 12-15 ml. Der er en positiv korrelation mellem spermatozokonzentration og testisvolumen [47](Evidens 2b).

Forandringer i epididymis og vas deferens registreres. Kan man ikke føle ductus deferens, eller føles den meget tynd, og har patienten azoospermi, må man mistænke en total eller partiel agenesi, som kan forekomme hos mænd, der er heterozygot for en *cystisk fibrose (CFTR-) genmutation*.

Sædanalysen

Sædprøven kan vurderes i henhold til WHO's kriterier, der angiver referenceværdier baseret på undersøgelse af fertile mænd [1] (se tabel 1). Sædanalyse i henhold til WHO's kriterier har relativ høj sensitivitet (89.6 %), dvs. at analysen diagnosticerer 9 ud af 10 mænd med sand nedsat sædkvalitet, men undersøgelsen har lav specificitet, idet en abnorm test ikke nødvendigvis er ensbetydende med nedsat sædkvalitet. Det skyldes bl.a., at sædens kvalitet (f.eks. antallet af sædceller) kan variere med tiden. Derfor bør der altid foretages en yderligere sædanalyse, hvis den første prøve viste nedsat sædkvalitet.

Der er en direkte sammenhæng mellem abstinensperioden og sædcellekonzentration og -volumen op til 6 døgns abstinensperiode [48] (Evidensniveau 3). Sædkvaliteten påvirkes signifikant af

feber [49], forskellige medikamina samt andre exogene faktorer, og selv hos fertile mænd er der en betydelig fluktuation i sædkvaliteten [50] (*Evidensniveau 3*).

Flere sædprøver øger specificiteten [50,51](Evidens 3). WHO's nedre reference for **sædcellekoncentrationen** er 15 mill/ml. Undersøgelser har dog fundet aftagende fekunditet og længere 'time to pregnancy' (TTP) ved en sædcellekoncentration under 40 mill/ml [52] (*Evidensniveau 3*).

Sædcellemorfologi bestemmes ved "strikte kriterier" [53]. Guzick et al. [54]foretog en prospektiv undersøgelse af sædkvaliteten hos infertile og fertile mænd og fandt et fertilt niveau ved flere end 12 % morfologisk normale sædceller. Mænd med under 9 % morfologisk normale sædceller var subfertile, hvorimod mænd med 9-12 % morfologisk normale sædceller var i et "intermediært niveau" (*evidensniveau 1b*). Det er dog vist, at sandsynligheden for graviditet ved IUI er nedsat ved <5 % morfologisk normale spermatozoer [55] og i den seneste version af WHO's manual er grænsen sat til 4 % [1].

Spermatozoantistoffer hos manden kan reducere motilitet og penetrationsevnen af sædcellen, foruden at de kan interferere med bindingen til oocytten, men ikke alle antistoffer påvirker fertiliteten. Chiu og Chambley konkluderede i et review af litteraturen, at ingen af de tilgængelige tests af spermatozoantistoffer kan anvendes til sikker diagnostisk og terapeutisk anvendelse[56].

Ved **leukocytospermi**, dvs et leukocytaltal i sædvæsken større end 1 mill/ml bør sædprøven gentages. Ved vedvarende leukocytospermi er det indiceret at foretage mikrobiologisk udredning inklusive PCR undersøgelse af urin for Chlamydia samt urindyrkning og evt. dyrkning af sæd, også selv om der ikke er symptomer på urethritis eller prostatitis.

Antibiotisk behandling er normalt kun indiceret, hvis der er symptomer på urogenital infektion, eller der foreligger positiv podning hos manden eller kvinden [57] (*evidensniveau 3*).

Ved lavt **sædvolumen** eller anamnese med aftagende ejakulatmængde eller anejakulation bør der foretages transrektal ultralydskanning (TRUS) med henblik på obstruerende processer samt undersøges for *retrograd ejakulation*, hvor man i en postejakulatorisk urinprøve kan påvise spermatozoer.

Ved lavt sædvolumen (typisk <1 ml) og azospermi bestemmes pH og fruktoseindhold i sædvæsken. Et lavt pH og et lavt fruktoseindhold tyder på manglende funktion/agenesi af vesiculæ seminales eller obstruktion i de øvre dele af sædvejene, idet fruktose primært secerneret af vesiculæ seminales.

DNA-fragmentering i spermatozoer

Indledning:

I Danmark har spørgsmålet om DNA-fragmentering i sædceller og hvilken påvirkning, det måtte have på fertiliteten, længe været diskuteret.

I denne guideline ønsker vi at afklare, om og hvorledes DNA-fragmentering påvirker chancen for at opnå graviditet efter forskellige fertilitetsbehandlinger.

Vores undersøgelsesspørgsmål er:

Påvirker mængden af DNA-fragmentering i sædcellerne chancen for at opnå graviditet efter IUI-, IVF- eller ICSI-behandling hos par i fertilitetsbehandling.

Baggrund:

I 1980'erne blev man opmærksom på DNA-fragmentering i sædceller og en mulig påvirkning heraf på fertiliteten, og man begyndte at udvikle metoder til analyse af DNA-fragmentering. Der er sidenhen kommet en del analysemetoder til, der blandt andet indbefatter Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labelling (TUNEL), Sperm Chromatin Dispersion (SCD) and Comet assay. Der er lavet en hel del studier indenfor dette område, med anvendelse af forskellige metoder og forskellige cut-off værdier til bestemmelse af høj eller lavt DNA-fragmentationsindex (DFI). I nogle studier har man blandet patientpopulationerne, hvilket har gjort det vanskeligt at lave en klinisk guideline på området [1].

Forhøjet DNA-fragmentation kan have flere forskellige årsager. Der er blandt andet set en sammenhæng mellem DNA-fragmentering og mængden af oxidativ stress i sædprøven, varicocele, varmepåvirkning af testiklerne, rygning, livsstil, visse sygdomstilstande hos manden samt påvirkning af miljøfaktorer. Eventuelle interventioner kan således have en effekt hos den ene patient med forhøjet DFI men ikke hos den anden, da den underliggende årsag kan være forskellig.

I 2017 udgav ESHRE en guideline vedrørende tilbagevendende graviditetstab, og her blev en sammenhæng mellem øget mængde DNA-fragmentering og risikoen for at miste graviditeten anerkendt [2].

Der er endvidere mistanke om, at der kan være en sammenhæng mellem nogle typer af udviklingsforstyrrelse hos børnene og graden af DNA-fragmentation i faderens sædceller. Resultaterne er dog ikke entydige, hvilket muligvis skyldes, at gruppen er børn med udviklingsforstyrrelser er relativt lille [3, 4].

Man har i de senere år haft fokus på at forstå de underliggende årsager til øget DNA-fragmentation i sædcellerne og dermed muligheden for intervention inden evt. fertilitetsbehandling, og der er publiceret flere artikler om den kliniske håndtering af øget DNA-fragmentering [5-7].

Denne guideline undersøger, om der er en sammenhæng mellem graviditetsraten efter forskellige typer fertilitetsbehandling og forhøjet DNA-fragmentering – ofte udtrykt som DNA-fragmenteringsindex (DFI), som er defineret som den procentdel af det samlede antal sædceller, der udviser DNA-fragmentering.

Guidelinegruppen anbefaler, at man sidenhen kan undersøge underliggende årsager og mulige interventioner.

Søgning:

Til gennemgang af vores undersøgelsesspørgsmål blev der foretaget litteratursøgning i følgende databaser: PubMed/Medline, Embase og Cochrane med følgende søgeord ((male) OR (men) AND (infertility)) AND (dna fragmentation) AND (pregnancy).

Litteratur:

Studier, der levede op til følgende kriterier, blev inkluderet: *i*) originalartikler, reviews og meta-analyser med infertile par der har fået målt DFI; *ii*) hvor der var udført enten IUI-, IVF- eller ICSI-behandling; *iii*) graviditetsrate som resultat og *iv*) hvor der blev lavet en sammenligning af graviditetsraten mellem patientgrupper med højt DFI vs. patientgrupper med lavt DFI.

Studier, hvor der var benyttet oocyttdonor eller kryopræservede/frosne sæd blev ekskluderet ligesom studier, hvor der var intervention med eks. antioxidanter. Studier, hvor man sammenlignede DFI mellem grupper, der opnåede graviditet og grupper, der ikke opnåede graviditet, blev også ekskluderet. Case reports, editorial letters og commentary articles blev også ekskluderet.

I vores primære søgning fandt vi 1.922 artikler, hvoraf var 484 dubletter. Af disse var 1.261 irrelevante, hvilket gav 177 artikler til fuldtekst-screening. Her blev yderligere 131 ekskluderet, hvilket resulterede i 46 artikler.

Gennemgang af evidensen:

IVF og ICSI

For IVF- og ICSI-behandling fandt vi i alt 24 originalartikler [8-31] og 10 metaanalyser og/eller reviews [32-41].

Ved gennemgang af litteraturen fandt vi et systematisk review og en metaanalyse fra 2021 af Ribas-Maynou et al. [32]. Det blev vurderet, at denne artikel var af en sådan kvalitet, at den kunne danne grundlag for beskrivelsen. Her var 18 af de i søgningen fundne originalartikler inkluderet [8-25]. Den kvantitative analyse var baseret på 12.380 cykli og viste signifikant nedsat graviditetsrate efter IVF-behandling, hvis DFI var forhøjet (0,72; 0,55-0,95; $P = 0,02$). Der var tale om en heterogen gruppe, og efter at have justeret for publikationsbias, var resultatet ikke længere signifikant. Efter ICSI-behandling fandtes ingen signifikant forskel på graviditetsraten (0,89; 0,78 – 1,02; $P = 0,09$). Justering for publikationsbias bekræftede dette resultat.

Ud over det systematiske review og metaanalysen af Ribas-Maynou et al. fandt vi 7 originalartikler, der ikke var inkluderet i denne.

Frydman et al. fandt hos 117 patienter, der modtog IVF-behandling, en signifikant lavere graviditetsrate for par med højt DFI (65,5 % [95 % CI 50,4 – 743,6] vs 37,5 % [95 % CI 24,0 – 51]; $P = 0,007$) [26].

I et studie af Khalafalla et al. inkluderede man 392 patienter, der modtog ICSI-behandling. Her fandt man ikke nogen signifikant forskel i graviditetsraten mellem lav, moderat og forhøjet DFI (33,3 % vs 41,6 % vs 34,5 %; $P = 0,265$) [27].

I et studie med 2.371 patienter, der modtog enten IVF- eller ICSI- behandling, fandt Liang et al. ingen signifikant forskel mellem graviditetsrater for par med lav og høj DFI (55,33 % vs 49,28 %; NS). Man har ikke opdelt resultaterne i IVF vs ICSI [28].

Lin *et al.* fandt i et studie med 137 IVF-cykli og 86 ICSI-cykli ingen statistisk signifikant forskel på graviditetsrater mellem par med lav, moderat og høj DFI efter hverken IVF (48,9 % vs 52,9 % vs 54,5 %) eller ICSI-behandling (52,4 % vs 52,3 % vs 47,6 %) [29].

Nicopoulos *et al.* inkluderede i alt 303 par i et studie, hvoraf 226 par modtog ICSI-behandling og 77 par modtog IVF behandling. I dette studie benyttede man sig af 3 forskellige grænseværdier og for alle 3 fandt man signifikant lavere chance for live birth hos gruppen med højt DNA-fragmentering (i dette studie er der ikke angivet data for graviditetsrate). Ved en grænseværdi på 29 var live birth raten 31 % vs 0 % ($P = 0,016$). Ved grænseværdi på 6 var live birth raten 37 % vs 1 % ($P = 0,003$) og ved en grænseværdi på 64 var live birth raten 33 % vs 0 % ($P = 0,012$). Hos de 226 par, der modtog ICSI-behandling fandt man, med et grænseværdi på 27, at live birth raterne for lav vs høj DFI var 44 % vs 29

% ($P = 0,062$). Med en grænseværdi på 10 var de 43 % vs 27 % ($P = 0,018$) og med en grænseværdi på 68 var de 46 % vs. 30 % ($P = 0,045$) [30].

I et sidste studie, udført af Virro *et al.* havde man inkluderet 249 par, der modtog enten IVF, ICSI eller begge dele. Ved en DFI grænseværdi på 30 fandt man at graviditetsraten for høj DFI var 28 % og for mænd med lavt DFI var den 47 % ($P = 0,01$) [31].

Ud over originalartikler har man i Ribas-Maynou *et al.* også sammenholdt de fundne resultater med tidligere reviews og metaanalyser publiceret på området. Ribas-Maynou finder 10 reviews og metaanalyser, og her var 8 også inkluderet i vores egen søgning. [33, 35-41]. Blandt de 10 studier fandt man en lignende association mellem forhøjet DNA-fragmentering og nedsat graviditetschance efter IVF-behandling i 6 af dem. Et enkelt havde fundet sammenhængen både for IVF- og ICSI-behandling.

Ud over de 8 reviews og/eller metaanalyser, der var inkluderet i Ribas-Maynou *et al.*, fandt vi et ekstra studie af Cho *et al* [34], medlignende resultater, dvs. at høj DNA-fragmentering påvirker graviditetsrater efter IVF-, men muligvis ikke efter ICSI-behandling.

IUI

Vedrørende IUI-behandling fandt vi 13 artikler [40, 42-53], hvoraf tre var reviews/metaanalyser [40, 42, 43]. To reviews/metaanalyser var fra 2019 og én fra 2011. De to nyeste blev valgt som udgangspunkt. Her var fem af de artikler, der var fundet i vores søgning inkluderet [44-47, 52]. Der var overlappende artikler i metaanalyserne.

Sugihara *et al.* inkluderede i alt otte artikler i deres kvalitative analyse og tre i deres kvantitative. Metaanalysen blev lavet på baggrund af data fra 917 cykli. Der blev benyttet en to gange to tabel med høj vs lav DFI graviditetsrate efter IUI-behandling. Resultatet var en relativ risiko på 3,3 (95 % CI: 1,16; 9,39), dvs. at par med et lavt DFI har tre gange højere chance for at opnå graviditet efter IUI-behandling end par med høj DFI [42].

Metaanalysen af Chen *et al.* er udført på baggrund af 10 artikler med i alt 2.839 cykli. En to gange 2 tabel blev lavet med høj vs lav DFI og graviditetsrate efter IUI-behandling som udfald. Her fandt man en relativ risiko på 0,34 (95 % CI 0,22-0,52 $P < 0,001$). Høj DNA-fragmentering resulterede i en signifikant reduceret chance for graviditet efter IUI med ca. faktor 3 [43]. Disse resultater er i tråd med den 3. metaanalyse af Zini *et al.* [40].

I de resterende 5 artikler var resultatet heterogent. I ét studie fandt man ingen signifikant forskel i graviditetsrater efter IUI mellem 68 patienter med høj og lavt DFI [51]. I Rex *et al.* med 137 patienter og 310 cykli, var graviditetsraten signifikant reduceret, hvis DFI var højere end 20% ($P=0,003$) med en OR på 2,71 (CI 95% 0,126-0,665; $P=0,001$) [49]. I et andet studie af Depoydt *et al.* satte man cut-off til 26 % og her fandt man en odds ratio 0,0326; 95% CI 0,0019 – 0,5400; $P = 0,017$) [48]. Det vil sige, at chancen for graviditet var 30 gange større, hvis DFI havde været lav. I et studie af Rex *et al.*, hvor man undersøgte DFI målt på en sædprøve indleveret før behandling, fandt man i 352 cykli ved et cut-off på 10, at graviditetsraten var 21,7 % ved lavt DFI og 9,9% ved højt DFI (OR: 0,39; CL 95% 0,21-0,75; $P<0,005$) [53]. I det sidste studie udført af Rios *et al.* var 147 patienter inkluderet. Her fandt man ingen signifikant forskel i graviditetsrater efter IUI hos par, hvor manden havde forhøjet DFI (3,6 %) vs. Par, hvor manden havde normalt DFI (19,3 %), ($P = 0,08$) [50].

