

Sædkvalitet og alder

*Utvikling i utvalgte sædparametre ved
økende alder*

Charlotte Fleischer og Sunniva Sagsveen



Prosjektoppgave ved det medisinske fakultet
UNIVERSITETET I OSLO
10/01-2013

© Charlotte Fleischer og Sunniva Sagsveen

2013

Sædkvalitet og alder - utvikling i utvalgte sædparametre ved økende alder

<http://www.duo.uio.no/>

Abstract

Until recently, research concerning fertility and ageing has mainly been focused upon the female reproductive system. Reproductive ageing in the male is a less explored field, but increasing evidence suggests that paternal age is highly relevant to a couple's fertility and the outcome of pregnancy. Studies have linked increased paternal age to longer time-to-pregnancy, more frequent spontaneous abortions and increased risk of certain diseases in the offspring, such as schizophrenia. The effects of male reproductive ageing are also getting more important, as the age of fathers-to-be is rising in our society. The aim of our study was to investigate the relationship between age and the sperm parameters DNA-fragmentation, DNA-stain-ability and rapid progressive motile spermatozoa. The population was 9835 men undergoing infertility evaluation at Rikshospitalet in the period 2004-2011. DNA-fragmentation and rapid progressive motile spermatozoa were found to decline significantly with increasing age, while DNA-stain-ability was significantly rising. The analysis also suggests a more rapid change in DNA-fragmentation after the age of 45 years, which might be indicative of acceleration in male reproductive ageing with similarities to that found in women. This is an interesting finding and in accordance with some theories about ageing in general. Our study concludes that there is a relationship between paternal age and selected sperm parameters, but more research is needed to evaluate the mechanisms behind male reproductive ageing and its clinical consequences.

Forord

Problemstilling

Er det sammenheng mellom mannens alder og sædkvalitet, herunder graden av spermienes raskt progressive motilitet, DNA-fragmentering og DNA-fargeopptak?

Omfang og bakgrunn

Denne oppgaven undersøker sammenhengen mellom ulike sædparametre og mannens alder. De aktuelle parametrene er DNA-fragmentering, DNA-fargeopptak og raskt progressive motile spermier. Analysene er gjennomført på et materiale fra Seksjon for barnløshet og assistert befruktning på Rikshospitalet. Resultatene drøftes og sammenlignes med tidligere forskning på området.

Vi valgte å skrive en oppgave relatert til ufrivillig barnløshet fordi det var et tema som engasjerte oss begge. Dessuten er det et problem som rammer flere enn det mange tror og som de fleste kommer borti, både som lege og privatperson. Da vi kontaktet Seksjon for barnløshet og assistert befruktning, ble vi raskt fascinert av det store datamaterialet som var tilgjengelig for analyse. Vi ble av veileder tipset om at reproduktiv aldring hos menn var et felt som var ”i vinden” og at det var vesentlig mindre forsket på enn tilsvarende hos kvinner. Derfor bestemte vi oss for å se på sammenhengen mellom DNA-fragmentering i spermier og alder. Etter hvert som vi arbeidet med oppgaven, så vi at vi med fordel kunne inkludere flere parametre. Vi valgte derfor ut DNA-fargeopptak og raskt progressive motile spermier som ekstra parametre.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Mannlig subfertilitet og aldring.....	1
1.1.1	Aldringsprosessen hos mennesker.....	1
1.1.2	Reproduktiv aldring.....	1
1.1.3	Mannlig subfertilitet: Årsaker og omfang.....	4
1.2	Spermatogenesisen.....	4
1.3	Sædanalysens kliniske betydning.....	5
1.3.1	Spermiekonsentrasjon og totalt antall spermier.....	6
1.3.2	Spermiemotilitet.....	6
1.3.3	Spermiemorfologi.....	6
1.3.4	pH.....	6
1.3.5	Antistoffanalyser.....	6
1.4	Spermie-DNA.....	7
1.4.1	Metoder for måling av DNA-skade i spermier.....	7
1.4.2	Betydningen av skade på spermie-DNA.....	7
1.5	Rask progressive motile spermier.....	9
1.5.1	Analyse og vurdering av motilitet.....	9
1.5.2	Betydning av raskt progressivt motile spermier.....	9
2	Metode.....	11
2.1	Populasjon.....	11
2.2	Laboratorieprosedyrer.....	11
2.2.1	Sædprøvetaking.....	11
2.2.2	Spermiemotilitet.....	12
2.2.3	Spermiekromatinstruktur assay (SCSA).....	13
2.3	Statistikk.....	13
3	Resultater.....	15
3.1	DNA-fragmentering.....	15
3.2	DNA-fargeopptak.....	18
3.3	Normal-DNA.....	18
3.4	Raskt progressive motile spermier.....	21
4	Resultatdiskusjon.....	24

5	Referanser.....	29
---	-----------------	----

Figur 1: Intraindividuell variasjon i spermieantall og konsentrasjon (28).....	5
Figur 2: Antall menn i hver aldersgruppe (år) ved sædprøve	11
Figur 3: DNA-fragmentering og alder.	15
Figur 4: DNA-fragmentering og alder med vendepunkt.....	16
Figur 5: Utvikling i DNA-fragmentering hos enkeltindivider	17
Figur 6: Endring i DNA-fragmentering per år med vendepunkt.....	17
Figur 7: DNA-fargeopptak og alder	18
Figur 8: Normal-DNA og alder.....	19
Figur 9: Normal-DNA og alder med vendepunkt	19
Figur 10: Utvikling i normal-DNA hos enkeltindivider.....	20
Figur 12: Raskt progressive motile spermier og alder.	21
Figur 13: Raskt progressive motile spermier og alder med vendepunkt.....	22
Figur 14: Utvikling av raskt progressivt motile spermier hos enkeltindivider.	23
Figur 15: Endring i raskt progressive motile spermier per år.	23

1 Innledning

1.1 Mannlig subfertilitet og aldring

1.1.1 Aldringsprosessen hos mennesker

Aldring er en prosess som angår alle. Mange har forsøkt å forstå hva som påvirker aldringsprosessen og hvordan denne foregår. Selv om forståelsen fortsatt er begrenset, har man objektive funn som viser at menneskets alderdom har blitt utsatt med et tiår. Levealderen i verden som en helhet har de siste to hundreårene mer enn doblet seg fra omtrent 25 år til 65 år for menn og 70 år for kvinner, og i land med allerede høy levealder øker forventet levealder med seks timer hver dag som går (1;2). Et interessant funn er at den kliniske aldringsprosessen ser ut til å gå like raskt som tidligere, den inntre bare på et senere tidspunkt. Det betyr at den svekkelsen som tidligere foregikk fra 70 til 80 år, nå foregår fra 80 til 90 år (1). Det er liten tvil om at bedring i levekår og medisinsk behandling har mye av æren for den økte levealderen. Søket etter spesifikke gener hos mennesker som styrer levealder har derimot ikke gitt klare svar. Tvillingstudier har vist at bare omtrent 25 % av forskjellene i levealder kan tilskrives gener, men genenes rolle øker med økende alder (1;3).

1.1.2 Reproduktiv aldring

Selv om levealderen stadig øker, og enkelte hevder livet er på sitt beste i 50-årene, er reproduksjonsevnen på topp langt tidligere i livet. Reduksjonen i kvinnens fertilitet begynner allerede i 20-årene (4), og sjansen for spontan graviditet er dobbelt så stor i aldersgruppen 19-26 som i 35-39-årsgruppen (5). Reproduktiv aldring har blitt en stadig mer aktuell problemstilling i takt med den økende alder hos vordende foreldre. Tall fra statistisk sentralbyrå viser at fars alder ved første barns fødsel har steget fra 26,0 år i 1971-75 til 30,8 i 2010. Tilsvarende tall for mor er 23,4 og 28,2. Det kan likevel se ut som kurven har flatet ut, da alderen for begge kjønn har ligget relativt stabil de siste åtte årene (6).

Reproduktiv aldring hos kvinner

Mesteparten av tapet i reproduktiv funksjon hos kvinnen skyldes aldersrelaterte endringer i ovariene. Kvinner er født med alle sine eggceller, i motsetning til menn, som stadig

produserer nye sædceller. De aller fleste av de medfødte eggcellene vil aldri ta del i egglosning, men degenerere. Hastigheten på denne degenereringen dobles ved cirka 37,5 års alder (7;8). I tillegg synker kvaliteten på eggcellene med økende alder. Studier tyder på at det ikke er evnen til fertilisering som blir dårligere, men at implantasjonsraten er lavere og risikoen for spontanabort høyere. Dette skyldes blant annet at insidensen av aneuploide embryoer er sterkt korrelert med mors alder. Årsaken til dette er feil i meiosen (7;8). En type feil i meiosen er knyttet til forbindelsen mellom søsterkromatidene. Oocytterne er stanset i meiosen, og er avhengige av at forbindelsen mellom søsterkromatider vedvarer gjennom de tiårene som potensielt kan gå før meiosen gjenopptas. Ved økende alder ser dette ut til å svikte, med økt frekvens av aneuploide datterceller som konsekvens (9). Frie radikaler (ROS) er antatt å bidra til aldring av eggcellene. En teori går ut på at eksponering for frie radikaler fører til forkortning av telomerene på kromosomene. For korte telomerer fører til stopp i celledyklus, instabilitet i genomet eller apoptose. Enzymet telomerase bidrar i mange celler til å vedlikeholde telomerlengden, men eggceller hos fertile kvinner har svært liten telomeraseaktivitet og er dermed mer utsatt for de negative virkningene av frie radikaler (8). Frie radikaler er også antatt å spille en rolle i menns reproduktive aldringsprosess (10;11).

Reproduktiv aldring hos menn

De fleste vet at kvinnens alder har effekt på fertilitet. Det har imidlertid vært langt mindre fokus på mannens alder, selv om nyere forskning viser at mannens alder på ingen måte er irrelevant.

Generelt opprettholdes spermatogenesisen hele livet. Derimot finner man en rekke andre forandringer hos eldre menn. Økende alder påvirker hypotalamus, hypofysen og testiklene, med reduserte sirkulerende androgener som følge. I en studie av 2162 amerikanske menn som besøkte sin primærlege, fant man at 38,7 % av menn over 45 år hadde lave testosteronnivåer (12). Man finner også en rekke endringer i testikkelvevet ved biopsi. Dette inkluderer færre leydigceller, sertoliceller og kimceller, tynnere epitel i de seminiferøse tubuli og dårligere vaskularisering av testikkelparenkymet (13). Flere oversiktsartikler har også funnet redusert sædvolum, lavere motilitet, dårligere verdier for morfologi og lavere antall sædceller i sædprøver fra eldre menn (13;14). I kontrast til disse negative funnene, har enkelte studier funnet at eldre menn har lengre telomerer på sine spermier. Dette skyldes en høy aktivitet av telomerase i testiklene. Normalt sett bidrar telomerase til å vedlikeholde telomerlengden, og

det er uklart hvorfor det i testiklene i tillegg skjer en progressiv forlenging. Studiene viser at barn av eldre fedre har lengre telomerer i blodet som følge av dette (15;16).

Etter utviklingen av tester som vurderer DNA-integriteten i spermier, deriblant Sperm Chromatin Structur Assay (SCSA), har man forsøkt å se om også disse parametrene viser en sammenheng med alder. Studiene har til dels kommet til ulike konklusjoner. Dette diskuteres nærmere under resultatdiskusjonen.

