

**„Sperm Retrieval“: Testikuläre SpermatozoenEntnahme (TESE) bei  
Non-Obstruktiver Azoospermie (NOA)  
-Optimierung der Patientenauswahl, Implementierung der chirurgischen Technik  
und vergleichende Beurteilung zwischen Makro- und Mikro-TESE**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Andreas Keudel  
aus Gießen  
Gießen 2022

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie

Gutachter: Prof. Dr. Meinhardt

Gutachter: Prof. Dr. Hauck

Tag der Disputation: 13.12.2022

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1. Einleitung**

#### **1.1. Definition Infertilität**

##### **1.1.1. Häufigkeit**

##### **1.1.2. Azoospermie**

##### **1.1.3. Obstruktive Azoospermie (OA)**

##### **1.1.4. Non-Obstruktive Azoospermie (NOA)**

#### **1.2. „Sperm Retrieval“ Techniken**

### **2. Fragestellung**

### **3. Patienten, Material und Methode**

#### **3.1. Klinische Standarddiagnostik**

#### **3.2. Chirurgisches Vorgehen**

#### **3.3. Gewebeaufarbeitung, testikuläre Histologie und Nachweis von elongierten Spermatisden**

#### **3.4. Nachkontrollen**

#### **3.5. Statistik**

### **4. Ergebnisse**

#### **4.1. Ergebnisse der Patientenzuordnung**



## **11. Anhang**

**11.1. Labor-Manual Andrologische Labordiagnostik: Spermogramm nach WHO 2010, EAA Zentrum Gießen**

**11.2. Marconi, M., Keudel, A., Diemer, Th., Bergmann, M., Steger, K., Schuppe, H.C., 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. 62(4): p. 713-9**

**11.3. Arbeitsanweisung 003, Aufbereitung von Hodengewebe (TESE-Test), Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie, Klinisch-Andrologisches Labor/Kryobank**

## **12. Publikationsverzeichnis**

## **13. Ehrenwörtliche Erklärung**

## **14. Danksagung**

## **1. Einleitung**

Im Jahr 1677 entdeckt der Medizinstudent Johan Ham „mikroskopische Tierchen“ in menschlichem Ejakulat, berichtet dem Naturforscher Antoni van Leeuwenhoek von seiner Beobachtung, und ordnet diese als Spermatozoen der Samenflüssigkeit mit einer befruchtenden Fähigkeit für das Ei zu [1]. Seit dieser Zeit wurden danach für einen Zeitraum von mehr als 300 Jahren Männer ohne Spermatozoen im Ejakulat als infertil angesehen. Sowohl eine Obstruktive Azoospermie (OA), die durch einen Verschluss der ableitenden Samenwege gekennzeichnet ist, als auch eine Non-Obstruktive Azoospermie (NOA), die durch eine fehlende Produktion von Samenzellen im Hoden definiert wurde, galten als nicht behandelbar [2].

Mit der Einführung der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (IntraCytoplasmic Sperm Injection: ICSI) Anfang der 1990er Jahre in das Behandlungsspektrum andrologisch bedingter Infertilität [3-6] wurde infertilen Männern mit wenigen oder funktionell nicht befruchtungsfähige Spermatozoen im Ejakulat, erstmals eine Möglichkeit geboten, Vater zu werden. Dabei wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen von ersten erfolgreichen ICSI berichtet, bei denen Spermatozoen direkt aus dem Hoden entnommen wurden [3-6].

### **1.1. Definition Infertilität**

Nach Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation: WHO) ist eine Infertilität die Unfähigkeit eines sexuell aktiven, nicht empfängnisverhütenden Paares, innerhalb eines Jahres eine Schwangerschaft zu erreichen [2]. In einer neueren Definition wird die Infertilität als Erkrankung des Fortpflanzungssystems gesehen, präzisiert durch das Ausbleiben einer klinischen Schwangerschaft nach 12 oder mehr Monaten regelmäßigen ungeschützten Geschlechtsverkehrs [7].

#### **1.1.1. Häufigkeit**

Etwa 25 % aller Paare werden innerhalb eines Jahres nicht schwanger, davon lassen sich 15 % wegen Unfruchtbarkeit medizinisch behandeln, wobei weniger als 5 % letztlich kinderlos bleiben [8]. Auch in den aktuellen „EAU Guidelines on Male Infertility“ [9] aus dem Jahr 2019 wird bei Paaren von einem Prozentsatz von 15% ausgegangen, die

keine Schwangerschaft in der Partnerschaft erreichen und sich medizinisch behandeln lassen. Nach unterschiedlichen Untersuchern besteht in etwa 50% der Fälle ein „Male Infertility Factor“ [8-12]. Die Gießener andrologische Arbeitsgruppe berichtete im Jahr 2010 von 1834 Männern mit Fertilitätsproblemen, die sich im Gießener EAA (European Academy of Andrology) Zentrum vorstellten [13]. Bei 6,9% der Fälle lag eine obstruktive Azoospermie vor [13]. Bei 24,5% der Fälle wurde eine testikuläre Störung mit oder ohne Azoospermie diagnostiziert [13].

### **1.1.2 Azoospermie**

Eine Azoospermie nach WHO liegt vor, wenn nach Zentrifugation des gewonnenen Ejakulates keine Spermatozoen und keine Spermatogenese Zellen nachgewiesen werden können [2, 14]. Auch in der aktuellsten sechsten Edition des „WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen“ aus dem Jahr 2021 ist die Azoospermie wie oben beschrieben definiert [15]. In der Gießener Arbeitsgruppe erfolgt die Azoospermiediagnostik standardisiert und schließt eine Analyse des Sedimentes des Ejakulates nach Zentrifugation ein [16]. Diese Standardisierung wird durch das Labor-Manual Andrologische Labordiagnostik: Spermogramm nach WHO 2010, EAA Zentrum Gießen beschrieben (**Anhang 1**).

