

Infertilitetsbehandling av menn med azoospermi

Sammendrag

Bakgrunn. Behandling av ufrivillig barnløse der det påvises azoospermi, er et nytt medisinsk område i Norge. De operative metodene for å påvise sædceller er lite kjent. Målsettingen med artikkelen er å gi en oversikt over årsakene til azoospermi, beskrive de operative metodene og samtidig drøfte viktige sider ved behandlingen.

Materiale og metode. Artikkelen er basert på søk i PubMed/Medline i tillegg til mer enn ti års erfaring i utredning og behandling av denne pasientgruppen.

Resultater. Blodprøver kan indikere hvilken type azoospermi som foreligger. For påvisning av en eventuell sædcelleproduksjon er kirurgisk uthenting av testikkelvev eller sædvæske nødvendig. Har man først ved utredningen påvist sædceller, er sjansen stor for at man finner sædceller ved den etterfølgende in vitro-fertiliseringsbehandlingen.

Fortolkning. Ved påvisning av azoospermi bør paret kunne diskutere med sin lege hvorfor det ikke var sædceller i ejakulatet, muligheten for videre utredning og behandling, og hvor stor sjansen er for å finne sædceller ved en videre utredning. En forutsetning for å kunne gi adekvate svar er at legen er oppdatert på området. Dessuten må et behandlingsopplegg for videre utredning og behandling være etablert, slik at paret får den hjelp de har krav på.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Erling Ekerhovd*

erling.ekerhovd@obgyn.gu.se
Kvinneklinikken
Førde Sentralsjukehus
6807 Førde

* Nåværende adresse:
Enheten for reproduksjonsmedisin
Kvinneklinikken
Sahlgrenska Universitetssjukhuset
SE-413 45 Göteborg

Azoospermi innebærer at det ikke finnes sædceller i ejakulatet i minst to sædprøver (1). Tilstanden foreligger hos cirka 1 % av alle menn og påvises hos 10–15 % av alle menn med infertilitetsproblemer (2). Bioteknologiloven fra 2004 medfører at ufrivillig barnløse der det diagnostiseres azoospermi har de samme rettighetene til utredning og behandling som andre pasientgrupper. For at den medisinske behandlingen skal bli optimal, må leger og annet helsepersonell som kommer i kontakt med denne pasientgruppen tilegne seg nødvendig kompetanse. For fastleger innebærer bioteknologiloven at ved påvisning av azoospermi bør resultatet av sædprøven diskuteres med paret, samtidig som paret får informasjon om mulighetene for videre utredning og behandling. Det bør finnes et strukturert samarbeid mellom fastlege og lege med spesialkompetanse på infertilitetsbehandling. Nasjonale retningslinjer for utredning og behandling av ufrivillig barnløse der det er påvist azoospermi foreligger ikke. Målet med denne artikkelen er å gi en oversikt over årsaker til azoospermi, forklare hvordan utredning og behandling av denne pasientgruppen kan utføres og samtidig drøfte spesielle behandlingsstrategier hos visse pasientgrupper med azoospermi.

Årsaker

Azoospermi kan ha en pretestikulær, testikulær eller posttestikulær årsak (fig 1). Posttestikulær azoospermi kan videre deles inn obstruktiv og dysfunksjonell type. Hos den sistnevnte gruppen foreligger ofte ikke noe ejakulat (aspermi), noe som blant annet kan skyldes retrograd ejakulasjon eller ejakulasjonssvikt.

Ved pretestikulær azoospermi er det typisk at det foreligger en hypogonadotrop hypogonadisme der det er en utilstrekkelig utskilling av gonadotropinfrigjørende hormon (GnRH) fra hypothalamus eller gona-

dotropiner fra hypofysen. Menn med pretestikulær azoospermi har meget lavt serumnivå av folikkelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH), samtidig som også konsentrasjonen av testosteron er lav. Medisinsk behandling med en GnRH-analog eller et gonadotropinpreparat vil vanligvis forbedre sæd kvaliteten hos disse mennene.

Hos menn med testikulær azoospermi, også kalt ikke-obstruktiv azoospermi, er det typisk at det foreligger en hypergonadotrop hypogonadisme der det er en svært lav eller ingen produksjon av sædceller. En eventuell sædcelleproduksjon vil være for liten til at det kommer med sædceller i ejakulatet. Histologisk undersøkelse av testikkelvevet vil vise enten aplasi av germinalcellene (Sertoli cell only syndrome), defekt utvikling til modne sædceller (maturation arrest) eller sklerose/atrofi av testikkeltubuli. Ved samtlige av disse diagnosene kan det foreligge fokal spermatogenese.