Man har altså en rekke objektive funn som viser endringer i mannens reproduktive system med alder. Dette er imidlertid lite interessant hvis det ikke gir kliniske utslag. Hassan et al. fant i sin studie på 2112 gravide kvinner at økende alder hos mannen ga signifikant lenger "time to pregnancy" (TTP, tid fra paret begynner å forsøke å bli gravide til oppnådd graviditet). Par der far var over 45 år hadde i snitt fem ganger lenger TTP enn der far var under 25 år (17). Høy alder hos far er i flere studier også vist å gi økt risiko for spontanabort (13;18) og preeklampsi (13). Sistnevnte har for øvrig en U-formet risikokurve, der både lav (<25) og høy (>35) alder hos far øker risikoen.

Mye tyder på at fars alder ikke bare påvirker utfall under graviditeten, men også risiko for visse sykdommer hos avkommet. Dette gjelder blant annet misdannelser, schizofreni, autisme, diabetes type 1, enkelte kreftformer og en rekke autosomalt dominante sykdommer (13;14;19). En studie fra Island viser at eldre menn i snitt får avkom med flere de novo-mutasjoner, og foreslår at dette fører til en økt sannsynlighet for at avkommet også får mutasjoner knyttet til schizofreni og autisme (20).

I motsetning til kvinners menopause, har menn ingen klar ende på sin fertile periode. Hos kvinner har man en gradvis reduksjon i fertilitet fra 20-37 år, fulgt av en raskere nedgang de påfølgende årene til menopause (21). Hos menn vet man derimot lite om hvordan den reproduktive aldringsprosessen forløper og ved hvilken alder de kliniske effektene som nevnt over begynner å gjøre seg gjeldende. I en studie av Dunson et al. fant man at mannens alder ikke hadde innvirkning på TTP før ved 35-årsalder. Det var altså ingen jevn reduksjon i fertiliteten. Etter 35-årsalder var derimot effekten tydelig. 18 % av par der mannen var 35 år ble ikke gravide i løpet av ett år, mens hvis mannen var 40 år økte denne andelen til 28 % (22). En annen studie viser tilsvarende sammenheng, der sannsynligheten for å bruke mer enn ett år på å bli gravid, dobles hvis far er over 35 år sammenlignet med under 25 år (23).

1.1.3 Mannlig subfertilitet: Årsaker og omfang

Omtrent 90 % av par som forsøker å bli gravide, oppnår dette i løpet av ett år. De resterende ti prosentene defineres som ufrivillig barnløse. I Norge gjelder dette omtrent 3000 par hvert år (24). Ufrivillig barnløshet kan skyldes faktorer hos kvinnen (50 %), mannen (20 %) eller en kombinasjon (30 %). Genitale infeksjoner, hormonforstyrrelser og immunologiske faktorer har vært ansett som de viktigste årsakene til mannlig subfertilitet, men i de siste årene har genetiske og molekylære årsaker fått økende oppmerksomhet. Dette inkluderer skade på spermie-DNA (25). I en studie med 2383 infertile menn hadde 48,4 % en underliggende årsak som kunne behandles medikamentelt eller kirurgisk (26). I visse tilfeller kan det likevel være klinisk mer effektivt og økonomisk gunstigere å benytte in vitro fertilisering eller intracytoplasmatisk spermieinjeksjon (IVF/ICSI) enn å korrigere årsaken (27).

1.2 Spermatogenesisen

Spermatogenese er utvikling og modning av spermier. Det tar omtrent 75 dager for en spermie å utvikles i testiklene. Modningsprosessen i testiklene tar ytterligere 14 dager. En mann produserer cirka 30 millioner sædceller om dagen. Spermatogoniene starter å modnes i puberteten. Noen datterceller forblir udifferensierte stamceller, mens andre blir til differensierte spermatocytter som gjennomgår første og andre meiose. En spermatocyt gir opphav til fire spermatider. Den videre modningen fra spermatider til spermatozoer eller spermier kalles spermiogenese, og er temperatursensitiv. Det skjer ingen ytterligere celledelinger, men remodeleringer av spermatidene for å danne en spermatozoon med hode, midtstykke og en lang hale. I hodet finner man kjernen og en blære kalt akrosomet, som inneholder enzymer som er viktige for at sædcellen skal penetrere veggen til eggcellen. Midtstykket er rikt på mitokondrier, som gir energi til halens bevegelse.

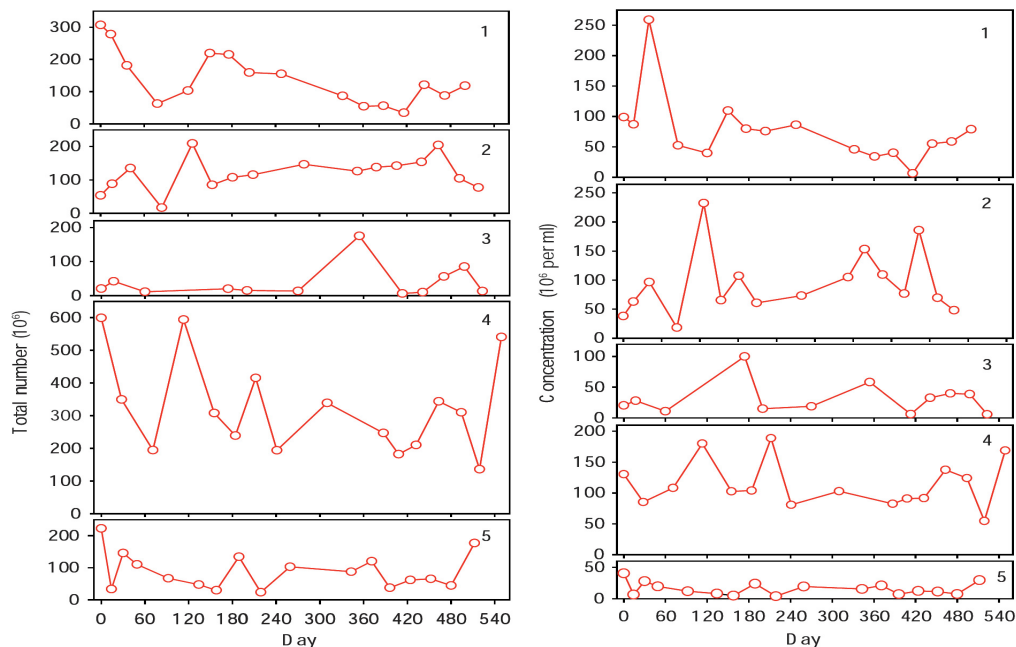
Sertoliceller, støtteceller i seminiferøse tubuli, er viktige for spermiogenesisen. De produserer androgenbindende protein, som oppkonsentrerer testosteron. Dette er viktig, da modningen er avhengig av høy konsentrasjon av testosteron i tubuli. Testosteronet produseres av leydigceller. En overordnet kontroll av sædproduksjonen foregår i hypofysen gjennom frigjøring av luteiniserende hormon (LH) og follikkelstimulerende hormon (FSH). LH virker på leydigcellene, og dermed på testosteronfrigjøring, mens FSH øker produksjon av androgenbindende protein fra sertoliceller. FSH er regulert via negativ feedback fra hormonet

inhibin, som frigjøres fra sertoliceller. LH- og FSH-produksjonen stimuleres av hjernen via hypotalamus gjennom frigjøring av neurohormonet GnRH (gonadotropin releasing hormone).

1.3 Sædanalysens kliniske betydning

Sædanalysen utgjør en viktig del av en infertilitetsutredning, men den kliniske betydningen er omdiskutert. I tillegg til den standard sædanalysen som er beskrevet nedenfor, finnes det en rekke andre analyser som WHO-manualen anser som valgfrie (28). Imidlertid viser nyere forskning at standard sædparametre alene ikke er gode nok til å forutsi fertiliteten hos et par, og at DNA-analyser kan være nyttige tilleggsmarkører (10;25;29). Normalverdiene er beregnet ut i fra det øvre 95 % konfidensintervallet av menn som har gjort sin partner gravid i løpet av de første tolv måneder (28). At man har prøvesvar under normalområdet er dermed ikke ensbetydende med infertilitet. Sædprøvesvaret sier noe om sannsynligheten for befruktning, men må sees i sammenheng med kvinnens reproduktive helse og alder. Infertilitetsutredning bør derfor anses som én felles utredning. Sædkvaliteten har stor intraindividuell variasjon (Figur 1) (28). Avvikende verdier kontrolleres derfor med ny prøve.

Fig. 21 Variation in total number of spermatozoa and sperm concentration over a one-and-a-half-year period



Data courtesy of Schering Plough and Bayer Schering Pharma AG.

Figur 1: Intraindividuell variasjon i spermieantall og konsentrasjon (28)

1.3.1

1.3.2 Spermiekonsentrasjon og totalt antall spermier

Spermiekonsentrasjonen er avhengig av produksjon, transport og uttømming av spermier, samt volumet av ejakulatet. Lav konsentrasjon kan skyldes stor sekresjon fra prostata og sædblæreene, mens lavt sædvolum kan gi høy spermiekonsentrasjon. Bestemmelse av totalt antall spermier er derfor viktig. Det er viktig å bestemme volum ved hjelp av veiing for at resultatet skal bli pålitelig (30). En europeisk undersøkelse viste en omvendt korrelasjon mellom tid før oppnådd graviditet og sædkonsentrasjon på inntil 55×10^6 /mL (31).

1.3.3 Spermimotoilitet

Spermienes motilitet bestemmes innen en time etter at prøven er avgitt. Motiliteten reduseres over tid, og hvor raskt dette skjer avhenger blant annet av temperatur og skadelige oksygenforbindelser som finnes i ejakulatet. Motiliteten klassifiseres etter bevegelseshastighet. Enkelte studier antyder at raskt progressive motile spermier er vesentlige for at fertilisering skal skje (31).

1.3.4 Spermimorfologi

En svært liten andel av spermier i en sædprøve fra en fertil mann har normal morfologi. Det er utviklet strenge kriterier for å bedømme morfologien til spermier slik at det biologiske grunnlaget skal bli godt nok. Kriteriene gir meget lav andel normale spermier og kritiseres for det. På bakgrunn av dette er det vanskelig å skille mellom fertile og subfertile menn. Imidlertid bygger kriteriene på morfologien til sædceller som klarer å penetrere cervixsekretet samt binde til zona pellucida, hvilket er de best evaluerte kriteriene (32).

1.3.5 pH

Prostatasekretet er surt, mens sekretet fra sædblæren er mer alkalisk. PH i sædprøver er normalt i det alkaliske området $\geq 7,2$ (28). Sur pH kan skyldes at det ikke finnes sædblæresekret på grunn av obstruksjon eller bilateral agenesi av ductus deferens (32).

1.3.6 Antistoffanalyser

Anti-spermieantistoffer i sæd tilhører nesten utelukkende til immunglobulinene IgA og IgG. IgA-antistoffer har muligens en større klinisk betydning enn IgG (28). Derimot er det ikke

sikkert om anti-spermieantistoffer har betydning for fertilisering eller ikke. En japansk studie på infertile menn viser en signifikant forskjell mellom pasienter med $\geq 80\%$ og $< 80\%$ antistoffbundet spermier, hvor 57,1 % av populasjonen med antistoffbundet spermier $\geq 80\%$ hadde redusert fertilitet, mens det var ingen reduksjon hos de med $< 80\%$ (33). Derimot viser en canadisk studie ingen signifikant korrelasjon mellom anti-spermieantistoffer og fertilisering eller graviditetsrate etter IVF/ICSI (34).