I de fleste studier er det fundet, at graviditetsraten ved forhøjet DFI er reduceret til ca. en tredjedel af graviditetsraten hos par med lavt DFI efter IUI-behandling.

Konklusion:

Ud fra ovenstående data synes der at være en overvejende konsensus om, at graviditetsraten ikke bliver påvirket signifikant af DFI efter ICSI-behandling.

Vi kan dog ikke på basis af den nuværende litteratur konkludere, om graviditetsraterne er ændrede ved IVF-behandling afhængig af DFI-status.

Derimod synes der at være god evidens for, at højt DFI resulterer i lavere graviditetsrater ved IUI-behandling. De fleste studier viser en graviditetsrate på en tredjedel efter IUI-behandling ved højt DFI, men studierne viste ikke enighed om præcis, hvor cut-off ligger.

Anbefaling:

Der er behov for bedre dokumentation af den eventuelle betydning af DNA-fragmentering i spermatozoer før implementering af rutinemæssige undersøgelser af manden i det infertile par.

Referencer:

1. Rex, A.S., J. Aagaard, and J. Fedder, *DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review*. *Andrology*, 2017. **5(4)**: p. 622-630.
2. <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Recurrent-pregnancy-loss>.
3. Cheung, S., et al., *Assessing the cognitive and behavioral development of 3-year-old children born from fathers with severe male infertility*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2021. **224(5)**: p. 508.e1-508.e11.
4. Yatsenko, A.N. and P.J. Turek, *Reproductive genetics and the aging male*. *J Assist Reprod Genet*, 2018. **35(6)**: p. 933-941.
5. Esteves, S.C., et al., *Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations*. *Andrologia*, 2021. **53(2) (no pagination)**(e13874).
6. Esteves, S.C., *Interventions to prevent sperm DNA damage effects on reproduction*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019. **1166**: p. 119-148.
7. Humaidan, P., et al., *The combined effect of lifestyle intervention and antioxidant therapy on sperm DNA fragmentation and seminal oxidative stress in IVF patients: a pilot study*. *Int Braz J Urol*, 2022. **48(1)**: p. 131-156.
8. Bradley, C.K., et al., *Intervention improves assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm DNA fragmentation: A retrospective analysis*. *Andrology*, 2016.
9. Borini, A., et al., *Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART*. *Human Reproduction*, 2006. **21(11)**: p. 2876-2881.
10. Borges, E., et al., *Sperm DNA fragmentation is correlated with poor embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility*. *Fertility and Sterility*, 2019. **112(3)**: p. 483-490.
11. Benchaib, M., et al., *Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome*. *Fertility and Sterility*, 2007. **87(1)**: p. 93-100.
12. Benchaib, M., et al., *Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique*. *Human Reproduction*, 2003. **18(5)**: p. 1023-1028.
13. Dar, S., et al., *In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with a markedly high DNA fragmentation index (>50%)*. *Fertility and Sterility*, 2013. **100(1)**: p. 75-80.
14. Esbert, M., et al., *Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes*. *Reproductive BioMedicine Online*, 2011. **23(6)**: p. 704-710.
15. Ni, W., et al., *Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcome of frozen-thawed embryo transfer and on blastocyst formation*. *PLoS ONE*, 2014. **9(4) (no pagination)**(e94956).
16. Niu, Z.H., et al., *Sperm chromatin structure assay results after swim-up are related only to embryo quality but not to fertilization and pregnancy rates following IVF*. *Asian Journal of Andrology*, 2011. **13(6)**: p. 862-866.
17. Oleszczuk, K., A. Giwercman, and M. Bungum, *Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome*. *Andrology*, 2016. **4(2)**: p. 290-296.
18. Payne, J.F., et al., *Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques*. *Fertility and Sterility*, 2005. **84(2)**: p. 356-364.

19. Seli, E., et al., *Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization*. *Fertility and Sterility*, 2004. **82(2)**: p. 378-383.
20. Simon, L., et al., *Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF*. *Reproductive BioMedicine Online*, 2013. **26(1)**: p. 68-78.
21. Sivanarayana, T., et al., *Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): Correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection*. *Reproductive Medicine and Biology*, 2014. **13(2)**: p. 87-94.
22. Speyer, B.E., et al., *Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation*. *Human Reproduction*, 2010. **25(7)**: p. 1609-1618.
23. Sun, T.C., et al., *Sperm DNA fragmentation index, as measured by sperm chromatin dispersion, might not predict assisted reproductive outcome*. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2018. **57(4)**: p. 493-498.
24. Wang, M., et al., *Assessment of density gradient centrifugation (DGC) and sperm chromatin dispersion (SCD) measurements in couples with male factor infertility undergoing ICSI*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2014. **31(12)**: p. 1655-1663.
25. Xue, L.T., et al., *Effect of sperm DNA fragmentation on clinical outcomes for Chinese couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection*. *J Int Med Res*, 2016. **44(6)**: p. 1283-1291.
26. Frydman, N., et al., *Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation*. *Fertil Steril*, 2008. **89(1)**: p. 92-7.
27. Khalafalla, K., et al., *The effect of sperm DNA fragmentation on intracytoplasmic sperm injection outcome*. *Andrologia*, 2021. **53(10) (no pagination)**(e14180).
28. Liang, X., et al., *Female age affects the utility of sperm DNA fragmentation in predicting IVF and ICSI outcomes*. *Reproductive BioMedicine Online*, 2019. **39(6)**: p. 955-962.
29. Lin, M.H., et al., *Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates*. *Fertility and Sterility*, 2008. **90(2)**: p. 352-359.
30. Nicopoullou, J., et al., *Novel use of COMET parameters of sperm DNA damage may increase its utility to diagnose male infertility and predict live births following both IVF and ICSI*. *Hum Reprod*, 2019. **34(10)**: p. 1915-1923.
31. Virro, M.R., K.L. Larson-Cook, and D.P. Evenson, *Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles*. *Fertility and Sterility*, 2004. **81(5)**: p. 1289-1295.
32. Ribas-Maynou, J., et al., *Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2021. **96(4)**: p. 1284-1300.
33. Collins, J.A., K.T. Barnhart, and P.N. Schlegel, *Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?* *Fertility and Sterility*, 2008. **89(4)**: p. 823-831.
34. Cho, C.L. and A. Agarwal, *Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review*. *Arab Journal of Urology*, 2018. **16(1)**: p. 21-34.
35. Deng, C., et al., *Sperm DNA fragmentation index influences assisted reproductive technology outcome: A systematic review and meta-analysis combined with a retrospective cohort study*. *Andrologia*, 2019. **51(6) (no pagination)**(e13263).
36. Evenson, D. and R. Wixon, *Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay*. *Reproductive BioMedicine Online*, 2006. **12(4)**: p. 466-472.
37. Osman, A., et al., *The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis*. *Reprod Biomed Online*, 2015. **30(2)**: p. 120-7.
38. Zhao, J., et al., *Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis*. *Fertil Steril*, 2014. **102(4)**: p. 998-1005.e8.
39. Zhang, Z., et al., *Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis*. *J Assist Reprod Genet*, 2015. **32(1)**: p. 17-26.
40. Zini, A., *Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic?* *Syst Biol Reprod Med*, 2011. **57(1-2)**: p. 78-85.
41. Simon, L., et al., *A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome*. *Asian J Androl*, 2017. **19(1)**: p. 80-90.
42. Sugihara, A., et al., *The role of sperm DNA fragmentation testing in predicting intra-uterine insemination outcome: A systematic review and meta-analysis*. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2020. **244**: p. 8-15.

43. Chen, Q., et al., *The association between sperm DNA fragmentation and reproductive outcomes following intrauterine insemination, a meta analysis*. Reproductive Toxicology, 2019. **86**: p. 50-55.
44. Bungum, M., et al., *The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI*. Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1401-8.
45. Vandekerckhove, F.W., et al., *Sperm Chromatin Dispersion Test before Sperm Preparation Is Predictive of Clinical Pregnancy in Cases of Unexplained Infertility Treated with Intrauterine Insemination and Induction with Clomiphene Citrate*. Front Med (Lausanne), 2016. **3**: p. 63.
46. Bungum, M., et al., *Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome*. Human Reproduction, 2007. **22**(1): p. 174-179.
47. Boe-Hansen, G.B., et al., *The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic*. Human Reproduction, 2006. **21**(6): p. 1576-1582.
48. Depuydt, C., et al., *Negative impact of elevated dna fragmentation and human papillomavirus (Hpv) presence in sperm on the outcome of intra-uterine insemination (iui)*. Journal of Clinical Medicine, 2021. **10**(4): p. 1-14.
49. Rex, A.S., et al., *Implementation of an in-house flow cytometric analysis of DNA fragmentation in spermatozoa*. Asian Journal of Andrology, 2020. **22**(3): p. 246-251.
50. Rios, J.S., et al., *Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation: predictors, fertility outcomes, and assays among infertile males*. F S Rep, 2021. **2**(3): p. 282-288.
51. Siddhartha, N., et al., *The effect of sperm DNA fragmentation index on the outcome of intrauterine insemination and intracytoplasmic sperm injection*. Journal of Human Reproductive Sciences, 2019. **12**(3): p. 189-198.
52. Yang, H., et al., *The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle*. Translational Andrology and Urology, 2019. **8**(4): p. 356-365.
53. Rex, A.S., et al., *Dna fragmentation in human spermatozoa and pregnancy rates after intrauterine insemination. Should the dfi threshold be lowered?* Journal of Clinical Medicine, 2021. **10**(6): p. 1-13.

Har abstinensiden fra ejakulation hos mænd en betydning for DNA-fragmentering, graviditetschance og levendefødte børn?

Introduktion

I de nuværende retningslinjer anbefaler WHO en ejakulationsabstinensid (EA) på 2-7 dage i forbindelse med den diagnostiske sædanalyse. Flere nyere studier har fundet en sammenhæng mellem et lavere DNA-fragmenterings-index (DFI) og højere graviditetsrate ved kortere EA. Hypotesen er, at jo længere sædcellerne befinder sig i de reproduktive udførselsgange, jo mere øges risikoen for oxidativ stress, hvilket kan føre til højere DFI i sædcellerne. Ejakulationsabstinensiden er en noninvasiv og omkostningsfri faktor at ændre på. Det er derfor relevant at undersøge, om en kortere EA har en gavnlig effekt på fertilitet og sædkvalitet hos mænd, samt om det øger chancen for graviditet.

Metode

Vi ønskede at undersøge, om abstinensid fra ejakulation hos mænd har betydning for DNA-fragmentering, graviditetsrate og levendefødte børn. Der blev udformet følgende PICO til afgrænsning af spørgsmålet:

- Population (P): Mænd
- Intervention (I): Korte abstinensider siden sidste ejakulation
- Sammenligningsgrundlag (C): Lange abstinensider siden sidste ejakulation
- Outcome (O): Graviditet, levendefødte børn og DNA fragmentering

PubMed, Embase og Cochrane blev benyttet som databaser ved en søgning foretaget den 20/04-2022 med følgende søgestreng:

((male or paternal or man or oligospermia or Oligozoospermia or low sperm count or semen or sperm or Asthenospermia or Asthenozoospermia or Azoospermia or Teratozoospermia or Teratospermia or Spermatogenic dysfunction) and (ejaculation or ejaculatory) and

(abstinence or time or interval) and (pregnancy or pregnant or live birth or hCG or human chorionic gonadotropin or DNA fragmentation))

Denne søgning førte til 1027 artikler efter duplikater blev ekskluderet. Alle artikler blev screenet på titel og abstract, hvorefter 973 artikler blev ekskluderet grundet manglende opfyldelse af PICO. Det blev fulltext screenet 57 artikler, hvori 30 studier var relevante. Af disse var 4 studier systematiske reviews. Referencelisten på inkluderede artikler blev ligeledes screenet, hvor der blev fundet en yderligere nylig metaanalyse fra 2020. Efter gennemgang af de inkluderede studier i de systematiske reviews, blev det vurderet at de 2 nyeste systematiske reviews fra 2021 og 2017 samt metaanalysen var tilstrækkelige til at besvare vores PICO.

Gennemgang af evidensen

En metaanalyse fra 2020 med 4 inkluderede studier (n=2566) undersøger sammenhængen mellem abstinensetid og graviditetsrate efter behandling med IVF/ICSI, EA skelnes ved < 4 dage (n=1117) og > 4dage (n=828) [1]. I sammenligning med lang EA viste kort EA i forrest plot analysen at forbedre graviditetsraten signifikant med en odds ratio på 1.44 (95 %CI [1.17-1.78; p=.0006]. Studierne havde en acceptabel heterogenitet ($I^2=47\%$). (Evidensgrad 2a)

Et systematisk review fra 2021 med 24 inkluderede studier, undersøgte sammenhængen mellem EA og sædparametre som DFI og graviditetsrate [2]. Abstinensperioden blev inddelt i < 2 dage, 2-7 dage (efter WHO's rekommandationer) og > 7 dage. Ud af de 24 studier analyserede 16 DFI (n=4030) hos både raske donorer og patienter henvist til fertilitetsbehandling, 11 af studierne viste homogene resultater i form af en lavere DFI ved < 2 dages EA sammenlignet med 2-7 dage. Fem af studierne viste ingen sammenhæng mellem forskellige abstinensperioder og DFI.

Fem ud af de 24 studier i samme systematiske review rapporterede om kliniske udfald som graviditetsrate (2680 cyklus). To af studierne fandt en højere graviditetsrate ved 1 dages EA sammenlignet med 2-7 dage. To andre studier sammenlignede 2-7 dage med > 7 dage, i det ene studie fandt man højere graviditetsrate og live birth rate ved kort EA [3], mens man i det andet studie ingen sammenhæng fandt [4]. Ét studie viste en højere graviditetsrate ved < 4 dage sammenlignet med > 4 dages EA [5]. I et studie undersøgte de forbindelsen mellem IUI og abstinensetid (< 2 dage vs. 2-7 dage) og fandt ingen sammenhæng i chancen at blive gravid. [6]. Studiets begrænsninger er en betydelig heterogenitet mellem studierne, samt at nogle studier er retrospektive og små, hvilket øger risikoen for selektionsbias. (Evidensgrad 2a-)

I et andet systematisk review fra 2017 med 30 inkluderede studier undersøgte sammenhæng mellem abstinensetid og sædparametre [7]. Otte af artiklerne rapporterede om DFI (n=693), hvoraf halvdelen fandt en øget DFI ved en langvarig EA. To studier der ikke er inkluderet i det systematiske review fra 2021 rapporterer om graviditetsrate. Ét studie finder den højeste graviditetsrate ved < 3 dages EA og den laveste rate ved > 10 dages EA hos par i IUI behandling [8]. Et andet studie fandt højeste graviditetsrate ved < 2 dages EA, sammenlignet med 3-5 dage og > 5 dages EA [9]. (Evidensgrad 2a-)

Resume af evidensen (Evidensgrad 2)

Alle studier peger i en retning, der favoriserer kort abstinensetid sammenholdt med lang abstinensetid, når det kommer til DNA fragmentering og graviditetschance. Det er dog svært at drage nogen samlet konklusion på det optimale antal dage med abstinens fra ejakulation før aflevering af en sædprøve, da studierne på området anvender forskellige abstinensintervaller,

cut-off værdier for DFI, typer af assisteret reproduktionsteknologi og har forskellige populationer. Resultatet bør derfor fortolkes med forsigtighed. En kort abstinensperiode på < 1-2 dage kan nedsætte DNA-fragmenteringen i sædprøver. En kort abstinensperiode på < 2-4 dage i forbindelse med IUI-, ICSI- og IVF-behandlinger synes sandsynligvis at give højeste graviditetsrate, < 4 dage viste at forbedre graviditetsraten med odds ratio på 1.44 (95 %CI [1.17-1.78; p=.0006] sammenlignet med > 4 dages abstinensperiode.