En viktig årsak til testikulær azoospermi er testikkelretensjon som forekommer hos 3–5 % av alle nyfødte guttebarn og som kan forklare årsaken til azoospermi hos omtrent 20 % av alle menn hos hvem det ikke påvises sædceller i ejakulatet. Forklaringen er at germinalcellene er svært følsomme for temperatur, og at de derfor dør om testiklene ikke kommer ned i scrotum. Infertilitet forekommer hos cirka 50 % av menn med unilateral testikkelretensjon og hos hele 75 % av menn med bilateral testikkelretensjon. Det faktum at azoospermi ofte forekommer selv etter en unilateral testikkelretensjon kan tale for at det kan finnes en medfødt eller en immunologisk årsak til tilstanden (3). Det er også viktig å merke seg at risikoen for testikkelkreft hos denne gruppen menn er 5–10 ganger så stor som i normalpopulasjonen og at



Hovedbudskap

- Ved påvisning av azoospermi har nå ufrivillig barnløse par rett til videre utredning og behandling med henblikk på å få egne biologiske barn
- Leger som rekvirerer sædprøve bør kjenne til de operative metodene for videre utredning og behandling dersom azoospermi påvises
- En behandlingsstrategi for denne pasientgruppen bør utarbeides

cancer in situ er blitt påvist hos 2–4 % av menn med testikkelretensjon. Ved ubehandlet cancer in situ er risikoen for progrediering til testikkelkreft innen fem år beregnet til å være cirka 50 % (4).

Av menn som rammes av postpubertal parotitt inntreffer en samtidig orkitt hos cirka 25 %, noe som vil kunne skade germinalepitetelet i så stor grad at azoospermi blir resultatet.

Ulike kromosomavvik forekommer hos 8–14 % av alle menn med testikulær azoospermi, sammenliknet med mindre enn 1 % i normalpopulasjonen. Den mest vanlige varianten i denne gruppen er Klinefelters syndrom (47,XXY). I tillegg er flere mikrodelesjoner på mannens Y-kromosom relatert til azoospermi. Dette skyldes at et spesielt område på Y-kromosomets lange arm inneholder gener som er nødvendige for normal spermatogenese.

Testikkelkirurgi, strålebehandling eller cytostatikabehandling kan alle resultere i azoospermi. Det er derfor viktig at menn der slik behandling er planlagt får informasjon om mulighetene til å fryse ned sæd innen behandlingen starter. Azoospermi kan være et uttrykk for testikkelkreft. Dersom det foreligger testikkelkreft og sædceller bare påvises i vevsprøver fra den testikkelen der det foreligger kreft, bør det vurderes om man kan bruke disse ved en eventuell fremtidig infertilitetsbehandling (5).

Menn med posttestikulær azoospermi er normogonadotrope og har normal produksjon av sædceller. Ved obstruktiv posttestikulær azoospermi foreligger et medfødt eller ervervet hinder på veien fra testiklene slik at sædcellene ikke blir med i ejakulatet. Et eksempel her er cystisk fibrose der det hos menn med sykdommen foreligger medfødt bilateralt fravær av normale sædledere (congenital bilateral absence of the vas deferens, CBAVD). Mutasjoner av cystisk fibrose-genet forekommer også ved isolert bilateralt fravær av normale sædledere, noe som innebærer at utvidet genetisk screening i disse tilfellene må utføres før en eventuell fertilitetsbehandling starter. Et annet eksempel på obstruktiv azoospermi er tilstanden som oppstår etter sterilisering med vasektomi.

