

Spermieuthenting fra testikkel for assistert befruktning ved azoospermi

Sammendrag

Bakgrunn. Par der mannen har azoospermi hadde ikke mulighet til å bli genetiske foreldre ved assistert befruktning i Norge før bioteknologiloven ble endret i 2004. Da åpnet man for midlertidig godkjenning av teknikker som kan hjelpe disse parene. Vi beskriver våre erfaringer med intracytoplasmatisk spermieinjeksjon (ICSI), der vi har brukt sædceller hentet ut fra testikkelen (testicular sperm extraction, TESE).

Materiale og metode. Vi har fulgt 94 par utredet ved Fertilitetsklinikken Sør i perioden 2004–06, der mannen har azoospermi. Av disse parene har 60 fått behandling med intracytoplasmatisk spermieinjeksjon med uthenting av sædceller fra testikkelen. Dette gjennomføres poliklinisk i lokalbedøvelse som en åpen testikkelbiopsi. Ved en spesiell teknikk finnes sædceller fra biopsien som benyttes til befruktning av partnerens eggceller.

Resultater. Totalt har man ved vår klinikk startet 100 behandlingsforsøk med metoden. Dette har gitt 82 tilbakeføringer av ferske embryoer og 40 tilbakeføringer av tinte embryoer. Fra dette er det oppnådd 39 kliniske graviditeter.

Fortolkning. En graviditetsrate på 39 % med denne metoden er på linje med resultater fra intracytoplasmatisk spermieinjeksjon med ejakulerte sædceller. Behandling med intracytoplasmatisk spermieinjeksjon og uthenting av sædceller fra testikkelen synes å være en god metode for å hjelpe par der mannen har azoospermi, til å bli genetiske foreldre.

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

> Se også side 2503

Hans Ivar Hanevik
hans.ivar.hanevik@sthf.no
Unn Mette Friberg
Anette Bergh
Siv Elin Karlsen
Katarina Isfoss
Jarl A. Kahn
Fertilitetsklinikken Sør
Sykehuset Telemark
3901 Porsgrunn

Antall par som søker hjelp for ufrivillig barnløshet, har vært sterkt økende de siste 25 år. Dette er ikke bare fordi antallet infertile par har økt, men også fordi mulighetene for behandling er blitt stadig bedre. Gjennombruddet for moderne reproduksjonsbehandling kom i slutten av 1970-årene med in vitro-fertilisering (IVF). De første parene i Norge fikk barn etter slik behandling i Trondheim i 1984 (1). In vitro-fertilisering er i prinsippet en metode for behandling av kvinnelig infertilitet, hvor sædcellene selv må finne frem til egget for at befruktning skal finne sted. Et stort fremskritt for behandling av mannlig infertilitet kom i 1992 med intracytoplasmatisk spermieinjeksjon (ICSI), der man injiserer en sædcelle inn i hvert egg som hentes ut (2, 3). Denne metoden har tilnærmet lik effektivitet som in vitro-fertilisering (3).

Fortsatt manglet hjelp til par der mannen ikke hadde sædceller i sædvæsken (azoospermi). Riktignok hadde man i 1985 oppnådd graviditeter med aspirerte epididymale sædceller og påfølgende in vitro-fertilisering (4), men fertilitetsbehandlingen av menn med azoospermi skjøt likevel fart først rundt 1995 da man kunne hente ut sædceller fra bitestikkel eller testikkel for så å bruke disse til intracytoplasmatisk spermieinjeksjon (5, 6). Disse metodene for assistert befruktning har siden vært i bruk i andre land, men ble først godkjent midlertidig for bruk i Norge i forbindelse med endringer i bioteknologiloven i 2004 (7, 8). Den midlertidige godkjenningen er nylig vedtatt forlenget.

I denne artikkelen gjør vi rede for våre erfaringer gjennom to år med behandling av par hvor mannen ikke har sædceller i sædvæsken og hvor vi har foretatt uthenting av sædceller fra testikkelen (testicular sperm extraction, TESE) for befruktning av oocytter fra kvinnen ved intracytoplasmatisk spermieinjeksjon.