Kliniske rekommandationer (Styrkegradering B)

- Hos mænd i fertilitetsbehandling skønnes en kort abstinensperiode på < 1-2 dage at reducere DNA-fragmentering.
- Hos mænd i fertilitetsbehandling, enten med IUI, IVF eller ICSI skønnes en kort abstinensperiode på < 2-4 dage at øge graviditetschancen.

1. Li J, Shi Q, Li X, Guo J, Zhang L, Quan Y, et al. The Effect of Male Sexual Abstinence Periods on the Clinical Outcomes of Fresh Embryo Transfer Cycles Following Assisted Reproductive Technology: A Meta-Analysis. *Am J Mens Health*. 2020 Jul 1;14(4).
2. Sokol P, Drakopoulos P, Polyzos NP. The effect of ejaculatory abstinence interval on sperm parameters and clinical outcome of art. A systematic review of the literature. Vol. 10, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2021.
3. Periyasamy AJ, Mahasampath G, Karthikeyan M, Mangalaraj AM, Kunjummen AT, Kamath MS. Does duration of abstinence affect the live-birth rate after assisted reproductive technology? A retrospective analysis of 1,030 cycles. *Fertil Steril*. 2017 Dec 1;108(6):988–92.
4. Lee JW, Cha JH, Shin SH, Cha HJ, Kim JH, Park CK, et al. Effect of the sexual abstinence period recommended by the World Health Organization on clinical outcomes of fresh embryo transfer cycles with normal ovarian response after intracytoplasmic sperm injection. *Andrologia*. 2018 May 1;50(4).
5. Borges E, Braga DPAF, Zanetti BF, Iaconelli A, Setti AS. Revisiting the impact of ejaculatory abstinence on semen quality and intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Andrology*. 2019 Mar 1;7(2):213–9.
6. Kabukçu C, Çil N, Çabuş Ü, Alataş E. Effect of ejaculatory abstinence period on sperm DNA fragmentation and pregnancy outcome of intrauterine insemination cycles: A prospective randomized study. *Arch Gynecol Obstet*. 2021 Jan 1;303(1):269–78.
7. Ayad BM, van der Horst G, du Plessis SS. Revisiting the relationship between the ejaculatory abstinence period and semen characteristics. Vol. 11, *International Journal of Fertility and Sterility*. Royan Institute (ACECR); 2018. p. 238–46.
8. Jurema MW, Vieira AD, Bankowski B, Petrella C, Zhao Y, Wallach E, et al. Effect of ejaculatory abstinence period on the pregnancy rate after intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2005 Sep;84(3):678–81.
9. Marshburn PB, Alanis M, Matthews ML, Usadi R, Papadakis MH, Kullstam S, et al. A short period of ejaculatory abstinence before intrauterine insemination is associated with higher pregnancy rates. *Fertil Steril*. 2010 Jan 1;93(1):286–8.

Hormonanalyser

Der bør foretages hormonanalyser som led i udredningen af mandlig infertilitet dels for at belyse årsagsfaktorer dels for at diagnosticere en eventuel hormonal årsag til den nedsatte sædkvalitet. Spermatogenesis vurderes ud fra FSH og inhibin B, mens Leydigcelle-funktionen vurderes ud fra LH, testosteron, SHBG, og frit androgen index (eller frit testosteron).

Et *lavt inhibin B niveau* indikerer oftest Sertoli celledysfunktion og dermed en defekt spermatogenese. Således vil mænd med *azoospermi* pga. manglende sædcelleproduktion have meget lave eller umålelige inhibin B-værdier ledsaget af kraftigt forhøjede FSH- værdier, som det f.eks. ses hos patienter med *Klinefelter syndrom*. Sandsynligheden for at udhente testikulære sædceller falder med aftagende inhibin B [60] (*evidensniveau 3*)

Normale værdier af FSH og Inhibin B hos en patient med azoospermi tyder derimod på normal spermatogenese med obstruktion af de fraførende sædveje som årsag til manglende sædceller i ejakulatet.

Hos mænd med *spermatogenic arrest* (modningsstop i spermatogenesisen) kan der forekomme normale FSH- og inhibin B-værdier (Tabel 4). Kombinationen af både Inhibin B og FSH har vist sig at give en bedre diagnostisk styrke, end hvis de bruges hver for sig [61](*evidensniveau 2a*).

Mænd med infertilitet har som gruppe betragtet tendens til lavere testosteron (og højere LH) end en fertil kontrolgruppe, omend størsteparten af mænd med nedsat sædkvalitet har testosteron- og LH-værdier indenfor normalområdet [62] (Evidens 3).

Umålelige FSH- og LH-værdier ses hos patienter med primær hypofysær eller hypothalamisk hypogonadisme samt hos patienter med HCG-producerende testistumor men ses også hos patienter med aktuelt eller tidligere *misbrug af anabole steroider*, som kan medføre både lave, normale eller forhøjede testosteronniveauer. Misbrug af anabole steroider vil ofte afstedkomme nedsat eller ophævet fertilitet, ligesom nedsat testikelstørrelse og gynækomasti kan ses ved længerevarende misbrug [63]

Ved hypogonadotrop hypogonadisme bør patienten henvises til specialafdeling med henblik på MR-skanning af hypofyse/hypothalamus til udelukkelse af tumor samt udredning på de øvrige hypofysehormonakser. Der bør endvidere bestemmes se-ferritin samt se-transferrin til udelukkelse af hæmokromatose. Ved partiel hypogonadotrop hypogonadisme bør der bestemmes prolaktin-niveau, idet hyperprolaktinæmi supprimerer gonadotropinerne. I en undersøgelse fandt man ingen forskel på TSH, frit thyroxin og thyroidea peroxidase antistoffer ved sammenligning af 253 mænd med nedsat sædkvalitet og 19 kontrolpersoner[64], og forfatterne konkluderer derfor, at der ikke er indikation for *rutinemæssig screening* for thyroidealidelser hos subfertile mænd (*evidensniveau 4*).

Thyreoideaprøver (TSH, T4 og frit T4) er derimod indiceret i følgende situationer:

- a) Manglende forhøjelse af FSH trods nedsat inhibin B.
- b) Manglende stigning af LH trods nedsat testosteron
- c) Nedsat SHBG
- d) Klinisk mistanke om myxødem

Tabel 4: Tolkning af kønshormoner ved ændret spermatogenese og obstruktion

	FSH	Inhibin B	Spermatozo koncentration
Normal sædcellekonzentration	N	N	≥ 15 mill/ml
Obstruktion	N	N	0
Nedsat spermatogenese	↑	↓	< 15mill/ml
Spermatogenic arrest	N eller ↑	N eller ↓	0-få mill/ml

Ultralydsscanning af scrotum anbefales hos mænd med azoospermi eller svær oligozoospermi med < 1 mill/ml, eller hvor sædkvaliteten er markant faldende samt hos mænd med anamnese med tidligere retentio testis eller testisatrofi.

Formålet med ultralydskanningen er dels at vurdere strukturen af testisparenchymet dels at få et mål for testis' størrelse samt at undersøge eventuelle forandringer i epididymis

Ultralydskanningen bør foretages med en lineær eller mekanisk sektor probe med frekvens på 7,5 mHz eller større og foretages af personer med særlig oplæring heri.

Med henblik på carcinoma in situ-diagnostik vurderes testisparenkymets struktur, og der gives et *score* fra 1-5 afhængig af regelmæssigheden, hvor 1 er det helt regelmæssige mønster, 2-3 stigende grader af uregelmæssighed, 4 ses ved meget uregelmæssigt mønster eventuelt med såkaldt mikrolithiasis (> 5 små hyperekkogene foci pr skanningsfelt) og 5 repræsenterer en testistumor [65].

Den prædiktive værdi af score 4 for CIS er i to prospektivt kontrollerede studier af henholdsvis 192 mænd med retentio testis og 78 mænd med kontralateral testikelcancer fundet til 18,2 % [66] (evidensgrad 3) og 22, 2 % [67] (*evidensniveau 3*). I en tilsvarende prospektiv undersøgelse blandt 95 infertile mænd fandtes ved scanning af 190 testes, 53 testes med score 4, men ingen havde CIS[65].

Lavere score end 4 udelukker ikke CIS [68,69] (*evidensniveau 4*). Betydningen af *mikrolithiasis* er uafklaret, idet det også ses hos asymptomatiske mænd. I reviews er der fundet en prævalens af mikrolithiasis på 0,6-9,0 % afhængig af population og studiedesign [70,71] (Evidens 3). Hos mænd med azoospermi fandtes >7 små hyperekkogene foci hos 13,4 %, og specielt hos mænd med Klinefelter's syndrom eller tidligere kryptorchisme fandtes små hyperekkogene foci [72] (*evidensniveau 2a*).

Blandt mænd med anamnese med retentio testis og >5 små hyperekkogene foci udviklede 10 % c. testis inden for 8 år [73] (*evidensniveau 4*). Endvidere synes risikoen for CIS at være forøget, hvis der findes > 5 hyperekkogene foci i en atrofisk testikel [74] (*evidensniveau 2a*).

Transrektal ultralydsscanning af sædvejene (TRUS) er indiceret hos mænd med lavt sædvolumen (ca < 1 ml) eller stærkt vekslende sædkvalitet. Skanningen foretages af personer med særlig erfaring heri. Der anvendes en endoskopisk probe, f.eks vaginal probe med frekvens på 7,5 mHz eller større.

Ved skanningen visualiseres de øvre sædveje, vesiculae seminales samt prostata og eventuelle kongenitte misdannelser (fx. agenesi af vesiculae seminales) eller obstruktioner. En cyste i prostata kan være et tilfældigt fund, men betydende prostatacyste kan give anledning til partiel/komplet obstruktion og kan ses hos mænd med vekslende og lavt sædvolumen, lavt pH og fruktose i sædvæsken [75](*evidensniveau 3*).

Genetiske undersøgelser

Karyotype

Genetiske afvigelser er hyppige årsager til svært nedsat sædkvalitet. Udredning er nødvendig for at man kan påvise mulige aneuploidier (numeriske kromosom-afvigelser) og strukturelle kromosomafvigelser samt give parret rådgivning med hensyn til risiko for genetisk betinget nedsat sædkvalitet hos potentielle drengebørn og sikre, at børnene ikke har en øget risiko for udvikling af cystisk fibrose. En genetisk forklaring udelukker dog ikke, at fertilitetsbehandling kan gennemføres. Azoospermi kan forklares genetisk i op til 25-30 % af tilfældene [76,77] (*Evidensniveau 2a*). Karyotype-analyse anbefales hos mænd med non-obstruktiv azoospermi eller svær oligozoospermi med < 1 mill/ml. Hyppigheden af abnorm karyotype hos mænd med oligozoospermi i flere studier er fundet at ligge på 5-7 % svarende til en frekvens, der er 10 gange højere end i den normale population [78-80]. Såvel aneuploidier som strukturelle kromosomafvigelser er væsentligt forøget blandt mænd med svært nedsat sædkvalitet [81,82] (*evidensniveau 2a*).

Den hyppigste numeriske kromosomafvigelse, *Klinefelters syndrom* (47, XXY) ses især hos mænd med azoospermi og små testikler. Hos mænd med oligozoospermi er Klinefelters syndrom sjældent, medmindre der er tale om en mosaik [83,84] (*Evidens 1a/3*). Klinefelters syndrom er blevet estimeret at forekomme hos ca. 1:667 mænd i Danmark, men kun ca. ¼ af disse diagnosticeres [85]. Udover numeriske kromosomafvigelser er strukturelle kromosomafvigelser i form af translokationer hyppige årsager til til oligozoospermi. Karyotypebestemmelse kan også være indiceret i tilfælde af manglende fertilisation ved IVF, men en mere detaljeret redegørelse herfor ligger uden for denne guidelines rammer.

Y kromosom mikrodeletioner

En Y-kromosom deletion kan enten påvises ved almindelig karyotype undersøgelse (strukturel kromosomafvigelse) eller ved DNA-undersøgelse. Små deletioner, der kun kan påvises ved DNA-undersøgelse, betegnes Y kromosom mikrodeletioner.

Simoni et al. [86] fandt ved opgørelse af den samlede relevante litteratur *Y kromosom mikrodeletioner* hos 125 af i alt 1897 mænd med svært nedsat sædkvalitet (~6,6%) (*evidensniveau 1b*). Heraf havde ⅓ -½ af mændene azoospermi. Til sammenligning havde man i studierne kun fundet *Y kromosom mikrodeletioner* hos fire af 1097 normale, fertile mænd (~0,4 %). De fleste *Y kromosom mikrodeletioner* findes i AZFc-regionen. Mænd med deletioner svarende til de mest proximale områder (AZFa og/eller AZFb) har sædvanligvis azoospermi [86]. Internationale arbejdsgrupper anbefaler ofte Y-mikrodeletions diagnostik ved svær oligozoospermi med < 5 mio/ml spermatozoer i råsæd [86]. Erfaringsmæssigt er Y-mikrodeletioner dog sjældne, hvis der er ≥ 1 mio/ml spermatozoer i råsæd, hvorfor Y-mikrodeletions diagnostik kan begrænses til denne patientgruppe (*evidensniveau 4*). Andre foretrækker – af praktiske grunde – at foretage Y-mikrodeletions diagnostik, når der er indikation for ICSI pga. azoospermi eller svær oligozoospermi. Y deletioner (herunder

mikrodeletioner) videregives fra far til søn [87], og en af konsekvenserne ved at påvise en Y-deletion er derfor i nogle tilfælde, at parrene vælger behandling med donorsæd.

CFTR genmutationer

Obstruktion af sædvejene er heller ikke sjældent genetisk betinget. Mænd, der er heterozygote for en *cystisk fibrose (CFTR-) mutation* har således ofte komplet eller partiel agenesi af *vas deferens* og *vesiculae seminales*.