Eine Azoospermie trifft auf 4-10% der Männer zu, die sich in einer infertilen Partnerschaft untersuchen lassen [8]. In neueren Untersuchungen [10, 11, 17] tritt die Azoospermie bei 10-15 % der Männer auf, die wegen Unfruchtbarkeit in der Partnerschaft ärztliche Hilfe suchen. Dieses Fehlen der Samenzellen kann in eine Obstruktive Azoospermie (OA) und Non-Obstruktive Azoospermie (NOA) unterteilt werden [8, 9].

### **1.1.3. Obstruktive Azoospermie (OA)**

Unter OA versteht man das Fehlen sowohl von Spermatozoen als auch von Spermatogenese Zellen im Ejakulat, bedingt durch einen Verschluss der ableitenden Samenwege [8, 9] die bei 15-20% der Männer mit Azoospermie auftritt [9]. Ursächlich werden intratestikuläre Verschlüsse vor allem im Rete testis in bis zu 15% und eine epididymale Obstruktion in bis zu 67% aller Fälle als wesentliche Krankheitsbilder

angesehen [8, 9]. Eine epididymale Obstruktion wird vor allem als post-entzündlich/infektiös (Chlamydien-, Gonokokken-Infektion) angenommen [8].

Unabhängig davon ist eine Obstruktion durch Vasektomie die häufigste iatrogen verursachte OA, die zu der vom Patienten gewünschten Unfruchtbarkeit führt. Trotz erfolgreicher Vasovasostomie wird in bis zu 10% eine Nebenhodenschädigung als Ursache für eine verbleibende postoperative Azoospermie diskutiert [18].

Weitere wichtige, aber seltene Ursachen einer OA umfassen unter anderem eine in der Prostataregion lokalisierte Veränderung, zum Beispiel durch einen beidseitigen Verschluss der Ductus Ejakulatorii bzw. zystische Veränderungen am Samenhügel [19]. Eine genetisch verursachte Erkrankung ist die kongenitale bilaterale Aplasie des Vas Deferens (Congenital Bilateral Aplasia of the Vas Deferens: CBAVD). Diese ist sehr selten und dem Formenkreis der zystischen Fibrose zuzurechnen, wobei in bis zu 85% aller Fälle Mutationen im zystischen Fibrosegen nachgewiesen werden können [20].

Es ist Konsens, dass die Therapie einer OA nur durch ausgewiesene, erfahrene urologische Mikrochirurgen durchgeführt werden darf [8, 9]. Die Gießener Arbeitsgruppe verfügt dazu über jahrelange Erfahrungen [19, 21-25]. Während eine Vasovasostomie nach Vasektomie in bis zu 90% der Fälle zu einer Samenleiterdurchgängigkeit führt, liegen die Durchgängigkeitsraten bei der mikrochirurgischen Korrektur bei den anderen genannten Ursachen deutlich niedriger [25]. Aus diesem Grund wird auch diskutiert, dass z.B. während der mikrochirurgischen Refertilisierung als „back-up“ zusätzlich ein „Sperm Retrieval“ aus dem Nebenhoden oder Hoden angeboten werden kann [25]. Über Jahre wurde in solchen Fällen eine Spermatozoengewinnung aus dem gestauten Nebenhoden empfohlen. Technik der Wahl ist hierbei die Mikrochirurgische Epididymale SpermatozoenAspiration (MESA) nach Nebenhodenfreilegung, auch über Perkutane Epididymale SpermatozoenAspiration (PESA) wird berichtet [21, 22, 26]. In den Händen der Gießener Arbeitsgruppe führte in bis zu 94% der Fälle die MESA zur Gewinnung von Spermatozoen bei Männern mit OA [21]. Mit dieser Methode kann Material für eine ausreichende Zahl von Spermatozoen für mehrere aufeinanderfolgende ICSI-Zyklen kryokonserviert werden [21]. Dies stellt einen eindeutigen Vorteil gegenüber im Volumen limitierten perkutanen Gewinnungsmethoden dar [26]. Daher setzt die Gießener Arbeitsgruppe bei allen Formen von nicht rekonstruierbaren Obstruktionen auf eine testikuläre Spermatozoenentnahme, wenn eine MESA nicht erfolgreich erscheint [25]. Auch in den aktuellen „EAU Guidelines on Male Infertility“ [9] wird die MESA als die zu bevorzugende Technik bei OA empfohlen.

#### 1.1.4. Non-Obstruktive Azoospermie (NOA)

Im Gegensatz zum Vorhandensein einer normalen Spermatogenese bei der OA, ist die NOA, auch testikuläre Azoospermie genannt, die schwerwiegendste Form der männlichen Infertilität und betrifft etwa 5 % der infertilen Männer [10, 11, 17]. Die NOA als testikuläre Erkrankung stellt einen heterogenen Zustand mit einer gestörten Spermatogenese dar: Morphologisch kann sowohl eine Hypospermatogenese, ein Maturationsarrest sowie als schwerste Form ein kompletter Verlust der Spermatogenese, ein sogenanntes „Sertoli-Cell Only Syndrom (SCO)“ vorliegen [10, 11, 17]. In der Spermatogenese werden mindestens 6 Zelltypen unterschieden, die von der Spermatogonie über die Spermatozyte I, die Spermatozyte II, runde Spermatische zu elongierten Spermatischen differenziert werden [27]. Die testikulär entnommenen Zellen werden Spermatischen genannt. Nach Verlassen der Hodentubuli werden die elongierten Spermatischen im Ejakulat als Spermatozoen bezeichnet. Wichtig ist, dass unterschiedliche Stadien der Spermatogenese mit den oben genannten Veränderungen nebeneinander vorkommen können [27].