1.4 Spermie-DNA

1.4.1 Metoder for måling av DNA-skade i spermier

Det finnes flere ulike tester for å undersøke DNA-skade i spermier, blant annet SCSA, TUNEL og Comet. SCSA er metoden som benyttes på Rikshospitalet. Det er en standardisert test som har liten intra- og interlaboratorievariasjon. En svakhet ved SCSA er at resultatene har en relativt stor dag-til-dag variasjon (25). SCSA er en flowcytometritest som måler tilbøyeligheten spermie-DNA har til syreindusert denaturering in situ, etterfulgt av farging med acridinorange. SCSA oppgir to ulike mål; DNA-fragmenteringsindeks (DFI) og DNA-fargeopptak (HDS, highly DNA stain-able cells), som ikke er korrelert med hverandre (35). Man tror at DFI er et mål på andel spermier med DNA-brudd, mens HDS representerer umodne spermier med mindre kondensert kromatin (10). Modne spermier har protaminer som DNA-kjerneproteiner, noe som gir en høyere kondensering enn histoner. En svikt i prosessen der histoner skal byttes ut med protaminer, kan gi spermier med mindre kondensert kromatin og høyere DNA-fargeopptak (35). DNA-fragmentering som parameter har bare middels sammenheng med tradisjonelle WHO-parametre. En ikke uvesentlig andel menn med normale WHO-parametre har en DNA-fragmentering $> 20\%$ og fanges dermed ikke opp i en standard sædanalyse (36).

1.4.2 Betydningen av skade på spermie-DNA

Spermier har normalt en kromosomoppbygning med for det meste kondensert kromatin bestående av DNA og kjerneproteiner (37;38). Skade på kromatinstrukturen kan skje i alle ledd av spermatogenesisen (10). Dette støttes av at nivået av DNA-skade, inkludert DNA-fragmentering, er minst i testikulære spermier og størst i ejakulatet (39). Det har vært foreslått en rekke årsaker til slike skader, blant annet endogene endonukleaser og caspaser,

strålebehandling og kjemoterapi, ulike toksiner i miljøet og oksidativt stress. Trolig virker flere faktorer sammen (10;37). Fordi DNA-reparasjonssystemet nedreguleres i senere trinn av spermatogenesisen, vil spermier med DNA-skade kunne komme ut i ejakulatet (40;41). Man tror at spermier med DNA-skade kan befrukte oocytter, men utfallet avhenger da av oocytten og embryoets reparasjonsmekanismer. Oocytten har bare en begrenset evne til å reparere DNA-skade fra spermien (38;39;42). Skadet DNA kan videre gi feil i DNA-replikasjonen og dannelse av de novo-mutasjoner. Man vet lite om muligheten for at DNA-skadede spermier kan gi nye mutasjoner i avkommet, men man kan ikke utelukke dette. Dette er spesielt aktuelt i forhold til ICSI, som ofte blir valgt hos pasienter med høy DNA-fragmentering (35;39).

DNA-fragmentering

Flere studier har forsøkt å undersøke hvilken betydning DNA-fragmentering har på utfallet av en eventuell graviditet. Disse har kommet til ulike konklusjoner. Oversiktsartikler konkluderer med at DNA-fragmentering er en prediktor for sjansen til å oppnå graviditet hos antatt fertile par (10;43). Bungum et al. (10) hevder at en DNA-fragmentering over 20 % gir redusert sjanse for spontan graviditet. Verdier over 30-40 % gir sjanse gir minimal sjanse for spontan graviditet. Evenson et al. (43) finner i en metaanalyse at par uten kjent subfertilitet har sju ganger høyere sannsynlighet for å bli gravide hvis DNA-fragmentering er <30 %. Den samme studien finner at ved IVF-behandling er sjansen for graviditet omtrent halvert ved DNA-fragmentering >30 %. Også en metaanalyse av Collins et al. (40) finner en liten signifikant sammenheng mellom DNA-fragmentering og graviditet ved IVF/ICSI, men konkluderer likevel med at sammenhengen er for liten til at testing bør inngå rutinemessig i fertilitetsutredning. Dette står i kontrast til dagens praksis blant annet på Rikshospitalet.

Utfallet ved ICSI synes å være mindre påvirket av DNA-fragmentering enn ved IVF (10;43;44). DNA-fragmentering er også vist å være assosiert med høyere risiko for spontanabort etter en IVF/ICSI-behandling (43). Det samme har vært vist ved intrauterin inseminasjon (45).

DNA-fargeopptak (HDS)

DNA-fargeopptak er en mye mindre undersøkt parameter enn DNA-fragmentering. Bungum et al. fant i sin oversiktsartikkel ingen sammenheng mellom DNA-fargeopptak (HDS) og sjansen for graviditet (10). Menn med >15 % HDS hadde i en studie av Virro et al. lavere

fertiliseringsrate etter IVF enn menn med <15 % HDS (46). I en enkeltstudie fant Lin et al. at risikoen for spontanabort etter IVF-befruktning var signifikant høyere hos menn med HDS >15 % (29). Virro et al. fant derimot ingen sammenheng mellom HDS og spontanabort ved IVF/ICSI (46).

1.5 Rask progressive motile spermier

1.5.1 Analyse og vurdering av motilitet

Det benyttes flere ulike metoder for klassifisering av spermimotoilitet. I dag er mikroskopi den beste undersøkelsen. Man kan også bruke ”computer assisted sperm analysis” (CASA) for analyser av prøver med forventet normal motilitet. Noen artikler har brukt ”simple computer-assisted method”, som er en eldre metode (45). WHO’s manual fra 2010 anbefaler mikroskopi eller nyere CASA instrumenter for analysen (28). Tidligere klassifiserte WHO progressiv motilitet i rask og treg med en cut-off på 25µm/sek. Dette har de gått bort i fra, da det er vanskelig for dem som analyserer prøvene å måle bevegelsene nøyaktig nok uten bias. Nå er det tilstrekkelig å skille mellom progressiv motilitet (aktiv bevegelse av spermien enten lineært eller i store sirkler), non-progressiv motilitet (alle andre mønstre av bevegelse uten progresjon) og immotile (28). Man kan se for seg at dette vanskeliggjør vurdering av fertilitet, da enkelte studier viser at raskt progressiv motilitet er en av de viktigste parametrene for å skille fertile fra subfertile menn ved in vivo befruktning (47). De fleste av mennene som avgir sædprøve er under fertilitetsutredning. I disse tilfellene er IVF den mest aktuelle behandlingen, og her er det mindre viktig å skille mellom ulike former for progressiv motilitet (48).

1.5.2 Betydning av raskt progressivt motile spermier

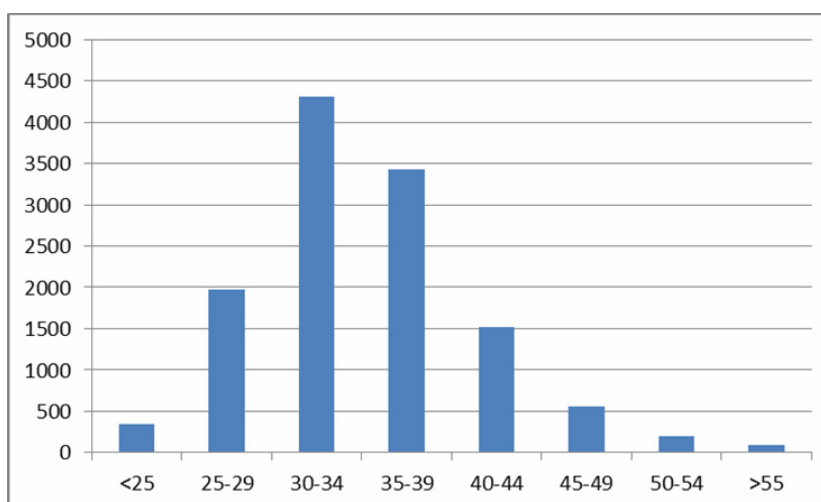
Spermimotoilitet er et område det har vært forsket en del på. Flere enkeltstudier viser en klar sammenheng mellom spermienes morfologi og tid før oppnådd graviditet (31;49). Dessuten er raskt progressive motile spermier viktig for befruktning (47;48). Guzick et al. konkluderer i sin studie med at spermiekonsentrasjon, -motilitet og -morfologi kan benyttes til å klassifisere menn som subfertile, intermediært fertile og fertile, men ikke som infertile (49). En studie av Hinting et al. viste at rask progressiv motilitet var en god parameter for å diskriminere subfertile fra fertile menn in vivo. Denne parameteren hadde en spesifisitet på 86 % og

sensitivitet på 89 % (47). Comhaire et al. undersøkte i sin studie hvilke sædparametre som skilte fertile og infertile menn in vitro. De baserte seg på 56 par som var til IVF-behandling og fant at raskt progressive motile spermier hadde en spesifisitet på 72 % og sensitivitet på 60 % (48). I motsetning til situasjonen in vivo, hvor raskt progressive motile spermier er en god parameter for å skille fertile fra subfertile menn, er spermiemorfologi en bedre parameter in vitro. Dette gjelder spesielt hodemorfologi. In vivo er sædcellene avhengig av å bevege seg gjennom cervixsekret for befruktning. Det er ved dette punktet det er størst krav til spermiens motilitet. Ved å eliminere behovet for penetrasjon av cervicalmucus som ved in vitro befruktning, vil lineær motilitet ikke være en nødvendighet. Det kan da være tilstrekkelig med andre former for progressiv motilitet for å penetrere corona radiata (48).

2 Metode

2.1 Populasjon

I perioden 2004-2011, har 9835 menn gjennomgått sædanalyse ved Andrologisk laboratorium, Rikshospitalet. Sædanalysen ble som regel gjennomført som innledende undersøkelse ved infertilitetsutredning eller som kontroll etter tidligere avvikende funn. Cirka 0,5 % av menn var henvist for kontroll etter vasektomi, og data for disse pasienter ble forsøkt ekskludert fra statistisk analyse. Gjennomsnittsalderen ved prøvetakning var 35 år. Figur 2 viser aldersfordelingen ved prøvetakning.



Figur 2: Antall menn i hver aldersgruppe (år) ved sædprøve

Gjennomsnittlig antall sædanalyser per pasient var 1,26 (variasjonsbredde 1-9). Median tidsperiode mellom den første og siste sædprøven hos menn som hadde avlagt mer enn én prøve var 5.2 måneder (variasjonsbredde 1 dag – 60 måneder).

2.2 Laboratorieprosedyrer

Alle laboratorieprosedyrer er hentet fra Rikshospitalets interne prosedyrer (50-52).

2.2.1 Sædprøvetaking

Pasienten får utlevert en ferdig veid kopp med navnelapp. Han vises til prøverommet, der det henger informasjon om korrekt prøvetakning. Hånd og penis skal vaskes uten såpe. Hele

ejakulatet må samles i beholderen. Det skal ikke benyttes kondom for oppsamling. Prøven leveres laboratoriet, og det noteres prøvetakningstidspunkt. Prøvebegeret settes så i en risteinkubator, som holder 37 °C. Alternativer til denne prosedyren er prøvetakning hjemme (hvis reisevei er mindre enn 1 time) eller i spesielle tilfeller ved hjelp av vibrostimulering av penishodet.