Det anbefales derfor, at mænd med obstruktiv azoospermi (eller mistanke herom) undersøges for de hyppigst forekommende CFTR genmutationer. Sandsynligheden for at påvise en CFTR mutation er speciel stor, hvis *vas deferens* ikke kan palperes ved objektiv undersøgelse. Påvisning af CFTR genmutation hos manden nødvendiggør, at også kvinden undersøges for de hyppigst forekommende CFTR mutationer [88,89] (*evidensniveau 2a/2a*). CFTR mutationer kan påvises hos 3-4 % af den danske befolkning og hos ca. 11 % mænd med azoospermi [90] (*evidensniveau 3*), og hvis begge forældre er heterozygote for en CFTR mutation, er der omkring 25 % risiko for, at et barn vil få cystisk fibrose (medmindre behandlingen kombineres med præimplantations- eller prænatal diagnostik). Der findes en lang række forskellige CFTR genmutationer. Hyppigheden af disse udviser stor geografisk variation, hvorfor man må være opmærksomme på patienternes etnicitet ved CFTR-diagnostik.

Testisbiopsi

Testisbiopsi med henblik på diagnosticering af eventuel carcinoma in situ testis bør foretages hvis der ved ultralydskanning er påvist score 3 eller 4 hos mænd med svær oligozoospermi eller azoospermi og prædisponerende faktor som f.eks. testisatrofi eller en anamnese med testis retention (*evidensniveau 4*)

Ved azoospermi hos en ikke-vasektomeret mand tilrådes det at foretage diagnostisk testisbiopsi eller TESA for at vurdere spermatogenesisen, hvis man planlægger at udføre ICSI med spermatozoer udhentet fra testis.

Behandling af mandlig infertilitet

Behandling af mandlig infertilitet vil blive beskrevet i 5 underafsnit:

- 1.) Eliminering af miljø- og livstilsfaktorer
- 2.) Medicinsk behandling
- 3.) Behandling ved ejakulatorisk dysfunktion
- 4.) Kirurgisk behandling af varicocele
- 5.) Behandling af obstruktiv azoospermi
- 6.) Behandling af non-obstruktiv azoospermi

Eliminering af miljø-og livsstilsfaktorer

Det er hensigtsmæssigt at manden behandles så kausalt som muligt, hvilket indebærer at man primært bør eliminere medicinske og miljø-og livsstilmæssige årsager til infertilitet (se ovenfor).

Medicinsk behandling af mandlig infertilitet

Resume af kliniske rekommandationer

Mænd med hypogonadotrop hypogonadisme kan behandles med gonadotropiner til stimulation af spermatogenesisen med god effekt på fertiliteten. Denne behandling bør foregå på specialafdelinger eller af speciallæger med særlig erfaring heri.	B
Det kan ikke anbefales, at behandle mænd med idiopatisk infertilitet med gonadotropiner, cabergolin, bromocriptin eller anti-østrogener, da der ikke er dokumenteret positiv effekt på fertiliteten	A
Glucocorticoider kan ikke anbefales ved spermatozoantistoffer	A
Antibiotisk behandling ved leukocytospermi uden ledsagende infektion kan ikke anbefales, da der ikke er påvist effekt på fertiliteten	A
Behandling med antioxidanter ved idiopatisk mandlig infertilitet er fortsat ikke tilstrækkelig dokumenteret.	D

Hypogonadotrop hypogonadisme

Mænd med primær eller sekundær hypogonadotrop hypogonadisme kan behandles med *gonadotropiner* til stimulation af spermatogenese og opnåelse af fertilitet. Behandlingen kan gives som HCG injektioner alene (1500-3000 IU s.c eller i.m. 2-3 gange ugentligt) afhængig af serum testosteron niveau, men ofte må behandlingen specielt ved primær hypogonadotrop hypogonadisme suppleres med HMG eller FSH injektioner (75-200 IU s.c. eller i.m. 3 gange ugentligt) [91-94] (Evidens 2b). Ved denne behandling er i mindre serier beskrevet henholdsvis spermatogenese hos 80 % (60 mænd) [94] og fertilitet hos 92 % (21 mænd) [92]. Blandt fertile opnåedes graviditet hos 16 % ved spermatozokonzentration under 1 mill/ml [92]. Hos mænd med tidligere uni- eller bilateral kryptorkisme blev significant færre fertile [91] (Evidens 2b).

Mænd med primær hypogonadotrop hypogonadisme kan også behandles med *pulsatil GnRH* til stimulation af spermatogenesisen og opnåelse af fertilitet. Begge behandlingsprincipper er formentlig lige effektive [95-97] (Evidens 2b), men spermatogenese opnås hurtigst med pulsatil GnRH behandling (12 vs. 20 mdr) [96] (Evidens 2b). GnRH kan gives s.c. eller i.v. i doser fra 2-20 ug hver 90-120. min afhængig af serum testosteron og klinisk respons [95-98] (Evidens 2b). Spermatogenese opnås hos 40-87 % af patienterne [95-97]. Efter induktion af spermatogenese kan den vedligeholdes med HCG alene [98]. De fleste graviditeter forekommer ved selv lave spermatozokonzentrationer [92,97] (Evidens 2b). Pulsatil GnRH

behandling kan også stimulere spermatogenesisen hos de fleste patienter med primær hypogonadotrop hypogonadisme og ledsagende uni-eller bilateral kryptorkisme efter orchiopexi [97] (Evidens 2b).

Ved hypogonadotrop hypogonadisme sekundært til hyperprolactinæmi opnås bedring i sædkvaliteten allerede efter 2 måneders behandling med cabergolin og efter 6 måneders behandling med bromocriptin [99,100], men normal sædkvalitet opnås først efter 12-24 måneders behandling [101] (Evidens 2a).

I et tidligere Cochrane review fra 1996 fandtes ingen evidens for at behandling med bromocriptin har effekt ved nedsat sædkvalitet uden ledsagende hyperprolactinæmi.

Empirisk hormonbehandling ved idiopatisk mandlig infertilitet

Gonadotropiner

To tidligere randomiserede placebokontrollerede undersøgelser fandt ingen signifikant effekt af gonadotropinbehandling på graviditetsrater ved idiopatisk mandlig infertilitet [102,103] (Evidens 1b). I en nyere prospektiv randomiseret undersøgelse fandtes at FSH behandling (100 IU i.m. hver 2. dag) i 3 måneder signifikant øgede spermatozo-koncentrationen hos en gruppe meget selekterede mænd med idiopatisk infertilitet [104] (Evidens 1b). Der var ingen spontane graviditeter i de tre måneder behandlingen varede, men i de følgende 3 måneder fandtes 16.7 % spontane graviditeter mod 3.1 % og 4.1 % i to patient kontrolgrupper. Ved efterfølgende fertilitetsbehandling var det hos disse selekterede par muligt at anvende IUI-H frem for ICSI.

Androgener

I en metaanalyse af 10 randomiserede kontrollerede studier fandtes ingen signifikant forbedring af graviditetsrater ved behandling af idiopatisk mandlig infertilitet (Odds ratio 1.07; 95 % CI 0.75-1.53) [105] (Evidens 1a).

Østrogen blokerende behandling

Østrogenblokada på receptor niveau (anti-østrogener) eller som aromatasehæmmer øger den endogene gonadotropin produktion. En metaanalyse af 10 randomiserede kontrollerede undersøgelser af antiøstrogenbehandling med clomifen citrat (6) og tamoxifen (4) fandt ingen signifikant effekt på graviditetsrater ved behandling af idiopatsik mandlig unfertilitet (Odds ratio 1,54; 95 % CI 0.99-2.40) om end der var en moderat forbedring af spermatozokoncentration og -motilitet [105] (Evidens 1a). I en ukontrolleret undersøgelse af 140 subfertile mænd med nedsat testosteron-østrogen ratio fandtes en signifikant stigning i spermatozokoncentration, -motilitet og -morfologi ved behandling med aromatasehæmmere (testolacton/anastrozol) [106] (Evidens 2a).

Kombineret androgen- og anti-østrogen behandling

I en placebokontrolleret randomiseret undersøgelse af 212 mænd med idiopatisk infertilitet, der blev behandlet med tamoxifen (20 mg dgl) og testosteronundecanoat (120 mg dgl) i 6 måneder, fandtes en signifikant bedring i spermatozokoncentration, -motilitet og -morfologi samt en signifikant højere forekomst af spontane graviditeter (Odds ratio 3.2; 95 % CI 2.6-3.8) [107] (Evidens 1b).

Anti-oxidanter

Har behandling med antioxidanter en betydning for sædkvaliteten, graviditetschance og levendefødte børn?

Introduktion

Oxidativt stress menes at spille en rolle for nedsat spermatozofunktion, og behandling med antioxidanter har i tidligere undersøgelser påvist en positiv effekt på sædparametre. Flere nye studier har fundet sammenhæng mellem behandling med antioxidanter og reduktion af spermatozo DNA fragmentering, samt øget graviditetsrate. Der er dog en stor variation i typen af antioxidanter, behandlingens længde, og kombinationen af de forskellige antioxidanter, som blev analyseret i studierne.

Metode

Vi ønsker undersøge om behandling med antioxidanter har en betydning for sædkvalitet, DNA fragmentering, klinisk graviditetsrate og levendefødte børn.

- Population (P): Mænd
- Intervention (I): Behandling med antioxidanter
- Sammenligningsgrundlag (C) : placebo eller ingen behandling
- Outcome (O): sædparametre, klinisk graviditet, levendefødte børn, DNA fragmentering.

PubMed database søgning

Søgningen førte til 755 artikler. Metaanalyser, reviews, systemiske reviews og publikationer på engelsk blev inkluderet til videre screening. 166 artikler blev screenet på titel og abstrakt, hvorefter 32 studier blev full- tekst screenet. 20 artikler var relevante at besvare PICO spørgsmål. Referencelisten på relevante artikler blev ligeledes screenet. Det blev vurderet at 4 metaanalyser fra 2022 er relevante for at besvare vores PICO.

Gennemgang af evidensen

Den nyeste Cochrane review fra 2022 [1] baseret på 90 inkluderede studier (n=10.303 mænd) undersøgte sammenhængen mellem behandling med antioxidanter og graviditetsrate. Ved 20 studier (n=1706 mænd) fandt de lav evidens for at behandling med antioxidanter kan føre til øgede kliniske graviditetsrater (OR 1,89, 95 % CI [1.45-2.47: p < 0,00001], I² = 3 %). Tolv mindre eller mellemstore studier (n=1283 mænd) fandt meget lav evidens for at antioxidanter øger chancen for antallet af levendefødte børn (OR 1.43, 95 % CI [1.07-1.91: p=.02], I² = 44 %) hos subfertile par, hvor manden indtog forskellige antioxidanter under fertilitetsbehandling. Studiet kunne ikke konkludere om antioxidanter har effekt på sædparametre og DNA fragmentering på grund af høj heterogenitet (Evidens 1a).

En anden metaanalyse fra 2022 [2] baseret på 45 randomiserede, kontrollerede undersøgelser finder meget lav evidens for at antioxidanter øger chancen for antallet af levendefødte børn (OR 1.21, 95 % CI [0.53- 2.76] n=388, p=0,64), moderat evidens for øgning af spermatozokonzentration (mean difference 5.93 mil/mL. 95 % CI [4.43-7.43] n=4310, p<0.01; I²=94 %), progressive sæd motilitet (mean difference 7.21 %, 95 % CI [3.66-10.76] n=2345, p<0.01; I²=99 %), total sperm motilitet (mean difference 7.52 %, 95 % CI [3.11- 11.94] n=4452, p<0.01; I²=100 %) og lav evidens for sæd morfologi (mean difference 3.28 %, 95 % CI [2.40- 4.17] n=1828, p<0.01; I²=96 %). Der er også fundet meget lav evidens for at der er sammenhæng mellem antioxidanter og sæd DNA fragmentering (standardized mean difference (SMD) -0.63, 95 % CI [-2.29, 1.02] n=135, p=0.45). Begrænsning af denne metaanalyse er lav antallet af godt designet kontrolleret studier og ret høj heterogenitet (Evidens 2a).

Den tredje metaanalyse [3] baseret på 11 studier (n=832 mænd) undersøgte sammenhæng mellem vitamin E, vit C og sædparametre samt graviditetsrate. Graviditetsraten var tydeligvis bedre i vitamin E gruppen end i kontrolgruppen (RR 1,86, 95 % CI [1,02-3,41]). Vit E og vit C grupperne havde markant forbedret progressiv motilitet (SMD 0,38, 95 % CI [0,22-0,55]), sæd koncentration (SMD 0,21, 95 % CI [0,09-0,34]), sæd morfologi (SMD 0,32, 95 % CI [0,09-0,55]) og total antallet af sædceller (SMD 0,28, 95 % CI [0,12-0,43]) (Evidens 2a). Den sidste metaanalyse [4] med 20 inkluderede studier undersøgte effekten af carnitin, Q10 og selen på graviditet og sædparametre hos par med mandlig infertilitet. Graviditetsraten i behandlingsgruppen (69/426, 16,2 %) var ikke forskellig fra placebo (45/401, 11,2 %) (p = 0,05). Behandlingsgruppen viste højere motilitet (mean difference 5,05, 95 % CI [2,77- 7,34] p = <.0001), progressiv motilitet (mean difference 5,72, 95 % CI [2,77-8,66], p = 0,0001), sæd koncentration [mean difference 6,58, 95 % CI [3,22, 9,93], p = 0,0001) end placebo (Evidens 2a).

Resume af evidensen (2)

Studierne peger i den retning, at behandling med antioxidanter har en vis effekt på sædparametre og eventuelt på sæd DNA fragmentering men lav eller meget lav evidens for øgning af klinisk graviditetsrate og levendefødte børn hos de par, hvor manden indtog antioxidanter.

Kliniske rekommandationer (B)

- Hos mænd i fertilitetsbehandling skønnes antioxidanter at forbedre sædparametre og eventuelt DNA fragmentering.
- Der er påvist meget lav og lav evidens af effekt af antioxidanter på antallet af levendefødte børn og klinisk graviditetsrate.

1. de Ligny W, Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Jordan V, Fleischer K, de Bruin JP, Showell MG. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2022;5(5):CD007411.

2. Agarwal A, Cannarella R, Saleh R, Hazzam AM, Kandil H, Salvio G, Boitrelle F, Kuroda S, Farkouh A, Rambhatla A, Zini A, Colpi G, Gül M, Kavoussi P, Hamoda TAA, Ko E, Calik G, Toprak T, Pinggera GM, Park HJ, Ghayda RA, Minhas S, Busetto GM, Bakırcıoğlu ME, Kadioglu A, Chung E, Russo GI, Calogero AE, Ambar RF, Jayasena CN, Shah R. Impact of Antioxidant Therapy on Natural Pregnancy Outcomes and Semen Parameters in Infertile Men: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials *World J Mens Health* . 2022 Sep 7. Online ahead of print

3. Zhou X, Shi H, Zhu S, Wang H, Sun S. Effects of vitamin E and vitamin C on male infertility: a meta-analysis. *Int Urol Nephrol.* 2022 Aug;54(8):1793-1805.

4. Sharma AP, Sharma G, Kumar R. Systematic Review and Meta-analysis on Effect of Carnitine, Coenzyme Q10 and Selenium on Pregnancy and Semen Parameters in Couples With Idiopathic Male Infertility. *Urology.* 2022 Mar;161:4-11

Mindre undersøgelser har desuden vist en mulig positiv effekt af behandling med planteekstrakter som *granatæble* og *galangarod* [116] på visse sædparametre, men der er ikke oplysninger om graviditetsrater. Sammenfattende mangler der fortsat dokumentation for disse behandlings effekt.