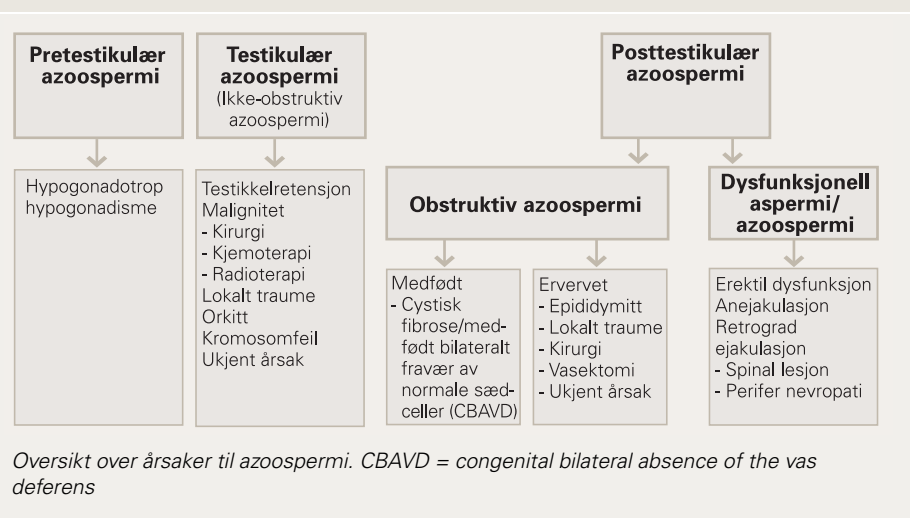
Ved retrograd ejakulasjon vil det finnes spermier i urinen. Menn med retrograd ejakulasjon vil kunne behandles medikamentelt med psevdofedrin/deksbromfeniramin tablett (Disofrol, Schering-Plough). Medikamentet kan fås på registreringsfritak.

Preoperativ utredning

Viktige mål med utredningen er å diagnostisere hvilken type azoospermi som foreligger, for så å undersøke om det finnes sædceller slik at in vitro-fertilisering med mikroinjeksjon (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) kan utføres og videre å vurdere eventuelle risikoaspekter ved en slik behandling.

Anamnesen gir ofte informasjon om mulig etiologi. Områder som her bør avklares er

Figur 1



tidligere genitale operasjoner eller traumer, seksuelt overførte infeksjoner, misbruk av anabole steroider og eventuell seksuell dysfunksjon.

Den kliniske undersøkelsen starter med en vurdering av kroppsbygning der man ser på mannens høyde og vekt, i tillegg til skjeggvekst, kroppsbe håring og sekundære kjønns karakteristika. Man undersøker deretter genitalia, hvor testiklene, bitestiklene og sædlederne lokaliseres og deres konsistens og størrelse bestemmes. Med normal testikkelstørrelse anses et volum på minst 15 ml. Testikkelvolum kan enkelt måles ved bruk av ultralyd. Skrotal ultralyd inngår som en naturlig del av den kliniske undersøkelsen. Man kan derved blant annet vurdere testikkelvevets ekkogenisitet, påvise godartede forandringer som varikocoele, hydrocele og spermatocele eller malignitet som testikkelkreft. Ved ultralydundersøkelse vil det normale testikkelvevet være homogent og uten hyperekkogene foci, mens et heterogent parenkym med hyperekkogene foci er uttrykk for dysfunksjon (6).

Serumnivå av FSH, LH og testosteron kan gi informasjon om hvilken type azoospermi som foreligger. Kromosomanalyse bør rutinemessig utføres ved azoospermi. Andre prøver, som for eksempel prolaktin og deleksjonsanalyse av Y-kromosom, utføres også ved enkelte klinikker etter medisinsk vurdering i hvert enkelt tilfelle.

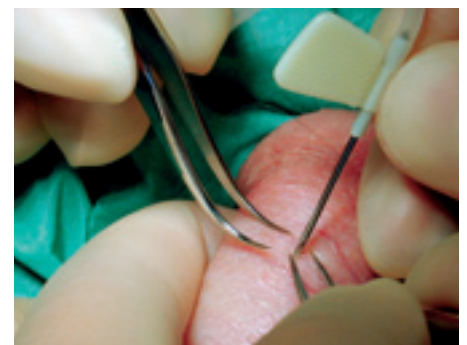
Operativ utredning

Den første beskrevne operative metoden for uthenting av sædceller var mikrokirurgisk epididymal spermieaspirasjon (microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA), som er en invasiv mikrokirurgisk operasjonsmetode der man frilegger bitestiklene før man aspirerer sædvæske. Metoden benyttes sjelden i dag.

Samtlige operasjonsmetoder som i dag anvendes for å påvise sædceller ved azoospermi, utføres poliklinisk i lokalbedøvelse

(funikkelblokkade) med lidokain/bupivakain. I de fleste tilfellene gis en intravenøs injeksjon med alfentanil før man setter lokalbedøvelsen. Som postoperativ smertelindring anvendes oftest paracetamol tablett.

