

## 보조생식술에서 고환 정세포의 in vitro 배양의 임상적 의의 Clinical Benefits from in vitro Culture of Testicular Germ Cells for ART

한림대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이 상 곤

### 1. 서 론

최근 20년 동안 보조생식술은 눈부신 발전을 하였다. 1992년 최초로 미세 정자주입법 (ICSI)으로 하나의 정자를 난자에 주입시켜 임신에 성공한<sup>1</sup> 이래 정자의 질이 심하게 저하된 감정자증이나 기형정자증의 남성불임 환자에서 비교적 높은 성공률을 보여 불임치료에 획기적인 장을 열었다.<sup>2</sup> 뒤이어 Schoysman 등<sup>3</sup>이 고환의 정자를 이용하여 최초로 임신에 성공하였고 비폐쇄성 무정자증 환자에서 원형정자세포<sup>4</sup>와 elongate 정자세포<sup>5</sup>로 정상아를 출산에 성공하는 등 이러한 업적들은 놀랍게도 정자의 parameter에 관계없이 불임치료가 가능한 듯 보였다.

ICSI가 남성불임에 주된 치료방법으로 대두된 이후 이 시술에 대한 우려되는 문제점들이 꾸준히 제기되어 왔다. 비정상 정자를 난자의 자연장벽을 우회하여 주입함으로써 수정이 실패할 가능성이 있다든지<sup>6</sup> 수정시 침윤적인 조작으로 인한 태아에 대한 손상의 가능성이라든지,<sup>7</sup> DNA가 손상된 정자로 인해 태어난 소아에서 종양을 증가시킨다는 간접적 증거들이<sup>8,9</sup> 그것이다.

ICSI의 성공률은 정자의 여러 parameter들 중에서 정자의 운동성이 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져<sup>10</sup> ICSI의 성공률을 높이기 위해서는 좋은 질의 정자나 정세포를 선택하는 일이 중요한 것으로 간주되었다.

그런데 최근에 비폐쇄성 무정자증에서 추출된 정자가 폐쇄성 무정자증, 또는 사정된 정자보다 ICSI 성공률이 저하된다는 문제가 제기되었고<sup>11-13</sup> 최초의 대조군 연구를 통해 고환조직에 이상이 있는 경우에서 수정능력에 관계가 없이 착상능력이 저하된다는 것이 확인되었다.<sup>14</sup> 저하의 원인이 정자와 관계없는 여성측의 요인인지, 정자자체 또는 고환의 병리현상에 의한 것인지에 대해 알 수 없었다. 그러나 정자생성의 질이 저하될수록 정자의 손상이나, apoptosis의 빈도가 증가한다는 사실이 밝혀져 이와 연관된 세포사멸과 정자의 생식능력의 저하가 관계가 있을 것으로 추정하게 되었다. 최근에 개발된 정자세포의 in vitro 배양 체계를 통한 정세포 분화성공은 이러한 한계점을 극복하기 위한 해결방법 중의 하나로 대두되고 있다.<sup>15</sup>

### 2. 비폐쇄성 무정자증과 폐쇄성 무정자증에서 ICSI 성공률

최근의 보고들에 의하면 비폐쇄성 무정자증의 고환에서 추출된 정자를 사용한 수정물이나 착상물이나 임신률 등 사정된 정자나 폐쇄성 무정자증에서 추출된 정자로 수정한 성공률에 비해 현재

히 저하되고 유산률은 증가된다는 것이 밝혀졌다 (Table). 또한 배아에서 blastocyte 형성률이 ICSI 시행군과 비교할 때 IVF 시행군에서 높은 것이 관찰되었고<sup>16</sup> ROSI의 성공률이 불완전 정자생성장애보다 완전 정자생성장애 환자에서 낮은 것이 확인되어 고환의 병리와 관련이 있는 것으로 추정하게 하였다.<sup>17,18</sup>

일련의 결과들을 토대로 비정상적인 정자는 배아의 발달에 해로운 영향을 미치고 결국 ICSI 성공률을 저하시킨다는 결론에 도달하게 되었다.<sup>16</sup>