Materiale og metode

Fertilitetsklinikken Sør har fra den midlertidige godkjenningen trådte i kraft i 2004 til

14.12. 2006 tatt inn til utredning 94 par hvor mannen har azoospermi. Utredningen innebærer blant annet at mannen undersøkes genitalt og kontrolleres med hensyn til hormonavvik ved måling av follikkelstimulerende hormon (FSH), luteiniserende hormon (LH), thyreoideastimulerende hormon (TSH) og prolaktin i serum. Kvinnen i paret blir utredet på vanlig måte, med blant annet gynekologisk ultralyd og hormonprøver.

Begge utredes med karyotyping, og av mannen tas i tillegg DNA-analyse med henblikk på Y-kromosomdelesjoner og de hyppigst forekommende genmutasjoner assosiert med cystisk fibrose. Blant de 94 mennene vi har utredet, har vi funnet åtte med ulike genmutasjoner relatert til cystisk fibrose. Av disse har sju siden vært til behandlingsforsøk med uthenting av sædceller fra testikkelen for intracytoplasmatisk spermieinjeksjon etter å ha gjennomført genetisk veiledning. Hos to pasienter har vi funnet Y-kromosomdelesjoner. Ingen av de to har vært til behandlingsforsøk, da vi ikke fant sædceller ved diagnostisk uthenting. Vi har ikke funnet noen pasienter med avvikende karyotype.

Hos 64 menn ble det utført en diagnostisk spermieuthenting fra testikkel som en del av utredningen. Hos 38 av disse ble det funnet sædceller i biopsiene. Hos 30 menn ble behandlingsforsøk startet uten diagnostisk uthenting ved vår klinikk. Av disse hadde 19 fått utført spermieuthenting ved annen klinikk utenfor Norge, seks var steriliserte fedre og fem hadde tidligere vært til intracytoplasmatisk spermieinjeksjon hvor det ble funnet spermier i ejakulatet. Hos disse fem ble injeksjonen gjort etter spermieuthenting fra testikkel enten planlagt fordi det hadde vært så få sædceller i ejakulatet at tidligere intracytoplasmatisk spermieinjeksjon ble vanskelig, eller som en siste utvei ved uven-

Hovedbudskap

- Intracytoplasmatisk spermieinjeksjon med uthenting av sædceller fra testikkelen kan hjelpe ufrivillig barnløse par der mannen har azoospermi
- Våre funn om metodens effektivitet er i samsvar med andre studier
- Vi støtter vedtaket om å forlenge midlertidig godkjenning av metoden i Norge

tet manglende sædceller i ejakulat når kvinnens egg allerede var hentet ut. Totalt er dermed 68 par tilbudt intracytoplasmatiske spermieinjeksjon med uthenting av sædceller fra testikkelen.

Intracytoplasmatiske spermieinjeksjon

Ved behandling vil man hos kvinnen stimulere eggstokkene til å modne flere egg på samme tid. Alle kvinnene i dette materialet fikk en gonadotropinfrigjørende blokade (GnRH-blokade) i form av GnRH-agonisten nafarelin nasalt fra 20. dag i foregående menstruasjonssyklus og frem til ovulasjonsinduksjon med humant koriongonadotropin (hCG) i form av hCG- α . Etter 14 dager med nedregulering på GnRH-agonist stimuleres ovariene med FSH-injeksjoner, enten follitropin- β , follitropin- α eller menotropin. Ca. 36 timer etter hCG-injeksjon blir eggene aspirert via vaginalt ultralydveiledet punksjon av folliklene. Videre oocytbehandlingen foregår etter standard metode for intracytoplasmatiske spermieinjeksjon, som beskrevet av Tanbo og medarbeidere (3).

Testikulær spermieekstraksjon

Testikkelbiopsien gjennomføres fortrinnsvis dagen før egguthenting. I løpet av det døgnet prosedyren tar, vil mange sædceller komme seg fri av sine tubuli. Dermed kan man enklere finne normalt utseende, helst bevegelige, sædceller til intracytoplasmatiske spermieinjeksjon på dagen for egguthenting.

Under sterile betingelser foretas testikkelbiopsi på følgende måte: Operasjonsfeltet vaskes sterilt. Man fikserer testikkelen manuelt. Lokalanestesi med 1,8 ml prilokain 30 mg/ml + felypressin 0,03 IU/ml (Citanest Dental Octapressin, Dentsply) settes inn i alle lag til og med tunica albuginea. Det legges et kort snitt inn til tubulært testikkelvev. Herfra tas to biopsier av 2–3 mm størrelse til umiddelbar undersøkelse og én biopsi til histopatologisk undersøkelse før hemostase og lagvis lukning.