2.2.2 Spermimotoilitet

Prosedyre

10 µL godt blandet, ufortynnet sæd (37 °C) legges på et oppvarmet (37 °C) objektglass. Et 22 x 22 millimeter dekkglass legges på. Dette gir en preparatdybde på ca. 20 µm. Preparatet ses på gjennom et 20 x fasekontrastobjektiv. Dersom det fortsatt er drift i preparatet etter cirka 1 minutt, lages et nytt preparat. Motilitetsbestemmelsen skal starte umiddelbart, før dråpen tørker inn. Minst 4 tilfeldige synsfelt skal telles, men man unngår synsfelt i utkanten av preparatet. Alle motile og immotile spermier i hvert synsfelt (eller deler av synsfeltene) skal telles. Innen hvert synsfelt telles først de raskt progressive og de langsomt progressive spermierne, deretter de ikke progressive og de urørlige. Det skal telles cirka 150 spermier per dråpe. Etter at motiliteten i en dråpe er bestemt, lages et nytt preparat og en tilsvarende analyse utføres. Løse haler eller spermier med ”pinheads” telles ikke. Spermimotoilitet deles inn i følgende kategorier:

WHO kategori	kode	Bevegelseshastighet
Raskt progressive	a	25 µm/s (ca. 5 spermiehoders lengde)
Langsomt progressive	b	5-24 µm/s
Ikke progressive	c	<5 µm/s
Urørlige (immotile)	d	0

Beregning

For hver dråpe beregnes det hvor mange prosent hver kategori utgjør. I hvert av de to preparatene som er undersøkt beregnes prosentandelen motile (a+b+c) og immotile spermier. Den høyeste verdien av disse kategoriene i en dråpe sammenlignes med tilsvarende kategori i den andre dråpen. Forskjellen i tallverdi mellom de to resultatene multipliseres med 20. Dette tallet skal ikke være større enn summen av de to tallene vi har telt. Det vil si at resultatene ikke skal avvike fra hverandre med mer enn 5 %. Dersom forskjellen er større enn anbefalt, telles en ny dråpe.

2.2.3 Spermiekromatinstruktur assay (SCSA)

Bakgrunn

Testen er basert på fargestoffet akridinorange (AO). AO inkorporert i uskadet, dobbeltrådet DNA avgir grønn fluorescens når det belyses med blått lys, mens AO inkorporert i enkelttrådet DNA eller RNA avgir rød fluorescens. Økt grønn fluorescens indikerer en redusert kondensering av spermiekromatin, mens økt rød fluorescens indikerer at cellens DNA er fragmentert. Fluorescensen avleses i et flowcytometer stilt inn på å telle 20 000 spermier.

Prosedyre

Apparatet (FACScan) skal kalibreres før målingen. Det benyttes en ufortynnet sædprøve med høy konsentrasjon, stort volum, <6 % DNA-fragmenteringsindeks (DFI) og <6 % high DNA stain ability (HDS).

Sædprøvene fortynnes til cirka 2 mill/mL med saltløsning. 100 µL fortynnet sæd blandes med 200µL syre-såpebuffer i 30 sekunder. Tilsett og bland i 600 µL fargeløsning. Resultatet avleses på FACScan 2-7 minutter etter fargeløsningen er blitt tilsatt.

2.3 Statistikk

Dataene er analysert ved hjelp av Excel 2007 med ekstra add-in kalt "Analysis Tool-Pak". For å undersøke sammenheng mellom alder og de ulike parametrene er det brukt lineær regresjon. Sammenhengen er beskrevet ved hjelp av Excels koeffisient. En koeffisient med p-verdi

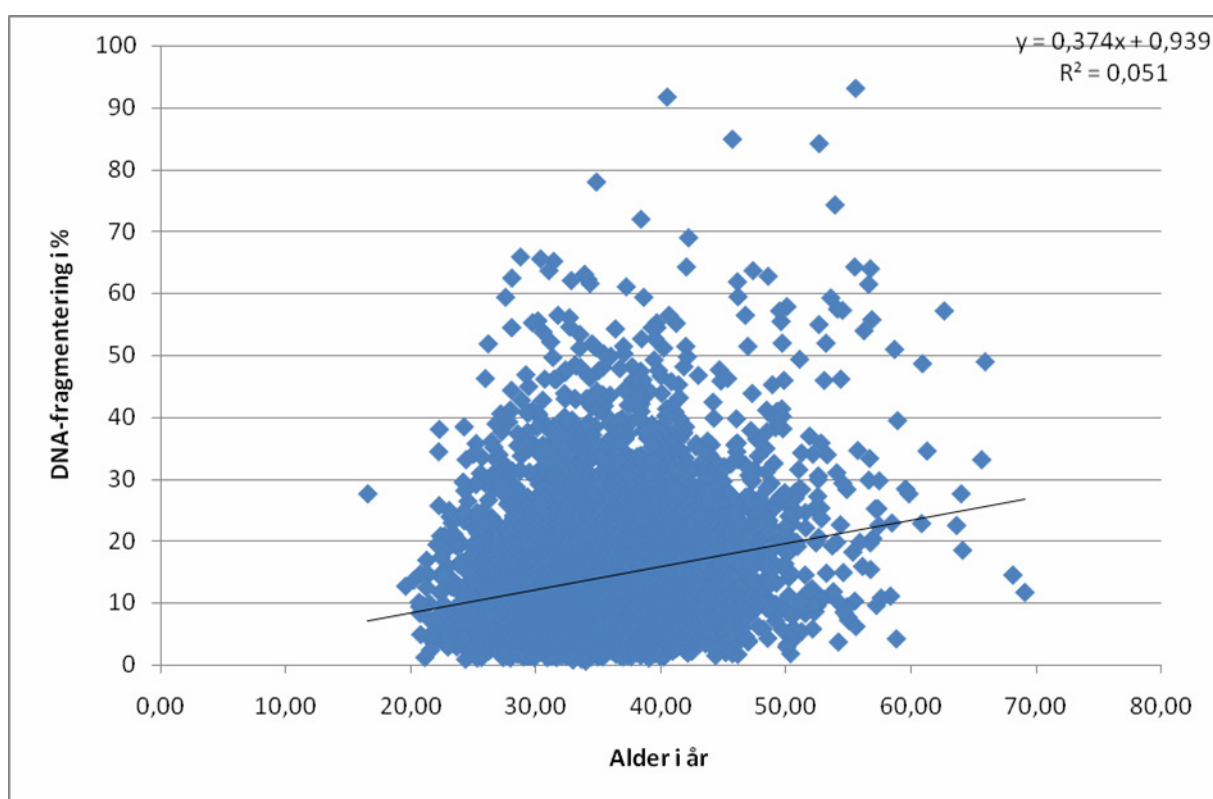
$<0,05$ er vurdert som statistisk signifikant. R^2 er oppgitt i figurene tilhørende regresjonsanalysene og forteller hvor mye av variasjonen i parameteren som kan forklares av alder.

Stykkevis lineær regresjon ble beregnet ved hjelp av nls funksjon av R (versjon 2.15.1, <http://www.r-project.org>), som også ble brukt til fremstilling av tilhørende diagrammer.

3 Resultater

3.1 DNA-fragmentering

Prøvematerialet for DNA-fragmenteringsanalysen består av 6116 menn fra 16 til 69 år med gjennomsnittlig alder på 35 år. Prøvene er innhentet i perioden 2006-2011. Analysen viser en lineær sammenheng mellom alder og DNA-fragmentering i populasjonen. Lineær regresjon estimerer en stigning på 0,37 prosentpoeng pr år med en p-verdi på $<0,001$. Figur 3 viser sammenhengen mellom DNA-fragmentering og alder i denne populasjonen.



Figur 3: DNA-fragmentering og alder.

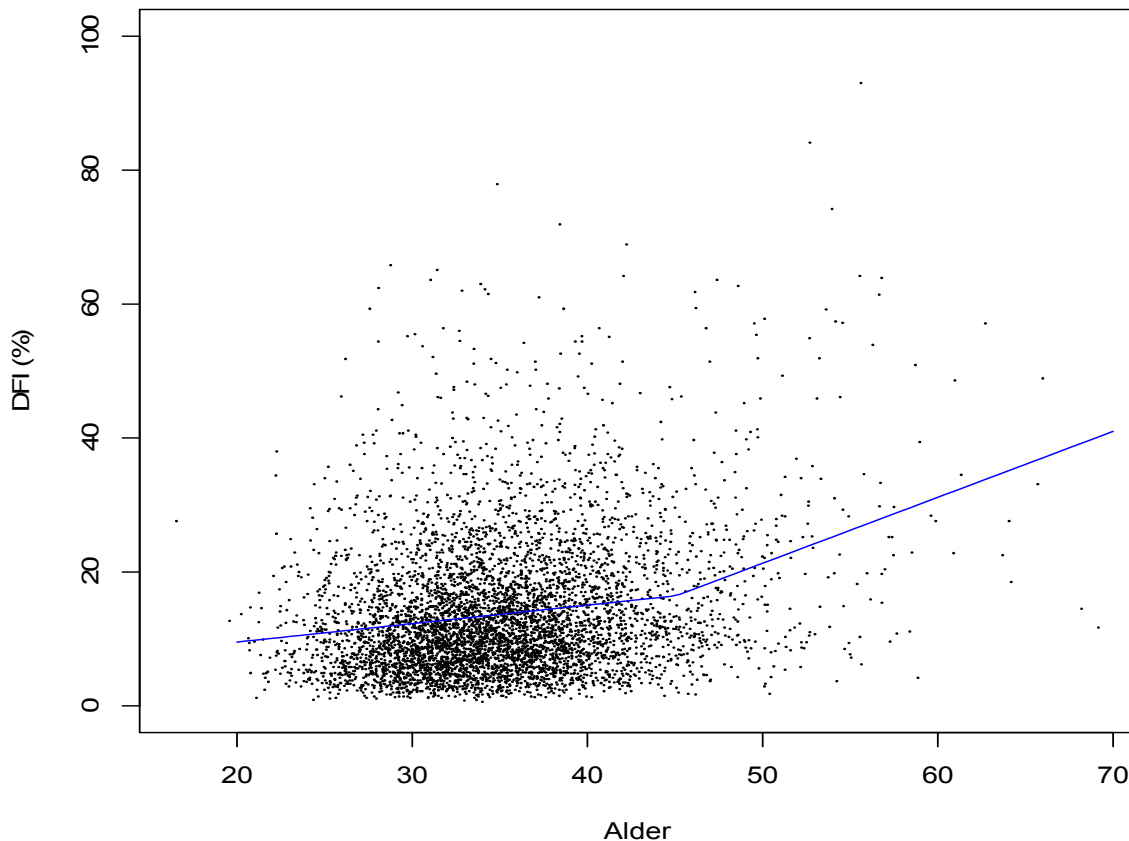
Resultatet over forutsetter at DNA-fragmentering øker jevnt lineært over tid. I følge én teori om aldring, akselererer aldringsprosessen etter en viss alder (1). Figur 4 viser sammenhengen man får hvis det lages to ulike regresjonslinjer med et statistisk beregnet vendepunkt.