고환조직에 이상이 있는 경우에 낮은 임신성공률을 보이는 원인은 확실히 알려져 있지는 않지만 최근에 apoptosis와 관련된 세포의 소멸과 순간적인 정자의 생식능력의 저하 때문이라는 증거가 점차 증대되고 있다. 실제로 질이 낮은 정자에서 DNA손상을 갖는 정자의 비율이 증가된다는 것이 관찰되고<sup>19-21</sup> 특발성 감무정자증에서는 대조군에 비해 분화이상의 빈도가 현저히 증대되었다.<sup>22</sup>

이같은 결과를 종합하면 배아의 분리, 착상, 등 배아의 발달은 주로 남성 쪽의 영향을 받는다는 것이라고 추론을 할 수 있고 심한 정자생성의 장애는 배아의 발달에도 심각한 장애를 유발할 가능성이 높다는 것이다.

### 3. 정자생성과정의 apoptosis역할과 정자의 DNA손상

정자생성과정에서 정자의 DNA손상의 chromatin의 농축 (packaging) 실패로 정자로 분화가 되지 않은 경우, 활성화 산소, apoptosis 등에 의해 일어날 수 있다. 또한 활성화 산소가 apoptosis를 유발할 수 있다.<sup>25</sup>

Apoptosis는 정상적으로 발생하는 세포의 자연적 소멸현상인데 세포의 괴사와 다른 점은 능동적이고 세포의 자가죽음을 초래하는 지속적인 생리적 현상으로 유전적 기전에 조절받는다. 정세

**Table.** Comparison of the intracytoplasmic sperm injection outcome according to the source of spermatozoa

	Testicular sperm		Ejaculatory sperm	Reference No.
	NOA	OA		
Implantation rate (%)	13.4	24.5	26	(14)
	19.1	28.6	37	(23)
Fertilization rate (%)	57	80.5		(24)
	37.6	52.4	56.9*	(11)
Pregnancy rate (%)	39	54.4	59.5*	(12)
	49.1	57.1		(24)
	13.7	34.1	34.3*	(11)
	11.3	31.9	27.3*	(12)
Blastocyte formation rate (%)	40	49	62.5	(23)
Abortion rate (%)	50		14	(13)

\*epididymal sperm, NOA: nonobstructive azoospermia, OA: Obstructive azoospermia

관에서 세포분열과 apoptosis의 조화는, 정자의 과도한 생성을 방지하여 분열하지 않는 Sertoli 세포의 정세포에 대한 조절능력과 조직의 전체 기능을 적절히 유지하는데 중요하다. 일반적으로 대부분의 정세포는 정자로 성숙단계에 도달하기 전에 소멸하는 것으로 알려졌다.<sup>26,27</sup>

Apoptosis는 호르몬의 영향이나 조절을 받는데 성선자극 호르몬이나 testosterone의 결핍은 정세관에서 정세포의 apoptosis를 촉진하고 반대로 in vitro에서 사람과 쥐의 정세관에서 apoptosis를 억제한다.<sup>28-30</sup> GnRH 차단제를 투여하면 쥐에서 무정자증을 유발하는데 이때 apoptosis가 정자생성의 감소에 주요 역할을 하는 것으로 추정된다.<sup>31</sup> Apoptosis의 과정은 유전적 정보에 의해 핵의 chromatin에서 endogenous nuclease를 활성화되어 DNA 나선구조가 파괴됨으로써 세포가 사멸하여 필요없는 (대부분이 손상된 것으로 추정되는) 정세포들을 제거하게 된다.<sup>32</sup> Apoptotic body는 고환 병리조직 절편 H & E 염색에서 광학현미경하에서 관찰할 수 있는데 기저막에서 떨어져 정세관내에 위치하고 핵이 농축 변형되고 세포질의 공동화, 위축의 소견을 볼 수 있다. 광학현미경으로는 초기 apoptosis는 관찰할 수 없으며 In situ end labeling (TUNEL assay)을 하면 apoptotic body가 갈색으로 염색이 되기 때문에 보다 많이 관찰할 수 있다.<sup>33</sup>