Glucocorticoid behandling ved anti-spermatozo autoantistoffer

Behandling af immunologisk infertilitet i form af spermatozoantistoffer med glucocorticoider er beskrevet i flere undersøgelser. I British Fertility Guideline er beskrevet fem små placebo-

kontrollerede randomiserede undersøgelser. Tre af disse fandt ingen effekt af glucocorticoid-behandling på graviditetsrater. I en af undersøgelserne fandtes signifikant effekt (27 % vs. 7 % graviditetsrate) efter prednisolonbehandling versus placebo, og i en anden undersøgelse en graviditetsrate på 18 % vs 3 % efter prednisolonbehandling vs. ingen behandling (Evidens 1b). Behandling med glucocorticoider har imidlertid hyppige og svære bivirkninger (Britisk guideline) (Evidens 3) og kan ikke anbefales. Førstevalgsbehandling ved svær immunologisk infertilitet er ICSI, hvorved opnås stort set samme graviditetsrater som ved ikke-immunologisk infertilitet, men formentlig en lidt højere frekvens af 1. trimester aborter [128] (Evidens 3).

Antibiotisk behandling ved leukocytospermi

Antibiotisk behandling af leukocytospermi uden ledsagende påvist infektion har været forsøgt i flere randomiserede kontrollerede undersøgelser med meget varierende resultat, og de fleste undersøgelser indeholder ikke oplysninger om graviditetsrater. I en placebokontrolleret undersøgelse fandtes ingen signifikant effekt på sædparametre eller graviditetsrater, hvorimod en anden placebokontrolleret undersøgelse fandt signifikant flere graviditeter efter antibiotikabehandling (Britisk guideline) (Evidens 1b).

Der er således ingen holdepunkter for at antibiotika behandling ved isoleret leukocytospermi forbedrer graviditetschancen. Såfremt der påvises en infektion ved dyrkning eller PCR skal denne behandles.

Har D-vitamintilskud gavnlig effekt på fertilitet og sædkvalitet hos mænd med nedsat sædkvalitet og påvist D-vitaminmangel?

Population

Mænd i fertilitetsbehandling med nedsat sædkvalitet* samt påvist for lavt D-vitaminiveau målt ved blodprøve**

Intervention

Peroralt D-vitamintilskud

Comparison

Intet D-vitamintilskud

Outcomes

Levende fødselsrate (Live birth rate)

Klinisk graviditetsrate (Clinical pregnancy rate) (igangværende graviditet med ultrasonisk påvist levende foster)

Implantationsrate (biokemisk graviditet)

Tid til graviditet (Time to pregnancy)

Total antal spermatozoer i sædprøve

Spermatozokoncentration i sædprøve

Motilitet (% motile spermatozoer, % progressivt motile spermatozoer)

Normal morfologi (% af spermatozoer med normal morfologi)

* Iht. WHO Reference Limits for Human Semen Characteristics

** D-vitamin > 50 nmol/L = normal; 25 – 50 nmol/L = D-vitamininsufficiens; < 25 nmol/L = D-vitaminmangel

Baggrund

Resultater fra dyreforsøg og observationelle, humane studier har vist mulige gavnlige effekter af D-vitamin tilskud på mandlig fertilitet [1,2,3,4,]. D-vitamin optages gennem kosten og dannes i huden ved eksposition for sollys. Det er velkendt, at D-vitamininsufficiens/mangel er relativt hyppigt forekommende i Danmark. Derfor vurderer guidelinegruppen, at det er relevant at undersøge om behandling med D-vitamin har gavnlig effekt på fertilitet og sædkvalitet hos mænd i fertilitetsbehandling med påvist nedsat sædkvalitet og D-vitamininsufficiens/mangel.

Søgning

Der blev søgt efter litteratur i følgende databaser: Medline/Pubmed, Embase, Cochrane Library. Søgeperiode XX til XX. Kun engelsksprogede artikler blev inkluderet.

Søgeord/Mesh terms: male infertility, subfertility, fertility, male factor, andrological factor, human semen analysis, semen analysis, semen quality, aspermia, azoospermia, oligozoospermia, teratozoospermia, asthenozoospermia, vitamin D, D3 vitamin, cholecalciferol, 25 cholecalciferol, ergocalciferol, therapy, treatment

Litteratur

I vores primære søgning fandt vi 31 publikationer, heraf en RCT [5]. Resten var oversigtsartikler eller observationelle studier uden direkte sammenligning af behandlet og ikke-behandlet D-vitamininsufficiens/mangel. En supplerende søgning ved hjælp af gennemgang af referencer i de fundne oversigtsartikler identificerede yderligere en publikation [6]. Det drejede sig om et kinesisk, prospektivt, ikke-randomiseret studie med 86 infertile mænd med sammenligning af 3 måneders D-vitamin + kalktilskud med 3 måneders C-vitamin + E-vitamin tilskud. Studiet blev ekskluderet i vores guideline pga. begrænsninger i form af manglende randomisering og ikke-sammenlignelig population, da mændene ikke havde fået påvist D-vitamin-insufficiens/mangel og da der ikke var nogen kontrolgruppe uden D-vitamin tilskud. Ydermere er artiklen publiceret på kinesisk, og der er kun engelsk abstract tilgængeligt.

Evidensgrundlaget er således begrænset til en RCT [5].

Gennemgang af evidensen

Det inkluderede forsøg er et dansk randomiseret, klinisk forsøg [5]. Populationen var infertile mænd med nedsat sædkvalitet bedømt ud fra WHO-kriterierne og i fertilitetsbehandling med partner. Alle mænd var henvist til andrologisk vurdering på Afdeling for Vækst og Reproduktion på Rigshospitalet. Alle patienter blev udredt med to sædprøver og blodprøver til karyotypebestemmelse og Y-kromosommikrodeletioner, samt ioniseret calcium, D-vitamin, testosteron, østradiol, SHBG, LH, FSH og Inhibin B. Derudover blev foretaget almindelig anamnese og objektiv undersøgelse inkl. ultralydsundersøgelse af testiklerne. Inklusionskriterier var nedsat sædkvalitet og D-vitamininsufficiens/mangel (D-vitamin < 50 nmol/L) og ingen alvorlig komorbiditet. Patienterne blev randomiseret til behandling i 5 måneder med D-vitamin eller placebo. Behandlere og patienter var blindede. Patienterne i behandlingsarmen fik daglig behandling med tablet D-vitamin 35 mikrogram og calcium 500 mg. Patienter i placeboarmen fik placebotablet dagligt. 164 mænd blev inkluderet i behandlings- og 166 i placeboarmen. Der var ingen forskelle i baselinekarakteristika mellem grupperne. Primære outcomes var sædkvalitet vurderet iht. WHO-kriterierne. Sekundære outcomes var live birth rates, Inhibin B- og FSH-niveau.

Der var en ligelig fordeling af patienter, som var *lost to follow-up* mellem grupperne.

Man fandt ingen forskel i sædkvalitet mellem grupperne. Man fandt heller ingen signifikant forskel i live birth rate mellem grupperne. Der var dog en tendens til øget live birth rate efter spontan graviditet hos de par, hvor manden fik D-vitamintilskud med 8 ud af 109 patienter (7,3 %) sammenlignet med 3 ud af 126 patienter (2,4 %), dog ikke statistisk signifikant. I en subanalyse af mænd med oligozoospermi fandt man øget live birth rate i gruppen med D-vitamintilskud hos 21 ud af 59 patienter (35,6 %) sammenlignet med 11 ud af 60 patienter (18,3 %) i placebogruppen ($p = 0,034$).

Kvaliteten af evidensen er moderat men begrænset til en enkelt RCT, og resultatet bør derfor fortolkes med forsigtighed.

Andre overvejelser

Udover mulige gavnlige effekter af D-vitamintilskud hos infertile mænd med D-vitamininsufficiens/mangel på fertilitet er det velkendt, at D-vitamintilskud har generelle gavnlige helbredseffekter hos personer med D-vitamininsufficiens/mangel jvf. Sundhedsstyrelsens anbefalinger. Ved almindelige tilskuddoser er der ingen kendte skadelige virkninger. Interventionen med peroral D-vitamin tilskud skønnes ikke at være præferencefølsom for patienterne.

Anbefaling

Der er ikke evidens for rutinemæssig udredning for D-vitaminmangel hos mænd i fertilitetsbehandling. Der er heller ikke evidens for rutinemæssig D-vitaminbehandling af mænd i fertilitetsbehandling.

Referencer

- 1 Blomberg Jensen M *et al.* Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1307-1317.
- 2 Yang B *et al.* Associations between testosterone, bone mineral density, vitamin D and semen quality in fertile and infertile Chinese men. *Int J Androl.* 2012;35(6):783-792.
- 3 Zhu *et al.* Investigation of serum vitamin D levels in Chinese infertile men. *Andrologica.* 2016;48(10):1261-1266.
- 4 Blomberg Jensen M *et al.* Vitamin D deficiency and low ionized calcium are linked with semen quality and sex steroid levels in infertile men. *Hum Reprod.* 2016;31(8):1875-1885.
- 5 Blomberg Jensen M *et al.* Effects of vitamin D supplementation on semen quality, reproductive hormones, and live birth rate: A randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(3):870-881.

Behandling ved ejakulatorisk dysfunktion

Resume af kliniske rekommandationer

Penil vibratorisk stimulation bør tilbydes som førstevalgsbehandling med henblik på at fremkalde antegrad ejakulation hos rygmarvsskadede mænd med bevaret ejakulationsrefleks (læsionsniveau ved eller over Th10).	A
Ved retrograd ejakulation kan imipramin-behandling med fordel forsøges uafhængigt af den bagvedliggende årsag.	A
Ved manglende effekt af imipramin kan brugbare spermatozoer ofte oprenses fra postejakulatorisk urin.	D
Penil vibratorisk stimulation kan anvendes hjemme af den rygmarvsskadede	

mand og fertil partner med henblik på opnåelse af graviditet efter vaginal selv-insemination, når sædanalyse har vist mere end 10 millioner bevægelige sædceller per antegrad ejakulat.	B
Rektal elektroejakulation kan tilbydes rygmarvsskadede mænd efter svigt af penil vibration. Denne behandling foregår på urologiske specialafdelinger.	A
Penil vibratorisk stimulation eller elektroejakulation kan tilbydes rygmarvsskadede mænd med ringe sædkvalitet i kombination med assisteret befrugtning af partner.	B

Behandling

Retrograd ejakulation kan i milde tilfælde modvirkes ved medikamentel behandling med alfa-receptor-agonister som f.eks. imipramin (25 mg x 2-3 dagligt i mindst 3 dage forud for ejakulation) [129] (Evidens 1a). Denne behandling får blærehalsen til at trække sig sammen så ejakulatet ikke løber op i blæren. Hvis medikamentel behandling ikke har effekt kan spermatozoerne opsamles fra urinblæren efter sædafgang forudgået af vandladning. Primært forsøges ejakulation på næsten tom blære med efterfølgende fuldstændig blæretømning. Såfremt spermatozoer ikke påvises, foretages blærekateterisation med instillation af 50 ml dyrkningsmedium inden masturbation og efterfølgende fornyet kateterisation mhp. udhentning af ejakulat og medium [130]. Det er vigtigt der benyttes gel uden spermatocid effekt og at man benytter et plastikkateter, idet spermatozoer kan sidde fast på silikone. Ved anejakulation er førstevalget penil vibratorisk stimulation (PVS). Dette kan forsøges ved alle former for neurologisk skade men succesraten er højest hos RS mænd, idet næsten 90 % med skader over T10 vil kunne få ejakulation med metoden [131](Evidens 1b). Ved skader under dette niveau er den refleksbue der udløser ejakulationen påvirket og succesraten falder til ca. 15 %. Stimulationen foregår ved at placere en vibrerende plade på frenulum preputii idet der stimuleres med en amplitude på 2.5 mm ved en frekvens på 100 Hz. Ejakulation opnås oftest indenfor ca. 2 min. Hvis dette ikke sker holder man en pause og forsøger med yderligere 2 minutters stimulationsintervaller. Er det fortsat ikke muligt at frembringe ejakulation kan man stimulere på begge sider af glans penis samtidig med 2 vibratorer. Hos RS mænd med >10 millioner motile sædceller per ejakulat, og en gynækologisk rask partner er det muligt at anvende PVS hjemme med efterfølgende selv-insemination. Efter PVS opsamles ejakulatet og sprøjtes ind i vagina. Et nyligt studie har vist at ca. halvdelen af de par der forsøger metoden i hjemmet vil opnå en graviditet [132] (Evidens 2b). Rektal elektroejakulation (EEJ) anvendes i hospitalsregi hos RS mænd som ikke har opnået ejakulation ved PVS. Der kræves universel anæstesi hos RS med følesans. EEJ kan også benyttes hos mænd med anejakulation af andre årsager, men vil i disse tilfælde altid kræve universel anæstesi. Ved EEJ indføres en probe i rektum, og der stimuleres i bølger med en svag strøm i op til 5-10 minutter. Det antegrade ejakulat opsamles, og evt. retrogradt ejakulat udhentes. Succesraten ved EEJ er tæt på 100 % men der er større ubehag forbundet med metoden end ved PVS [133] (Evidens 1b). Selvom der ved PVS/EEJ i nogle tilfælde kan opnås sædkvaliteter egnet til insemination eller konventionel IVF, er ICSI ofte indiceret [134]. Den gennemsnitlige graviditetsrate per behandling efter anvendelse af de forskellige assisterede befrugtningemetoder er ca. 25 %

[12]. Såfremt man ikke kan komme igennem med ovennævnte metoder, kan spermatozoer udhentes fra testis eller epididymis.

Varicocele og mandlig infertilitet

Introduktion

Varicocele er defineret som en abnorm dilatation af plexus pampiniformis og kan identificeres hos op til 15 % af alle raske mænd samt hos op til 35 % af mænd der søger behandling for primær infertilitet [1]. Det findes langt overvejende på venstre side, men op til 50 % af mænd med varicocele har bilaterale fund [2]. Patofysiologisk resulterer det kompromitterede venøse tilbageflow et forandret miljø omkring testes med blandt andet øget temperatur på 2.6 °C, højere niveau af oxidativt stress samt testikulær hypoksi med negativ påvirkning af spermatogenesisen til følge [3]. Selvom varicocele kan findes unilateralt kan begge testes blive påvirket grundet kollateraler [3]. Ifølge verdenssundhedsorganisationen WHO's 2010 kriterier for mandlig infertilitet, kan varicocele føre til nedsat spermatozo-antal, nedsat motilitet og påvirket morfologi, men ikke sædvolumen [4].

Det har længe været diskuteret om intervention af varicocele kan bedre mandlig infertilitet. I dette afsnit forsøger vi at afdække litteraturens svar på dette spørgsmål.

Interventionsformer

Der findes adskillige metoder og procedurer for at behandle varicocele, heriblandt åben og laparoskopisk varicolectomi, mikrokirurgisk subinguinal adgang og perkutan embolisering og sklerosering [5]. Der findes ingen medicinsk behandling og i Danmark er den hyppigst anbefalede metode mikrokirurgisk subinguinal adgang grundet mindre risiko for postoperative komplikationer [6].