I vårt laboratorium skylles så biopsibitene i spermie-medium (Sydney IVF Sperm Medium, Cook) Vevet dissekeres med skalpell og smal, grasil karver (Hu-Friedy Statin Steel XTS, Lic. Scandenta), og sædcellene klemmes ut av tubuli. Innholdet i skålen pipetteres over i sentrifugerør, og ekstra spermie-medium tilsettes for vask, etterfulgt av sentrifugering. Sentrifugerøret settes i inkubator over natten. Dagen etter biopsi pipetteres den øverste væsken (supernatanten) over i et nytt sentrifugerør. Etter ny sentrifugering helles medium igjen i hvert rør. Begge sedimentene (fra supernatant og fra biopsivev) sllemmes opp og pipetteres i tre dråper i lokket til en liten petriskål sammen med to polyvinylpyrrolidondråper under olje. Mest mulig normale, modne sædceller identifiseres for å kunne benyttes til intracytoplasmatiske spermieinjeksjon. Inseminasjonsprosedyre og embryobehandling videre foregår etter standard metode

Tabell 1 Resultater etter intracytoplasmatiske spermieinjeksjon med uthenting av sædceller fra testikkelen hos 60 par der mannen har azoospermi

Antall behandlinger startet	100
Antall tilbakeføringer av ett eller to ferske embryoer	82
Antall tilbakeføringer av ett eller to tinte embryoer	40
Antall kliniske graviditeter etter tilbakesetting av ferske embryoer	32
Antall kliniske graviditeter etter tilbakesetting av tinte embryoer	7

som beskrevet av Tanbo og medarbeidere (3). To dager etter egguthenting foretas tilbakeføring av ett eller to embryoer med normal celledeling (2–6 celler) (9).

Resultater

Etter utredning av 94 par er 68 par tilbudt behandling. Hos 60 par er det per 14.12. 2006 igangsatt minst én behandling med det mål å gjennomføre intracytoplasmatiske spermieinjeksjon med testikulær spermieekstraksjon. Resultatene fra behandlingen av disse parene er presentert i tabell 1. Av de åtte par som er tilbudt, men ikke gitt behandling, er det fire par som venter på behandling. For tre par er behandling ikke lenger aktuelt av annen årsak. Hos ett par der mannen tidligere hadde fått intracytoplasmatiske spermieinjeksjon med få sædceller i ejakulatet, ble spermieuthenting fra testikkel forsøkt, men man fant færre sædceller i biopsien enn i ejakulatet.

Av de 60 parene har 31 par gjennomgått én egguthenting, 19 par to egguthentinger og ti par mer enn to egguthentinger. Dermed utgjør materialet totalt 100 behandlingsforsøk startet med tanke på intracytoplasmatiske spermieinjeksjon med uthenting av sædceller fra testikkel. Fra disse oppnådde man 82 tilbakeføringer av ferske embryoer. Sju av stimuleringsene ble stoppet på grunn av lav ovarial respons, i seks behandlingsforsøk ble det ikke utviklet normale embryoer og i tre ble det ikke funnet sædceller som kunne brukes. I to tilfeller ble alle embryoene fryst. Dette skjedde på grunn av fare for ovarialt hyperstimuleringsyndrom hos kvinnen, noe som gjør tilbakeføring av embryo kontraindisert.

Totalt ble 898 oocytter injisert med sædceller hentet ut fra testikkel. 98 % av disse var oocytter i metafase 2. Av de 898 ble 548 normalt befruktet (61 %). Det var 434 embryoer som utviklet seg normalt til dag 2 etter injeksjonen og dermed enten kunne fryses eller brukes til tilbakeføring av ferske embryoer. Av de 82 tilbakeføringene av ferske embryoer ble det ved 58 satt tilbake to embryoer og ved 24 satt tilbake ett embryo. Av disse 24 var 15 et resultat av elektiv tilbakesetting av ett embryo i henhold til anbefalinger fra European Society of Human Reproduction and Embryology (10).

