

지주세포증후군 환자에서 생식세포 배양의 유용성

Efficacy of *In Vitro* Germ Cell Culture in Nonobstructive Azoospermic Patients with Sertoli Cell Only Syndrome

Jong Jin Oh, Jung Jin Lim¹, Dong Ryul Lee¹, Young Kwon Hong, Jae Yup Hong

From the Department of Urology, College of Medicine, Pochon CHA University, Seongnam, ¹Fertility Center of CHA General Hospital, CHA Research Institute, Pochon CHA University, Seoul, Korea

Purpose: We determined the usefulness of *in vitro* germ cell culture in nonobstructive azoospermic patients diagnosed with Sertoli cell only syndrome, no sperm in testicular sperm extraction.

Materials and Methods: This study included 44 patients (45 testicular tissues) with nonobstructive azoospermia who were diagnosed with Sertoli cell only syndrome and were found to have no sperm in testicular sperm extraction between January 2006 and July 2008. Among the 45 testicular tissues, 22 tissues were processed for culture. In the *in vitro* cultures, the testicular tissues were dissociated and plated on gelatin-coated dishes. Patients were divided into 2 groups according to culture success: group I, culture positive (+; n=10); and group II, culture negative (-; n=12).

Results: The mean patient ages were 31.73 and 31.68 years for groups I and II, respectively. The mean testicular sizes were 10.19 and 10.42 cc, respectively; the semen volumes were 2.86 and 3.04 cc, respectively; and the mean FSH, LH, and testosterone levels were 18.86 mIU/ml, 5.99 mIU/ml, and 4.46 ng/ml vs. 21.02 mIU/ml, 6.29 mIU/ml, and 4.32 ng/ml for groups I and II, respectively, with no significant differences between the groups ($p>0.05$). The culture rate of nonobstructive azoospermic patients diagnosed with Sertoli cell only syndrome was 45.5% (10/22). Round spermatid injection was done in 2 patients with consent of the patients, but implantation failed. Among the 45 tissues, germ cells were found in 8 tissues after pathologic reexamination.

Conclusions: The *in vitro* culture of germ cells would be useful in the advanced treatment of nonobstructive azoospermic patients. (Korean J Urol 2009;50:267-271)

Key Words: Azoospermia, Sertoli cell-only syndrome, *In vitro* culture

Korean Journal of Urology
Vol. 50 No. 3: 267-271, March 2009

DOI: 10.4111/kju.2009.50.3.267

포천중문의과대학교 비뇨기과학교실,
¹차병원 여성의학연구소 불임연구실

오종진 · 임정진¹ · 이동률¹
홍영권 · 홍재엽

Received : August 28, 2008
Accepted : February 2, 2009

Correspondence to: Jae Yup Hong
Department of Urology, Bundang
CHA Hospital, 351, Yatap-dong,
Bundang-gu, Seongnam 463-712,
Korea
TEL: 031-780-5274
FAX: 031-780-5323
E-mail: honguro4@hanmail.net

© The Korean Urological Association, 2009

서 론

지주세포 증후군은 del Castillo 등¹이 처음 언급하였는데 완전한 무정자증으로 고환조직에서 세정관을 이루는 정상 지주세포 (Sertoli cell)만 있고 생식세포 (germ cell)는 전혀 없는 경우를 말한다. 이런 경우에 이론적으로는 고환생검 조직에서 정자가 발견되지 않기 때문에 치료방법이 없다. 하지만, 이전의 조직 검사에서 지주세포증후군으로 진단이

되어도 다중적고환조직정자채취술 시에 정자 생성을 하는 부위가 있어 정자추출 및 임신에 성공하고 있다.^{2,3} 지주세포증후군으로 진단되어도 정자 채취 시에 정자세포가 발견되는 이유는 한 환자의 고환에서도 서로 다른 조직학적 소견이 공존할 수 있고, 고환조직 정자채취술 (testicular sperm extraction; TESE)과 조직검사에 이용되는 고환조직의 양이 서로 다르며, 고환조직 판독에 있어 검사자 간 차이나 오류가 있을 수 있기 때문이다.⁴

최근 난자세포질 내 정자주입법이 활성화 되면서 성공률

을 높이기 위해 질 좋은 정자나 성숙된 정자세포를 선택하는 일이 중요하게 되었고, 고환조직의 체외배양을 하였을 때 세포의 자멸사가 감소되고, 정자의 DNA 손상의 빈도를 현저히 낮출 수 있다는 것이 보고되어 대두된 방법이 정자세포의 체외배양이다.³

