

TESE'de başarıyı belirleyen faktörler

Doç. Dr. Tahsin Turunç

Başkent Üniversitesi, Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi, Üroloji Kliniği

Azoospermi, ejakulatta hiç sperm bulunmaması anlamına gelir ve erkeklerin %1'inde, infertilite yakınması olanların ise %10-15'inde bulunur (1,2). Nonobstrüktif azoospermi (NOA), testislerde tam olarak gelişmiş sperm minimal olması ya da üretilmemesi nedeniyle ejakulatta spermatozoa yokluğu olarak tanımlanır. NOA olgularında günümüzde kabul gören tedavi testiküler sperm ekstrasyonu (TESE) yöntemidir. TESE'de elde edilen spermatozoalar intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda (ICSI) kullanılarak sağlıklı gebelikler sağlanabilmektedir. ICSI, 1992 yılında Palermo tarafından uygulanmış ve ilk gebelik gerçekleşmiştir (3). Konvansiyonel yöntemle yapılan TESE operasyonlarında alınan biyopsi sayısının artırılmasının sperm bulma ihtimalini arttırdığı gösterilmiştir (4). Fakat, fazla sayıda doku alınmasının intratestiküler hematoma ve fibrozis olasılığını arttırdığı, aynı zamanda düşük volümlü testislerin serum testosteronunda düşmeye yol açabileceği bilinmektedir (5,6). TESE, önce konvansiyonel çoklu biyopsilerle yapılmaktayken günümüzde mikrodiseksiyon yöntemi ile (mikro TESE) uygulanmaktadır. Mikro TESE ilk defa Schlegel tarafından 1999 yılında tanımlanmıştır (7). NOA tanılı hastalarda mikroTESE operasyonunda spermatozoa bulma oranı %60 olarak verilmektedir (8).

Günümüzde NOA hastalarında TESE öncesi testislerde spermatozoa olup olmadığını kesin olarak gösterecek herhangi bir klinik parametre bulunmamaktadır. Buna rağmen, NOA tanısıyla TESE operasyonu yapılmadan önce bazı klinik ve laboratuvar verilerine bakılarak TESE'de sperm bulma ihtimalini öngörecektir çeşitli parametreler geliştirilmiş ve halen geliştirilmeye çalışılmaktadır. Daha önce geliştirilen parametreleri ve sperm bulma olasılığı üzerine etkisi olabileceği düşünülen yöntemleri kısaca hatırlayalım;

Testis biyopsisi

Çoklu testis biyopsisinin TESE operasyonunun sonuç-

ları ile uyumlu olduğu birçok çalışmada gösterilmiş olmakla beraber günümüzde testis biyopsisi bir tanı aracı olarak değil, TESE'nin bir parçası olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Testiküler histoloji, TESE'de sperm bulunup bulunmayacağına belirlenmesinde iyi bir prediktif faktör olarak bilinmektedir (9,10,11). Bunun aksine, testis biyopsisinde sertoli cell only sendromu saptanan hastalarda bile daha sonra yapılacak TESE operasyonlarında azımsanmayacak oranlarda sperm bulunabildiği ve testiküler histolojinin TESE başarısını göstermede yeterli olmayabileceğini öne süren çalışmalar da yapılmıştır (12,13). EAU 2013 kılavuzuna göre ise tanısal testis biyopsisi histolojisi ile TESE'de alınan biyopsinin histolojisi arasında yüksek bir korelasyon bulunduğu bildirilmektedir.

Testis boyutu

Testis boyutu ile TESE'de sperm bulma olasılığı arasında ilişki olup olmadığını inceleyen çalışmalarda daha çok kabul gören sonuç, testis boyutu ile TESE sonucu arasında herhangi bir ilişki olmadığıdır. Yapılan bir çalışmada normal volümlü testislerin %44'ünde, küçük volümlü testislerin de %25'inde spermatozoa bulunmuş ve testis volümleri 5 ml'den az olan olgularda bile spermatozoa bulunabileceği gösterilmiştir (14). Bir başka çalışmada ise testis volümü 5ml ve daha düşük olan hastalarda sperm elde etme oranı %20.8, 6-15 ml arasında olan hastalarda %40 ve 16 ml ve daha üstü olan hastalarda ise %58.2 olarak bulunmuştur (15). Bu çalışmaya rağmen günümüzde testis boyutu çok düşük olan hastalarda bile TESE uygulanması gerektiği görüşü kabul görmüştür (16). EAU 2013 kılavuzuna göre testis boyutu ile sperm bulma olasılığı arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır.