Regresjonslinjene følger formelen

$$x < \text{cutoff}: y = 4,0144 + 0,2757x$$

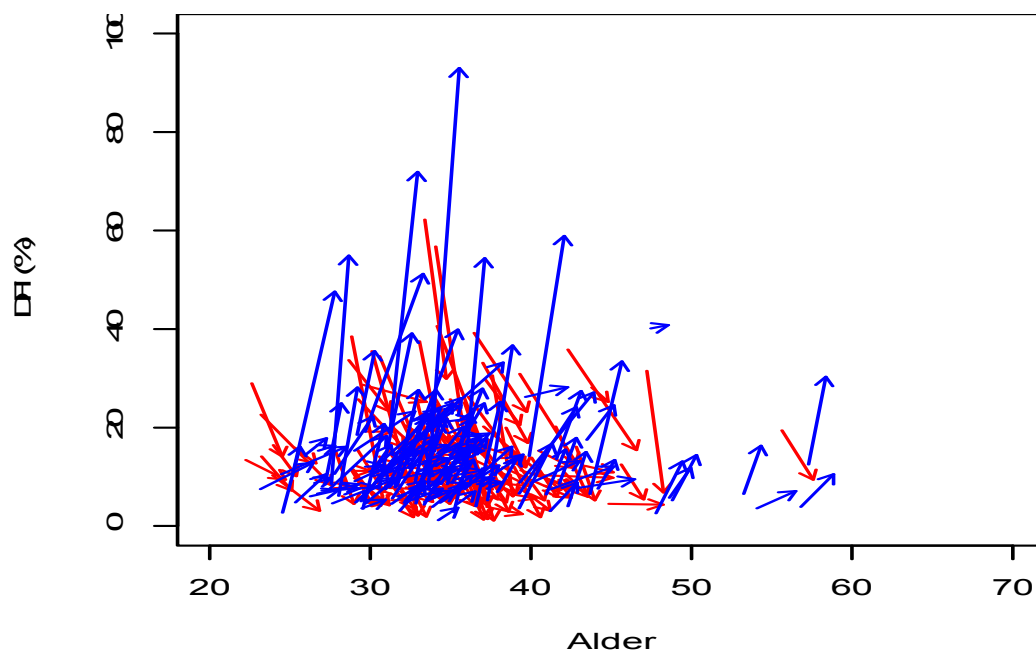
$$x > \text{cutoff}: y = 4,0144 + 0,2757 \cdot \text{cutoff} + 0,9842(x - \text{cutoff})$$

Cutoff er estimert til 45 år (95 % konfidensintervall 42,22 - 46,45). I følge denne modellen stiger DNA-fragmentering med 0,28 prosentpoeng per år fram til 45-års alder, for senere å øke med 0,98 prosentpoeng per år. Sammenhengen er statistisk signifikant, med p-verdier $<0,001$.



Figur 4: DNA-fragmentering og alder med vendepunkt

For å se på endring i DNA-fragmentering hos hvert enkelt individ ble det regnet ut endring i DNA-fragmentering per år. Populasjonen er på 209 menn som har avgitt to eller flere prøver med mer enn 365 dager mellom hver. Utviklingen i DNA-fragmentering hos disse mennene er vist i figur 5.

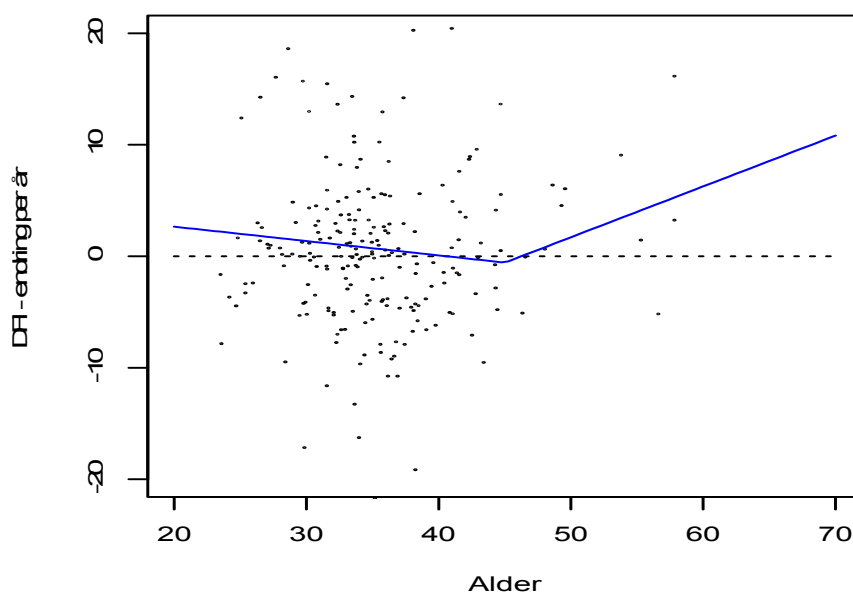


Figur 5: Utvikling i DNA-fragmentering hos enkeltindivider

Analysen for endring i DNA-fragmentering per år tar utgangspunkt i det estimerte vendepunktet ved 45 år som ble funnet for populasjonen som helhet. Ut i fra dette ble det laget en todelt regresjonslinje, figur 6. Resultatet er ikke statistisk signifikant.

Endring i DNA-fragmentering per år < 45 år: -0,13 (95 % konfidensintervall: -0,37 til 0,11)

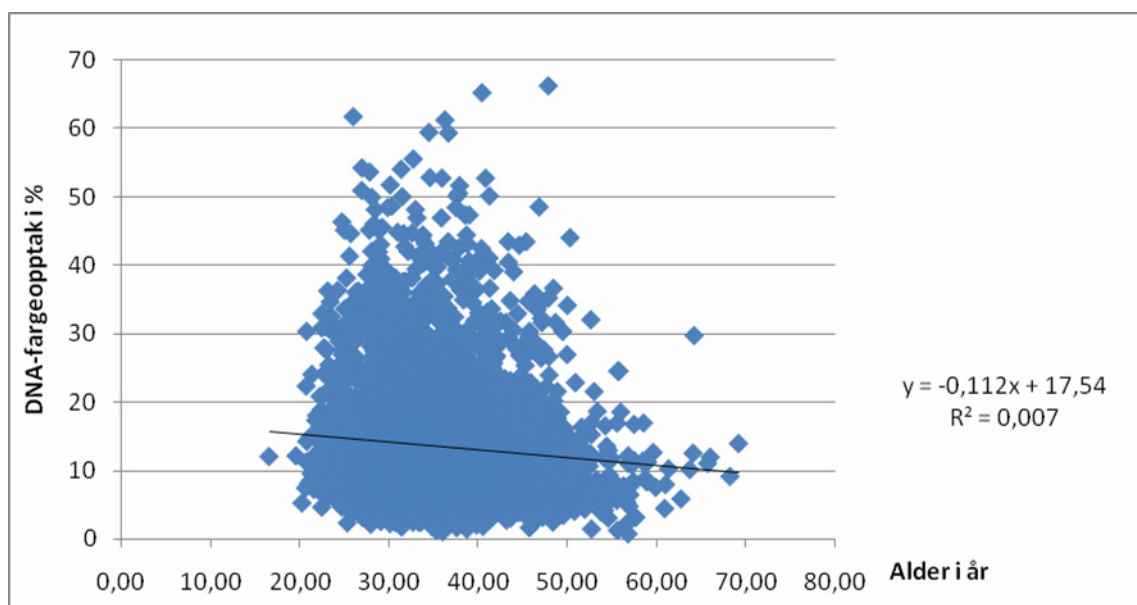
Endring i DNA-fragmentering per år > 45 år: 0,46 (95 % konfidensintervall: -0,25 til 1,16).



Figur 6: Endring i DNA-fragmentering per år med vendepunkt.

3.2 DNA-fargeopptak

Prøvematerialet for DNA-fargeopptak består av sædprøver fra 6114 ulike menn i alderen 16 til 69 år, med snittalder på 35 år. Materialet er innhentet i tidsperioden 2006-2011 og analysert som beskrevet i metodekapittelet. Figur 5 viser sammenhengen mellom DNA-fargeopptak og alder hos disse mennene.



Figur 7: DNA-fargeopptak og alder

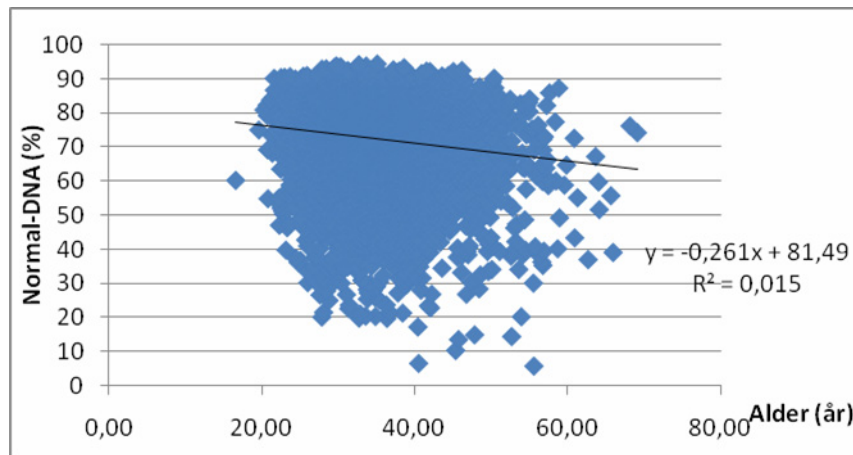
Analysen viser en signifikant sammenheng mellom alder og DNA-fargeopptak, der lineær regresjon estimerer at DNA-fargeopptak faller med 0,11 prosentpoeng per år. Sammenhengen har en p-verdi $<0,001$.

Det ble i tillegg utført en analyse for å se på utviklingen i DNA-fargeopptak hos hver enkelt mann over tid. Populasjonen besto da av 210 menn som hadde analysert DNA-fargeopptak ved to ulike anledninger med minst 365 dagers mellomrom. Man regnet ut endring i DNA-fargeopptak per år, men det ble ikke funnet noen signifikant trend i denne analysen.

3.3 Normal-DNA

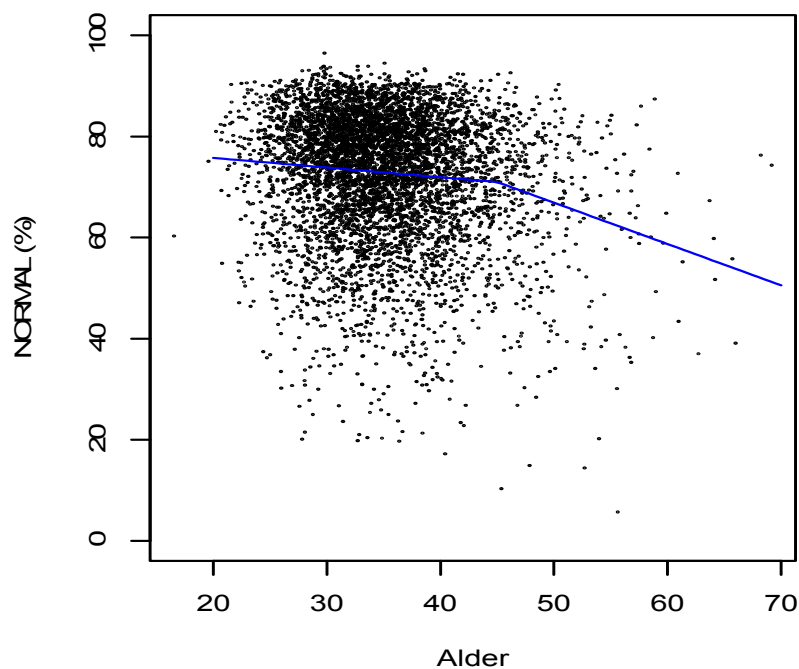
Prøvematerialet for normal-DNA består av prøver fra 6113 ulike menn i alderen 16-69 år som har fått analysert både DNA-fragmentering og DNA-fargeopptak for den gitte prøven. Snittalder på pasientene er 35 år. Prøvene er levert i perioden 2006-2011. Normal-DNA er

regnet ut med formelen $100 - (\text{DNA-fragmenteringsindeks} + \text{DNA-fargeopptak})$. Figur 8 viser sammenhengen mellom normal-DNA og alder i populasjonen.