Metode

Vi ønsker at undersøge hvad kirurgisk intervention af varicocele har af betydning for mænd med nedsat fertilitet. Til fremsøgning af relevante artikler blev der udformet følgende PICO til begrænsning af forskningsspørgsmål:

- Population (P): Mænd med nedsat fertilitet og bekræftet varicocele
- Intervention (I): Varicolectomi, embolisering eller sklerosering
- Sammenligningsgrundlag (C): Før og efter resultater eller behandlet versus ikke behandlet gruppe
- Outcome (O): Sædparametre og graviditetsrate

Litteratur-søgning

PubMed, Embase og Cochrane blev benyttet som databaser ved en søgning foretaget den 12/10-2021 med følgende søgestreng:

((Male infertility) OR (Male subfertility) OR (Impaired fertility) OR (Oligozoospermia) OR (Oligospermia) OR (Azoospermia) OR (Aspermia) OR (Teratozoospermia) OR (Teratospermia) OR (Asthenozoospermia) OR (Asthenospermia) OR (DNA fragmentation) OR (Spermatogenic dysfunction)) AND (varicocele) AND ((varicolectomy) OR (embolization) OR (sclerozation)) AND ((dna fragmentation) OR (pregnancy) OR (pregnant implantation) OR (sperm motility) OR (sperm concentration) OR (sperm morphology) OR (sperm count))

Denne søgning førte til 1074 artikler efter duplikater blev ekskluderet. Alle artikler blev screenet på titel og abstract, hvorefter 981 artikler blev ekskluderet grundet irrelevans. Et opdateret veludført systematisk review var tilstrækkeligt for at besvare vores PICO.

Resultater af behandling af varicocele

Et retrospektivt studie fra 2021 rapporterede konsekvensen af mikrokirurgisk subinguinal adgang til varicocelektomi hos 85 patienter med svær oligozospermi efterfulgt af et systematisk review og meta-analyse [7]. Der fandtes en signifikant forbedring i sædcellekoncentrationen, motilitet og totalt antal motile sædceller (TMSC), men ingen forskel i volumen, spermatozo-morfologi eller hormonparametre. Det systematiske review og meta-analyse inkluderede 7 studier og fandt sammenlignelige resultater samt en spontan graviditetsrate på 27.5 %.

Et andet systematisk review fra 2010 undersøgte konsekvensen af forskellige interventioner til varicocele fra i alt 33 studier med en samlet population på over 5000 patienter [8]. Sammenlignet med embolisering, sclerosering og laparoskopisk adgang, blev det her anbefalet at benytte den mikrokirurgiske inguiale/subinguinale adgang, da dette er mere kost-effektivt med færre tilfælde af postoperative komplikationer og har den højeste rate af spontan graviditet efterfølgende med rater på mellem 42-45 %. Desuden angav de at der ingen sammenhæng er mellem subklinisk varicocele og infertilitet. Dette blev bekræftet af et andet systematisk review og meta-analyse, der undersøgte resultater af behandling af subklinisk varicocele hos i alt 1357 patienter igennem 13 studier, hvor der var ringe bedring af sædkvalitet postoperativt [9].(9).

Et nyere systematisk review og meta-analyse blev publiceret i 2020, hvor 31 studier blev inkluderet, heraf 12 randomiserede kliniske studier [10]. Sammenligning med ingen behandling for varicocele viste varicocelektomi i forrest plot analyser at forbedre graviditetsraten med en odd-ratio (95 % CI) på 1.82 (1.37-2.41). Særligt i subgruppen med normozoospermi var der en forbedring med en odds ratio (95 % CI) på 2.85 (1.47-5.54). Ligeledes var der en forbedring i live birth rate med en odds ratio (95 % CI) på 2.80 (1.67-4.72), hvilket også var særligt gældende for subgruppen med normozoospermi hvor odds ratio (95 % CI) var 9.90 (3.22-30.43) - dog med forbehold for en meget bredt confidensinterval på grund af en lille samlet population.

Resume af evidens og rekommandationer

- Der er ingen sammenhæng mellem subklinisk varicocele og mandlig infertilitet, og deraf ringe gavnlig effekt af varicocelektomi (evidensgrad 1a)
- Varicocelektomi fører til bedring af sædkoncentration, motilitet og TMSC, særligt ved varicocele grad 2 og 3 (evidensgrad 1a). Man synes ikke at have skelnet mellem unilateral og bilateral varicocele.
- Sammenlignet med ingen behandling forøger varicocelektomi signifikant chancen for graviditet og live birth (evidensgrad 1a). Udgangspopulationerne har været fertilitetspatienter, men opnået graviditet inkluderer både naturlig konception og ART. Forsøg på at opnå naturlig konception efter varicocelektomi indebærer, at ART-behandling må udskydes.
- Mikrokirurgisk inguinal/subinguinal adgang er at foretrække ved varicocelektomi (evidensgrad 1a)

Litteraturliste

1. Alsaikhan B, Alrabeeah K, Delouya G, Zini A. Epidemiology of varicocele. *Asian J Androl.* 2016;18(2):179–81.
2. Abdulmaaboud MR, Shokeir AA, Farage Y, El-Rahman AA, El-Rakhawy MM, Mutabagani H. Treatment of varicocele: A comparative study of conventional open surgery, percutaneous retrograde sclerotherapy, and laparoscopy. *Urology.* 1998;52(2):294–300.
3. Hassanin AM, Ahmed HH, Kaddah AN. A global view of the pathophysiology of varicocele. *Andrology.* 2018;6(5):654–61.
4. Agarwal A, Sharma R, Harlev A, Esteves S. Effect of varicocele on semen characteristics according to

- the new 2010 World Health Organization criteria: A systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl.* 2016;18(2):163–70.
5. Johnson D, Sandlow J. Treatment of varicoceles: techniques and outcomes. *Fertil Steril* [Internet]. 2017;108(3):378–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.020>
 6. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *Eur Urol.* 2012;62(2):324–32.
 7. Majzoub A, ElBardisi H, Covarrubias S, Mak N, Agarwal A, Henkel R, et al. Effect of microsurgical varicocelectomy on fertility outcome and treatment plans of patients with severe oligozoospermia: An original report and meta-analysis. *Andrologia.* 2021;53(6):1–9.
 8. Diegidio P, Jhaveri JK, Ghannam S, Pinkhasov R, Shabsigh R, Fisch H. Review of current varicocelectomy techniques and their outcomes. *BJU Int.* 2011;108(7):1157–72.
 9. Kohn TP, Ohlander SJ, Jacob JS, Griffin TM, Lipshultz LI, Pastuszak AW. The Effect of Subclinical Varicocele on Pregnancy Rates and Semen Parameters: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Urol Rep.* 2018;19(7):1–10.
 10. Birowo P, Tendi W, Widyahening IS, Atmoko W, Rasyid N. The benefits of varicocele repair for achieving pregnancy in male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon* [Internet]. 2020;6(11):e05439. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05439>

Behandling ved obstruktiv azoospermi

Resume af kliniske rekommandationer

Mikrokirurgisk vasovasotomi kan tilbydes ufrivilligt barnløse par, hvor manden har obstruktiv azoospermi på ductus deferens-niveau af mindre end 15 års varighed, og kvinden er under 40 år gammel og fertil. Under disse forudsætninger kan graviditet opnås hos ca. 50 %.	B
Ved obstruktiv azoospermi på epididymis-niveau kan mænd tilbydes mikrokirurgisk vasoepidymostomi under forudsætning af, at partner er fertil og under 40 år gammel. Naturlig graviditet kan opnås hos ca. 40 %	B
Ved obstruktiv azoospermi på prostataniveau findes der ikke dokumentation for at udføre transurethral resektion af de ejakulatoriske ductuli (TUR-ED) med henblik på at genskabe sædcellepassagen således, at graviditet kan opnås.	D
Hvis kausal behandling ikke er mulig/tilrådelig og det er nødvendigt at udhente spermatozoer fra testikel eller bitestikel, må man tilstræbe så få udhentningsforsøg som muligt, og evt. overskydende udhentet testisvæv/spermatozoer bør forsøges nedfrosset.	√

Behandling

Obstruktiv azoospermi foreslås i flere tilfælde behandlet med enten mikrokirurgisk rekonstruktion (vaso-vasostomi/vasoepidymostomi) eller transurethral resektion af de ejakulatoriske ductuli (TUR-ED) [8] (Evidens 3). Imidlertid findes der ingen randomiserede, kontrollerede undersøgelser af mænd med obstruktiv azoospermi, som sammenligner behandlingseffekten m.h.t. opnåelse af graviditet hos fertil partner efter anvendelse af henholdsvis kirurgisk behandling/naturlig konception og spermatozo-udhentning fra f.eks. testiklerne i kombination med ICSI.

Behandlingseffekt

Flere opgørelser påviser dog, at man efter vaso-vasostomi kan skabe sædcellepassage hos næsten alle [153] (Evidens 2a); [8] (Evidens 3). Ved anvendelse af de nyeste mikrokirurgiske teknikker kan der opnås sædcellepassage hos op til 80 % af mændene efter vaso-epididymostomi [154] (Evidens 2a). En afgørende faktor for opnåelse af graviditet er tiden fra obstruktionens indtræden til genetablering af sædcellepassage.

En stor multicenter opgørelse [155] (Evidens fra 2a til 3) med 1.469 opererede mænd viste, at vaso-vasostomi udført mindre end 3 år efter vasektomi medførte en naturlig graviditetsrate på 75 %. Vaso-vasotomi udført mellem 3-8 år, 9-14 år og mere end 15 år efter vasektomi har vist naturlige graviditetsrater på henholdsvis 53 %, 44 % og 30 %. De naturlige graviditetsrater efter vasoepididymostomi er opgjort til ca. 40 % [154] (Evidens 2a). En forudsætning for opnåelse af de her beskrevne naturlige graviditetsrater efter kirurgi er, at partner er fertil og under 40 år gammel.

Der findes kun få og små studier af effekten af TUR-ED, som dog viser, at det er muligt at opnå sædcellepassage hos 50-75 % af mændene og naturlige graviditetsrater på ca. 25 % [156,157] (Evidens 3). I forbindelse med TUR-ED findes en række mulige komplikationer herunder retrograd ejakulation, refluks af urin til sædvejene og efterfølgende risiko for infektioner i prostata og epididymis. Der savnes større kontrollerede undersøgelser af mulige komplikationer og effekt på fertiliteten efter TUR-ED.

Man opnår sædvanligvis lige så høje graviditetsrater ved ICSI med testikulære og epididymale spermatozoer fra mænd med obstruktiv azoospermi, som hvis der gøres ICSI med ejakulerede spermatozoer. I et studium omfattende 196 cykli hos par, hvor der i langt de fleste tilfælde var tale om obstruktiv azoospermi fandtes i alle tilfælde brugbare spermatozoer ved PESA/TESA, og der opnåedes en graviditetsrate på 37 % per transfer [158] (Evidens 3). I nævnte studium var der i 76 tilfælde tale om repetitiv behandling med fornyet udhentning af spermatozoer. Intervallerne mellem to successive behandlinger varierede fra 63 til 588 dage, og man kunne ikke se nogen association mellem intervallets længde og graviditetschance. Det kan ikke helt udelukkes at en bedre oocyt-kvalitet hos de som valgte de korteste intervaller kan have kompenseret for en relativt dårligere spermatozo-kvalitet [158] (Evidens 3).

Ved azoospermi udhentes spermatozoer sædvanligvis med kanyler/"sommerfugl" fra epididymis (PESA = Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration) eller fra testis med enten kanyler (TESA = TEsticular Sperm Aspiration) eller TruCut/skalpel (TESE = TEsticular Sperm Extraction). Før man aspirerer fra epididymis skal man være afklaret med at efterfølgende forsøg på rekonstruktion af sædvejene er udelukket, da epididymis kan ødelægges ved indgrebet [159]. Efter indgreb på testis kan man observere UL-forandringer. Disse synes at repræsentere inflammation og små hæmatomer, som senere afløses af fibrose og småforkalkninger [160].

Behandling ved non-obstruktiv azoospermi

Resume af kliniske rekommandationer

Ved non-obstruktiv azoospermi er der i visse tilfælde mulighed for testikulær	
---	--

udhentning af sædceller til ICSI. I disse tilfælde er diagnostisk testisbiopsi tilrådelig som led i udredningen.	√
Par, hvor manden har non-obstruktiv azoospermi, bør – før behandling med testikulære spermatozoer – være informeret om, at behandling med donorsæd er en alternativ mulighed	√

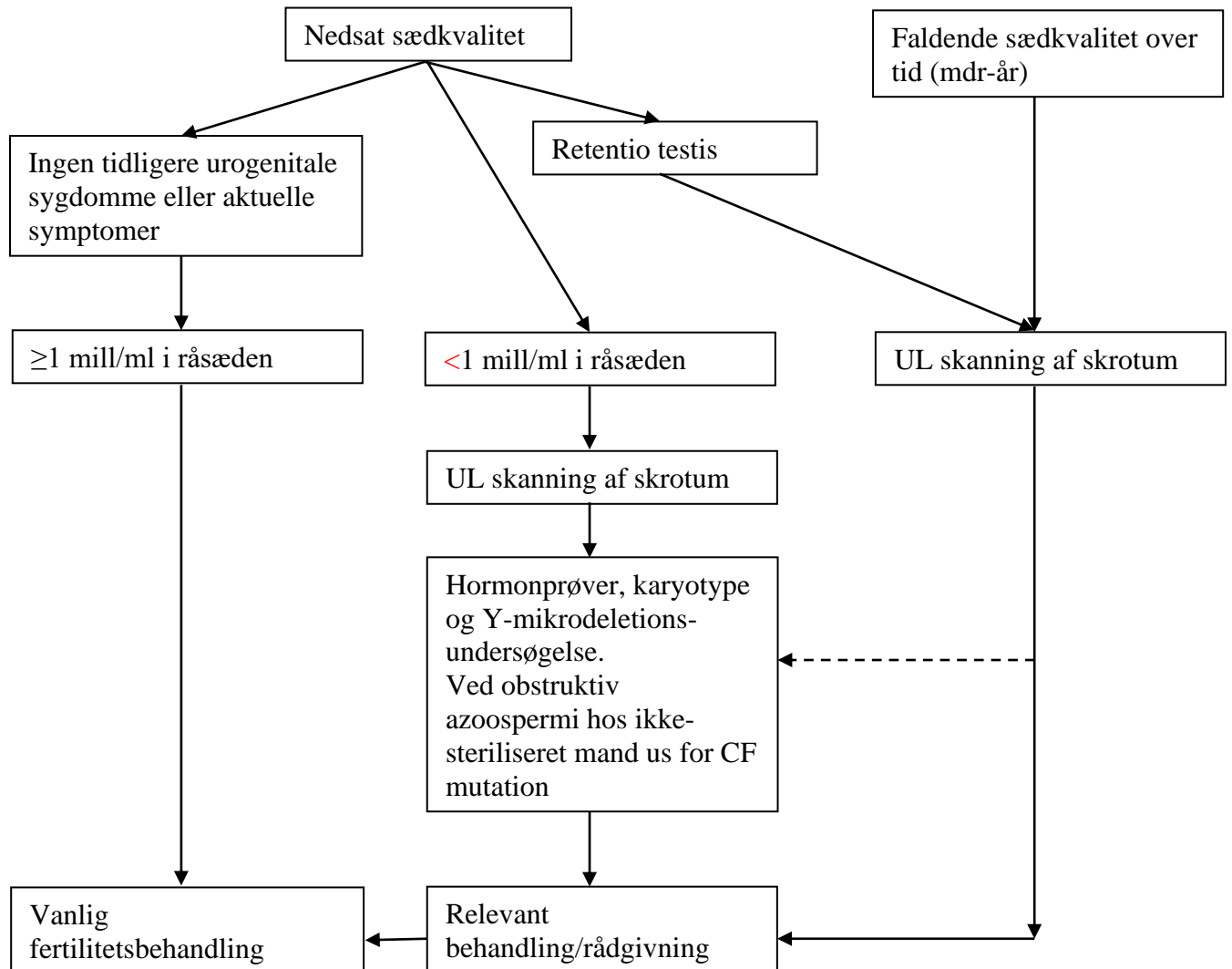
Non-obstruktiv azoospermi (NOA) kan skyldes enten komplet (Sertoli cell only syndrom) eller meget svær hæmning af spermatogenesisen. Hos nogle mænd med meget svær hæmning af spermatogenesisen vil der i nogle ejakulater være enkelte sædceller (cryptozoospermi). Ved NOA kan man eventuelt forsøge TESE/TESA i forbindelse med ICSI efter forudgående relevant udredning. Det er tilrådeligt ved diagnostisk testisbiopsi at vurdere spermaogenesisen forud for denne behandling, ligesom det er vigtigt, at der på specialistplan i øvrigt tages hånd om udredning og opfølgning af denne gruppe mænd, hvoraf nogle vil have behov for androgen-substitution som f.eks. mænd med Klinefelter Syndrom [161].