Serum FSH düzeyi

FSH düzeyi seminifer tubüllerdeki spermatogonium miktarını yansıtır, fakat spermatozoa üretimiyle bir ilişkisi

yoktur (17). Buna rağmen FSH düzeyinin yüksek olmasının TESE'de sperm bulma olasılığını istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırdığını gösteren çalışmalar vardır (15). Yapılan bir başka çalışmada ise NOA tanılı hastalar TESE operasyonu öncesi kan FSH düzeyleri <15, 15-30, 31-45 ve >45 IU/mL olmak üzere 4 ayrı gruba ayrılmış ve TESE sonrasında gruplar arasında sperm bulma oranları açısından anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür (18). Dolayısıyla serum FSH düzeyinin normal olması spermatozoa bulma ihtimalini arttırmayacağı gibi yüksek FSH düzeyi de spermatozoa bulunmayacağı anlamına gelmemektedir (9). EAU 2013 kılavuzuna göre serum FSH düzeyi ile sperm bulma olasılığı arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır.

Serum inhibin B düzeyi

Hipofizden salgılanan FSH hormonu sertoli hücreleri tarafından yapılan inhibin B hormonu ile kontrol edilir. NOA hastalarında inhibin B'nin belirli bir seviyenin altında (40 pg/ml altı) olmasının TESE'de spermatozoa bulma şansını azalttığı gösterilmiştir (19,20,21). Yapılan bazı çalışmalarda ise bu çalışmaların aksine, serum inhibin B düzeyindeki düşme ile sperm bulma ihtimali arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (22,23). Buna rağmen inhibin B'nin TESE'de sperm bulma ihtimalini göstermede FSH'dan daha duyarlı olabileceği ileri sürülmektedir (24). EAU 2012 kılavuzuna göre serum inhibin B düzeyi ile sperm bulma olasılığı arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır.

Y Kromozomu mikrolelesyonu

Azoospermiye neden olan delesyonların en sık görüldüğü bölge Y kromozomunun uzun kolu üzerinde lokalizedir (Yq11). Y kromozomu mikrolelesyonu azoospermik hastaların %10-15'inde görülür (25). AZFa, AZFb ve AZFc olmak üzere üç farklı mikrolelesyon bölgesi vardır. AZFc delesyonları en sık görülen delesyonlardır ve ejakulatta spermatozoa bulunabilir. Fakat, AZFb ve AZFa delesyonlarının prognozu daha kötüdür (26). EAU 2013 kılavuzuna göre AZFa, AZFb ve bu bölgelerin içinde bulunduğu kombine delesyonlarda TESE'de sperm bulunamayacağı kabul edilmektedir.

Klinefelter sendromu

Klinefelter sendromu olan hastalarda sperm bulma ih-

timali normal bireylerden daha düşüktür (15). Fakat, literatürde Klinefelter sendromu olan hastalarda TESE sonuçlarına bakıldığı zaman sperm bulma ihtimalinin KS olmayan hastalar ile hemen hemen aynı olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (27). Hatta yapılan bir çalışmada Klinefelter sendromlu hastalarda TESE'de sperm bulma ihtimali %69 olarak bulunmuştur (28). Bu oran, genel olarak kabul gören NOA hastalarındaki sperm bulma oranından bile çok yüksektir. Bu çalışmalara rağmen günümüzde Klinefelter sendromlu hastalarda TESE'de sperm bulma ihtimalinin daha düşük olduğu kabul edilmektedir.

MikroTESE

TESE'de başarıyı belirleyen faktörlerden önemli bir tanesinin de TESE operasyonunun şekli olduğu bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada sperm bulma olasılığı mikroTESE operasyonunda konvansiyonel yöntemlere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (15,29,30,31,32).

