

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

WÜRFEL W, BÖHM I, FIEDLER K, KRÜSMANN G, OVENS-RAEDER A, SCHLEYER M
SCHWARZER U, WALDENMAIER C, WIEDEMANN U
Das "Münchner" Kryo-TESE-Konzept

*Journal für Fertilität und Reproduktion 1999; 9 (1): 32-37
(Ausgabe für Österreich)*

Homepage:

www.kup.at/fertilitaet

Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche

ZEITSCHRIFT FÜR IN-VITRO-FERTILISIERUNG, ASSISTIERTE REPRODUKTION UND KONTRAZEPTION

W. Würfel, U. Schwarzer, G. Krüsmann, M. Schleyer, K. Fiedler, A. Ovens-Raeder, U. Wiedemann, I. Böhm, C. Waldenmaier

DAS
„MÜNCHNER“
KRYO-TESE-
KONZEPT

DAS „MÜNCHNER“ KRYO-TESE-KONZEPT

Summary

We report on the "Munich" concept of cryo-TESE and the results that have been achieved after performing 376 treatment cycles. Characteristic for this concept is: all testicular biopsies are carried out in a separate operation room in the women's hospital and – after separating parts for histological examination – all biopsies immediately are prepared by mechanic methods; there is no cryopreservation of the biopsies "en bloc", but only – after preparation – a cryopreservation of testicular spermatozoa in homogeneous solutions. By using cryopreserved spermatozoa for ICSI, the fertilization rate was 55.6% on average and the embryo transfer rate 90.7% resulting in a

pregnancy rate of 23.6% per treatment cycle and 26% per embryo transfer. After treatment of 173 patients 89 clinical pregnancies were established so that we reached until now a pregnancy rate per patient of 51.4%. Up to July 1998 39 healthy children were already born. We conclude from these data that – compared to native testicular spermatozoa – the use of cryopreserved testicular spermatozoa for ICSI leads to equal results. In contrast to the use of native testicular spermatozoa with the necessity of repetitive testicular biopsies, cryopreservation is advantageous in many concerns (eg, logistic, organisatoric and financial) and must be recommended for clinical routine.

logistischer, organisatorischer und finanzieller Hinsicht vorteilhafter und muß demzufolge für die klinische Routine empfohlen werden.

EINLEITUNG

Mit Einführung der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) ist es möglich geworden, humane Oozyten auch mit testikulären Spermatozoen zu fertilisieren [1, 2, 3, 4, 5]. Eines der dabei auftretenden Hauptprobleme besteht darin, daß die Spermatozoen für jeden einzelnen Behandlungszyklus der Ehefrau aufs neue durch eine testikuläre Spermienextraktion (TESE), also eine Hodenbiopsie, operativ gewonnen werden müssen. Dies bringt nicht nur eine erhebliche körperliche Belastung des Ehemannes mit sich, sondern auch logistische und organisatorische Probleme bei der Abstimmung der operativen Eingriffe beider Ehepartner [6, 7, 8].

Eine Lösung dieses Problems könnte darin bestehen, möglichst viele Eizellen zu entnehmen, als Vorkernstadien zu kryokonservieren und in folgenden Transferzyklen (im Entwicklungsstadium eines Präimplantationsembryos) nach und nach zurückzusetzen. Allerdings bleiben hierbei rechtliche Unsicherheiten, da das bundesdeutsche Embryonenschutzgesetz (ESchG) verbietet, innerhalb eines Behandlungszyklus mehr Eizellen zu befruchten als zurückgesetzt werden können; die Höchstanzahl liegt bei drei. Ein anderes Problem dieses Konzeptes besteht darin, daß die Schwangerschaftsraten nach Kryokonservierung schlechter ausfallen als ohne [9].