최근 비폐쇄성무정자증 환자에서 생식세포의 체외배양을 시도하였을 때, 원형정자세포가 배양된다는 보고가 있다.⁵ Lee 등⁵의 결과에 따르면, 비폐쇄성무정자증 환자 55명 중 지주세포증후군에서 13명, 정자성숙정지 환자에서 12명에서 정세포의 체외배양에 성공하였다. 이 점에 착안하여, 본 연구에서는 다중적 고환조직채취술 시 정자가 없고 고환조직학적 검사에서, 정자세포가 발견되지 않을 때 임신을 포기할 수 밖에 없는 현실에서 이를 극복하기 위한 생식세포 배양을 알아보고자 한다.

대상 및 방법

2006년 1월부터 불임을 주소로 분당차병원 비뇨기과에 내원한 환자 중 정액 검사에서 무정자증으로 진단 받고, 다중적고환정자채취술 (multiple TESE)을 시행하여 정자가 발견되지 않은 환자 중에서 조직학적 검사에서 지주세포 증후군으로 진단 받은 환자 44명을 대상으로 하였다.

초진 시 환자의 연령, 불임기간 또는 임신의 과거력 등 불임 관련사항에 대한 조사와 고환용적 측정 등의 신체검사를 실시하였으며 불임기간은 피임기간을 제외한 결혼 이후 초진까지의 기간을 불임기간으로 하였다. 불임의 원인을 진단하기 위하여 정액검사를 실시하였다. 정액검사 시 무정자증으로 진단받은 환자에서 호르몬검사를 실시하여 비폐쇄성무정자증이 의심되는 환자에서 염색체 검사와 deleted in azoospermia (DAZ) 유전자 검사를 시행하였다. 세정관 내 조직학적 관찰과 정자 유무를 알기 위하여 TESE를 시행하였으며, 정자가 발견되지 않은 환자 중에서 고환 조직 검사에서 지주세포증후군으로 진단 받은 환자를 본 연구의 대상으로 하였다.

체외배양의 결과로 콜로니를 형성한 이후 (Fig. 1), 원형정자세포로 분화된 경우 배양 성공으로 평가하였으며, 환자의 동의 하에 이차 배양 및 원형정자세포주입법 (round spermatid injection; ROSI)을 시도하였다. ROSI는 배양된 고환 조직에서 원형정자세포를 얻은 후에, ROSI 계획으로 배란 유도된 배우자의 성숙 난자에 주입하는 방법으로 시행하였으며, 과배란 후 평균 11.2개의 난자를 이용하여 시행하였고, 평균 6.7개의 전핵 (pronucleus)을 형성하여 50% 정도의 수정 성공률을 보였으며, ROSI 72시간 후 전핵을 확인하여 배아이식 (embryo transfer)을 시행하였다.

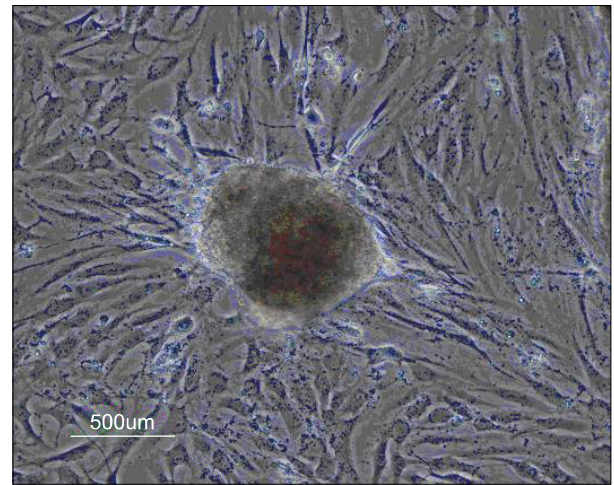


Fig. 1. In vitro culture, formatted colony.

세포의 배양은 Lee 등⁵이 보고한 0.5 mg/ml 콜라겐나제 (Type I; Sigma Chemical Co., St Louis, USA), 10 µg/ml DNase I, 1 µg/ml soybean trypsin inhibitor (Gibco, Grand Island, USA), 그리고 1 mg/ml hyaluronidase (Sigma) in Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free phosphate-buffered saline (PBS)의 효소에서 해리시켜 실온에서 20분간 배양후, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)의 젤라틴 코팅 배양접시 2-4주간 배양하는 방법으로 시행하였다.