Doku ayrıştırma yöntemleri

TESE yapıldıktan sonra dokular sıklıkla mekanik yöntemle birbirlerinden ayrıştırılmaktadır. Mekanik ayrıştırma ile yeterli hücre elde edilemeyen olgularda ise enzimatik ayrıştırma yöntemleri kullanılmaktadır. Bu enzimler arasında kollagenaz ön plana çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada mekanik ayrıştırma yöntemleriyle sperm bulma olasılığı %36 iken kollagenaz tip IV ve DNA'az enzimatik ayrıştırma işlemlerinin eklenmesiyle bu oranın %57'ye çıktığı gösterilmiştir (33). Öte yandan, çok merkezli verilerin retrospektif olarak değerlendirildiği bir çalışma, mekanik ayrıştırma veya enzimatik ayrıştırma yöntemlerinin motil sperm eldesinde fertilizasyon ve gebelik oranları üzerinde birbirlerine anlamlı bir üstünlük göstermediğini ortaya koymuştur (34).

TESE öncesi hormonal tedavi

Oligoastenoteratospermili hastalarda spermatogenezini indüklemek için ampirik olarak hormonal tedaviler uygulanmaktadır. Bunlar arasında en popüler olanları Klomifen sitrat ve insan koriyonik gonadotropini (hCG)'dir. Hormonal tedaviler NOA hastalarında TESE operasyonu öncesinde de uygulanmıştır. Bu çalışmalar arasında şüphesiz en ilgi çekici olanlardan birisi daha önceki mikroTESE operasyonu başarısız olan ve ikinci mikroTESE öncesinde hCG te-

davisinin uygulandığı çalışmadır. Bu çalışmada daha önce başarısız mikroTESE uygulaması olan 48 hastanın 20'sine herhangi bir tedavi uygulanmamış ve 28 hastaya ise 4-5 ay boyunca günlük subkütan hCG tedavisi uygulanmıştır. hCG stimülasyonu yapılırken gonadotropin seviyesi düşen 15 hastaya da ek olarak rekombinan FSH tedavisi verilmiştir. Tedavi verilmeyen grupta ikinci mikroTESE'de hiç sperm bulunamazken tedavi verilen hastaların 6'sında (%21) sperm bulunmuştur (35). Bir başka çalışmada ise NOA tanısı alan 496 hastaya TESE öncesi uygulanan bir protokol ile Klomifen sitrat, hCG ve hMG tedavisi verilmiş ve TESE öncesi tedavi verilmeyen gruba göre çalışma grubunda TESE'de sperm bulunma ihtimali anlamlı derecede daha yüksek bulunmuş (%33.6'ya karşı %57), hatta hastaların %10.9'unun ejakulatında sperm hücrelerine rastlanmıştır (36).

Bu çalışmaların dışında ejakulatta spermatidin bulunması ve skrotal doppler profüzyonunun kullanımının da pozitif TESE için predikte faktörler olabilecekleri ileri sürülmüş olmakla beraber bu uygulamalar yaygın kabul görmüşlerdir (37,38).

TESE'de sperm bulma başarısını olumlu yönde etkileyebileceği düşünülen yeni parametre ve faktörlerden bazıları aşağıda verilmiştir;

Kombine trifokal mikroTESE operasyonu

MikroTESE operasyonunun standart TESE operasyonundan daha üstün olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan birisinde 335 NOA hastasının testislerinin üst, orta ve alt kesimlerine 5 mm'lik insizyonlar yapılarak konvansiyonel TESE operasyonu yapılmış ve eğer sperm bulunursa TESE operasyonu sonlandırılmıştır. Eğer sperm bulunamazsa testisin üst ve alt kutbundaki insizyonlar sütüre edilmiş ve orta kesimdeki insizyon genişletilerek mikroTESE operasyonu yapılmıştır. Konvansiyonel yöntemde sperm bulunma oranı %33.7 iken kombine yöntemde bu oran %50.8'e çıkmıştır (15). Son zamanlarda metodolojisi bu çalışmaya benzeyen bir başka çalışmada sperm bulma ihtimalinin düşük olduğu düşünülen (testis volümü <8 ml, FSH düzeyi >12.4 IU/L) 65 NOA hastası alınmış ve testisin 3 ayrı bölgesi insize edilerek konvansiyonel TESE operasyonu yapıldığında sperm bulma oranı %53.8 iken testisin orta kısmına yapılan insizyonun genişletilmesi ile yapılan mikroTESE operasyonunda sperm bulunma oranı %66.2'ye çıkmıştır. Çalışmada bu grup has-

talarda sperm elde edilmesi için en iyi tekniğin kendi yaptıkları kombine trifokal mikroTESE olduğu ifade edilmiştir (39).