ZUSAMMENFASSUNG

Wir berichten über das „Münchener“ Kryo-TESE-Konzept und die Ergebnisse, die hiermit nach 376 Behandlungszyklen erzielt wurden. Folgende Charakteristika zeichnen das Konzept aus: Alle Hodenbiopsien werden in einem speziellen Operationsaal in den Räumen der Frauenklinik durchgeführt und die Aufarbeitung der Biopsate erfolgt – nachdem ein Teil für die histologische Untersuchung abgetrennt wurde – unmittelbar, und zwar mechanisch; die Kryokonservierung erfolgt dann nicht „en bloc“, sondern – nach Präparation – in homogenen Lösungen. Unter Verwendung von kryokonservierten Spermatozoen für die ICSI erzielten wir eine durch-

schnittliche Fertilisationsrate von 55,6% und eine Embryotransferate von 90,7%. Hieraus errechnet sich eine Schwangerschaftsrate von 23,6% pro Behandlungszyklus und 26% pro Embryotransfer. Von bislang 173 behandelten Patientinnen konzipierten 89 im Sinne einer klinischen Schwangerschaft, was einer Schwangerschaftsrate von 51,4% pro Patientin entspricht. Bis zum Juli 1998 sind bereits 39 gesunde Kinder geboren worden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Verwendung von kryokonservierten testikulären Spermatozoen für die ICSI zu den gleichen Resultaten führt wie die Verwendung von nativen. Im Gegensatz zur Verwendung von nativen testikulären Spermatozoen, die wiederholte Hodenbiopsien erforderlich machen, ist die Kryokonservierung auch noch in

Aufgrund dieser Überlegungen wurde das Konzept entwickelt, die testikulären Spermatozoen zu kryokonservieren (Kryo-TESE) und die Eizellen mit aufgetauten, testikulären Spermatozoen zu fertilisieren [8]. Im nachfolgenden möchten wir das von uns entwickelte Konzept („Münchner Modell“) vorstellen und über die damit erzielten Behandlungsergebnisse berichten.

VORGANGSWEISE UND TECHNISCHE DURCHFÜHRUNG

Die Hodenbiopsien führt der urologische Fachkollege mit gynäkologischer Assistenz in der Frauenklinik durch. Hierfür existiert ein spezieller andrologischer Operationsraum, der unmittelbar an die andrologischen Labors angrenzt. Durch diese räumliche Anordnung ist es problemlos möglich, die Biopsien sofort aufzuarbeiten und über das Ergebnis der Aufarbeitung zu informieren. Dadurch kann der Umfang der TESE, d. h. der multiplen Biopsien, jeweils der individuellen andrologischen Situation des Patienten optimal angepaßt werden.

Ein kleiner Teil einer jeden Biopsie wird für die histologische Untersuchung abgetrennt. Das übrige Gewebe wird mechanisch aufgearbeitet, teils durch „Ausmelken“ der Samenkanälchen, teils durch Quetschung des Gewebes. Durch diese Vorgangsweise lassen sich sehr schnell erste Aussagen über die Existenz von Spermatozoen machen. Diese Information ist – wie dargestellt – für die weitere Operationsplanung bzw. die Ausdehnung des Eingriffs essentiell. Nach der mechanischen

Aufarbeitung erfolgt eine Suspension in Kulturmedium (Ham's F10) und – nach Abschluß der TESE – ein Pooling aller Proben. Diese werden – je nach Verunreinigungsgrad durch andere Zellelemente und aufgrund der Spermatozoendichte – entweder über Percollgradienten oder durch Pelletierung und Resuspension (1–2 Mal) gereinigt. Um eine gewisse „Standardisierung“ zu erreichen, resuspendieren wir das gereinigte Material abschließend auf 1 ml Medium. Erst danach wird ein Spermiogramm erstellt: Sollte sich hierbei eine sehr niedrige Spermatozoendichte ergeben, so vermindern wir durch eine erneute Pelletierung und Resuspension das Endvolumen; bei einer sehr hohen Dichte erhöhen wir es durch weitere Zugabe von Medium.