Zur klinischen Diagnosefindung bei Männern mit NOA liegt die Histologie zur Prognosebeurteilung üblicherweise nicht vor, obwohl eine differenzierte Hodenhistologie mit dem Nachweis von Tubuli voller elongierter Spermatischen ein sehr guter Prädiktor für ein erfolgreiches operatives „Sperm Retrieval“ ist [28]. Die Gießener Arbeitsgruppe ist jedoch mit der „EAU Section Andrological Urology“ (ESAU) der „European Association of Urology“ (EAU) [29] zu dem Schluss gekommen, keine denkbare histologische Vordiagnostik mit einem zusätzlichen chirurgischen Eingriff vor dem geplanten testikulären „Sperm Retrieval“ zu empfehlen [25]. Obwohl das histologische Bild der Spermatogenese wahrscheinlich ein sehr wichtiger Prognosefaktor für ein erfolgreiches „Sperm Retrieval“ ist [28], wird die Histologie üblicherweise während des TESE Eingriffs mituntersucht und liegt damit dem Operateur vorab nicht vor. Dementsprechend kann ihm die Histologie auch prognostisch keinen Hinweis auf die beste Entnahmestelle im Hoden geben [29]. Zu dem damaligen Zeitpunkt war eine Identifizierung von eventuell geeigneten Spermatogenese Arealen durch perkutane Aspiration, wie 2016 durch die Arbeitsgruppe von Jensen et al. [30] empfohlen, nicht üblich.

In den entsprechenden Leitlinien der EAU [8, 9, 29] werden klinisch kongenitale und erworbene Ursachen bei Patienten mit Verdacht auf Non-Obstruktiver Azoospermie differenziert. Das Klinefelter-Syndrom (KS) [17, 31, 32] und die Y-Chromosomale

Mikrodeletion [33] sind die häufigsten angeborenen Ursachen für eine Non-Obstruktive Azoospermie (NOA) bedingt durch eine genetische Veränderung. Ebenso kongenital (mit-)verursachend gelten auch der Kryptorchismus, der histologische Befund eines „Sertoli Cell Only Syndroms“ (SCO) und der Maturationsarrest [8]. Der Kryptorchismus wird üblicherweise als Testikuläres Dysgenese Syndrom angesehen und wird mit reduzierter Fertilität und einem erhöhtem testikulären Karzinomrisiko assoziiert [34]. Zu den häufigsten erworbenen Ursachen der NOA gehören traumatische Krankheitsbilder, insbesondere die Hodentorsion, aber auch intraoperative Schädigungen der Hodendurchblutung z.B. bei kindlicher Herniotomie, postentzündliche Veränderungen bei Orchitis (z.B. Mumps), und andere testikuläre Veränderungen wie Hodentumoren und eine Varikozele [8]. Wie stark eine Varikozele mit einer nachweisbaren testikulären Azoospermie durch eine operative Korrektur tatsächlich positiv beeinflussbar ist, bleibt unklar [35]. Weiter wird diskutiert, dass eventuell die geringe Anzahl an postoperativ auftretenden Spermatozoen im Ejakulat nach einer Varikozelen Operation in vielen Fällen für eine ICSI nicht ausreicht [35]. Zusätzlich müssen iatrogene Schäden, zum Beispiel nach Chemotherapie oder Strahlentherapie berücksichtigt werden [8]. An dieser Stelle wird angemerkt, dass für den Befund einer NOA üblicherweise eine beidseitige Hodenschädigung vorausgesetzt wird [8, 29].

## **1.2. „Sperm Retrieval“ Techniken**

Während bei der OA in annähernd 100% der Fälle von einer erfolgreichen testikulären Spermatozentnahme ausgegangen wird [22, 36], gelingt das „Sperm Retrieval“ bei einer NOA in einem deutlich niedrigeren Prozentsatz. Als Ursachen sind hierfür unterschiedlich starke und heterogene Spermatogenesestörungen anzuführen [37-40]. Eine Publikation der deutschen Arbeitsgruppe um Schwarzer [41] geht von einem höheren „Sperm Retrieval“ von bis zu 80% nur dann aus, wenn es sich um eine „Mixed Atrophy“ handelt. Hier wird von einer heterogenen Spermatogenese ausgegangen, das heißt testikuläre Areale mit und ohne intakte Spermatogenese, im gleichen und kontralateralen Hoden. Aus Sicht der Gießener Arbeitsgruppe ist auch eine falsch diagnostizierte obstruktive Variante mit intakten Spermatogeneseinseln zu bedenken [22, 25].