Skorlama sistemi

NOA hastalarında TESE öncesi mevcut olan parametrelere bakılarak bir skorlama sistemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada 280 NOA hastası alınmış ve TESE operasyonu öncesi hastaların testis volümleri ölçülmüş, serum FSH düzeyi ve serum inhibin B düzeyine bakılmıştır. Bu üç parametre ile bir skorlama sistemi geliştirilmiştir (915 x FSH / Testis volümü x inhibin B). Skor <18.5 iken sperm bulma oranı %77.4 ve canlı doğum oranı %42.8 iken skor >3700 olunca sperm bulma oranı %37.8'e ve canlı doğum oranı ise %7.7'ye düşmüştür (40).

Yapay nöral ağ ve leptin

Leptin, obezite geni tarafından sentezlenen, spermatogenez, gonadotropin kontrolü ve spermatozoid matürasyonunda etkili olan bir proteindir. Yapılan çalışmada yapay nöral ağ (ANN=yeni bir multivariate istatistiksel metod) aracılığıyla sperm bulma olasılığını tahmin etmek amaçlanmış ve 12 farklı değişken kullanılmıştır (ANN1= Testis volümü; ANN 2= Semen volümü, seminal ph, seminal α -glukozidaz ve fruktoz; ANN 3= Serum FSH, LH, Testosteron, Prolaktin, Estradiol düzeyi; ANN 4= Serum ve semende Leptin düzeyi). Çalışma sonucunda NOA hastalarına yapılan TESE'de sperm bulunamayan hastaların serum ve semeninde bu parametreler arasında Leptin düzeyi yüksek olarak bulunmuştur. Dolayısıyla NOA hastalarında TESE öncesinde sperm elde oranını tahmin etmede yapay nöral ağ modelinin kullanılabileceği ve Leptin'in sperm elde etmede iyi bir yardımcı belirteç olabileceği öne sürülmüştür (41).

1H Magnetik rezonans spektroskopisi

Testisin 1H Magnetik rezonans spektroskopisi, testiste lokal spermatogenez odağını gösterebilen noninvaziv bir görüntüleme yöntemidir. Yapılan çalışmada NOA ve obstrüktif azospermi nedeniyle testis biyopsisi yapılan ve biyopsi materyalleri dondurulan 27 hasta değerlendirilmiştir ve testisin 1H magnetik rezonans spektroskopisi yapılmıştır. Magnetik rezonans spektroskopisi aynı zamanda testisteki metabolik aktiviteyi de göstermektedir. Spektroskopisi yapılırken 19 farklı doku metaboliti verilmiş ve normal

spermatogenez saptanan testis dokularında bu metabolitlerden fosfokolin konsantrasyonu belirgin derecede daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar çalışma sonucunda NOA hastalarında spermatogenez olup olmadığının gösterilmesi için metabolit olarak fosfokolin kullanılan ¹H magnetik rezonans spektroskopisi yönteminin yapılmasını önermişlerdir (42).

Multifoton tomografi

Multifoton tomografi mikroskopisi (MPM), infrared lazer yardımı ile işlenmemiş dokularda eşzamanlı otomatik floresan görüntüleme sağlayan bir yöntemdir. Yapılan çalışmada normal ve anormal spermatogenez saptanan 7 testis biyopsisi MPM ve hematoxilen-eozin (H&E) boyama ile 3 farklı patoloji tarafından incelenmiş ve testis biyopsisi sonuçları açısından BT eşliğinde yapılan multifoton mikroskopisi ve H&E boyama arasında %86 oranında uyum olduğu görülmüştür. Çalışmacılar, MPM yöntemindeki seminifer tübül yapısının karakterizasyonunun H&E boyama sonuçlarıyla benzer olduğunu ve MPM'nin normal ve anormal spermatogenezin ayırımında kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (43).