Sammenlignet med TESA/TESE har man ved micro-TESE eller lup-brille-kirurgi bedre mulighed for at finde områder med 'voluminøse' tubuli, som med større sandsynlighed indeholder spermatozoer og samtidig identificere testikulære kar [162,163]. Micro-TESE er imidlertid et mere tidskrævende indgreb, og nogle steder tilbydes derfor ensidig subcapsulær orchiectomi med henblik på nedfrysning af testikulære spermatozoer som alternativ til den sub-gruppe af mænd med NOA, der har Klinefelter Syndrom og dermed alligevel med stor sandsynlighed skal testosteron substitueres [164,165].

I retrospektive opgørelser har man fundet lavere graviditets- og implantationsrater, når man anvender testikulære spermatozoer fra mænd med non-obstruktiv azoospermi, sammenlignet med testikulære spermatozoer fra mænd med obstruktiv azoospermi, epididymale eller ejakulerede spermatozoer [166-168] (Evidens 3). Hertil kommer, at der ved non-obstruktiv azoospermi er større risiko, for at man ikke opnår spermatozoer egnet til ICSI, end hvis vir har obstruktiv azoospermi [169] (Evidens 3). Enkelte nyere retrospektive studier tyder på, at man hos mænd med cryptozoospermi kan opnå højere graviditets-og implantationsrater ved at anvende testikulære frem for ejakulerede spermatozoer [170] (Evidens 2).

Ved behandling af par hvor manden har NOA eller få sædceller i ejakulatet anbefales, at der orienteres om mulighed for donor-back-up.

Bilag 1

Hvilke mænd bør tilbydes udredning

Reference List

1. **WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5 edn.** World Health Organization; 2010.
2. **Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990, 5: 586-592.**
3. **Skakkebaek NE, Rajpert-De ME, Main KM: Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001, 16: 972-978.**
4. **Skakkebaek NE: Carcinoma in situ of the testis: frequency and relationship to invasive germ cell tumours in infertile men. *Histopathology* 1978, 2: 157-170.**
5. **Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, Hansen J, Olsen JH, Skakkebaek NE *et al.*: Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *BMJ* 2000, 321: 789-792.**
6. **Giwercman A, Bruun E, Frimodt-Moller C, Skakkebaek NE: Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. *J Urol* 1989, 142: 998-1001.**
7. **Moller H, Prener A, Skakkebaek NE: Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control* 1996, 7: 264-274.**
8. **Hopps CV, Goldstein M, Schlegel PN: The diagnosis and treatment of the azoospermic patient in the age of intracytoplasmic sperm injection. *Urol Clin North Am* 2002, 29: 895-911.**
9. **Oates RD, Amos JA: The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl* 1994, 15: 1-8.**
10. **Fedder J, Cruger D, Oestergaard B, Petersen GB: Etiology of azoospermia in 100 consecutive nonvasectomized men. *Fertil Steril* 2004, 82: 1463-1465.**
11. **Cornel EB, Dohle GR, Meuleman EJ: Transurethral deroofing of midline prostatic cyst for subfertile men. *Hum Reprod* 1999, 14: 2297-2300.**
12. **Biering-Sorensen F, Sonksen J: Sexual function in spinal cord lesioned men. *Spinal Cord* 2001, 39: 455-470.**
13. **Rowland DL: Psychophysiology of ejaculatory function and dysfunction. *World J Urol* 2005, 23: 82-88.**
14. **Pryor JL, Howards SS: Varicocele. *Urol Clin North Am* 1987, 14: 499-513.**
15. **Schlesinger MH, Wilets IF, Nagler HM: Treatment outcome after varicolectomy. A critical analysis. *Urol Clin North Am* 1994, 21: 517-529.**

16. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. *Fertil Steril* 1992, 57: 1289-1293.
17. Jarow JP, Ogle SR, Eskew LA: Seminal improvement following repair of ultrasound detected subclinical varicoceles. *J Urol* 1996, 155: 1287-1290.
18. Steckel J, Dicker AP, Goldstein M: Relationship between varicocele size and response to varicocelectomy. *J Urol* 1993, 149: 769-771.
19. Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH *et al.*: Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004, 82: 863-870.
20. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP: Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril* 2008, 90: 619-626.
21. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM: The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010, 16: 293-311.
22. Hammiche F, Laven JS, Twigt JM, Boellaard WP, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP: Body mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile couples. *Hum Reprod* 2012, 27: 2365-2372.
23. Li Y, Lin H, Li Y, Cao J: Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil Steril* 2011, 95: 116-123.
24. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP: Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007, 22: 188-196.
25. Jensen TK, Jorgensen N, Punab M, Haugen TB, Suominen J, Zilaitiene B *et al.*: Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced semen quality and testis size in adulthood: a cross-sectional study of 1,770 young men from the general population in five European countries. *Am J Epidemiol* 2004, 159: 49-58.
26. Joo KJ, Kwon YW, Myung SC, Kim TH: The effects of smoking and alcohol intake on sperm quality: light and transmission electron microscopy findings. *J Int Med Res* 2012, 40: 2327-2335.
27. Jensen TK, Swan SH, Skakkebaek NE, Rasmussen S, Jorgensen N: Caffeine intake and semen quality in a population of 2,554 young Danish men. *Am J Epidemiol* 2010, 171: 883-891.
28. Bonetti A, Tirelli F, Catapano A, Dazzi D, Dei CA, Solito F *et al.*: Side effects of anabolic androgenic steroids abuse. *Int J Sports Med* 2008, 29: 679-687.

29. Menon DK: Successful treatment of anabolic steroid-induced azoospermia with human chorionic gonadotropin and human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril* 2003, 79 Suppl 3: 1659-1661.
30. Schurmeyer T, Knuth UA, Belkien L, Nieschlag E: Reversible azoospermia induced by the anabolic steroid 19-nortestosterone. *Lancet* 1984, 1: 417-420.
31. Turek PJ, Williams RH, Gilbaugh JH, III, Lipshultz LI: The reversibility of anabolic steroid-induced azoospermia. *J Urol* 1995, 153: 1628-1630.
32. Dohle GR, Smit M, Weber RF: Androgens and male fertility. *World J Urol* 2003, 21: 341-345.
33. Moss JL, Crosnoe LE, Kim ED: Effect of rejuvenation hormones on spermatogenesis. *Fertil Steril* 2013, 99: 1814-1820.
34. Sharpe RM: Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010, 365: 1697-1712.
35. Whorton D, Krauss RM, Marshall S, Milby TH: Infertility in male pesticide workers. *Lancet* 1977, 2: 1259-1261.
36. Whorton D, Foliart D: DBCP: eleven years later. *Reprod Toxicol* 1988, 2: 155-161.
37. Cherry N, Moore H, McNamee R, Pacey A, Burgess G, Clyma JA *et al.*: Occupation and male infertility: glycol ethers and other exposures. *Occup Environ Med* 2008, 65: 708-714.
38. Figa-Talamanca I, Traina ME, Urbani E: Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. *Occup Med (Lond)* 2001, 51: 174-188.
39. Bonde JP, Storgaard L: How work-place conditions, environmental toxicants and lifestyle affect male reproductive function. *Int J Androl* 2002, 25: 262-268.
40. Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieusset R: Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod* 1998, 13: 2122-2125.
41. Bonde JP: Semen quality in welders exposed to radiant heat. *Br J Ind Med* 1992, 49: 5-10.
42. Stoy J, Hjollund NH, Mortensen JT, Burr H, Bonde JP: Semen quality and sedentary work position. *Int J Androl* 2004, 27: 5-11.
43. Tas M, Dasdag S, Akdag MZ, Cirit U, Yegin K, Seker U *et al.*: Long-term effects of 900 MHz radiofrequency radiation emitted from mobile phone on testicular tissue and epididymal semen quality. *Electromagn Biol Med* 2013.
44. Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E: Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum Reprod* 2005, 20: 452-455.

45. Sheynkin Y, Welliver R, Winer A, Hajimirzaee F, Ahn H, Lee K: Protection from scrotal hyperthermia in laptop computer users. *Fertil Steril* 2011, 95: 647-651.
46. Wong WY, Zielhuis GA, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP: New evidence of the influence of exogenous and endogenous factors on sperm count in man. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003, 110: 49-54.
47. Wang C, Chan SY, Leung A, Ng RP, Ng M, Tang LC *et al.*: Cross-sectional study of semen parameters in a large group of normal Chinese men. *Int J Androl* 1985, 8: 257-274.
48. Carlsen E, Swan SH, Petersen JH, Skakkebaek NE: Longitudinal changes in semen parameters in young Danish men from the Copenhagen area. *Hum Reprod* 2005, 20: 942-949.
49. Carlsen E, Andersson AM, Petersen JH, Skakkebaek NE: History of febrile illness and variation in semen quality. *Hum Reprod* 2003, 18: 2089-2092.
50. Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE: Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertil Steril* 2004, 82: 358-366.
51. Opsahl MS, Dixon NG, Robins ER, Cunningham DS: Single vs. multiple semen specimens in screening for male infertility factors. A comparison. *J Reprod Med* 1996, 41: 313-315.
52. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB *et al.*: Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 1998, 352: 1172-1177.
53. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA *et al.*: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986, 46: 1118-1123.
54. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C *et al.*: Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001, 345: 1388-1393.
55. Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E, Cox A, Jacobs P, Janssen M *et al.*: Semen quality and intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2003, 7: 485-492.
56. Chiu WW, Chamley LW: Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. *Fertil Steril* 2004, 82: 529-535.
57. Fedder J: Nonsperm cells in human semen: with special reference to seminal leukocytes and their possible influence on fertility. *Arch Androl* 1996, 36: 41-65.
58. Lewis SE, John AR, Conner SJ, Iuliis GD, Evenson DP, Henkel R *et al.*: The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2013, 27: 325-337.

59. Barratt CL, Aitken RJ, Bjorndahl L, Carrell DT, de BP, Kvist U *et al.*: Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report. *Hum Reprod* 2010, 25: 824-838.
60. Grunewald S, Glander HJ, Paasch U, Kratzsch J: Age-dependent inhibin B concentration in relation to FSH and semen sample qualities: a study in 2448 men. *Reproduction* 2013, 145: 237-244.
61. Andersson AM, Petersen JH, Jorgensen N, Jensen TK, Skakkebaek NE: Serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels as tools in the evaluation of infertile men: significance of adequate reference values from proven fertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 2873-2879.
62. Andersson AM, Jorgensen N, Frydelund-Larsen L, Rajpert-De ME, Skakkebaek NE: Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 3161-3167.
63. Nieschlag E, Behre HM: *Andrology. Male reproductive health and dysfunction*, 2 edn. Springer; 2000.
64. Poppe K, Glinoe D, Tournaye H, Maniewski U, Haentjens P, Velkeniers B: Is systematic screening for thyroid disorders indicated in subfertile men? *Eur J Endocrinol* 2006, 154: 363-366.
65. Lenz S, Thomsen JK, Giwercman A, Hertel NT, Hertz J, Skakkebaek NE: Ultrasonic texture and volume of testicles in infertile men. *Hum Reprod* 1994, 9: 878-881.
66. Lenz S, Giwercman A, Skakkebaek NE, Bruun E, Frimodt-Moller C: Ultrasound in detection of early neoplasia of the testis. *Int J Androl* 1987, 10: 187-190.
67. Lenz S, Skakkebaek NE, Hertel NT: Abnormal ultrasonic pattern in contralateral testes in patients with unilateral testicular cancer. *World J Urol* 1996, 14: S55-S58.
68. Lenz S, Skakkebaek NE, Hertel NT: Abnormal ultrasonic pattern in contralateral testes in patients with unilateral testicular cancer. *World J Urol* 1996, 14 Suppl 1: S55-S58.
69. Petersen PM, Giwercman A: Testicular cancer and infertility. In *Gonadal function-genetics to physiology*. Edited by Hillensjö T, Ahrén K. Rome: Ares-Serono Symposia Publications; 1996:179-191.
70. Rashid HH, Cos LR, Weinberg E, Messing EM: Testicular microlithiasis: a review and its association with testicular cancer. *Urol Oncol* 2004, 22: 285-289.
71. van Casteren NJ, Looijenga LH, Dohle GR: Testicular microlithiasis and carcinoma in situ overview and proposed clinical guideline. *Int J Androl* 2009, 32: 279-287.

72. Fedder J: Prevalence of small testicular hyperechogenic foci in subgroups of 382 non-vasectomized, azoospermic men. A retrospective cohort study. *Andrology* 2017, 5: 258-255.
73. Husmann DA: Cryptorchidism and its relationship to testicular neoplasia and microlithiasis. *Urology* 2005, 66: 424-426.
74. von Eckardstein S, Tsakmakidis G, Kamischke A, Rolf C, Nieschlag E: Sonographic testicular microlithiasis as an indicator of premalignant conditions in normal and infertile men. *J Androl* 2001, 22: 818-824.
75. Turek PJ, Magana JO, Lipshultz LI: Semen parameters before and after transurethral surgery for ejaculatory duct obstruction. *J Urol* 1996, 155: 1291-1293.
76. Fedder J, Cruger D, Oestergaard B, Petersen GB: Etiology of azoospermia in 100 consecutive nonvasectomized men. *Fertil Steril* 2004, 82: 1463-1465.
77. Dul EC, van Ravenswaaij-Arts CM, Groen H, van Echten-Arends J, Land JA: Who should be screened for chromosomal abnormalities before ICSI treatment? *Hum Reprod* 2010, 25: 2673-2677.
78. Bourrouillou G, Dastugue N, Colombies P: Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet* 1985, 71: 366-367.
79. Retief AE, Van Zyl JA, Menkveld R, Fox MF, Kotze GM, Brusnick J: Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet* 1984, 66: 162-164.
80. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 2006: evidence and evolution. *Hum Reprod Update* 2007, 13: 515-526.
81. Baschat AA, Kupker W, al HS, Diedrich K, Schwinger E: Results of cytogenetic analysis in men with severe subfertility prior to intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996, 11: 330-333.
82. Johnson MD: Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998, 70: 397-411.
83. Denschlag D, Tempfer C, Kunze M, Wolff G, Keck C: Assisted reproductive techniques in patients with Klinefelter syndrome: a critical review. *Fertil Steril* 2004, 82: 775-779.
84. Cruger D, Toft B, Agerholm I, Fedder J, Hald F, Bruun-Petersen G: Birth of a healthy girl after ICSI with ejaculated spermatozoa from a man with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 2001, 16: 1909-1911.
85. Bojesen A, Juul S, Gravholt CH: Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88: 622-626.