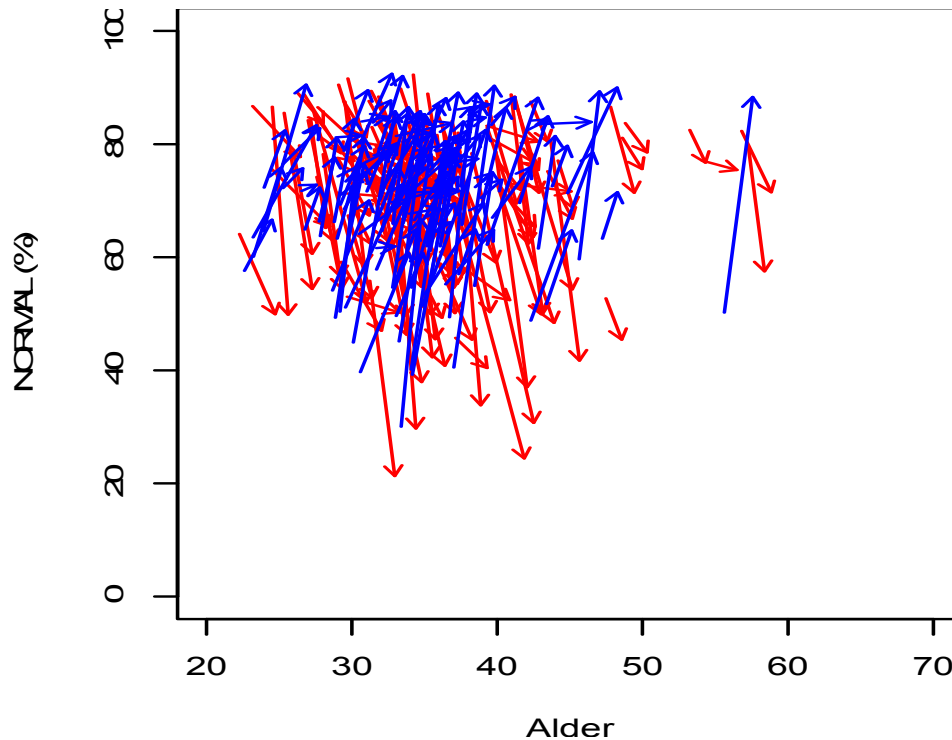
Figur 8: Normal-DNA og alder

Analysen viser at det i populasjonen er en signifikant sammenheng ($p < 0,001$) mellom normal-DNA og alder. Regresjonsanalysen estimerer at normal-DNA faller med 0,26 prosentpoeng per år. I tillegg utførte man en todelt regresjonsanalyse med vendepunkt på 45 år. (Figur 9) Denne gir et fall i normal-DNA på 0,19 prosentpoeng (95 % konfidensintervall -0,26 til -0,13) før 45-års alder og et mer uttalt fall på 0,82 prosentpoeng (95 % konfidensintervall -1,04 til -0,59) etter 45 år.



Figur 9: Normal-DNA og alder med vendepunkt

Det ble også utført en analyse for å se på utviklingen i normal-DNA hos enkeltindivider over tid. Populasjonen for denne analysen er 210 menn som har målt både DNA-fragmentering og DNA-fargeopptak ved to ulike anledninger med mer enn 365 dagers mellomrom. Utviklingen er illustrert i figur 10.



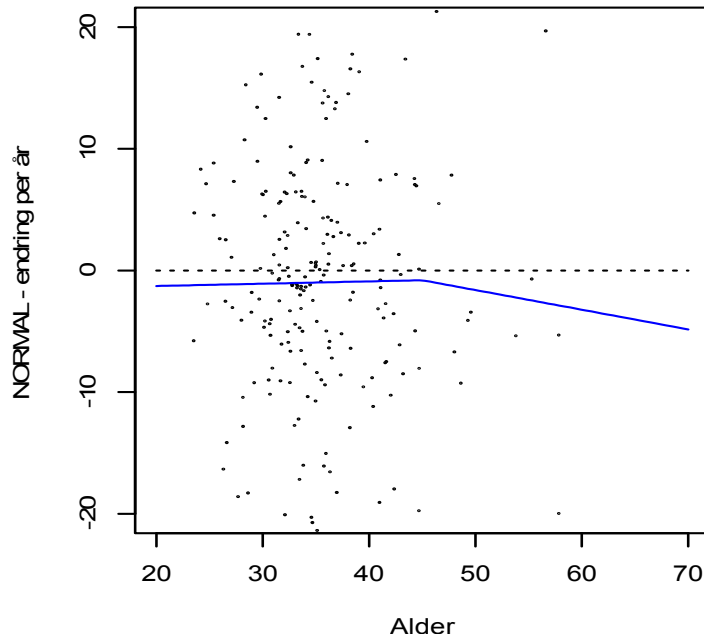
Figur 10: Utvikling i normal-DNA hos enkeltindivider

Analysen av endring i normal-DNA per år hos enkeltindivider ble også gjort med en todelt regresjon med vendepunkt på 45 år (figur 11) med følgende resultat:

Endring i normal-DNA per år < 45 år: 0,02 (95 % konfidensintervall: -0,28 til 0,32)

Endring i normal-DNA per år > 45 år: -0,16 (95 % konfidensintervall: -1,03 til 0,71)

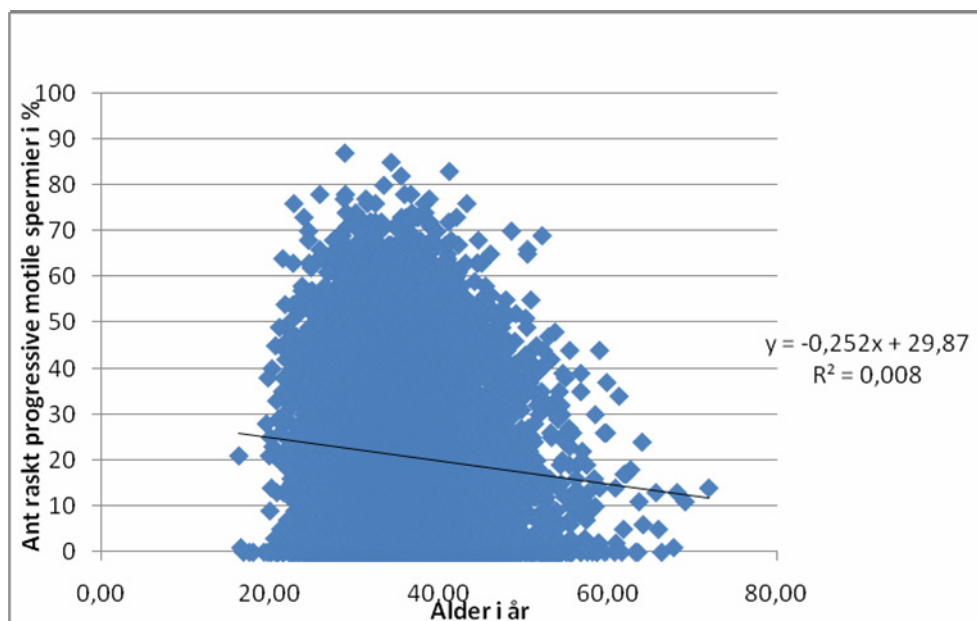
Sammenhengen er ikke statistisk signifikant.



Figur 11: Endring i normal-DNA per år med vendepunkt

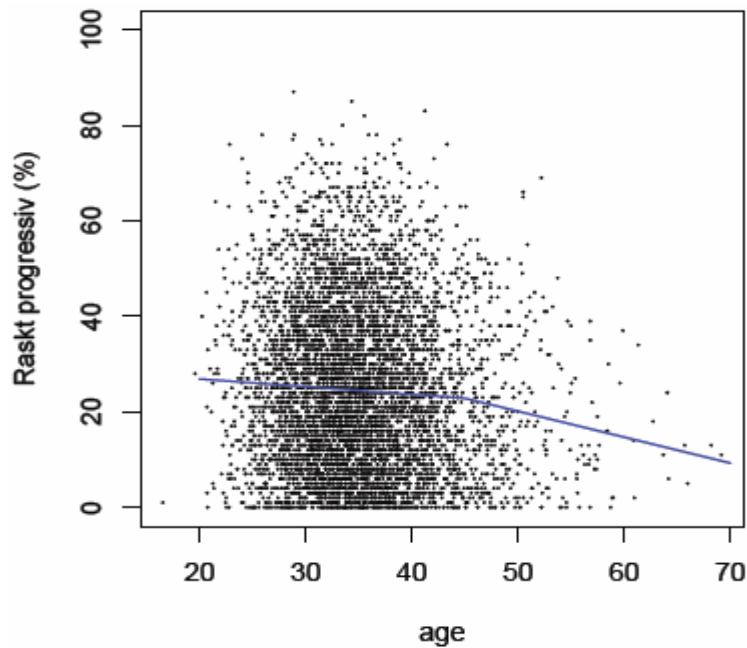
3.4 Raskt progressive motile spermier

Prøvematerialet for raskt progressive motile spermier består av 9832 menn fra 16 til 71 år med gjennomsnittlig alder på 35 år. Prøvene er innhentet i perioden 2005-2011. Figur 12 viser en negativ lineær sammenheng mellom alder og raskt progressive motile spermier.



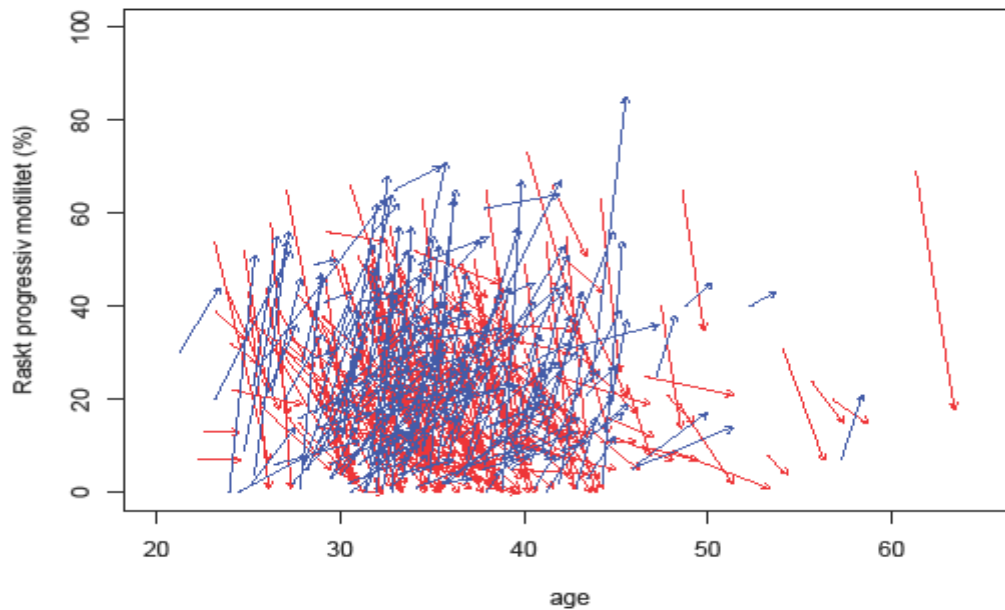
Figur 12: Raskt progressive motile spermier og alder.