Decorin

Decorin, insan testisinin interstisyumunda ve peritübüler alanlarda yer alan bir ekstraselüler matriks bileşenidir. Bu proteinin insandaki fibrozise yol açan çeşitli hastalıklarda overekspresyonu olduğu gösterilmiştir. İnfertil erkeklerde ve inflamasyonla ilişkili infertilite oluşturulmuş fare modellerinde testislerdeki fibrotik değişiklikler ve TNF- α artışı ile beraber decorin üretiminde de belirgin derecede artış olduğu görülmüştür. Dolayısıyla infertil erkeklerde decorin spermatogenezdeki bozulma ile ilişkili olarak bulunmuştur (44).

ESX1 Geni

ESX1 geni testis, plasenta, akciğer ve beyinde bulunan bir genidir. İn vitro ortamda mitotik siklinlerin parçalanmasını önler. Yapılan çalışmada spermatogenezin olduğu ve olmadığı azoospermik hastalarda ESX1 geni dizilimi ve ekspresyonu değerlendirilmiştir. Normal spermatogenezli hastaların %95'inde (62/65) ve spermatogenez saptan-

mayan sertoli cell only sendromu olan hastaların sadece %18'inde ESX1 gen transkripsiyonu saptanmıştır. ESX1 gen transkripsiyonunun testislerde spermatogenezin olduğunu öngörmeye önemli bir belirleyici gen olabileceği düşünülmüştür (45).

VASA mRNA

mRNA ekspresyonunun spermatogenezde önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada mRNA deriveleri 52 NOA hastasında mikroTESE'de sperm bulma başarısı açısından değerlendirilmiş ve multivariate analize göre sadece VASA mRNA ekspresyonu olan infertil hastalarda mikroTESE'de sperm bulma oranının belirgin derecede daha yüksek olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, NOA hastalarında -sperm bulma ihtimali üzerine olan pozitif etkisinden dolayı- TESE öncesinde testiste VASA mRNA ekspresyonu olup olmadığının değerlendirilmesi önerilmektedir (46).

Genetik değişiklikler

CATSPER2, PLSCR2 ve SYT6 genlerinde ortaya çıkan duplikasyon ve delesyonlar, spermatozoid düzeyinde mayotik arrest ve infertilite ile sonuçlanmıştır (47)

Survivin

Survivin, bir apoptozis inhibitör proteindir ve hücre düzeyinde apoptozisi düzenler. TESE'de sperm bulunan NOA hastalarının semenlerinde survivin proteininin bulunduğu, sperm bulunmayanların semeninde ise bulunmadığı gözlemlenmiştir. Seminal survivinin spermatogenezin göstergesi olabileceği öne sürülmüştür (48).

Sonuç olarak, TESE'de başarıyı belirleyen faktörler değerlendirildiği zaman testis biyopsisi ve mikroTESE yönteminin ön plana çıktığı görülmektedir. Son yıllarda TESE öncesinde sperm bulma ihtimali ile ilişkili olabileceği düşünülen çok sayıda parametre değerlendirilmiş ve yeni parametreler ile ilgili çalışmalar halen devam edilmektedir. Bu çalışmalar neticesinde daha güçlü prediktif markırlar bulunabilir. Yapılan çalışmaların geniş serili ve prospektif randomize çalışmalar olması, elde edilecek pozitif sonuçların umut verici ve rutinde kullanılabilir olmasına zemin hazırlayacaktır.