본 연구는 시술 전, 원형정자세포를 이용한 난자 내 정자주입술에 대하여 환자들에게 충분한 설명과 수술 및 장기배양 동의서를 받은 상태로 진행하였으며, 임상 시험 심사위원회의 심의를 거쳐 진행하였다.

결과에 대한 통계적 분석은 Statistical Package for the Social Science (SPSS, version 13.0)를 사용하였으며 유의성 검정은 chi-square test를 이용하였다. 유의 수준은 p값이 0.05 미만인 경우를 기준으로 하였다.

결 과

지주세포증후군으로 진단받은 환자 44명의 연령 분포는 21세에서 42세까지였고 평균 연령은 32.16세였다. 정액량은 평균 3.05 cc였으며, 고환 용적은 우측 9.88 cc, 좌측 10.05 cc였고, 염색체 검사에서 모두 46XY로 정상 소견을 보였으며, DAZ 유전자 이상을 보인 환자는 6명이었다. 호르몬 검사의 혈중 평균치는 각각 follicle stimulating hormone (FSH)는 20.48 mIU/ml, luteinizing hormone (LH)는 6.54 mIU/ml, testosterone은 4.02 ng/ml였다. 과거력에서 고혈압과 당뇨는 없었고, 생식기계 외상 과거력도 없었으며, 성 매개 감염의 과거력은 한명에서 있었다 (Table 1).

Table 1. Characteristics of patients with Sertoli cell only syndrome (SCO; n=44)

Characteristics	Values (range) or No. of patients (%)
Mean age (years)	32.16
Non-married	3 (6.82%)
Testis size (cc)	
Right	9.88
Left	10.05
Semen volume (cc)	3.05
Chromosomal abnormality	0
DAZ abnormality	6 (13.64%)
Genital trauma Hx	0
STD Hx	1 (2.27%)
Mean FSH (mIU/ml)	20.48
Mean LH (mIU/ml)	6.54
Mean testosterone (ng/ml)	4.02
Mean prolactin (ng/ml)	11.69

DAZ: deleted in azoospermia, STD: sexual transmitted disease, FSH: follicle stimulating hormone, LH: luteinizing hormone.

지주세포 증후군으로 진단받은 환자 44명 중 (45개의 조직), 환자의 동의 하에 체외 세포 배양을 21명 (22조직)에서 시행하였고, 22조직 중 10조직에서 배양에 성공하였다 (45.45%). 배양에 성공한 10조직을 1군으로, 나머지 12조직을 2군으로 분류하여 조사한 결과 평균나이는 31.73세, 31.68세로 측정되었으며, 평균 고환 용적은 1군과 2군에서 각각 10.19 cc, 10.42 cc로 측정되었고, 평균 정액량은 2.86 cc, 3.04 cc였고, DAZ 유전자 검사 시에 이상소견은 1군에서만 2례 발견되었고, 평균 FSH, LH, testosterone은 각각 1군에서 18.86 mIU/ml, 5.99 mIU/ml, 4.46 ng/ml로 2군에서 21.02 mIU/ml, 6.29 mIU/ml, 4.32 ng/ml로 측정되었으나 연관성을 찾는 분석에서 모두 통계학적인 유의성은 찾을 수 없었다 (Table 2). 배양에 성공한 10례 중에서 환자가 동의한 경우에 한하여 원형 정자 세포 주입 (ROSI)을 2례에서 시행하였으나 착상에는 실패하였다. 나머지 8례에서는 경제적인 면 등에서 동의하지 않았다.

생식세포가 관찰되지 않는 지주세포 증후군 환자에서 배양 시에 정자세포가 배양된다는 점에 착안하여 병리검사를 다시 시행한 결과, 45조직 중 8조직에서 정세포가 발견되었는데 7례에서 정조세포, 1례에서 정모세포가 발견되었다 (17.78%).