Etter de 82 tilbakeføringene av ferske embryoer oppstod det 32 (39 %) kliniske graviditeter, definert som ultralydpåviselig intrauterint foster med hjerteaksjon ved sju-åtte ukers graviditet. Videre er det foretatt

tilbakeføring av tinte embryoer ved 40 anledninger på 22 kvinner. Dette har medført ytterligere sju (18 %) kliniske graviditeter.

Totalt fra de 93 behandlingene med uthenting av egg ble det 39 kliniske graviditeter (42 %). 60 par har startet minst én behandling, og 35 av disse ble gravide minst én gang (58 %). Dessuten har flere av parene fortsatt frosne embryoer oppbevart. Fra de 39 graviditetene er det blitt 15 fødsler, fire av disse tvillinger, slik at det er født 19 barn. Ni av graviditetene har endt i tidlig abort etter påvist klinisk graviditet (23 %), og 15 er pågående kliniske graviditeter. Det er ikke registrert misdannelser i fødselsperioden på noen av barna født etter intracytoplasmatiske spermieinjeksjon med testikulær spermieekstraksjon ved vår klinikk.

Diskusjon

Ved bruk av operative prosedyrer for uthenting av sædceller fra testikkelen hos par hvor mannen har azoospermi, kan man hjelpe ufrivillig barnløse par som tidligere ikke har hatt noe behandlingsalternativ. I forbindelse med endring av bioteknologiloven i 2004 fikk man en midlertidig godkjenning til å utføre denne type behandling. Nylig er den midlertidige godkjenningen vedtatt forlenget, og våre funn støtter dette vedtaket.

Ved vår klinikk er graviditetsraten for intracytoplasmatiske injeksjon med testikulær spermieekstraksjon per behandlingsforsøk og per par sammenliknbar med resultatene for in vitro-fertilisering og intracytoplasmatiske injeksjon med ejakulerte spermier. Andel kliniske graviditeter per tilbakeføring av ferskt embryo hos oss i samme tidsrom er 35 % ved in vitro-fertilisering og 32 % ved intracytoplasmatiske spermieinjeksjon. Våre resultater med injeksjon etter testikulær spermieekstraksjon er også i samsvar med funn ved andre anerkjente internasjonale klinikker (11, 12).

Vi har valgt å gjøre uthenting av testikulære sædceller som en åpen biopsi. Dette mener vi gir større sjanse for å få nok normale sædceller til befruktning. Ved mange andre klinikker, også i Norge, benyttes enten perkutan nålebiopsi eller stansebiopsi (13). En metaanalyse konkluderer med at man ikke har nok data til sikkert å kunne anbefale én metode fremfor andre, men at det vil være logisk å benytte den minst invasive teknikken (14). Wood og medarbeidere har studert testikulær spermieekstraksjon og perkutan epididymal spermieaspirasjon (percutaneous epididymal sperm aspiration, PESA) i

full narkose og finner at det er flere små komplikasjoner og større postoperativ smerte involvert med testikulær spermieekstraksjon, men at pasienttilfredsheten er den samme ved de to metodene (15). Vi utfører sædcelleuthenting fra testikkel poliklinisk i lokalbedøvelse. Av komplikasjoner har vi ved de over 100 testikkelbiopsiene vi har utført, hatt fem tilfeller av postoperativt hematom. I ett av disse tilfellene tilkom også infeksjon med abscess som måtte incideres.

Denne studien er for liten til å kunne vurdere økt hyppighet av medfødte misdannelser hos barn født etter intracytoplasmatiske spermieinjeksjoner med testikulær sædeks-traksjon. Hos de 19 barna i dette materialet er det ikke påvist noen misdannelser ved fødselen. Teoretisk kan man se for seg en økt risiko for misdannelser, blant annet da umodne spermier viser en økt tendens til aneuploidi (16). Imidlertid konkluderer en nylig publisert rapport fra Nasjonalt kunnskapssenter for helsetjenesten med at metoden ikke gir noen økt tendens til medfødte misdannelser samlet sett (17). Forfatterne av rapporten bemerker allikevel at det er behov for videre studier med oppfølgingsdata på barn født etter denne behandlingsformen.