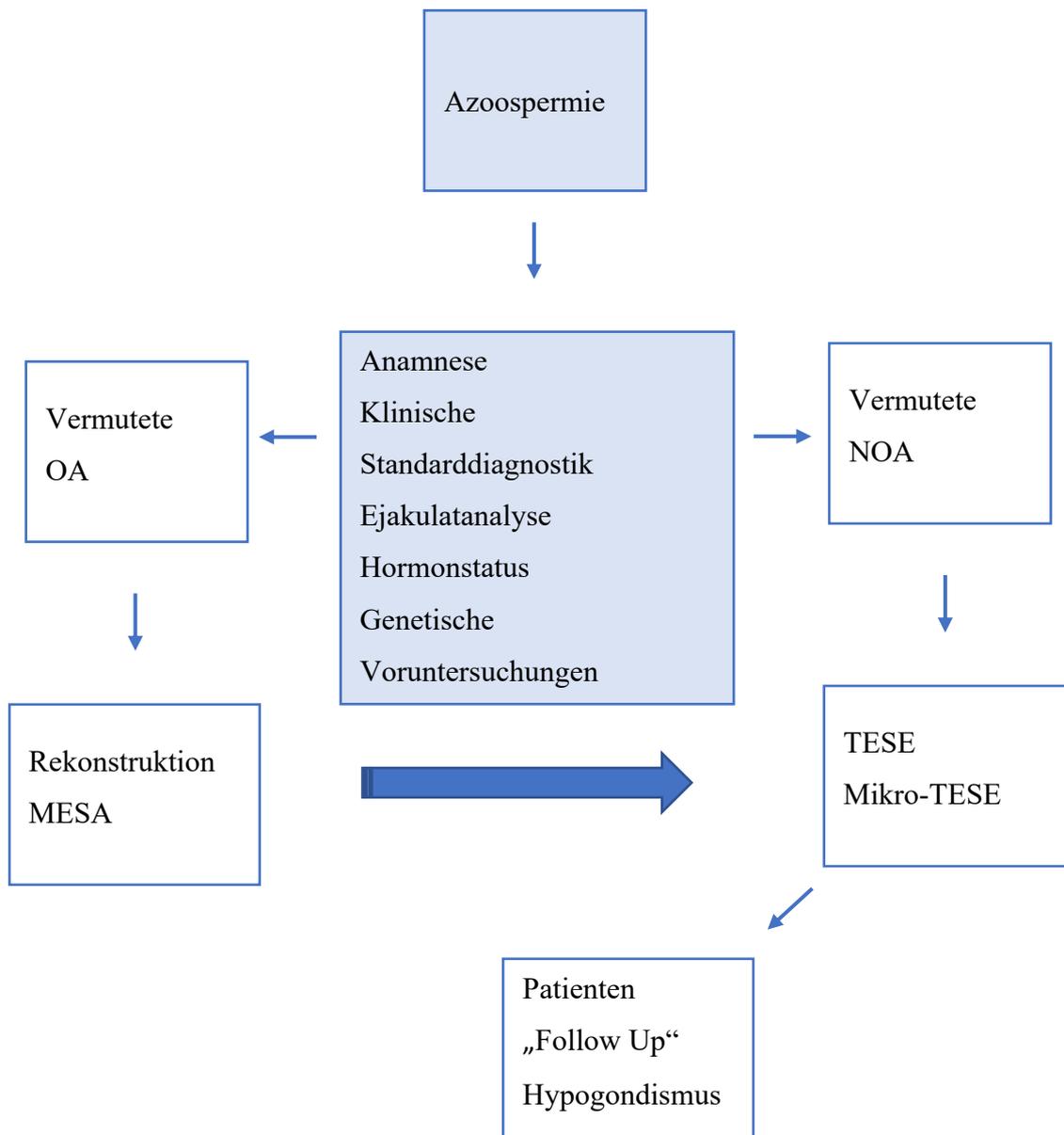
Das „Sperm Retrieval“ bei Patienten mit NOA, unabhängig ob die Hodenbiopsien ohne oder mit Hilfe eines OP-Mikroskops (makro- oder mikrochirurgisches operatives

Vorgehen) durchgeführt wurden, schwankt mit Prozentzahlen von 15% bis annähernd 60% unterschiedlich stark in den verschiedenen Studien [22, 25]. Ein wahrscheinlich das „Sperm Retrieval“ beeinflussender Parameter ist die Zahl der TESE Entnahmestellen. Dabei ist die Gießener Arbeitsgruppe bereits 2008 zu dem Schluss gekommen, dass eine Trifokale Makro-TESE (makroskopische Biopsieentnahme an 3 Stellen, oberer, mittlerer und unterer Pol) als Standardmethode eventuell einen Vorteil bieten könnte [22, 24, 42]. Dabei ist bezüglich der Lokalisation der Entnahmestelle eine arterienschonende Inzision am freien Rand des Hodens anzustreben [22, 24, 41, 42]. Neben diesen lokalen Aspekten gibt es weitere Faktoren, die das „Sperm Retrieval“ negativ beeinflussen können: insbesondere kleine Hodenvolumina und hohe Serumspiegel des Follikel-Stimulierenden Hormons (FSH) werden als prognostisch ungünstig angesehen [22, 39, 43].

Die Testikuläre Spermatozoenextraktion (TESE) als offene Biopsie ohne Einsatz des OP-Mikroskopes galt auch für die Gießener Arbeitsgruppe über Jahre als die effektive Methode zur Spermatozoengewinnung aus den Hoden [22, 24, 42]. Im Jahr 1999 hat die Arbeitsgruppe um Schlegel [44] erstmals eine TESE mit Hilfe eines OP-Mikroskopes durchgeführt. Die Autoren bezeichneten die bis dahin geübte TESE als ein „Blindverfahren“, welches erst durch die Einführung der mikrochirurgischen Technik zur Testikulären Spermatozoenextraktion, als Mikro-TESE, entscheidend verbessert werden konnte [44]. Dabei wird unter dem Mikroskop, nach Öffnung des Hodenparenchyms, nach vergrößerten Tubuli mit weißlich-opaker Farbe gesucht, die vermehrt elongierte Spermatozoen enthalten sollen [44]. Diese werden dann gezielt entnommen [44]. Die Gießener Arbeitsgruppe [22, 24, 25, 42] hat diese Technik aufgenommen und nach Trainingseinheiten in verschiedenen mikrochirurgisch-reproduktionsmedizinisch erfahrenen Zentren in Gießen etabliert. In den aktuellen „EAU Guidelines on Male Infertility“ [9] wird die Mikro-TESE als die Entnahmetechnik mit dem höchsten „Sperm Retrieval“ empfohlen. In diese Empfehlung fließen ausdrücklich die Erfahrungen der Gießener Arbeitsgruppe [45] ein.

Die gegenwärtige klinische, durch verschiedene EAU/ESAU Arbeitsgruppen [8, 9, 22, 25, 29, 46] etablierte Vorgehensweise bei Azoospermie, unterteilt in OA und NOA, ist in **Abbildung 1** systematisch dargestellt.

**Abbildung 1**  
**Klinische Vorgehensweise Azoospermie**



Quelle: Eigene Darstellung

Leider bleibt es unklar, ob die Mikro-TESE tatsächlich ein höheres „Sperm Retrieval“ im Vergleich zur konventionellen TESE (ohne Mikroskop) erzielen kann. Die unterschiedlichen Einflussmöglichkeiten auf die Erfolgsrate sind bereits oben ausführlich dargestellt und diskutiert worden [22, 24, 38-43, 47, 48]. Erschwerend kommt hinzu, dass

unterschiedliche reproduktionsmedizinische Techniken weltweit zur Aufnahme und Aufarbeitung des testikulären Biopsiematerial eingesetzt worden sind [25], wobei in der Gießener Arbeitsgruppe das aufgenommene Material immer 3-teilig aufgearbeitet wurde: zur Kryokonservierung, zur histologischen und zur molekularen Diagnostik [25].