병리 재검 시 정자세포가 발견된 조직 8개 중에서 배양검사를 시행한 조직이 총 2조직이 있었으며, 그 중 한 조직에서는 배양이 되었고, 다른 한 조직에서는 배양이 되지 않아 통계적인 유의성을 찾을 수 없었다 ($p>0.05$). 배양이 된 10

Table 2. Comparison of parameters in relation to culture success

Variables	Culture (+) n=10	Culture (-) n=12	p-value
Mean age (years)	31.73	31.68	NS
Testis size (cc)	10.19	10.42	NS
Semen volume (cc)	2.86	3.04	NS
DAZ abnormality (%)	20	0	NS
Mean FSH (mIU/ml)	18.86	21.02	NS
Mean LH (mIU/ml)	5.99	6.29	NS
Mean testosterone (ng/ml)	4.46	4.32	NS
Mean prolactin (ng/ml)	12.40	11.03	NS

DAZ: deleted in azoospermia, STD: sexual transmitted disease, FSH: follicle stimulating hormone, LH: luteinizing hormone, NS: not significant

조직 중에서 병리 재검 시 9조직에서는 정자세포가 발견되지 않았으며, 1조직에서만 발견되어 역시 통계적인 유의성은 없었다 ($p>0.05$).

고 찰

고환 기능 부전으로 인한 비폐쇄성무정자증 환자는 불임 남성의 약 7-15%를 차지하지만^{6,8} 최근 이러한 비폐쇄성무정자증 환자에서도 TESE 등으로 정자를 채취하고 난자세포질 내 정자주입법 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI)을 이용하여 임신에 성공한 사례 많은 수의 비폐쇄성무정자증 환자에서 임신과 출산에 성공하고 있다.^{6,9,10} 그럼에도 불구하고 고환조직 채취 시에 정자를 발견하지 못하는 경우에는 비배우자 인공수정이나 입양하는 것 외에는 현재로서는 치료법이 없다.²

불임환자의 고환조직 소견에서 지주세포증후군으로 관찰되는 경우는 보고자에 따라 10-40%로 그 범위가 넓다.^{2,11,12} Kim과 Lee²의 보고에 따르면 한국에서 불임환자의 24.1%에서 지주세포증후군이 보고되었다. 지주세포증후군에서 대부분 정액검사에서 무정자증을 보이나, 일부 환자에서는 정액에 정자가 관찰될 수도 있다고 보고된다.^{2,12} 178례 중 7례에서 정자가 나타난 경우가 보고되어 병리소견과 모순된 결과를 보여 지주세포증후군의 병리학적 진단이 임상적 기준이 될 수 없음을 보여준다.²

실제로 본 연구에서도 생식세포가 관찰되지 않았던 지주세포증후군 환자에서 병리슬라이드를 통해 재검사를 시행한 결과, 45조직 중 8조직 (17.78%)에서 정세포 (7조직은 정조세포, 1조직은 정모세포)가 발견되었다. 따라서, 병리학적인 진단이 최종진단이 될 수 없을 뿐 아니라 병리학적인 진단에서 지주세포증후군으로 진단되어도 정자세포가 있을 가

능성을 배제할 수 없다.

또한, 한 번의 정자채취술 이후에 정자가 발견되지 않아 치료를 종결할 것인가에 대한 논란의 여지가 있다. 실제로 TESE를 시행할 경우, 얻어지는 조직의 양과 부위가 고환 전체를 정확히 대표하지는 않는다.^{3,13} 정자채취는 한 번 시술 후 정자 획득에 실패한 경우에는 반복하여 정자채취를 시도하는 것이 정자 획득의 기회를 높일 수 있다고 하지만 이렇게 정자채취를 여러 번 시행하면 생검 자리에 염종과 혈종 형성이 생기고 장기적으로 고환에 혈액공급장애 등이 나타날 수 있어 정자생성에 해로운 영향을 줄 수 있고,^{14,15} 특히 반복적인 정자채취술을 6개월 안에 시행한다면 정자채취를 어렵게 할 수 있다고 하였다.

다중적 고환조직정자채취술을 시행하면 정자채취 성공률을 높일 수 있는데, 보고에 의하면 48-52%의 정자채취성공률을 보였다.^{6,9,16-18} 다중적 고환조직정자채취술 시행으로 지주세포증후군으로 진단 받았던 환자에서 정자채취가 보고되는데, Su 등¹⁹은 이전의 조직검사에서 지주세포 증후군으로 진단된 환자에서 다중적 고환조직정자채취술 시행 시 24%의 정자채취율을 보고하였고, Seo와 Ko¹³는 지주세포증후군에서 16.3%의 정자채취율을 보고하였다. 이는 한 환자의 고환에서도 서로 다른 조직학적 소견이 공존할 수 있고, 채취 시 이용되는 고환조직의 양이 서로 다르며, 고환조직 판독에 있어 검사자 간 차이나 오류가 있을 수 있기 때문이라고 보고하였다.^{4,20}