Regresjonsanalysen estimerer en reduksjon på 0,25 prosentpoeng per år med en p-verdi på $<0,001$. Også her utførte man en todelt regresjonsanalyse med vendepunkt på 45 år. Denne gir et fall i raskt progressiv motilitet på 0,16 prosentpoeng (95 % konfidensintervall -0,25 til -0,07) før 45-års alder, mens fallet etter 45 år er på 0,54 prosentpoeng (95 % konfidensintervall -0,85 til -0,24). Det er ingen signifikant forskjell på reduksjonshastigheten før og etter 45 år. Figur 13 viser denne sammenhengen.



Figur 13: Raskt progressive motile spermier og alder med vendepunkt.

For å se på endring i raskt progressive motile spermier hos hvert enkelt individ ble det regnet ut endring i raskt progressive motile spermier per år. Populasjonen er på 417 menn som har avgitt to eller flere prøver med mer enn 365 dager mellom hver. Utviklingen hos hver enkelt mann er illustrert ved figur 14



Figur 14: Utvikling av raskt progressivt motile spermier hos enkeltindivider.

I likhet med normal-DNA ble analysen av endring i raskt progressive motile spermier gjort med en todelt regresjon med vendepunkt på 45 år (figur 15) med følgende resultat:

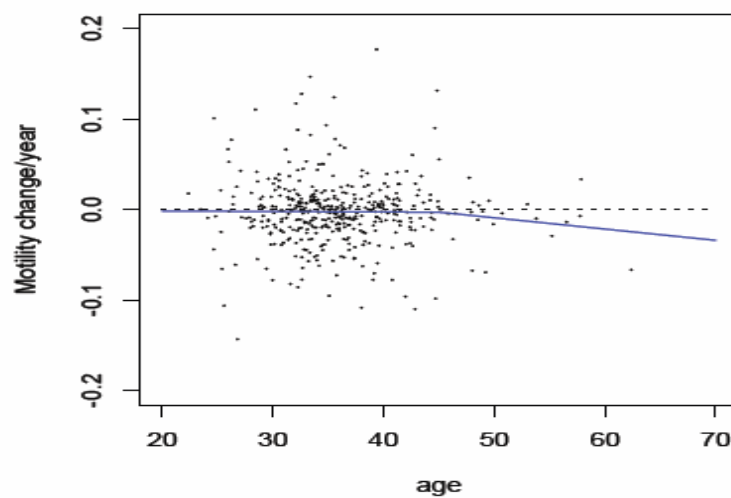
Endring i raskt progressive motile spermier per år < 45 år:

-0,02 (95 % konfidensintervall -0,29 til 0,25)

Endring i raskt progressive motile spermier per år > 45 år:

-0,45 (95 % konfidensintervall -1,29 til 0,37)

Sammenhengen er ikke statistisk signifikant.



Figur 15: Endring i raskt progressive motile spermier per år.

4 Resultatdiskusjon

Våre data (DNA-fragmentering og DNA-fargeopptak) bygger på analyse ved hjelp av SCSA som beskrevet over. Dette er en standardisert metode som har vist liten variasjon mellom laboratorier (10;25;40). Flere av studiene som resultatene våre sammenlignes med, har derimot brukt terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), som er en annen analysemetode. Ved TUNEL utsettes blant annet ikke spermene for denaturering slik som ved SCSA. Studier har vist at de ulike analysemetodene korrelerer moderat med hverandre og at de sannsynligvis måler noe ulike typer av DNA-skade (10;39). Det betyr at sammenligning med studier der TUNEL er benyttet, muligens bør vektlegges mindre.

Et søk i PubMed med søkeord "DNA-fragmentation sperm age" og filter på "human" ga 52 engelskspråklige treff. 15 artikler viste seg å være relevante i forhold til DNA-fragmentering og alder hos mannen (53-67). De aller fleste av disse studiene er utført på menn som er, eller har vært, til fertilitetsutredning. Dette samsvarer med vårt eget materiale. En gjennomgang av artiklene viser at det er svært sprikende resultater. Omtrent halvparten av studiene viser ingen signifikant sammenheng mellom mannens alder og DNA-fragmentering. Felles for mange av disse studiene er at de har en liten populasjon. Dette gjelder blant annet Braga et al. (50 menn) og Brahem et al. (40 menn) (54;57). Det er tre studier som skiller seg vesentlig ut med tanke på studiens størrelse. Den største studien er av Moskovtsev et al. Den inkluderer 2586 menn som oppsøkte et andrologisk laboratorium over en periode på fem år. Studien fant en signifikant sammenheng mellom DNA-fragmentering og alder. Pasientene var her delt inn i aldersgrupper (<30, 30-40, 40-50, >50), og verdiene for hver gruppe var signifikant økende (62). Moskovtsev har også en annen lignende studie med samme resultat, som trolig er basert på delvis overlappende pasientmateriale (66). Den siste studien med over tusen pasienter er Bellocs studie fra 2009 (61). Denne har benyttet TUNEL som analysemetode. Studien inkluderer 1769 menn, alle pasienter ved et fertilitetscenter. Også her finner man en liten, men signifikant økning i DNA-fragmentering ved økende alder. Det faktum at de tre største studiene har funnet en signifikant sammenheng, støtter våre egne funn.

En mindre del av studiene har sett på fertile eller antatt fertile menn. Dette er gjennomgående mindre studier, der den største har 97 menn (53). Denne har funnet en signifikant sammenheng. De resterende fire studiene har ikke funnet en signifikant sammenheng (58;63;65;67). Det er dermed mindre overbevisende resultater når det gjelder friske menn.

Man kan ikke med sikkerhet si at resultatene som baserer seg på menn som utredes for infertilitet er direkte overførbare til en fertil populasjon. Dette inkluderer også våre egne resultater. Samtidig vil en populasjon av menn til infertilitetsutredning også inneholde en stor andel fertile menn, ettersom problemet i mange tilfeller ligger hos kvinnen.

Vi har i tillegg til den lineære kurven over sammenheng mellom alder og DNA-fragmentering forsøkt å framstille data i en kurve med knekkpunkt. Bakgrunnen for dette var å se om mannlig reproduktiv aldring har et forløp tilsvarende det for kvinner, med en akselerasjon etter en viss alder. Vi fikk et statistisk beregnet knekkpunkt ved 45-års alder, der andelen spermier med DNA-fragmentering begynte å øke hurtigere. Sammenhengen var statistisk signifikant. Vi har ikke funnet andre studier som har framstilt resultater på denne måten, slik at det er vanskelig å sammenligne vårt funn med annen forskning.

I den siste delen av analysen ønsket vi å se på utviklingen i DNA-fragmentering hos enkeltindivider. Vi forventet å se en stigning fra prøve nummer 1 til prøve nummer 2. Analysen ga ingen signifikante resultater. Dette kan skyldes en kombinasjon av få data (n=209) og en stor dag til dag-variasjon. Heller ikke her har vi funnet andre studier å sammenligne med. En feilkilde ved denne analysen er at vi ikke vet noe om hva pasientene har foretatt seg i tiden mellom prøvene. Det er en mulighet for at noen har gjennomgått intervensjoner som kan ha påvirket resultatet og gitt en svakere sammenheng enn den reelle.

Når det gjelder analysen av DNA-fargeopptak, et mål på kromatinkondensering i spermene, fant vi en signifikant reduksjon i fargeopptak med alder, altså en økning i kromatinkondensering. Dette er motsatt av hva vi forventet å finne. Undersøkelse av utvikling hos enkeltindivider ga ingen signifikante resultater. Det finnes lite forskning på området, men en studie av Nijs et al. fant en liten signifikant sammenheng der DNA-fargeopptak økte med økende alder (55). Sammenhengen falt bort da de i stedet for å ha alder som en kontinuerlig variabel, delte resultatene inn etter aldersgrupper. Rybar et al. fant i sin studie ingen signifikant sammenheng mellom DNA-fargeopptak og alder (56). Vi har dermed lite forskning å sammenligne resultatet vårt med.

I tillegg valgte vi å lage en kombinert parameter kalt normal-DNA, der andelen spermier med DNA-fragmentering og DNA-fargeopptak ble trukket fra totalen, for å finne andelen normale spermier. Dette er ingen anerkjent parameter, og det finnes dermed ikke noe forskning å sammenligne resultatene våre med. Vårt resultat viste som forventet at andelen spermier med

såkalt ”normal-DNA” sank med økende alder. Også her fikk vi en markant økning i hastigheten ved 45-års alder når vi lagde kurve med knekkpunkt. Begge resultatene var signifikante. Heller ikke for normal-DNA fikk vi signifikant resultat for analysen som så på utvikling hos enkeltindivider. Resultatet for normal-DNA samsvarer med resultatet for DNA-fragmentering, der man forventer at normal-DNA synker når DNA-fragmentering øker. Dette ser ut til å dominere over DNA-fargeopptak, der andelen sank med økende alder og dermed skulle gitt økende normal-DNA.

Analysen vår viser en klar og statistisk signifikant sammenheng mellom økende alder hos menn og reduksjon i antall progressive motile spermier. Konfidensintervallene for den todelte regresjonsanalysen overlapper så vidt. Det er heller ikke en statistisk signifikant forskjell når vi ser på utviklingen hos hver enkelt mann. Dette kan skyldes at vi har for få menn. Studier av Maya et al. og Centola et. al finner også en signifikant sammenheng mellom alder og raskt progressive spermier (68;69). De har i likhet med vår undersøkelse studert menn under fertilitetsutredning. De har funnet en svakere sammenheng enn det vi har, men de har langt mindre studier på henholdsvis 1364 og 2065 menn. Hvorvidt man kan overføre forskningen til friske menn er usikkert. I en studie gjort på friske menn av Colin et al. sees også en reduksjon i raskt progressive spermier ved økende alder (58). Dette er en liten studie, men på tross av dette er resultatet statistisk signifikant.

En vesentlig feilkilde i våre data, er usikkerhet i laboratorieanalysene. Det er rapportert en betydelig dag til dag-variasjon for sædanalyser. I tidlige studier viste SCSA mindre dag til dag-variasjon enn standard sædparametre (70). En nyere studie (25) finner derimot at variasjonen er på linje med variasjonen for andre sædparametre. Denne rapporterer en dag til dag-variasjon på 30 % for DNA-fragmentering. I studien hadde 37 % av pasientene med DNA-fragmentering over 30 % i første testen, en verdi under 30 % i den neste. Dette kommer svært tydelig fram i våre pildiagrammer der endring fra prøve 1 til prøve 2 er framstilt, hvor man ser at det for mange menn er en stor endring på kort tid. En stor dag til dag-variasjon kan bidra til at vi ikke har fått signifikante verdier i analysene som skulle se på utviklingen hos hver enkelt person over tid. For å veie opp for den store dag til dag-variasjonen, ville man ideelt sett hatt et større prøvemateriale. Dette ble begrenset av at bare en relativt liten del av populasjonen hadde tatt de aktuelle prøvene to ganger med over et års mellomrom.

En svakhet ved vår egen og de andre studiene vi har sett på, er at datagrunnlaget i de øvre aldersgruppene er dårlig. I vår studie har vi for DNA-fragmentering data fra 388 menn over

45 år og 5728 menn under 45 år. Dette er en naturlig konsekvens av at materialet stammer fra menn som er til fertilitetsutredning, men hvis man ser for seg en utvikling der verdiene akselererer etter 45 år som vist i figur 9, ville det vært ønskelig med flere pasienter i denne aldersgruppen.