Uansett er det viktig å utrede menn med azoospermi for genetiske avvik som beskrevet over. Større materialer vil kunne gi oss indikasjoner på om det finnes tilstander vi bør unnlate å behandle. I dette materialet har vi funnet 23 % aborter. En så vidt høy andel aborter var uventet, men er i overensstemmelse med funn fra andre studier (18). I fremtiden bør abortene undersøkes genetisk.

Vi har sett en tendens til at det er diskrepans mellom muligheten til å finne sædceller i prøven ved testikulær spermieekstraksjon og den histopatologiske diagnosen som stilles. Dette vil bli undersøkt i en senere studie.

Behandlingen kan forbedres ved at klinikker fryser ned sædceller etter testikulær spermieekstraksjon og med det unngår behandlingsforsøk uten befruktning (11, 19). Opptining av nedfrosne sædceller vil også kunne gi flere behandlingsforsøk per gjennomførte sædcelleuthenting fra testikkel.

Konklusjon

Hos ufrivillig barnløse par der mannen har azoospermi, synes intracytoplasmatiske spermieinjeksjoner med uthenting av sædceller fra testikkelen å være en effektiv metode for å hjelpe parene til å bli genetiske foreldre. Resultatene er like gode som ved andre metoder for assistert befruktning. I vårt begrensede materiale finner vi at barna født etter bruk av denne behandlingsformen er uten misdannelser. Våre funn støtter vedtaket om å forlenge den midlertidige godkjenningen av metoden i Norge.

Litteratur

1. Kahn JA, Sunde A, Lundmo P et al. De første barna i Norge etter in vitro- fertilisering. Tidsskr Nor Lægeforen 1985; 105: 565–7.
2. Palermo G, Joris H, Devroey P et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17–8.
3. Tanbo T, Kjekshus E, Dale PO et al. Intracytoplasmatiske spermieinjeksjoner. Tidsskr Nor Lægeforen 1998; 118: 864–9.
4. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA et al. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. J In Vitro Fert Embryo Transf 1985; 2: 119–22.
5. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M et al. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. Lancet 1993; 342: 1237.
6. Devroey P, Liu J, Nagy Z et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 1995; 10: 1457–60.
7. Lov 2003–12–05 nr. 100: Lov om humanmedisinsk bruk av bioteknologi m.m (bioteknologiloven).
8. Sosial- og helsedirektoratet. MESA/PESA/TESA som metode i assistert befruktning. Brev 16.4.2004. www.shdir.no/vp/multimedia/archive/00004/MESA-PESA-TESA_4036a.doc [5.6.2007].

9. Kahn JA, von Düring V, Sunde A et al. The efficacy and efficiency of an in-vitro fertilization programme including embryo cryopreservation: a cohort study. Hum Reprod 1993; 8: 247–52.
10. Land JA, Evers JK. Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting. Hum Reprod 2003; 18: 445–57.
11. Vernaev V, Tournaye H, Osmanoglu K et al. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. Fertil Steril 2003; 79: 529–33.
12. Habermann H, Seo R, Cieslak J et al. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. Fertil Steril 2000; 73: 955–60.
13. Ekerhovd E. Infertilitetsbehandling av menn med azoospermi. Tidsskr Nor Lægeforen 2006; 126: 1598–601.
14. Van Peperstraten A, Proctor ML, Johnson NP et al. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to ICSI for azoospermia. Cochrane Database Syst Rev 2006; CD002807.
15. Wood S, Thomas K, Septhorn V et al. Postoperative pain, complications, and satisfaction rates in patients who undergo surgical sperm retrieval. Fertil Steril 2003; 79: 56–62.
16. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I et al. Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2001; 76: 479–84.
17. Holte TO, Hofman B, Lie RT et al. Mannlig infertilitet: Intracytoplasmatiske spermieinjeksjoner (ICSI) med spermier uthentet fra bitestikkel eller testikkel. Rapport nr. 7/2007. Oslo: Nasjonalt kunnskapssenter for helsetjenesten, 2007.
18. Buffat C, Patrat C, Merlet F et al. ICSI outcomes in obstructive azoospermia: influence of the origin of surgically retrieved spermatozoa and the cause of obstruction. Hum Reprod 2006; 2: 1018–24.
19. Nagy Z, Liu J, Cecile J et al. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1995; 63: 808–15.

Manuskriptet ble mottatt 31.1. 2007 og godkjent 5.6. 2007. Medisinsk redaktør Trine B. Haugen.