본 연구에서도 고환조직 채취 시 다중적 고환정자채취술을 시행하였으며, 정자가 발견되지 않은 경우는 환자와 상의 후 반대측 고환에서 시행하였다. 그럼에도 불구하고 정자가 발견되지 않은 경우, 체외배양을 실시하였다. 체외배양을 실시한 조직은 총 43조직이었으며, 이 중 조직학적 진단에서 지주세포증후군이 22조직 (51.16%), 정조세포에서 정자형성정지가 9조직 (20.93%), 정모세포에서 정자형성정지가 12조직 (27.91%)이었다. 하지만, 배양에 성공한 경우는 총 10조직이었으며, 모두 지주세포증후군에서 배양되었다. 이런 결과로 배양의 결과에 조직학적 진단이 영향을 미치지 못하는 것을 알 수 있다.

Lee 등⁵의 보고에 따르면, 비폐쇄성무정자증 환자에서 고환조직의 배양결과, 정자성숙정지 환자 2명과 지주세포증후군 환자 11명에서 배양을 시행하였을 때, 각각 100%, 36.3%의 배양결과를 보였다. 저자들의 경우 지주세포증후군에서 45.45%, 정자성숙정지 환자에서는 배양이 되지 않는 결과를 보여 결과 간의 다소 차이가 있지만, 지주세포증후군에서도 정세포가 배양된다는 점에서 의의를 가진다.

정세포의 체외배양은 다른 연구자들에 의해 많이 연구되어 왔는데, 일반적으로 줄기세포를 배양하면, 다른 세포와는

달리 콜로니를 형성하는 특징을 가지고 있다. 과거 연구자들은 초기 배양한 세포를 줄기세포의 특이적인 항체를 이용하여 염색을 해 보았는데, 이 항체들은 특이적으로 콜로니에서만 염색이 되고 그 나머지 세포들에는 염색이 되지 않았다. 여기에 착안하여 줄기세포는 우선 콜로니를 형성한 군을 지칭하게 되었으며, 본 연구에서 배양한 세포는 고환조직을 이용하였으므로 고환조직 내에 존재하는 소량의 정원세포에 의하여 만들어진 생식줄기세포라고 말할 수 있다.²¹

생식줄기세포가 만들어졌다고 무조건 원형 정자세포가 만들어지는 것은 아니다. 정원세포유래의 줄기세포에서 원형 정자세포가 되기 위해서는 2번의 감수분열을 거쳐야 한다. 하지만, 생식줄기세포의 수가 워낙 적기 때문에 무정자증 환자군에서는 우선 콜로니가 만들어지면 이것을 체외조건에서 가능한 많은 수로 증식시킨다. 이런식으로 증식시킨 생식줄기세포는 정자형성과정에 관여하는 성장인자와 호르몬을 처리하여 분화를 유도하게 된다.^{22,23}

분화 유도는 정모세포와 정세포의 관찰로 면역 조직 화학 염색과 특이적인 유전자의 발현으로 확인하여 체외 정세포 배양의 근거를 마련하였다.^{22,23} 체외배양은 정세포의 성숙 과정에도 관여하는데, Tesarik 등²⁴⁻²⁷은 지주 세포를 포함한 배양 체계를 통해 일차 정모세포단계의 성숙 정지와 정자세포단계의 성숙 정지 환자들에서 1-2일의 체외배양을 통해 일차정모세포에서 정자세포로 분화를 시켜 난자 세포질 내 정자 주입법을 통해 임신율 보고하기도 하였다.

본 연구에서는 성숙정지뿐 아니라 조직학적 진단에서도 정세포가 발견 되지 않는 지주세포증후군에서도 체외배양 시 정세포를 만들어 원형정자세포주입법에 적용할 수 있다는 근거를 제공한다는 점에서 의미를 갖는다. 또한, 환자 본인 이외의 세포는 사용하지 않았으며, 시약도 일반적으로 시험관 시술에 사용하는 검증된 것만 사용하였고, 혈청의 사용량도 최소화하여 안전성을 높였으며, 임상 시험 심사위원회의 심의를 거쳐 진행하였다. 따라서 앞으로 불임치료의 영역에서 정자가 발견되지 않아 치료를 진행할 수 없는 환자들에게 정자조직의 체외배양은 새로운 치료의 선택 방향을 제시하리라 생각한다. 하지만, 아직 임신이 성공된 사례가 없고, 체외배양을 통해 불임 환자의 유전적 특성이 전달될 수 있다는 점, 불임 이외의 다른 문제들이 간과된다는 점에서 신중한 상담과 관찰이 필요하며, 앞으로 관련 연구와 윤리적 논의가 필요할 것으로 생각한다.