Zur Vorbereitung auf die Kryokonservierung wird die Endsuspension tröpfchenweise mit dem Kryoprotektivum Steritec® (Fa. Steripharm, Berlin) versetzt, gemischt und dann mittels langer Kanülen in Straws eingefüllt, die an einem Ende mit einem Kügelchen verschlossen sind (Minitüb, Landshut). Nach dem Abfüllen wird auch das andere Ende mit einem kleinen Kügelchen verschlossen. Für die Kryokonservierung verwenden wir das Planer Biomed MR3 Kryo 10, vertrieben durch die Fa. Messer-Griesheim, Krefeld. Der Abkühl- bzw. Gefriervorgang ist programmgesteuert: nach einer langsamen Abkühlungsphase von 8 min. folgt eine schnelle Phase von 12 min. Die Proben werden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt (Biosafe-System, Fa. Messer-Griesheim).

Nach dem Auftauen resuspendieren wir die Probe – je nach der

Spermatozoendichte – in Kulturmedium (Ham's F10). Für die eigentliche Durchführung der ICSI verzichten wir in aller Regel auf eine Aufschwemmung der Spermatozoen in Polyvinylpyrrolidon (PVP) und verwenden stattdessen die native End-Suspension (Direkte Spermienaspiration, DSA). Ansonsten richten wir uns bei der technischen Durchführung der ICSI nach den Angaben von van Steirteghem et al. [10]. Nach der ICSI belassen wir die injizierten Oozyten allerdings nicht unter Paraffinöl, sondern inkubieren sie wiederum in frischem Medium.

Der Embryotransfer erfolgt zwei Tage nach ICSI, ausschließlich intrauterin und meist mittels eines gebogenen Wallace® Katheters.

Die Lutealphase stützen wir üblicherweise mit 3 x 1500 I.E. hCG und 3 x 200 mg Progesteronkügelchen intravaginal (Utrogest® oder Utrogestan®). Von diesem Schema weichen wir allerdings ab, wenn ein hohes Risiko für ein ovarielles Hyperstimulationssyndrom (OHSS) besteht (dann keine hCG-Gaben) oder aufgrund der Stimulation von einer relativen Ovarialinsuffizienz ausgegangen werden muß (dann 3 x 5000 I.E. hCG).

PATIENTENKOLLEKTIV

Bis zum Juli 1998 haben wir bei insgesamt 206 Patienten eine multilokuläre und zumeist beidseitige TESE zur Spermatozoengewinnung vorgenommen. Bei 33 Ehemännern (16,0%) konnten keine Spermatozoen gefunden werden, sodaß 173 Männer bzw. deren Ehefrauen in Behandlung verblieben.

Die zugrundeliegenden Indikationen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die häufigste Indikation war ein Zustand nach Maldescensus testis, bei den meisten Männern wohl aufgrund einer operativen Spätversorgung nach dem 6. Lebensjahr. Weitere, häufige Indikationen waren ein Zustand nach Orchitis (nahezu ausschließlich adulte Mumpsorchitiden), ein Zustand nach Chemotherapie (genitale und extragenitale Tumoren) und postentzündliche Samenleiterläsionen, bei denen eine mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration (MESA) nicht mehr möglich war. Ein vergleichsweise ebenfalls großes Kollektiv bilden auch die Männer mit einem hypergonadotropen Hypogonadismus unklarer Pathogenese. Die durchschnittlichen FSH-Werte (meist mehrere Bestimmungen pro Patient) in dieser Gruppe ermittelten wir mit 36,8 U/l. Unter „andere Ursachen“ haben wir Patienten mit einer Orchiektomie (aufgrund eines Karzinoms oder einer Hodentorsion) oder solche mit Klinefelter-Syndrom zusammengefaßt. Bislang haben wir bei 7 Männern mit dieser Diagnose eine TESE durchgeführt, konnten jedoch trotz ausgedehnter Biopsien bei 5 Patienten keine Spermatozoen nachweisen.