Zusätzlich zu den oben genannten teils widersprüchlichen „Sperm Retrieval“ Ergebnissen desillusionierte eine Cochrane Analyse der bisher publizierten Daten aus dem Jahre 2008 [49] die Verfechter der Mikro-TESE. Diese kam zum damaligen Zeitpunkt zu dem Schluss, dass eher kein Vorteil für das „Sperm Retrieval“ durch die Mikro-TESE bei NOA gesehen werden konnte [49].

Unabhängig davon versuchte die Arbeitsgruppe um Colpi [43], an 138 Hodeneinheiten zwischen offener Makro-TESE und Mikro-TESE Erfolgsfaktoren für eine Spermatidengewinnung zu analysieren. Es zeigte sich ein signifikanter Vorteil der Mikro-TESE bei Patienten mit erhöhtem FSH-Serumspiegel [43]. Hodenvolumina und Hodenhistologie hatten keinen Einfluss [43]. Etwas abweichend davon berichtete die Arbeitsgruppe um Ghalayini [39] ebenfalls über ein erhöhtes „Sperm Retrieval“ bei der Mikro-TESE, den negativen Einfluss eines erhöhten FSH-Serumspiegels und den fehlenden Einfluss eines kleinen Hodenvolumens [39]. Bezüglich der Hodenhistologie war der Nachweis eines „Sertoli Cell Only Syndroms (SCO)“ mit einem geringeren „Sperm Retrieval“ assoziiert [39]. In einer älteren Studie aus dem Jahr 2000 wies die Arbeitsgruppe um Amer [37] darauf hin, dass das „Sperm Retrieval“ sich signifikant bei einer Mixed Pathology, d.h. intakte Spermatogeneseareale sind vorhanden, erhöht [37]. Dies wirft die Frage auf, ob die Häufung derartiger Befunde nicht durch intakte Spermatogeneseinseln bei einer wie oben erwähnten unentdeckten Obstruktionskomponente erklärt werden können. Eine weitere von der Arbeitsgruppe um Schwarzer [41] im Jahr 2013 publizierte Studie zeigte ein signifikant höheres „Sperm Retrieval“ bei einer Mikro-TESE bei geringen Hodenvolumina <5ml [41]. Die Arbeitsgruppe um Turunc et al. [40] analysierte 335 Patienten mit NOA. Es zeigte sich bei einer zusätzlichen Ausweitung der Biopsieanzahl kein Einfluss des FSH-Serumspiegels auf das „Sperm Retrieval“ [40]. Bei größeren Hodenvolumina waren die Ergebnisse jedoch besser [40].

In zwei weiteren Untersuchungen an sehr kleinen Patientengruppen [38, 47] wurde keine erhöhte „Sperm Retrieval“ Rate bei einer Mikro-TESE gefunden.

Des Weiteren ließ sich in der Untersuchung der Arbeitsgruppe um Mulhall [38] kein Einfluss zwischen genetisch determinierten Krankheitsbildern wie des Klinefelter

Syndroms und der Y Chromosomalen Mikrodeletion (Azoospermiefaktor *c*) auf die „Sperm Retrieval“ Rate erkennen [38]. Einzig „kleine“ Hodenvolumina  $\leq 10\text{ml}$  wurden als prognostisch negativ beurteilt [38].

## 2. Fragestellung

In den Jahren 2007 und 2008 wurden der andrologischen Arbeitsgruppe des EAA Zentrums Gießen, die eine besondere Expertise in der mikrochirurgischen Refertilisierung besaß, eine zunehmende Anzahl von Patienten zur TESE zugewiesen. Zu dieser Zeit bestand am Standort Gießen ein chirurgischer Konsens, dass eine Trifokale Makro-TESE bei der Diagnose NOA durchgeführt werden sollte [22]. Nach der internationale Einführung der Mikro-TESE, die zu einer Verbesserung des „Sperm Retrievals“ bei NOA führen sollte, folgte ein sprunghafter Anstieg von Zuweisungspatienten am Standort Gießen, an dem diese mikrochirurgische Technik etabliert und jede zusätzliche Mikro-TESE eine weitere Chance für ein erfolgreicherer „Sperm Retrieval“ bieten sollte [22].

Ziel der Arbeit war eine Optimierung der Patientenauswahl, Implementierung der chirurgischen Technik und vergleichende Beurteilung zwischen Makro- und Mikro-TESE.

Die Gießener Arbeitsgruppe hat dazu beim Überweisungskollektiv zur TESE eine entsprechende subtile Diagnostik zwecks Optimierung der Patientenauswahl eingeführt. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

Welche Voruntersuchungen sind für ein erfolgreiches „Sperm Retrieval“ notwendig?

Wie kann präoperativ die Diagnostik für ein erfolgreiches „Sperm Retrieval“ verbessert werden?

Wie häufig ist in diesem Patientenkollektiv eine obstruktive Komponente nachzuweisen?

Welche klinischen Risikofaktoren haben sich zur Optimierung der Patientenzuordnung bewährt?

Zur Beurteilung der Fragen im Detail wurde eine „Low Chance NOA“ Gruppe nach Tüttelmann [50] gebildet, das heißt mit gesicherter testikulärer Azoospermie, mit einem erhöhtem FSH-Serumspiegel über 12,4 IU/l und einem geringem Hodenvolumen unter 8ml für beide Hoden.