결 론

비폐쇄성무정자증 환자에서 TESE 등의 정자 채취 시에 정자가 발견되지 않고 조직학적 진단에서 지주세포증후군

으로 진단 받은 환자에서 현재로서는 치료 방법이 없는 것이 현실이다. 하지만, 고환조직의 체외배양을 실시하였을 때, 즉 생식줄기세포의 배양과 생식줄기세포의 분화 과정을 통해 이러한 환자에서 정세포의 일부 배양이 가능함에 따라 고환조직의 체외배양이 불임환자 치료의 새로운 선택 방향이 될 것으로 보인다.

REFERENCES

- del Castillo EB, Trabucco A, de la Balze FA. Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1947;7:993
- Kim CS, Lee HY. Sertoli cell only syndrome. *Korean J Urol* 1987;28:97-104
- Korean Andrology Society. Textbook of andrology. 1st ed. Seoul: Koonja Publishing Inc; 2003;137-65
- Ezeh UI, Moore HD, Cooke ID. Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum Reprod* 1998;13:3066-74
- Lee DR, Kim KS, Yang YH, Oh HS, Lee SH, Chung TG, et al. Isolation of male germ stem cell-like cells from testicular tissue of non-obstructive azoospermic patients and differentiation into haploid male germ cells in vitro. *Hum Reprod* 2006;21:471-6
- Ko WJ, Seo JT. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermic patients. *Korean J Urol* 2000;41:381-6
- Harris SE, Sandlow JJ. Sperm acquisition in nonobstructive azoospermia: what are the options? *Urol Clin North Am* 2008; 35:235-42
- Ubaldi F, Nagy ZP, Rienzi L, Tesarik J, Anniballo R, Franco G, et al. Reproductive capacity of spermatozoa from men with testicular failure. *Hum Reprod* 1999;14:2796-800
- Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995;10:1457-60
- Tournaye H, Camus M, Goossens A, Liu J, Nagy P, Silber S, et al. Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995; 10(Suppl 1):115-9
- Park WH, Rou CH, Choo KW. The relationship between the size of the testis and plasma hormonal levels in Sertoli cell only syndrome. *Korean J Urol* 1981;22:424-8
- Wong TW, Straus FH, Jones TM, Warner NE. Pathological aspects of the infertile testis. *Urol Clin North Am* 1978;5: 503-30
- Seo JT, Ko WJ. Predictive factors of successful testicular sperm recovery in non-obstructive azoospermia patients. *Int J Androl* 2001;24:306-10
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995;10:148-52
- Seo JT, Park YS, Kim JH, Lee YS, Jun JH, Lee HJ, et al. The treatment of non-obstructive azoospermia. *Korean J Fertil Steril* 1997;24:95-9
- Kahraman S, Ozgur S, Alatas C, Aksoy S, Tasdemir M, Nuhoglu A, et al. Fertility with testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 1996;11:756-60
- Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, Menendez S, Zaninovic N, Veeck LL, et al. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology* 1997;49:435-40
- Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goossens A, Silber S, et al. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996;11:127-32
- Su LM, Palermo GD, Goldstein M, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia: testicular histology can predict success of sperm retrieval. *J Urol* 1999; 161:112-6
- Hong YK, Shin JS, Lee WS. Investigations on the factors predicting the results of testis sperm extraction. *Korean J Urol* 1999;40:1349-54
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13726-31
- Tanaka A, Nagayoshi M, Awata S, Mawatari Y, Tanaka I, Kusunoki H. Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl 1):795-801
- Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, et al. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 2002;297:392-5
- Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod* 1998;4:757-62
- Tesarik J, Mendoza C, Testart J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med* 1995;333:525
- Tesarik J, Mendoza C. Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum Reprod* 1996;11:772-9
- Tesarik J, Guido M, Mendoza C, Greco E. Human spermatogenesis in vitro: respective effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on meiosis, spermiogenesis, and Sertoli cell apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4467-73