ERGEBNISSE

Die Eckdaten bezüglich der Durchführung der ICSI sind in Tabelle 2 dargestellt. Bislang haben wir 2391 Oozyten aspiriert, hiervon 2236 (93,5%) in Metaphase II und damit für die ICSI geeignet. Nach der ICSI fertilisierten sich 1244 Eizellen regelhaft mit der Ausbildung von 2 Pronuklei (55,6%).

Atypisch aktivierte Eizellen mit drei oder mehr Vorkernen verzeichneten wir 37 (1,6%), die Zahl der atretischen Eizellen nach ICSI betrug 109 (7,3%).

Nach Resuspension auf 1 ml Medium schwankte die Spermatozoendichte zwischen 50/ml (geschätzt) und 1,5 Mio/ml. Eine geringe ortsständige Beweglichkeit zeigten einzelne Spermatozoen fast immer, ausgesprochen selten waren Spermatozoen mit progressiver Motilität. In diesen Fällen war dann meistens auch die Spermatozoendichte hoch.

Die klinischen Behandlungsergebnisse zeigt Tabelle 3. Bis Juli 1998 haben wir 376 Behandlungszyklen durchgeführt. Bei allen Ultraschallpunktionen konnte mindestens eine Eizelle aspiriert werden. Die Embryotransferrate lag mit 341 intrauterinen Embryotransfers bei 90,7%. Im Schnitt transferierten wir 2,2 Präimplantationsembryonen. Die Zahl der transferierten Embryonen (maximal 3 sind nach dem ESchG gestattet) richtete sich allerdings letztlich nach den Wünschen des Ehepaares.

Tabelle 1: Indikationen zur TESE (Alle Prozentangaben sind auf die Patienten mit Spermatozoen bezogen, d. h. auf 173)

Biopsierte Männer	206 (100 %)
Keine Spermatozoen gefunden	33 (16,0 %)
Männer mit testikulären Spermatozoen	173 (84,0 %)
Maldescensus testis	50 (28,9 %)
Hypergonadotroper Hypogonadismus unklarer Genese	42 (24,2 %)
Z. n. Orchitis	28 (16,2 %)
Z. n. Chemotherapie	19 (10,9 %)
Postentzündlicher Zustand / Nebenhodendysplasie	17 (9,8 %)
Andere Ursachen (z. B. Klinefelter-Männer)	17 (9,8 %)

Tabelle 2: Eckdaten der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion

Behandlungszyklen	376
Gewonnene Eizellen	2.391
hiervon in Metaphase II (für ICSI geeignet)	2.236 (93,5 %)
Injizierte Eizellen (Metaphase II)	2.236
Atretische Eizellen nach ICSI	182 (8,1 %)
Fertilisierte Eizellen mit 2 Vorkernen	1.244 (55,6 %)
Atypisch aktivierte Eizellen mit 3 oder mehr Vorkernen	37 (1,6 %)

Tabelle 3: Klinische Behandlungsergebnisse

Patientinnen	173
Behandlungszyklen	376
Embryotransfers (ET)	341 (90,7 %)
Klinische Schwangerschaften	89
Klinische Aborte	13
Geborene Kinder	39
Schwangerschaftsrate pro Behandlungszyklus	23,6 %
Schwangerschaftsrate pro Embryotransfer	26,0 %
Schwangerschaftsrate pro Patientin („kumulativ“)	51,4 %

Bisher konnten wir 89 klinische Schwangerschaften (definiert durch Visualisierung im Ultraschall) verzeichnen, woraus sich eine Schwangerschaftsrate pro Behandlungszyklus von 23,6% bzw. von 26,0% pro Embryotransfer ergibt. Die klinische Abortrate beträgt bislang 14,6% (13 Patientinnen).