Apoptosis가 정자생성의 장애가 있는 경우에 그 빈도가 증가한다는 사실이 점차 밝혀지면서 수정률 저하의 주요 원인의 하나로 주목받게 되었다. 정자의 형태가 DNA손상된 정자빈도와 상관관계가 있다든지,<sup>19</sup> 정자생성 장애에서 apoptosis가 정상 대조군에 비해 증가한다든지, 완전 정자생성실조에서 부분 정자생성실조에 비해 apoptosis의 빈도가 증가한다는 사실들은 위의 가정을 뒷받침하는 결과들이다.<sup>21,34,35</sup> 그러나 Sertoli only syndrome에서는 apoptosis가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 고환에서 여러 가지 병적인 진행과정이 apoptosis현상으로 나타나 성숙중단을 초래하여 결국은 손상된 정자가 수정 성공률을 저하시키는 요인으로 작용하게 되는 것이다. Host 등<sup>36</sup>은 DNA strand 손상이 IVF에서는 수정률을 저하시키지만, ICSI에서는 영향이 없다고 발표하였으나 ICSI에 사용한 정자의 형태가 정상으로 DNA 손상이 적었기 때문으로 설명하였다. 그러나 모든 정자의 DNA fragmentation이 apoptosis 현상과 관련이 있지는 않다.<sup>37</sup>

앞으로 DNA strand 손상이 과연 정자의 수정률을 저하시키는가가 밝혀져야 하고 아직 이에 대한 연구가 더 필요하다.

#### 4. 정세포의 In Vitro 배양

In vitro에서 정세포의 분화는 Sertoli 세포의 존재가 필수적인 것으로 간주되었기 때문에 분리된 세포배양으로는 발생하기 힘든 것으로 오랫동안 받아들여져 왔다. 따라서 Sertoli 세포와 정세포를 각각 분리하여 배양한 후 혼합배양하는 체계를 사용하거나 정세관 조직 자체를 배양하는 방법이 시도하였다. 배양결과의 관찰도 정세포의 분화보다는 생존된 정세포를 관찰하는데 목표를 두었다.<sup>38</sup> 최초의 in vitro상태에서 성공적인 감수분열과 정자형성의 유도는 쥐의 정세관 전체조직배양을 통해서였다.<sup>39</sup> 그 후 세포와 분자수준의 상호작용을 더 알게 됨에 따라 보다 정교한 배양체계를 통하여 정세포의 분화를 성공적으로 유도할 수 있게 되었다.<sup>40</sup> 즉 Sertoli 세포와 정세포와의 직접적 접촉없이 Sertoli 세포의 humoral effect만으로 정자세포 핵의 농축, 이동, 돌출 등 감수분열 이후 세포분화를 유도할 수 있게 되었다.<sup>41</sup>

정세포 배양에는 testosterone과 FSH가 필요하다. In vitro 배양에서 정세포 분화의 진행이 있었

던 군에서는 그렇지 않았던 군에 비해 FSH가 낮다는 것을 관찰하였다.<sup>42</sup> FSH는 *in vivo*에서, 정자형성감소증을 보이는 사람에서 초기 정자생성을 자극하나 정자세포 단계의 성숙중단소견을 보이는 환자에서는 효과가 없었다.<sup>43</sup> 반면에 *in vitro*에서는 *in vivo*에 비해 Sertoli 세포를 자극하는데 상당히 높은 농도의 FSH가 필요하다. 이는 직접적 세포의 접촉이 없기 때문인 곳으로 추정된다. 한편 Testosterone은 FSH의 meiosis와 정자생성과정의 작용을 증진시킨다. Testosterone은 Sertoli 세포의 apoptosis를 방지하고 FSH는 Sertoli 세포를 통해 정자생성을 자극하는 등 서로 상승적 역할을 한다.<sup>44</sup>

이제까지 이차 정모세포로 임신유도를 유도한 보고가 있으나<sup>45</sup> 아직 일차 정모세포 단계에서 중단된 premeiotic arrest에서는 성공한례는 없었다.