86. **Simoni M, Kamischke A, Nieschlag E: Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. Initiative for international quality control. *Hum Reprod* 1998, 13: 1764-1768.**
87. **Silber SJ, Repping S: Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod Update* 2002, 8: 217-229.**
88. **Dayangac D, Erdem H, Yilmaz E, Sahin A, Sohn C, Ozguc M *et al.*: Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 2004, 19: 1094-1100.**
89. **Grangeia A, Niel F, Carvalho F, Fernandes S, Ardalan A, Girodon E *et al.*: Characterization of cystic fibrosis conductance transmembrane regulator gene mutations and IVS8 poly(T) variants in Portuguese patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 2004, 19: 2502-2508.**
90. **Fedder J, Jørgensen MW, Engvad B: Prevalence of CBAVD in azoospermic men carrying pathogenic *CFTR* mutations - Evaluated in a cohort of 639 non-vasectomized, azoospermic men. *Andrology* 2021, 9: 588-598.**
91. **Finkel DM, Phillips JL, Snyder PJ: Stimulation of spermatogenesis by gonadotropins in men with hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 1985, 313: 651-655.**
92. **Burris AS, Clark RV, Vantman DJ, Sherins RJ: A low sperm concentration does not preclude fertility in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism after gonadotropin therapy. *Fertil Steril* 1988, 50: 343-347.**
93. **Burgues S, Calderon MD: Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotropic Hypogonadism. *Hum Reprod* 1997, 12: 980-986.**
94. **Burgues S, Calderon M: Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. Spanish Collaborative Group on Male Hypogonadotropic Hypogonadism. *Hum Reprod* 1997, 12: 980-986.**
95. **Liu L, Banks SM, Barnes KM, Sherins RJ: Two-year comparison of testicular responses to pulsatile gonadotropin-releasing hormone and exogenous gonadotropins from the inception of therapy in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 67: 1140-1145.**
96. **Schopohl J, Mehlretter G, von Zumbusch R, Eversmann T, von Werder K: Comparison of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin therapy in male patients with idiopathic hypothalamic hypogonadism. *Fertil Steril* 1991, 56: 1143-1150.**
97. **Buchter D, Behre HM, Kliesch S, Nieschlag E: Pulsatile GnRH or human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin as effective treatment**

- for men with hypogonadotropic hypogonadism: a review of 42 cases. *Eur J Endocrinol* 1998, 139: 298-303.
98. Delemarre- van de Waal HA: Application of gonadotropin releasing hormone in hypogonadotropic hypogonadism - diagnostic and therapeutic aspects. *Eur J Endocrinol* 2004, 151: U89-U90.
99. De Rosa M, Colao A, Di Sarno A, Ferone D, Landi ML, Zarrilli S *et al.*: Cabergoline treatment rapidly improves gonadal function in hyperprolactinemic males: a comparison with bromocriptine. *Eur J Endocrinol* 1998, 138: 286-293.
100. De Rosa M, Zarrilli S, Di Sarno A, Milano N, Gaccione M, Boggia B *et al.*: Hyperprolactinemia in men: clinical and biochemical features and response to treatment. *Endocrine* 2003, 20: 75-82.
101. Colao A, Vitale G, Cappabianca P, Briganti F, Ciccarelli A, De Rosa M *et al.*: Outcome of cabergoline treatment in men with prolactinoma: effects of a 24-month treatment on prolactin levels, tumor mass, recovery of pituitary function, and semen analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 1704-1711.
102. Kamischke A, Behre HM, Bergmann M, Simoni M, Schafer T, Nieschlag E: Recombinant human follicle stimulating hormone for treatment of male idiopathic infertility: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 1998, 13: 596-603.
103. Matorras R, Perez C, Corcostegui B, Pijoan JI, Ramon O, Delgado P *et al.*: Treatment of the male with follicle-stimulating hormone in intrauterine insemination with husband's spermatozoa: a randomized study. *Hum Reprod* 1997, 12: 24-28.
104. Foresta C, Bettella A, Garolla A, Ambrosini G, Ferlin A: Treatment of male idiopathic infertility with recombinant human follicle-stimulating hormone: a prospective, controlled, randomized clinical study. *Fertil Steril* 2005, 84: 654-661.
105. Liu PY, Handelsman DJ: The present and future state of hormonal treatment for male infertility. *Hum Reprod Update* 2003, 9: 9-23.
106. Raman JD, Schlegel PN: Aromatase inhibitors for male infertility. *J Urol* 2002, 167: 624-629.
107. 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: 914-920.
108. Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID *et al.*: A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril* 1995, 64: 825-831.
109. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA: Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996, 17: 530-537.

110. 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: 1028-1033.
111. Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG *et al.*: ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod* 2005, 20: 2590-2594.
112. Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F *et al.*: Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003, 79: 292-300.
113. Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J: The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol* 1998, 82: 76-80.
114. Balercia G, Mosca F, Mantero F, Boscaro M, Mancini A, Ricciardo-Lamonica G *et al.*: Coenzyme Q(10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertil Steril* 2004, 81: 93-98.
115. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP: Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2002, 77: 491-498.
116. Fedder MDK, Jakobsen HB, Giversen I, Christensen LP, Parner E, Fedder J: An extract of pomegranate fruit and galangal rhizome increases the numbers of motile sperm: A prospective, randomized, controlled, double-blinded trial. *PLoS.one* 2015, 9: e108532.
117. Safarinejad MR, Safarinejad S, Shafiei N, Safarinejad S: Effects of the reduced form of coenzyme Q10 (ubiquinol) on semen parameters in men with idiopathic infertility: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *J Urol* 2012, 188: 526-531.
118. Nadjarzadeh A, Sadeghi MR, Amirjannati N, Vafa MR, Motevalian SA, Gohari MR *et al.*: Coenzyme Q10 improves seminal oxidative defense but does not affect on semen parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: a randomized double-blind, placebo controlled trial. *J Endocrinol Invest* 2011, 34: e224-e228.
119. Safarinejad MR: Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Int Urol Nephrol* 2011, 43: 315-328.
120. Safarinejad MR: Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. *Andrologia* 2011, 43: 38-47.

121. Wang YX, Yang SW, Qu CB, Huo HX, Li W, Li JD *et al.*: [L-carnitine: safe and effective for asthenozoospermia]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2010, 16: 420-422.
122. Dimitriadis F, Tsambalas S, Tsounapi P, Kawamura H, Vlachopoulou E, Haliasos N *et al.*: Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on Leydig cell secretory function in oligoasthenospermic infertile men: a randomized trial. *BJU Int* 2010, 106: 1181-1185.
123. Kumar R, Saxena V, Shamsi MB, Venkatesh S, Dada R: Herbo-mineral supplementation in men with idiopathic oligoasthenoteratospermia : A double blind randomized placebo-controlled trial. *Indian J Urol* 2011, 27: 357-362.
124. Sun ZG, Lian F, Jiang KP, Zhang JW, Ma FM, Zhang N *et al.*: [Shengjing prescription improves semen parameters of oligoasthenozoospermia patients: efficacy and mechanism]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2012, 18: 764-767.
125. Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ: Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2011, CD007411.
126. Jensen TK, Skakkebaek NE, Jorgensen N, Jensen MB, Juul A: [Antioxidants and male subfertility--a survey of a Cochrane review]. *Ugeskr Laeger* 2011, 173: 3253-3255.
127. Bonner MR, McCann SE, Moysich KB: Dietary factors and the risk of testicular cancer. *Nutr Cancer* 2002, 44: 35-43.
128. Lombardo F, Gandini L, Lenzi A, Dondero F: Antisperm immunity in assisted reproduction. *J Reprod Immunol* 2004, 62: 101-109.
129. Kamischke A, Nieschlag E: Update on medical treatment of ejaculatory disorders. *Int J Androl* 2002, 25: 333-344.
130. Yavetz H, Yogev L, Hauser R, Lessing JB, Paz G, Homonnai ZT: Retrograde ejaculation. *Hum Reprod* 1994, 9: 381-386.
131. Sonksen J, Biering-Sorensen F, Kristensen JK: Ejaculation induced by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries. The importance of the vibratory amplitude. *Paraplegia* 1994, 32: 651-660.
132. Sonksen J, Fode M, Lochner-Ernst D, Ohl DA: Vibratory ejaculation in 140 spinal cord injured men and home insemination of their partners. *Spinal Cord* 2012, 50: 63-66.
133. Ohl DA, Sonksen J, Menge AC, McCabe M, Keller LM: Electroejaculation versus vibratory stimulation in spinal cord injured men: sperm quality and patient preference. *J Urol* 1997, 157: 2147-2149.
134. Sønksen J: *Ejaculation induced by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries*. Copenhagen: 1995.
135. Tauber R, Johnsen N: Antegrade scrotal sclerotherapy for the treatment of varicocele: technique and late results. *J Urol* 1994, 151: 386-390.

136. Gat Y, Bachar GN, Everaert K, Levinger U, Gornish M: Induction of spermatogenesis in azoospermic men after internal spermatic vein embolization for the treatment of varicocele. *Hum Reprod* 2005, 20: 1013-1017.
137. Cayan S, Shavakhabov S, Kadioglu A: Treatment of palpable varicocele in infertile men: a meta-analysis to define the best technique. *J Androl* 2009, 30: 33-40.
138. Cayan S, Kadioglu TC, Tefekli A, Kadioglu A, Tellaloglu S: Comparison of results and complications of high ligation surgery and microsurgical high inguinal varicocelectomy in the treatment of varicocele. *Urology* 2000, 55: 750-754.
139. Al-Said S, Al-Naimi A, Al-Ansari A, Younis N, Shamsodini A, Sadiq K *et al.*: Varicocelectomy for male infertility: a comparative study of open, laparoscopic and microsurgical approaches. *J Urol* 2008, 180: 266-270.
140. Evers JL, Collins JA: Surgery or embolisation for varicocele in subfertile men. *Cochrane Database Syst Rev* 2004, CD000479.
141. Breznik R, Vlasisavljevic V, Borko E: Treatment of varicocele and male fertility. *Arch Androl* 1993, 30: 157-160.
142. Grasso M, Lania C, Castelli M, Galli L, Franzoso F, Rigatti P: Low-grade left varicocele in patients over 30 years old: the effect of spermatic vein ligation on fertility. *BJU Int* 2000, 85: 305-307.
143. 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: 164-171.
144. 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: 120-124.
145. Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Behre HM: Treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod* 1995, 10: 347-353.
146. 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: 591-596.
147. Unal D, Yeni E, Verit A, Karatas OF: Clomiphene citrate versus varicocelectomy in treatment of subclinical varicocele: a prospective randomized study. *Int J Urol* 2001, 8: 227-230.
148. Yamamoto M, Hibi H, Hirata Y, Miyake K, Ishigaki T: Effect of varicocelectomy on sperm parameters and pregnancy rate in patients with subclinical varicocele: a randomized prospective controlled study. *J Urol* 1996, 155: 1636-1638.

149. Ficarra V, Cerruto MA, Liguori G, Mazzoni G, Minucci S, Tracia A *et al.*: Treatment of varicocele in subfertile men: The Cochrane Review--a contrary opinion. *Eur Urol* 2006, 49: 258-263.
150. Marmar JL, Agarwal A, Prabakaran S, Agarwal R, Short RA, Benoff S *et al.*: Reassessing the value of varicocelectomy as a treatment for male subfertility with a new meta-analysis. *Fertil Steril* 2007, 88: 639-648.
151. Abdel-Meguid TA, Al-Sayyad A, Tayib A, Farsi HM: Does varicocele repair improve male infertility? An evidence-based perspective from a randomized, controlled trial. *Eur Urol* 2011, 59: 455-461.
152. Mansour GM, Asgari SA, Dadrass N, Allahkhah A, Iran-Pour E, Safarinejad MR: Effects of varicocele repair on spontaneous first trimester miscarriage: a randomized clinical trial. *Urol J* 2012, 9: 505-513.
153. Goldstein M, Li PS, Matthews GJ: Microsurgical vasovasostomy: the microdot technique of precision suture placement. *J Urol* 1998, 159: 188-190.
154. Chan PT, Brandell RA, Goldstein M: Prospective analysis of outcomes after microsurgical intussusception vasoepididymostomy. *BJU Int* 2005, 96: 598-601.
155. Belker AM, Thomas AJ, Jr., Fuchs EF, Konnak JW, Sharlip ID: Results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group. *J Urol* 1991, 145: 505-511.
156. Jarow JP: Diagnosis and management of ejaculatory duct obstruction. *Tech Urol* 1996, 2: 79-85.
157. Fisch H, Kang YM, Johnson CW, Goluboff ET: Ejaculatory duct obstruction. *Curr Opin Urol* 2002, 12: 509-515.
158. Fedder J, Gabrielsen A, Petersen K: Pregnancy rates in relation to time intervals between repeat sperm-retrieval procedures. *Arch Androl* 2001, 46: 141-144.
159. Fedder J: [Infertility due to azoospermia. Causes, examination methods and therapeutic strategies]. *Ugeskr Laeger* 1999, 161: 6472-6477.
160. Schlegel PN, Su LM: Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997, 12: 1688-1692.
161. Gravholt CH, Chang S, Wallentin M, Fedder J, Moore P, Skakkebaek A: Klinefelter syndrome - integrating genetics, neuropsychology and endocrinology. *Endocr Rev* 2018, 39: 389-423..
162. Schlegel PN: Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999, 14: 131-135.
163. Dabaja AA, Schlegel PN: Microdissection testicular sperm extraction: an update. *Asian J Androl* 2013, 15: 35-39.

164. Fedder J, Gravholt CH, Kristensen SG, Marcussen N, Engvad B, Andersen CY: Testicular sperm sampling by subcapsular orchiectomy in Klinefelter patients; A new simplified treatment approach. *Urology* 2015, 86: 744-750.
165. Fullerton G, Hamilton M, Maheshwari A: Should non-mosaic Klinefelter syndrome men be labelled as infertile in 2009? *Hum Reprod* 2010, 25: 588-597.
166. Vernaev V, Tournaye H, Osmanagaoglu K, Verheyen G, Van SA, Devroey P: Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2003, 79: 529-533.
167. Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Ramsay JW: The results of 154 ICSI cycles using surgically retrieved sperm from azoospermic men. *Hum Reprod* 2004, 19: 579-585.
168. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Fahmy I, Kamal A, Tawab NA *et al.*: Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. *Fertil Steril* 1997, 68: 108-111.
169. Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Schachter M, Soffer Y, Ron-El R: Factors influencing the outcome of ICSI in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia: a comparative study. *Hum Reprod* 2002, 17: 3114-3121.
170. Ben-Ami I, Raziel A, Strassburger D, Komarovsky D, Ron-El R, Friedler S: Intracytoplasmic sperm injection outcome of ejaculated versus extracted testicular spermatozoa in cryptozoospermic men. *Fertil Steril* 2013, 99: 1867-1871.