Die kumulative Schwangerschaftsrate, also die Schwangerschaftsrate pro Patientin, beträgt bei 176 behandelten Patientinnen bis zum jetzigen Zeitpunkt 51,4%. Da sich ein Teil der Patientinnen, die bislang nicht konzipierten oder abortierten, noch bzw. wieder in Behandlung befinden, wird die kumulative Schwangerschaftsrate noch ansteigen.

Geboren wurden bis zum Juli 1998 insgesamt 39 Kinder, zwei Mal Drillinge, vier Mal Zwillinge und 25 Einlinge. Ausweislich aller bislang durchgeführten Untersuchungen sind alle Kinder ohne Auffälligkeiten und gesund.

DISKUSSION

Bezüglich der Verwendung von kryokonservierten testikulären Spermatozoen (Kryo-TESE) zur intrazytoplasmatischen Injektion (ICSI) gibt es in der Literatur bislang noch nicht viele Mitteilungen [11, 12, 13, 14]. Dementsprechend sind die hier vorgestellten Daten – unserem Wissen nach – die umfangreichsten zu dieser Thematik.

Unseren Erfahrungen nach sind durch ICSI mit kryokonservierten Spermatozoen (Kryo-TESE) Ergebnisse erzielbar, die denen mit

nativen testikulären Spermatozoen entsprechen [2, 4, 5, 6]. Diese Feststellung gilt sowohl im Hinblick auf die Embryotransfer- als auch die Schwangerschaftsraten. Bislang sind über 50% der behandelten Patientinnen schwanger; dieser Prozentsatz wird noch ansteigen, da viele Patientinnen, die bislang nicht konzipierten, weiterhin in Behandlung sind.

Die Kryokonservierung von testikulären Spermatozoen verschlechtert die Behandlungsergebnisse also nicht. Da die Kryokonservierung eine zeitliche Entkopplung der Behandlung von Ehemann und Ehefrau ermöglicht und sich darüberhinaus noch weitere logistische und finanzielle Vorteile ergeben, steht es unseres Erachtens außer Frage, daß das Kryo-TESE-Konzept in der klinischen Behandlungsroutine Priorität haben muß. Solche, hier gemeinten Vorteile sind: Vermeidung unnötiger Behandlungen der Ehefrau (bei immerhin 16% der Ehemänner konnten keine Spermatozoen gefunden werden) und wiederholter Hodenbiopsien, Möglichkeit zu Zusatzuntersuchungen (wie z. B. der Bestimmung der Aneuploidierate der Spermatozoen [15]) und ggf. zur erneuten Beratung (z. B. wenn nur Spermatiden gefunden wurden) und somit letztlich eine deutliche Verminderung der Gesamtbehandlungskosten.

Das hier vorgestellte Konzept einer engen räumlichen, personellen und organisatorischen Vernetzung ermöglicht es, eine TESE dann zu beenden, wenn sich ausreichend viele Spermatozoen nachweisen ließen; umgekehrt kann die TESE situationsgerecht ausgedehnt werden, wenn in den gewonnenen Proben keine Spermatozoen

zu finden sind. Dadurch kann ein Höchstmaß an patientenorientierter Individualisierung des operativen Eingriffs realisiert werden. Deshalb erscheint uns diese Organisationsform bzw. Vorgangsweise empfehlenswert.