Tesarik 등<sup>46</sup>은 일차 정모세포 단계에서 중단 (premeiotic arrest)된 환자에서 elongate 정자세포를 얻어 임신에 성공하였고 정자세포단계의 성숙중단 환자에서 Sertoli 세포와 diploid 정세포의 합동배양을 통해 1~2일 배양 후 원형 정자세포 (Sa)에서 elongate 정자세포 (Sd2, Scp stage)로 분화시키고 ICSI를 통해 임신에 최초로 성공하였다 (Tesarik, 1999). 이 결과는 감수분열전의 성숙중단에서 *in vitro* 배양을 통해 gamete를 만들 수 있게 되었다는 의미이다. 그러나 이 방법의 문제점은 후기 pachytene 기에 원형정자세포로 되는데 16~20일이 소요되는데<sup>47</sup> 비해 비교적 단시간인 24시간 이내에 급격한 세포변화를 한다는 점과 ICSI에 사용할 수 있는 정세포이지만 형태적으로 비정상정자세포가 증가한다는 점이다. 아직 그 원인은 확실치 않으나 생체내의 정자생성에서는 형태적, 분자수준의 성숙과정에 다양한 점검체계가 작동하나 실험 조건 내에서는 이러한 과정이 생략되기 때문에 결과적으로 정자형성이 짧은 시간에 진행되고 비정상 정자세포도 증대되는 것으로 추정할 수 있다. 원형정자세포 단계의 성숙중단에서는 *in vitro* 배양이 도움이 될 수 있다.

고환조직에서 *in vitro* 배양을 통해 DNA strand 파괴 빈도를 현저히 낮출 수 있다는 것을 확인된 만큼<sup>44</sup> 이제는 *in vitro* 배양에 의한 정세포 분화를 통해 DNA손상된 정자빈도가 높은 성숙중단 환자에서 가장 가능성이 있는 치료방법으로 등장하게 되었다.

## 5. 결 론

정자생성장애가 심한 고환에서 채취한 정자 또는 정자세포를 이용한 ICSI 성공률이 낮은 원인은 아직 확실치 밝혀져 있지 않으나 고환의 정자생성장애가 심할수록 apoptosis빈도가 증가하는 현상과 ICSI에 의한 배아의 발달에는 남성측 요인의 영향이 크다는 점을 고려할 때 apoptosis와 관련된 정자 또는 정세포의 손상은 보조생식술의 성공률을 저하시키는 주요 요인이 될 수 있다고 추론할 수 있다. DNA strand 손상이 수정률을 저하시키는지에 대해서는 보다 명확한 결과가 나온다면 심한 고환정자의 apoptosis는 앞으로 *in vitro* 배양의 새로운 적응증으로 대두될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Sreirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17-8.

2. Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, et al. High fertilization and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; 8: 1061-6.
3. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, et al. Pregnancy after fertilization within testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; 342: 1237.
4. Tesarik J, Mendoza C, Testart J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Eng J Med* 1995; 33: 525.
5. Fishel S, Green S, Bishop M, Thornton S, Hunter A, Fleming S, et al. Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet* 1995; 345: 1641-2.
6. Lopez S, Jurisicova A, Casper RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 703-8.
7. Cummins JM, Jequier AM. Concerns and recommendations for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *Hum Reprod* 1995; 10(suppl 1): 138-43.
8. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996; 351: 199-203.
9. Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Nat Cancer Inst* 1997; 89: 238-44.
10. Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem AC. Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum Reprod* 1998; 13(suppl1): 143-54.
11. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Fahmy I, Kamal A, Tawab NA, et al. Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculation using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. *Fertil Steril* 1997; 68: 108-11.
12. Mansour RT, Kamal A, Fahmy, Tawab N, Serour, Aboulghar MA. Intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12: 1974-9.
13. Ghazzawi IM, Sarraf MG, Taher MR, Khalifa FA. Comparison of the fertilizing capacity of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 348-52.
14. Ubaldi F, Nagy ZP, Reinzi L, Tesarik J, Anniballo R, Franco G, et al. Reproductive capacity of spermatozoa from men with testicular failure. *Hum Reprod* 1999; 14: 2796-800.
15. Craft I, Tsirigotis M, Zhu J. In-vitro culture of testicular sperm. *Lancet* 1995; 346: 1438.
16. Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 1998; 13: 1632-7.
17. Amer M, Soliman E, El- Sadek M, Mendoza C, Tesarik J. Is complete spermatogenesis failure a good indication for spermatis conception? *Lancet* 1997; 350: 116.
18. Vanderzwalmen P, Zech H, Birkenfeld A, Yemini M, Bertin G, Lejeune B, et al. Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation. *Hum Reprod* 1997; 12: 1203-13.
19. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm:

- correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-7.
20. Barroso S, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane traslocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 1338-44.
  21. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 830-9.
  22. Gazvani MR, Wilson EDA, Richmond DH, Howard PJ, Kingsland CR, Lewis-Jones DI. Role of mitotic control in spermatogenesis. *Fertil Steril* 2000; 74: 251-6.
  23. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, et al. Blastocyst transfer following intracytoplasmic injection of ejaculated, epididymal or testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2001; 16: 125-9.
  24. Palermo GD, Schlegel PN, Hariprashad J, Ergun B, Mielnik A, Zaninovic N, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14(3): 741-8.
  25. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: A balancing act between beneficial and detrimental effect. *Hum Reprod* 1995; Oct.10(Suppl 1): 15-21.
  26. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal aults rats: an analysis using a samplified classification of germinal epithelium. *Anat Rec* 1978; 905-26.
  27. Oakberg E. A description of spermatogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 1956; 99: 391-413.
  28. Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1995; 136: 2770-5.
  29. Erkkila K, Henriksen K, Hirvonen V, Rannikko S, Salo J, Parvinen M, et al. Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2314-21.
  30. Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M. Testosterone inhibits and induces spoptosis in rat seminiferous tubules in stage-specific manner in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinol* 1995; 136: 3285-91.
  31. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Temporal staged specific changes in spermatogenesis of rat after gonadotropin deprivation by potent gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1993; 133: 2161-70.
  32. Gorczyca W, Traganos F, Jesinowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA Strand Breaks and increased sensitivity of DNA in Situ to Denaturation in abnormal human sperm cells: Analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp cell Res* 1993; 207: 202-5.
  33. Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation srrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 1997; 158: 1791-3.
  34. 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.
  35. Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI, Kim Edward. In situ end-labeling of human testicular

- tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997; 68: 1065-9.
36. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand break in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 559-63.
  37. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000; 21: 903-12.
  38. Steinberger A. In vitro technique for the study of spermatogenesis. In: Hardmann JG, O'Malley BW, eds. *Methods in enzymology*. Vol 39. New York: Academic Press 1975: 283-96.
  39. Parvinen M, Wright WW, Phillips DM. Spermatogenesis in vitro: completion of meiosis and early spermiogenesis. *Endocrinology* 1983; 112: 1150-2.
  40. Kierszenbaum AL. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr Rev* 1994; 15: 116-34.
  41. Tesarik J, Greco E, Reinzi L, Ubaldi F, Guido M, Cohen-Bacrie P, et al. Differentiation of spermatogenic cells during in-vitro culture of testicular biopsy samples from patients with obstructive azoospermia: effect of recombinant follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998; 13: 2722-81.
  42. Tesarik J, Balaban B, Isiklar A, Alatas C, Urman B, Aksoy S, et al. In-vitro spermatogenesis resumption in men with maturation arrest: relationship with in-vivo blocking stage and serum FSH. *Hum Reprod* 2000; 15; 6: 1350-4.
  43. Foresta C, Bettella A, Ferlin A, Garolla A, Rossato M. Evidence for a stimulatory role of follicular-stimulating hormone on the spermatogonial population in adult males. *Fertil Steril* 1998; 69: 636-42.
  44. Tesarik J, Bahceci M, Ozcan C, Greco G, Mendoza C. Restoration of fertility by in vitro spermatogenesis. *Lancet* 1999; 353: 555-6.
  45. Sofikitis N, Mantzavinos T, Loutradis D, Yamamoto Y, Tarlatzis V, Miyagawa I. Ooplasmic injections of secondary spermatocytes for non-obstructive azoospermia. *Lancet* 1998; 351: 1177-8.
  46. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Assisted reproduction with in-vitro-cultured testicular spermatozoa in cases of severe germ cell apoptosis: a pilot study. *Hum Reprod* 2001; 16(12): 2640-5.
  47. Heller CG, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res* 1964; 20: 545-75.