Testikulær spermieaspirasjon (testicular sperm aspiration, TESA) benyttes for å få påvise testikulære spermier og brukes først og fremst ved testikulær (ikke-obstruktiv) azoospermi. Man går inn i testikkelvevet med en sommerfuglnål (butterfly) som via en tynn plastslange er knyttet til en 20 ml sprøyte (fig 2). Ved å dra opp sprøyten etableres et undertrykk. Man beveger så sommerfuglnålen opp og ned i testikkelen hvorved testikkeltubuli aspireres inn i nålen. Når man så forsiktig drar ut nålen fra testikkelen, griper man fatt i aspirert materiale med et par pinsetter. Hver testikkel punkteres vanligvis på 5–6 forskjellige steder. Det aspirerte vevet legges umiddelbart i et dyrkingsmedium. Deretter undersøker man ved hjelp av mikroskopi om vevet inneholder sædceller. I tillegg sendes vev rutinemessig til histologisk undersøkelse.



Figur 2 Testikulær spermieaspirasjon (testicular sperm aspiration, TESA). Testikkelvevet aspireres til en sommerfuglnål (butterfly) ved at det etableres et undertrykk. Et par pinsetter benyttes for å gripe fatt i det aspirerte vevet. Metoden brukes ved testikulær azoospermi for å undersøke om det foreligger fokal spermatogenese



Figur 3 Perkutan nålebiopsi for uthenting av testikkelvev ved azoospermi. Ved bruk av en biopsinål får man ut testikkelvev om så undersøkes for forekomst av fokal spermatogenese. Metoden benyttes ved testikulær azoospermi, spesielt om man ikke har lyktes å få ut tilstrekkelig med vev ved testikulær spermieaspirasjon



Figur 4 Perkutan spermieaspirasjon (percutaneous sperm aspiration, PESA). Sædvæske fra bitestikkelen aspireres ved hjelp av en butterfly-nål. Metoden benyttes ved obstruktiv azoospermi



Figur 5 Testikulær spermieekstraksjon (testicular sperm extraction, TESE). Ved en åpen operasjon hentes testikkelvev for undersøkelse av eventuell fokal spermatogenese. Metoden brukes ved testikulær azoospermi, spesielt dersom man ikke har klart å finne sædceller ved TESA eller ved bruk av perkutan nålebiopsi

Dersom man ikke får tilstrekkelig materiale ved tradisjonell testikulær spermieaspirasjon (TESA), kan perkutan nålebiopsi utføres (fig 3). Ved denne metoden benyttes en biopsinål for å få tak i vev fra ulike deler av testiklene.

En spesiell variant av metoden er testikulær finnålsaspirasjon (testicular fine needle aspiration, TEFNA) som benyttes ved obstruktiv azoospermi (7). Man stikker her med en sommerfuglnål inn i testikkelen og holder nålen deretter stille mens man med 5–15 dragninger i sprøyten aspirerer væske fra testikkelen. Væsken blir så undersøkt ved hjelp av mikroskopi for å se om den inneholder sædceller.

Perkutan spermieaspirasjon (percutaneous sperm aspiration, PESA) brukes bare ved obstruktiv azoospermi (fig 4). Ved hjelp av en tynn sommerfuglnål punkteres bitestikkelen og undertrykk etableres på samme måte som ved tradisjonell testikulær spermieaspirasjon. Ved forsiktig bevegelse av nålen lokaliseres væskeinnholdet i bitestikkelen som på grunn av undertrykket aspireres. Eventuelle sædceller i den aspirerte væsken vil umiddelbart kunne påvises ved mikroskopi. Denne metoden har mange steder i stor grad erstattet mikrokirurgisk refertilisering hos menn som tidligere er blitt sterilisert med vasektomi.

Ved testikulær spermieekstraksjon (testicular sperm extraction, TESE) utføres en åpen operasjon for å få tak i testikkelvev (fig 5). Metoden anvendes vanligvis om man ikke har lyktes å finne sædceller ved de tidligere beskrevne mindre invasive metodene ved testikulær azoospermi. Den er dessuten et førstevalg for å påvise sædceller om testiklene er svært små (< 10 ml). Testikkelvev bør også her rutinemessig sendes til histologisk undersøkelse.

Mikrokirurgisk testikulær spermieekstraksjon er en videreutvikling av tradisjonell testikulær spermieekstraksjon der man blottlegger store deler av testikkelvevet (8). Man lokaliserer her ved hjelp av mikrodilatasjon dilaterte tubuli, der det er størst sjanse for fokal produksjon av sædceller, for så deretter å ta rettede biopsier.