Einer etwas anderen Vorgangsweise folgt das „Hamburger“ Kryo-TESE-Konzept, bei dem die Biopsate sofort – d. h. also „blind“ – kryokonserviert werden [16]. Von diesen Biopsaten wird vor der Kryokonservierung – ähnlich wie bei uns vor der Aufarbeitung – ein Teil abgetrennt und zur histologischen Untersuchung gegeben. Im Gegensatz zu unserem Konzept dient die histologische Untersuchung aber auch dem Nachweis von Spermatozoen, freilich mit dem Nachteil, daß diese wichtige Information erst lange nach dem operativen Eingriff verfügbar ist. Berücksichtigt man, daß die Restspermiogenese bei ausgeprägten testikulären Insuffizienzen nicht homogen über den Hoden verteilt ist [17] und die Proben in ihrem „Spermatozoengehalt“ daher sehr verschieden ausfallen können [8, 13, 17], muß diese Vorgangsweise zwangsläufig als ungünstiger erachtet werden. Darüberhinaus hat unsere Erfahrung gezeigt, daß sich bei der Aufarbeitung der Exzisate immer wieder Spermatozoen finden lassen, obwohl die histologische Untersuchung keine nachweisen konnte. Nicht unberücksichtigt bleiben sollte auch, daß die sofortige Homogenisierung der Proben eine zuverlässige Portionierung erlaubt, weswegen bei der späteren ICSI nicht mehr Straws aufgetaut werden müssen, als unbedingt notwendig. Ein Argument für die *in toto*-Kryokonservierung der Exzisate ist die vermeintlich

bessere Kryoprotektion der Spermatozoen [16]. Dieses Argument sehen wir durch unsere Behandlungsergebnisse allerdings nachhaltig widerlegt. Dasselbe muß wohl bezüglich der enzymatischen Andauung und Aufarbeitung der Biopsate („Hamburger“ Konzept) versus der von uns geübten mechanischen gelten [13, 16].

Ohne Frage stellt das Kryo-TESE-Konzept in allen Belangen hohe Anforderungen an die Organisation und Erfahrung eines Zentrums [1, 2, 16, 17]. Es ist daher dringend zu empfehlen, Kryo-TESE/ICSI nur an solchen Zentren durchzuführen, an denen entsprechende Behandlungszyklen auch in einer wirklich nennenswerten Anzahl pro Jahr anfallen.

Literatur:

1. Feige A, Rempen A, Würfel W, Caffier H, Jawny J (eds). *Frauenheilkunde*. Urban & Schwarzenberg 1996.
2. Lunglmayr G, Obruca A. Assisted reproductive technology in the management of azoospermic men - the Austrian experience. *Andrologia* 1996; 28 (suppl 1): 83–6.
3. Parikh FR, Kamat SA, Arawandekar DR, Nadkarni SG, Chibber PJ, Sonawalla FP, Sonawalla SB, Parikh RM. Successful pregnancy following microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection. *Indian J Urol* 1996; 13 (1): 26–30.
4. Rosenlund B, Sjoblom P, Dimitrakopoulos A, Hillensjo T. Epididymal and testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in the treatment of obstructive azoospermia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76 (2): 135–9.
5. Ubaldi F, Camus M, Tournaye H, Clasen K, Nagy Z, Smitz J, van Steirteghem A, Devroey P. Results of microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA) and testicular sperm extraction (TESE) in azoospermic men using intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Andrologia* 1996; 28 (suppl. 1): 71–5.



Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Wolfgang Würfel

Geboren 1955 in München, 1974 bis 1981 Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität München. 1981 Promotion zum Dr. med. Von 1981 bis 1987 Facharztausbildung zum Frauenarzt an der Frauenklinik Dr. Wilhelm Krüsmann in München (öffentliches Krankenhaus in privater Trägerschaft). Seit 1985 dort als Funktionsoberarzt tätig, gemeinsam mit Dr. Gottfried Krüsmann Gründung des IVF-Zentrums. 1987 Facharztprüfung bei der Bayer. Landesärztekammer. 1987 bis 1989 Assistenzarzt an der Frauenklinik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Direktor: Prof. Dr. K. H. Wulf). Von 1989 bis 1991 Assistent Professor an der University of Chicago, Abt. Endokrinologie (Direktor: Prof. Dr. J. Schreiber); zugleich DFG-Stipendium.