Chirurgisch wurde eine standardisierte Trifokale Makro-TESE um eine Mikro-TESE an jeder testikulären Einheit ergänzt. Technisch wurde die Trifokale Makro-TESE im oberen, mittleren und unterem Hodenbereich durchgeführt und um eine Mikro-TESE in der mittleren Inzision erweitert [45]. Ziel war, im intraindividuellen Vergleich beim gleichen Patienten und gleicher Hodeneinheit das „Sperm Retrieval“ in den

verschiedenen Inzisionsarealen der Hoden getrennt zu bewerten und zusätzlich den Einfluss der mikrochirurgischen Technik auf das Ergebnis zu analysieren [45].

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

Gibt es bei diesen Patienten Hinweise auf ein typisches Muster von Risikofaktoren?

Bestehen Unterschiede im testikulären histologischen Befund zwischen den biopsierten Arealen?

Gibt es Unterschiede in der Anzahl auswertbarer Tubuli zwischen Makro- und Mikro-TESE.

Liegen im Bergmann/Kliesch Score in den biopsierten Arealen unter Berücksichtigung der Mikro-TESE Unterschiede vor?

Erhöht sich im Gießener Konzept-Trifokale Makro-TESE und Mikro-TESE das „Sperm Retrieval“ unter besonderer Berücksichtigung der zusätzlichen mikrochirurgischen Komponente?

Zusätzlich wurde Anhand dieser Ergebnisse der Einfluss eines erhöhten FSH-Serumspiegels und verkleinerter Hodenvolumina mittels ROC Kurven analysiert.

Weiterhin wurden in der „Low Chance NOA“ Gruppe die peri- und postoperativen Komplikationen bis 6 Monate nach Operation objektiviert, dabei wurde der Frage eines postoperativen Hypogonadismus nach 6-monatiger Nachkontrolle gezielt nachgegangen.

### 3. Patienten, Material und Methode

Zwischen Januar 2008 und Oktober 2010 stellten sich 182 Patienten mit der Diagnose Azoospermie mit testikulärem Faktor zur Spermatozoengewinnung („Sperm Retrieval“) in der Andrologischen Sprechstunde von Prof. Dr. Wolfgang Weidner, Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Universitätsklinik Gießen vor. Diese wurden einer standardisierten Diagnostik durch die Gießener andrologische Arbeitsgruppe unterzogen.

#### 3.1. Klinische Standarddiagnostik<sup>1</sup>

Die klinische andrologische Untersuchung umfasste eine ausführliche allgemeine und spezielle andrologische Anamnese, nach von der Gießener Arbeitsgruppe festgelegten Kriterien [51]. Bei einem anamnestischen Hinweis auf Azoospermie wurde nach relevanten andrologischen durchgemachten Krankheitsbildern unter Benutzung eines speziellen Anamnesebogens gefragt, wie einem Zustand nach Hodenhochstand, einer Hodentumoranamnese, einer Mumpsorchitis, einer Epididymitis, einem Zustand nach Hodentrauma und Hodentorsion, und insbesondere nach einer genetischen Erkrankung wie dem Klinefelter Syndrom. Üblicherweise waren die Voruntersuchungen zum Ausschluss oder Erkennung genetischer Erkrankungen von den überweisenden niedergelassenen Urologen bereits durchgeführt worden und die Befunde lagen vor.

Die Untersuchung der Skrotalorgane umfasste die Hodenlage, die Beurteilung der Hodenkonsistenz und von chronischen Nebenhodenveränderungen im Sinne einer Epididymitis [51]. Hierbei wurde insbesondere auf palpatorisch vergrößerte Nebenhodenköpfe als Obstruktionszeichen geachtet [51]. Weiterhin wurde eine Palpation des Skrotalinhaltes nach den Richtlinien der WHO und der European Association of Urology (EAU) durchgeführt [2, 8]. Dazu wurde von lateral nach medial im Stehen der Samenstrang zwischen zwei Fingern palpirt, um das Vorhandensein der Samenleiter zu bestätigen oder auszuschließen. Die Untersuchung endete mit Palpation des Samenstranges, um unter Valsalva im Stehen eine Erweiterung von Plexusvenen nachzuweisen, die dann als Varikozele diagnostiziert wurden [51] (**Abbildung 2**).

---

<sup>1</sup> Mein Dank gilt Dr. M. Marconi, unter dessen Anleitung und Kontrolle die klinische Diagnostik durch mich in der nachfolgend dargestellten Weise erfolgte. Die Patientenauswahl zur TESE erfolgte aufgrund der Befunde auf Vorschlag von Dr. M. Marconi, mit endgültiger Festlegung durch Prof. Dr. W. Weidner.