Kaynaklar

- Willott GM: Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int* 1982; 20: 9-13.
- Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 1989; 142: 62-7.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340(8810): 17-8.
- Amer M, Hagggar SE, Moustafa T, Abd El-Naser T, Zohdy W. Testicular sperm extraction: impact of testicular histology on outcome, number of biopsies to be performed and optimal time for repetition. *Hum Reprod* 1999; 14(12): 3030-4.
- Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1997; 12: 1688-92.
- Takada S, Tsujimura A, Ueda T, Matsuoka Y, Takao T, Miyagawa Y, Koga M, Takeyama M, Okamoto Y, Matsumiya K, Fujioka H, Nonomura N, Okuyama A. Androgen decline in patients with nonobstructive azoospermia after microdissection testicular sperm extraction. *Urology* 2008; 72: 114-8.
- Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999; 14(1): 131-5.
- Schlegel PN. Nonobstructive azoospermia: a revolutionary surgical approach and results. *Sem Reprod Med* 2009; 27: 165-170.
- Jezeck D, Knuth UA, Schulze W. Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Hum Reprod* 1998; 13: 1230-4.
- 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.
- Abdel Raheem A, Garaffa G, Rushwan N, De Luca F, Zacharakis E, Raheem TA, Freeman A, Serhal P, Harper JC, Ralph D. Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *BJU Int* 2012 [Basimda]
- Donoso P, Tournaye H, Devroey P. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 539-49.
- Kalsi J, Thum MY, Muneer A, Abdullah H, Minhas S. In the era of micro-dissection sperm retrieval (m-TESE) is an isolated testicular biopsy necessary in the management of men with non-obstructive azoospermia? *BJU Int* 2011; 109: 418-24.
- Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod* 2000; 15(7): 1431-4.
- Turunc T, Gul U, Haydardedeoglu B, Bal N, Kuzgunbay B, Peskircioglu L, Ozkardes H. Conventional testicular sperm extraction combined with the microdissection technique in nonobstructive azoospermic patients: a prospective comparative study. *Fertil Steril* 2010 Nov; 94(6): 2157-60.
- Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, Molero MD, Remohi J, Pellicer A. Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection: a chance of fertility in nonobstructive azoospermia. *J Urol* 1998; 160(6): 2063-7.
- DeKretser DM, Burger HG, Hudson B. The relationship between germinal cells and serum FSH levels in males with infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38: 787-93.
- Ramasamy R, Lin K, Gosden LV, Rosenwaks Z, Palermo GD, Schlegel PN. High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2009 Aug; 92(2): 590-3.
- Ballesca JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fabregues F, de Osaba MJ, Ascaso C, Vanrell JA. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000; 15: 1734-8.
- Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Calamera JC, Urrutia F, Nodar F, Acosta AA. Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2001; 76: 1124-9.
- Bailly M, Guthauser B, Bergere M, Wainer R, Lombroso P, Ville Y, Selva J. Effects of low concentrations of inhibin B on the outcomes of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003; 79(4): 905-8.
- Garem YF, Arini AF, Beheiry AH, Zeid SA, Comhaire FH. Possible relationship between seminal plasma inhibin B and spermatogenesis in patients with azoospermia. *J Androl* 2002; 23: 825-9.
- Guthauser B, Bailly M, Bergere M, Wainer R, Ville Y, Selva J. Successful pregnancy and delivery after testicular sperm extraction despite an undetectable concentration of serum inhibin B in a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2002; 77: 1077-8.
- Vernaev V, Tournaye H, Schiettaacatte J, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P. Serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2002; 17: 971-6.
- Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L, Roberts KP. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997; 336: 534-9.
- Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod* 2000; 15(7): 1431-4.
- Emre Bakircioglu M, Erden HF, Kaplancan T, Ciray N, Bener F, Bahceci M. Aging may adversely affect testicular sperm recovery in patients with Klinefelter syndrome. *Urology* 2006; 68: 1082-6.
- Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Goldstein M, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Success of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6263-7.
- Okada H, Dobashi M, Yamazaki T, Hara I, Fujisawa M, Arakawa S, Kamidono S. Conventional versus microdissection testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2002; 168: 1063-7.
- Okubo K, Ogura K, Ichioka K, Terada N, Matsuta Y, Yoshimura K, Arai Y, Honda T, Umeoka K, Nakahori T, Takahashi A, Umaoka Y. Testicular sperm extraction for non-obstructive azoospermia: results with conventional and microsurgical techniques. *Hinyokika Kiyo* 2002; 48: 275-80.
- Amer M, Ateyah A, Hany R, Zohdy W. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examinations. *Hum Reprod* 2000; 15: 653-6.
- Ramasamy R, Yagan N, Schlegel PN. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology* 2005; 65: 1190-1194.
- Aydos K, Demirel LC, Baltaci V, Unlu C. Enzymatic digestion plus mechanical searching improves testicular sperm retrieval in non-obstructive azoospermia cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 120(1): 80-6.
- Baukloh V. Retrospective multicentre study on mechanical and enzymatic preparation of fresh and cryopreserved testicular biopsies. *Hum Reprod* 2002; 17: 1788-94.
- Shiraishi K, Ohmi C, Shimabukuro T, Matsuyama H. Human chorionic gonadotrophin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2012 Feb; 27(2): 331-9.
- Hussein A, Ozgok Y, Ross L, Rao P, Niederberger C. Optimization of spermatogenesis-regulating hormones in patients with non-obstructive azoospermia and its impact on sperm retrieval: a multicentre study. *BJU Int* 2012 Sep 7 [Basimda].
- Tesarik J, Sousa M, Greco E, Mendoza C. Spermatozoa as gametes: indications and limitations. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl. 3): 89 - 107.
- Har-Toov J, Eytan O, Hauser R, Yavetz H, Elad D, Jaffa AJ. A new power Doppler ultrasound guiding technique for improved testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2004; 81: 430-4.
- Marconi M, Keudel A, Diemer T, Bergmann M, Steger K, Schuppe HC, Weidner W. Combined trifocal and microsurgical testicular sperm extraction is the best technique for testicular sperm retrieval in "low-chance" nonobstructive azoospermia. *Eur Urol* 2012 Oct; 62(4): 713-9.
- Boitrelle F, Robin G, Marcelli F, Albert M, Leroy-Martin B, Dewailly D, Rigot JM, Mitchell V. A predictive score for testicular sperm extraction quality and surgical ICSI outcome in non-obstructive azoospermia: a