Ende 1991 Habilitation, Anfang 1992 Ernennung zum Privatdozenten. Von 1991 bis 1992 Oberarzt an der Universitäts-Frauenklinik Würzburg. Seit Ende 1992 Leitung des Zentrums für Gynäkologische Endokrinologie und Sterilitätsmedizin an der Frauenklinik Dr. Wilhelm Krüsmann, München, gemeinsam mit Dr. Gottfried Krüsmann und Dr. Klaus Fiedler; gleichberechtigter Leiter, zugleich Ärztlicher Direktor an der Frauenklinik Dr. Wilhelm Krüsmann.

1993 Fachberater der Bayerischen Landesärztekammer für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin. 1994 zusätzliche Berufung in das Prüfungsgremium für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der Bayer. Landesärztekammer. 1995 Anerkennung „Spezielle Geburtshilfe und Perinatalmedizin“ (Bayer. Landesärztekammer). 1997 Anerkennung der fakultativen Weiterbildung „Spezielle Operative Gynäkologie“. Juni 1998 Ernennung zum apl. Professor an der Universität Würzburg.

Korrespondenzadresse:

Prof. DDr. Wolfgang Würfel
Frauenklinik Dr. Wilhelm Krüsmann, Münchener Arbeitsgemeinschaft für Reproduktionsmedizin (MAR)
D-81241 München, Schmiedwegel 2–6

6. Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cunningham D, Carson R. Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12 (4): 734–9.
7. Schlegel PN, Palermo GD, Goldstein M, Menendez S, Zaninovic N, Veeck LL, Rosenwaks Z. Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology* 1997; 49 (3): 435–40.

8. Würfel W, Krüsmann G, Fiedler K, von Hertwig I, Schwarzer U. Schwangerschaften nach In-vitro-Fertilisation (IVF) und intracytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) von testikulären Spermatozoen (TESE) aus Kryokonservaten. *Zentralbl Gynakol* 1996; 118: 665–8.
9. Al-Hasani S, Ludwig M, Gagsteiger F, Küpker W, Strum R, Yilmaz A, Bauer O, Diedrich K. Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and

after conventional in-vitro fertilization. Hum Reprod 1996; 11: 604–7.

10. van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Lui J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993; 8: 1061–6.

11. Craft I, Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. Hum Reprod 1995; 10: 1623–7.

12. Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, Rubio C, de los Santos MJ, Remohi J, Pellicer A. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Hum Reprod 1996; 11: 1309–13.

13. Würfel W, Krüsmann G, Fiedler K, von Hertwig I, Schleyer M, Böhm I, Ovens-Raeder A, Wiedemann U, Waldenmaier C, Schwarzer U. Intracytoplasmatische Injektion von kryokonservierten testikulären Spermatozoen (Kryo-TESE): Eine retrospektive der ersten 250 Behandlungszyklen. Zentralbl Gynäkol 1998; 120: 386–90.

14. Romero J, Remohi J, Minguez Y, Rubio C, Pellicer A, Gil-Salom M. Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Fertil Steril 1996; 65 (4): 877–9.

15. Wiedemann U, Waldenmaier C, Würfel W, Krüsmann G. Bestimmung der

Aneuploidierate von Spermien, Spermatozoen aus Hodenbiopsien bei Patienten mit testikulärer Insuffizienz durch Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung. Arch Gynecol Obstet 1996; 258: S235.

16. Salzbrunn A, Benson DM, Holstein AF, Schulze W. A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization. Hum Reprod 1996; 11 (4): 752–5.

17. Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goosens A, Silber S, van Steirteghem AC, Devroey P. Correlation between testicular biopsy and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. Hum Reprod 1996; 11 (1): 127–32.

ANTWORTFAX

JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION

Hiermit bestelle ich

ein Jahresabonnement
(mindestens 4 Ausgaben) zum
Preis von € 36,- (Stand 1.1. 2004)
(im Ausland zzgl. Versandkosten)

Name

Anschrift

Datum, Unterschrift

Einsenden oder per Fax an:

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft,
Postfach 21, A-3003 Gablitz, **FAX: 02231 / 612 58-10**

Bücher & CDs
Homepage: www.kup.at