Infertilitetsbehandling

Dersom man ved utredningen finner modne sædceller, vil in vitro-fertilisering med mikroinjeksjon kunne gjennomføres på et senere tidspunkt. Ved testikulær azoospermi får man vanligvis ut for få sædceller til at man kan fryse ned et tilstrekkelig antall i påvente av behandlingen. Har man først påvist produksjon av sædceller, er sjansen stor for at man også finner tilstrekkelig med sædceller ved en ny operasjon (9, 10).

Dersom man lykkes med å påvise sædceller ved diagnostisk testikulær spermieaspirasjon, kan ny operativ uthenting av sædceller i forbindelse med in vitro-fertilisering utføres bare noen uker senere. Dette skyldes at den postoperative normaliseringen av testik-

kelvevet etter testikulær spermieaspirasjon inntreffer raskt (6). Etter diagnostisk testikulær spermieekstraksjon anbefales det derimot at det skal gå minst seks måneder mellom operasjonene for at det skal bli minimalt med postoperativ intratestikulær arrdanning (11). Ingen av de operative metodene har vist seg å ha ugunstig effekt på hormonproduksjon, testikkelvolum eller danningen av antistoffer mot sædcellene.

Sjansen for å finne sædceller ved obstruktiv azoospermi er i prinsipp 100 % da det her foreligger en normal spermatogenese. Implantasjonsfrekvensen ved obstruktiv azoospermi er den samme som ved mikroinjeksjon med ejakulerte sædceller. Når det gjelder testikulær azoospermi, finner man ved den operative utredningen modne sædceller i 20–60 % av tilfellene.

Flere studier er utført med henblikk på å finne tester som kan bekrefte tilstedeværelse av fokal spermatogenese slik at man kunne unngå diagnostiske operasjoner (12). Mulig prediktive tester for produksjon av sædceller som er blitt undersøkt, er blant annet serumnivå av FSH, testosteron og inhibin B og testikkelvolum i tillegg til skrotal ultralyddoppfølgerundersøkelse. Et par studier indikerte at et visst serumnivå av inhibin B var predikativt for sædcelleproduksjon (13, 14). Dette ble senere avkreftet ved at man blant annet ved testikulær spermieekstraksjon påviste fokal spermatogenese på tross av at serumnivået av inhibin B var for lavt til at det kunne måles (15–17). En annen studie indikerte at påvisning av intratestikulære arterier ved hjelp av ultralyddoppfølgerundersøkelse talte for spermatogenese i tilsvarende området og at ingen tegn til intratestikulær arterier var et uttrykk for manglende spermatogenese (18). Min erfaring er likevel at man alltid kan påvise intratestikulære blodkar og at påvisningen av disse først og fremst er avhengig av at man har tilgang til moderne ultralyddapparat (19).

Klinefelters syndrom forekommer hos cirka en av 600 nyfødte guttebarn. Hos omtrent 80 % av disse foreligger ikke-mosaikk karyotype (47,XXY). Menn med ikke-mosaikk Klinefelters syndrom ble tidligere betraktet som uhelbredelig sterile. Nesten 10 % av alle menn med azoospermi viser seg å ha denne karyotypen (20). Skrotal ultralydundersøkelse av menn med Klinefelters syndrom viser økt testikulær ekkogenisitet og redusert intratestikulær blodgjennomstrømming (19, 21). De små testiklene (1–8 ml) representerer en behandlingsmessig utfordring. For å påvise spermatogenese ved Klinefelters syndrom bør man velge testikulær spermieekstraksjon som operasjonsmetode. Ettersom testosteron blokkerer spermatogenesisen, anbefales det at disse mennene er uten testosteronsubstitusjon i minst fire måneder før testikulær spermieekstraksjon utføres (22). Frem til 2003 fantes 13 publikasjoner som beskrev totalt 36 barn som var blitt født etter in vitro-fertilisering med mi-

kroinjeksjon med testikulære spermier der den biologisk faren hadde ikke-mosaikk Klinefelters syndrom (17). Alle barna var genetisk friske.

Ved testikulær azoospermi er sjansen for graviditet og fødsel cirka 65% av hva man normalt oppnår når mikroinjeksjon utføres med ejakulerte sædceller (23). Dette skyldes en lavere implantasjonsrate som igjen er et uttrykk for at sædcelle kvaliteten er redusert, på tross av at man oppnår normal befruktning og celledeling av eggene. En forklaring til den noe lavere implantasjonsraten er en økt forekomst av kromosomal aneuploiditet hos disse sædcellene.