- retrospective study. *Hum Reprod* 2011 Dec; 26(12): 3215-21.
41. Ma Y, Chen B, Wang H, Hu K, Huang Y. Prediction of sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia using artificial neural networks: leptin is a good assistant diagnostic marker. *Hum Reprod* 2011 Feb; 26(2): 294-8.
 42. Aaronson DS, Iman R, Walsh TJ, Kurhanewicz J, Turek PJ. A novel application of ¹H magnetic resonance spectroscopy: non-invasive identification of spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2010 Apr; 25(4): 847-52.
 43. Najari BB, Ramasamy R, Sterling J, Aggarwal A, Sheth S, Li PS, Dubin JM, Goldenberg S, Jain M, Robinson BD, Shevchuk M, Scherr DS, Goldstein M, Mukherjee S, Schlegel PN. Pilot study of the correlation of multiphoton tomography of ex vivo human testis with histology. *J Urol* 2012 Aug; 188(2): 538-43.
 44. Adam M, Urbanski HF, Garyfallou VT, Welsch U, Köhn FM, Ullrich Schwarzer J, Strauss L, Poutanen M, Mayerhofer A. High levels of the extracellular matrix proteoglycan decorin are associated with inhibition of testicular function. *Int J Androl* 2012 Aug; 35(4): 550-61.
 45. Bonaparte E, Moretti M, Colpi GM, Nerva F, Contalbi G, Vaccalluzzo L, Tabano S, Grati FR, Gazzano G, Sirchia SM, Simoni G, Gallina A, Miozzo M. ESX1 gene expression as a robust marker of residual spermatogenesis in azoospermic men. *Hum Reprod* 2010 Jun; 25(6): 1398-403.
 46. Ando M, Yamaguchi K, Chiba K, Miyake H, Fujisawa M. Expression of VASA mRNA in testis as a significant predictor of sperm recovery by microdissection testicular sperm extraction in patient with nonobstructive azoospermia. *J Androl* 2012 Jul-Aug; 33(4): 711-6.
 47. Stouffs K, Vandermaelen D, Massart A, Menten B, Vergult S, Tournaye H, Lissens W. Array comparative genomic hybridization in male infertility. *Hum Reprod* 2012 Mar; 27(3): 921-9.
 48. Roshdy N, Mostafa T. Seminal plasma survivin in fertile and infertile males. *J Urol* 2009 Mar; 181(3): 1269-72.