Et av de mest sentrale funnene i studien vår, er analysene som viser den markerte endringen ved 45-års alder. Dette er en framstillingsmåte vi ikke har sett brukt i tidligere forskning. For alle parametrene unntatt raskt progressiv motilitet er det en signifikant forskjell på grafens stigningstall før og etter det statistisk beregnede knekkpunktet på 45 år. Knekkpunktet inntreffer noen år senere enn hos kvinner. I tillegg ser man naturligvis ingen fruktbarhetsslutt tilsvarende kvinners menopause. Vårt funn tyder på at mannlig reproduktiv aldring ikke er en lineær prosess, men derimot har noe til felles med kvinnelig reproduktiv aldring, med en akselerering etter en gitt alder. Vi mener dette er et interessant funn med tanke på at man ikke vet så mye om forløpet av mannlig reproduktiv aldring.

Dessverre fant vi ingen signifikant utvikling for parametrene våre når vi studerte to prøver fra hver mann. Tanken bak å gjøre denne analysen var at hvis det er en sammenheng med alder i populasjonen som helhet, må denne stamme fra en økning hos enkeltindividene. En signifikant økning hos enkeltindivider over tid hadde dermed bidratt til å styrke vårt hovedfunn, nemlig at det er en sammenheng mellom alder og parametrene vi undersøkte i befolkningen. Vi mener at mangelen på statistisk signifikans sannsynligvis skyldes et for lite datamateriale tatt i betraktning den store dag til dag-variasjonen slike parametre har. Det hadde derfor vært nyttig å gjøre en tilsvarende studie med et større materiale.

Konklusjon

Sædkvaliteten blir dårligere med økende alder, blant annet ved at raskt progressiv motilitet reduseres og DNA-fragmenteringen øker. Tidligere forskning viser at parametrene er av stor betydning for befruktning in vitro og in vivo og abortraten etter IVF. Vi fant en negativ sammenheng mellom DNA-fargeopptak og alder, noe som var motsatt av det vi forventet. Viktigheten av dette funnet er usikkert ettersom man vet lite om den kliniske betydningen av DNA-fargeopptak. Etter 45-års alder ser det ut til at det er en større reduksjon av sædkvaliteten enn før 45 år, noe som tyder på en akselerasjon i mannens reproduktive aldring. Tidligere studier viser at mannens alder er av betydning for fertiliteten. I følge våre funn er

DNA-fragmentering og rask progressiv motilitet er parametre som kan si noe om reproduktiv aldring hos mannen.

5 Referanser

- (1) Vaupel JW. Biodemography of human ageing. *Nature* 2010 Mar 25;464(7288):536-42.
- (2) Oeppen J, Vaupel JW. Demography. Broken limits to life expectancy. *Science* 2002 May 10;296(5570):1029-31.
- (3) vB HJ, Iachine I, Skyttthe A, Vaupel JW, McGue M, Koskenvuo M, et al. Genetic influence on human lifespan and longevity. *Hum Genet* 2006 Apr;119(3):312-21.
- (4) Lockwood G. Fertility and infertility for dummies. John Wiley and Sons; 2007.
- (5) Braude P, Taylor A. ABC of subfertility. BMJ publishing group; 2004.
- (6) Stabile fødselstall. 7-4-2011. Statistisk sentralbyrå. 6-2-2012.
Ref Type: Online Source
- (7) Fitzgerald C, Zimon AE, Jones EE. Aging and reproductive potential in women. *Yale J Biol Med* 1998 Sep;71(5):367-81.
- (8) Djahanbakhch O, Ezzati M, Zosmer A. Reproductive ageing in women. *J Pathol* 2007 Jan;211(2):219-31.
- (9) Jessberger R. Age-related aneuploidy through cohesion exhaustion. *EMBO Rep* 2012 Jun;13(6):539-46.
- (10) Bungum M. Sperm DNA integrity assessment: a new tool in diagnosis and treatment of fertility. *Obstet Gynecol Int* 2012;2012:531042.
- (11) Desai N, Sabanegh E Jr, Kim T, Agarwal A. Free radical theory of aging: implications in male infertility. *Urology* 2010 Jan;75(1):14-9.
- (12) Mulligan T, Frick MF, Zuraw QC, Stenhagen A, McWhirter C. Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the HIM study. *Int J Clin Pract* 2006 Jul;60(7):762-9.
- (13) Sartorius GA, Nieschlag E. Paternal age and reproduction. *Hum Reprod Update* 2010 Jan;16(1):65-79.
- (14) Stewart AF, Kim ED. Fertility concerns for the aging male. *Urology* 2011 Sep;78(3):496-9.
- (15) Eisenberg DT, Hayes MG, Kuzawa CW. Delayed paternal age of reproduction in humans is associated with longer telomeres across two generations of descendants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 Jun 26;109(26):10251-6.

- (16) Kimura M, Cherkas LF, Kato BS, Demissie S, Hjelmborg JB, Brimacombe M, et al. Offspring's leukocyte telomere length, paternal age, and telomere elongation in sperm. *PLoS Genet* 2008 Feb;4(2):e37.
- (17) Hassan MA, Killick SR. Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age. *Fertil Steril* 2003 Jun;79 Suppl 3:1520-7.
- (18) Maconochie N, Doyle P, Prior S, Simmons R. Risk factors for first trimester miscarriage--results from a UK-population-based case-control study. *BJOG* 2007 Feb;114(2):170-86.
- (19) Kuhnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update* 2004 Jul;10(4):327-39.
- (20) Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 2012 Aug 23;488(7412):471-5.
- (21) Rowe T. Fertility and a woman's age. *J Reprod Med* 2006 Mar;51(3):157-63.
- (22) Dunson DB, Baird DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol* 2004 Jan;103(1):51-6.
- (23) Ford WC, North K, Taylor H, Farrow A, Hull MG, Golding J. Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood). *Hum Reprod* 2000 Aug;15(8):1703-8.
- (24) Velkommen til Seksjon for barnløshet og assistert befruktning. 1-6-2008. Oslo, Kvinneklinikken, Rikshospitalet. 3-2-2012.

Ref Type: Online Source

- (25) Bungum M, Bungum L, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* 2011 Jan;13(1):69-75.
- (26) Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66(4):691-700.
- (27) Stahl PJ, Stember DS, Goldstein M. Contemporary management of male infertility. *Annu Rev Med* 2012 Feb 18;63:525-40.
- (28) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5 ed. 2010.
- (29) Lin MH, Kuo-Kuang LR, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. 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. *Fertil Steril* 2008 Aug;90(2):352-9.

- (30) Cooper TG, Brazil C, Swan SH, Overstreet JW. Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *J Androl* 2007 Jan;28(1):1-4.
- (31) Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002 Feb;17(2):503-15.
- (32) Bjorndahl L, Haugen TB. [The information contained in a semen analysis]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2008 Jan 31;128(3):320-3.
- (33) Shibahara H, Shiraishi Y, Hirano Y, Suzuki T, Takamizawa S, Suzuki M. Diversity of the inhibitory effects on fertilization by anti-sperm antibodies bound to the surface of ejaculated human sperm. *Hum Reprod* 2003 Jul;18(7):1469-73.
- (34) Zini A, Lefebvre J, Kornitzer G, Bissonnette F, Kadoch IJ, Dean N, et al. Anti-sperm antibody levels are not related to fertilization or pregnancy rates after IVF or IVF/ICSI. *J Reprod Immunol* 2011 Jan;88(1):80-4.
- (35) Lipschultz L, Howards S, Niederberger C. *Infertility in the male*. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
- (36) Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006 Jan;8(1):11-29.
- (37) Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000 Jan;73(1):43-50.
- (38) Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002 Jan;23(1):25-43.
- (39) Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med* 2008 May;54(3):111-25.
- (40) Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008 Apr;89(4):823-31.
- (41) Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005 Oct;322(1):33-41.
- (42) Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010 Mar 1;93(4):1027-36.
- (43) Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 2006 Apr;12(4):466-72.

- (44) Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007 Jan;22(1):174-9.
- (45) Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, De MJ, Hazout A, et al. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2008 Sep;17(3):392-7.
- (46) Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004 May;81(5):1289-95.
- (47) Hinting A, Comhaire F, Schoonjans F. Capacity of objectively assessed sperm motility characteristics in differentiating between semen of fertile and subfertile men. *Fertil Steril* 1988 Oct;50(4):635-9.
- (48) Comhaire FH, Vermeulen L, Hinting A, Schoonjans F. Accuracy of sperm characteristics in predicting the in vitro fertilizing capacity of semen. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1988 Dec;5(6):326-31.
- (49) 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 Nov 8;345(19):1388-93.
- (50) Fedorcsak PZ. Spermiokromatin struktur assay. 7-11-2011.
Ref Type: Generic
- (51) Fedorcsak PZ. Spermiemotilitet. 4-11-2011.
Ref Type: Generic
- (52) Fedorcsak PZ. Sædprøvetaking. 4-11-2011.
Ref Type: Generic
- (53) Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Jun 20;103(25):9601-6.
- (54) de Almeida Ferreira Braga DP, Setti AS, Figueira RC, Nichi M, Martinhago CD, Iaconelli A, Jr., et al. Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology* 2011 Oct;78(4):786-91.
- (55) Nijs M, De JC, Cox A, Janssen M, Bosmans E, Ombelet W. Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology. *Andrologia* 2011 Jun;43(3):174-9.
- (56) Rybar R, Kopecka V, Prinosilova P, Markova P, Rubes J. Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia* 2011 Aug;43(4):286-91.

- (57) Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Semen processing by density gradient centrifugation is useful in selecting sperm with higher double-strand DNA integrity. *Andrologia* 2011 Jun;43(3):196-202.
- (58) Colin A, Barroso G, Gomez-Lopez N, Duran EH, Oehninger S. The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2010 Dec;94(7):2609-14.
- (59) Hammiche F, Laven JS, Boxmeer JC, Dohle GR, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Sperm quality decline among men below 60 years of age undergoing IVF or ICSI treatment. *J Androl* 2011 Jan;32(1):70-6.
- (60) Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Weber RF, Dohle GR. Sperm chromatin structure is associated with the quality of spermatogenesis in infertile patients. *Fertil Steril* 2010 Oct;94(5):1748-52.
- (61) Belloc S, Benkhalifa M, Junca AM, Dumont M, Bacrie PC, Menezo Y. Paternal age and sperm DNA decay: discrepancy between chromomycin and aniline blue staining. *Reprod Biomed Online* 2009 Aug;19(2):264-9.
- (62) Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 2009 Oct;74(4):789-93.
- (63) Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J Assist Reprod Genet* 2009 Jan;26(1):41-6.
- (64) Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, et al. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online* 2007 Nov;15(5):514-9.
- (65) Plastira K, Msaouel P, Angelopoulou R, Zanioti K, Plastiras A, Pothos A, et al. The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2007 Oct;24(10):437-43.
- (66) Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JB. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril* 2006 Feb;85(2):496-9.
- (67) Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *J Assist Reprod Genet* 2011 May;28(5):425-32.
- (68) Cardona MW, Berdugo J, Cadavid JA. The effects of male age on semen parameters: analysis of 1364 men attending an andrology center. *Aging Male* 2009 Dec;12(4):100-3.
- (69) Centola GM, Eberly S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration. *Fertil Steril* 1999 Nov;72(5):803-8.

- (70) Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999 Apr;14(4):1039-49.