## Abbildung 2

Varikozele links: Füllung der Venen unter Valsalvabedingungen im Stehen



Quelle: Prof. Dr. Wolfgang Weidner

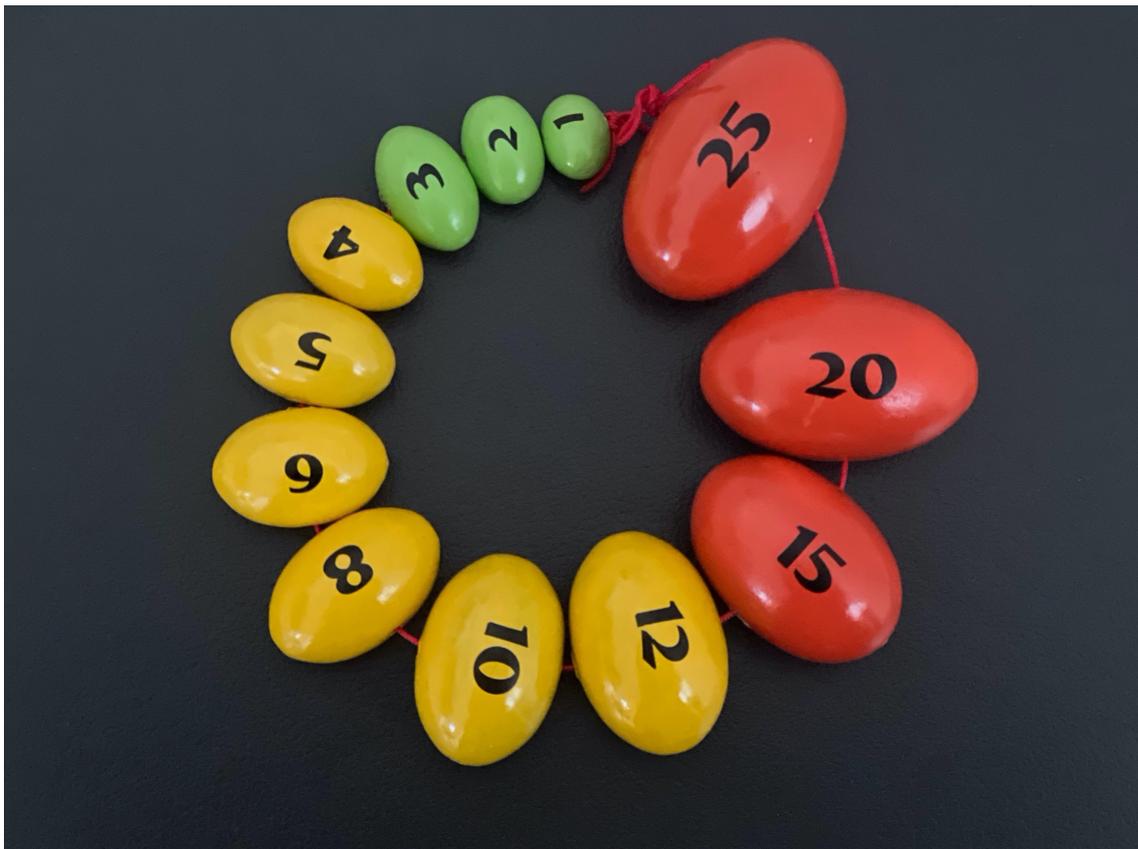
Zur Bestimmung der Hodenvolumina wurde eine vergleichende palpierende Volumenschätzung mit einem Orchidometer nach Prader durchgeführt und das Hodenvolumen in ml angegeben [51] (**Abbildung 3**).

Angeschlossen wurde ein skrotaler Ultraschall, zur damaligen Zeit mit einem gebräuchlichen Realtime-Scanner mit einer 7,5-10 Megaherzfrequenz und Wasservorlaufstrecke [52]. Weiterhin erfolgte die Berechnung des Hodenvolumens nach der Ellipsoidformel ( $0,52 \times A \times B \times C$ ) [52]. Durch Einsatz des Ultraschallgerätes konnte

das Volumen eines Hodens und Nebenhodens berechnet werden (**Abbildung 4<sup>2</sup>**). Eine routinemäßige Bestimmung des Hodenvolumens durch Ultraschall erfolgte bei allen Patienten bei denen der Verdacht auf eine testikuläre Azoospermie (s.u.) bestand, dies umfasste auch alle Patienten der nachfolgend genannten Kohortenstudie [45] .

### **Abbildung 3**

#### **Orchidometer nach Prader**



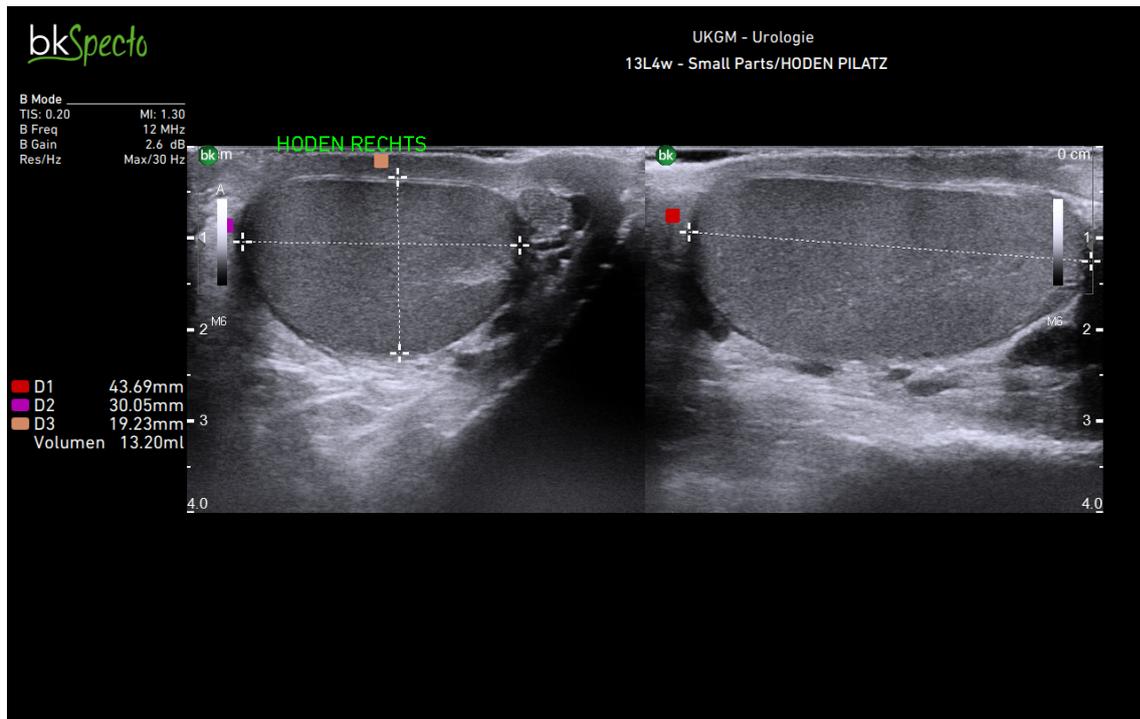
Quelle: Eigene Darstellung

---

<sup>2</sup> Mein Dank gilt Prof. Dr. Adrian Pilatz, der die aktuellen Ultraschallbilder in den Abbildungen 4, 5 ,6 ,7 und 8 zur Verfügung gestellt hat. Diese Ultraschallbilder wurden mit einem bkSpecto Ultraschallgerät im Jahr 2022 gemacht.