Det må også understrekes at selv om man initialt i infertilitetsutredningen påviser azoospermi hos mannen, bør den basale utredningen av kvinnen fortsette. Målet med enhver utredning er ikke å påvise årsaken til infertiliteten, men at kvinnen oppnår graviditet og paret opplever fødsel av et friskt barn. Som for alle ufrivillig barnløse kvinner bør infertilitetsutredningen skje etter moderne prinsipper. Det betyr at den gjennomføres i løpet av en kort tidsperiode med minimal anvendelse av invasive metoder (24). En utsettelse av utredningen av kvinnen vil fra et fertilitetssynspunkt være ugunstig. Påviser man først sædceller, er kvinnens alder den viktigste prognostiske faktoren for å oppnå graviditet og fødsel av et friskt barn (25, 26).

Bioteknologiloven utgjør det juridiske grunnlaget for at par som er ufrivillig barnløse på grunn av azoospermi kan få hjelp. Det er opp til helseforetakene å etablere det medisinske tilbudet.

Manuskriptet ble godkjent 7.4. 2006.

Jeg takker dr.med. Göran Westlander, Kvinne-klinikken, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Göteborg, for kommentarer under utarbeidningen av manuskriptet.

Litteratur

1. WHO. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
2. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002; 77: 873–82.
3. Foresta C, Ferlin A, Garolla A et al. Functional and cytological features of the contralateral testis in cryptorchidism. *Fertil Steril* 1996; 66: 624–9.
4. Dieckmann KP, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *Int J Cancer* 1999; 83: 815–22.
5. Ekerhovd E, Westlander G. Birth of a healthy child achieved by frozen thawed spermatozoa extracted at orchidectomy due to testicular seminoma in a male with nonobstructive azoospermia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 505–6.
6. Westlander G, Ekerhovd E, Granberg S et al. Serial ultrasonography, hormonal profile and anti-sperm antibody response after testicular sperm aspiration. *Hum Reprod* 2001; 12: 2621–7.
7. Tournaye H, Clasen K, Aytoz A et al. Fine needle aspiration versus open biopsy for testicular sperm recovery: a controlled study in azoospermic patients with normal spermatogenesis. *Hum Reprod* 1998; 13: 901–4.
8. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999; 14: 131–5.
9. Westlander G, Hamberger L, Hanson C et al. Diagnostic epididymal and testicular sperm recovery and genetic aspects in azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14: 118–22.
10. Westlander G, Rosenlund B, Søderlund B et al. Sperm retrieval, fertilization, and pregnancy outcome in repeated testicular sperm aspiration. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 171–7.
11. Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997; 12: 1688–92.
12. Tournaye H, Verheyen G, Nagy P et al. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum Reprod* 1997; 12: 80–8.
13. Pierik FH, Vreeburg JTM, Stijnen T et al. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3110–4.
14. Ballescá JL, Balasch J, Calafell JM et al. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azospermia. *Hum Reprod* 2000; 8: 1734–8.
15. Vernaev V, Tournaye H, Schiettecatte J et al. Serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17: 971–6.
16. Westlander G, Ekerhovd E, Bergh C. Low levels of serum inhibin B do not exclude successful sperm recovery in men with nonmosaic Klinefelter syndrome. *Fertil Steril* 2003; 79 (suppl 3): 1680–2.
17. Vernaev V, Staessen C, Verheyen G et al. Can biological or clinical parameters predict testicular sperm recovery in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients? *Hum Reprod* 2004; 19: 1135–9.
18. Foresta C, Garolla A, Bettella A et al. Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Hum Reprod* 1998; 13: 3090–3.
19. Westlander G, Ekerhovd E, Granberg S et al. Testicular ultrasonography and extended chromosome analysis in men with nonmosaic Klinefelter syndrome: a prospective study of possible predictive factors for successful sperm recovery. *Fertil Steril* 2001; 75: 1102–5.
20. Nieschlag E, Behre HM, Meshede D et al. Disorders at the testicular level. I: Nieschlag E, Behre HM, red. *Andrology: male reproductive health and dysfunction*. Heidelberg: Springer, 2000: 133–59.
21. Ekerhovd E, Westlander G. Testicular sonography in men with Klinefelter syndrome shows irregular echogenicity and blood flow of high resistance. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 517–22.
22. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ et al. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *J Androl* 2002; 23: 149–62.
23. Vernaev V, Tournaye H, Osmanagaoglu 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.
24. Ekerhovd E, Fried G, Granberg S. An ultrasound-based approach to the assessment of infertility, including the evaluation of tubal patency. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 13–28.
25. Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P et al. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 2000; 320: 1708–12.
26. Baird DT, Collins J, Egocue J et al. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 261–76.