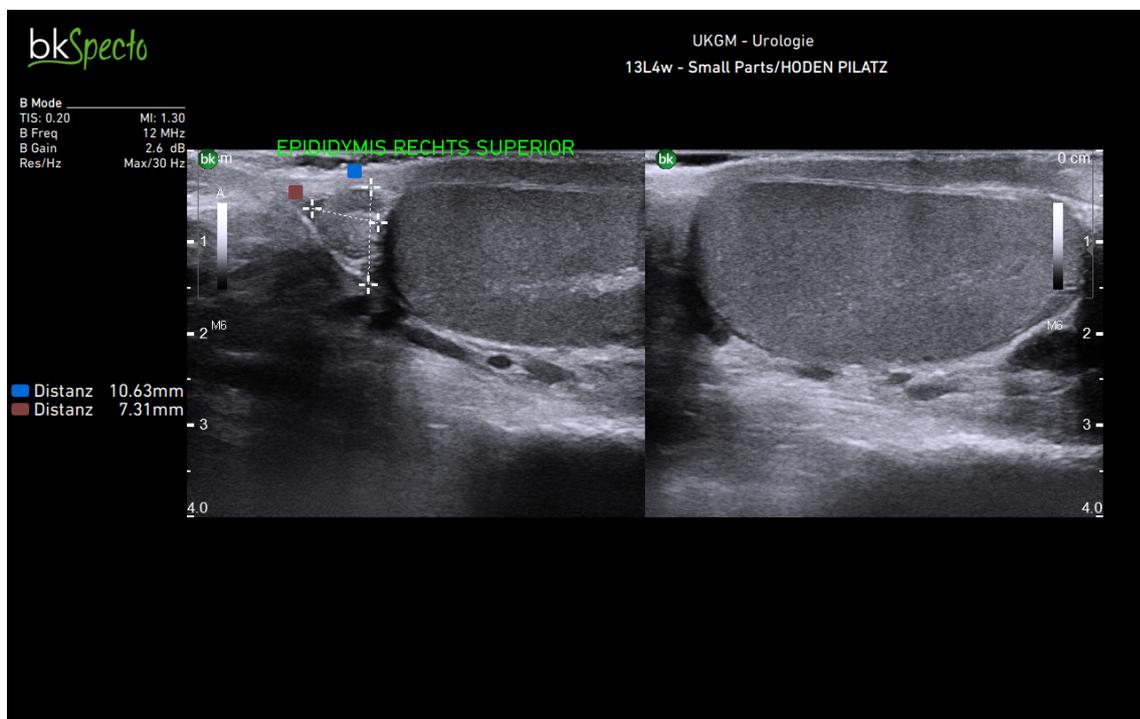
## Abbildung 4

### a Sonographische Bestimmung des Hodenvolumens



Quelle: Prof. Dr. Adrian Pilatz (2022)

### b Sonographische Bestimmung des Nebenhodenvolumens

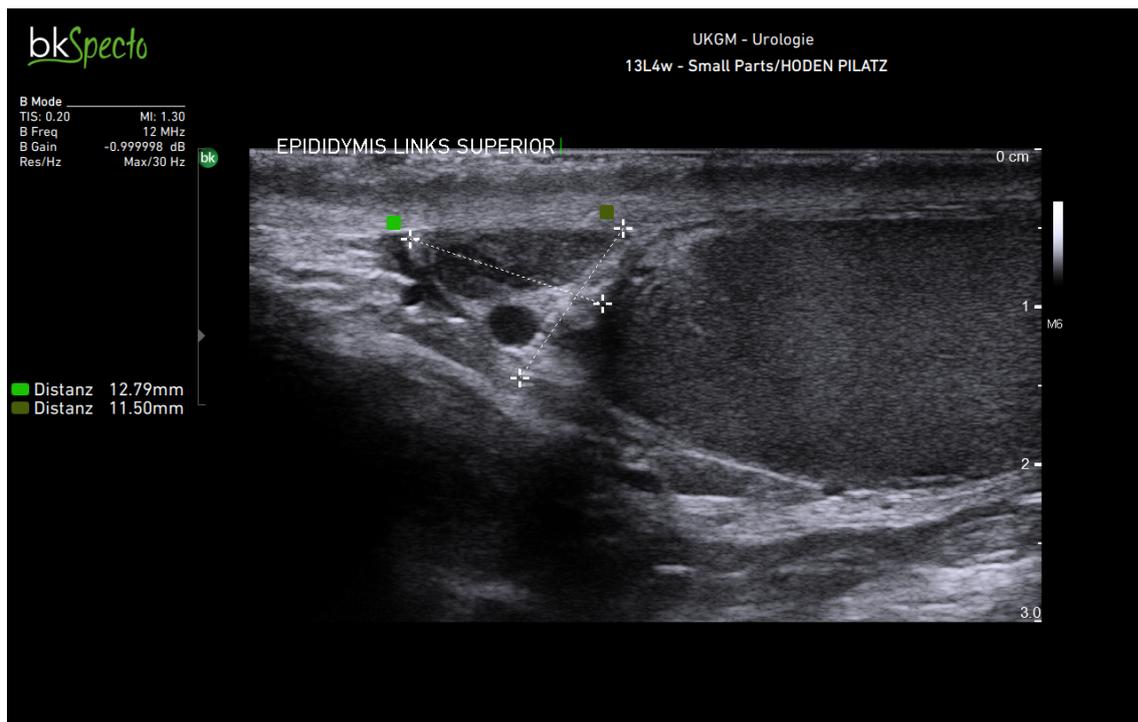


Quelle: Prof. Dr. Adrian Pilatz (2022)

Bei Verdacht auf eine epididymale Obstruktion erfolgte nach der Palpation (s.o.) eine routinemäßige, sonographische Beurteilung des Nebenhodenkopfes [52]. Die größte Ausdehnung des Nebenhodenkopfes wurde transversal gemessen, Durchmesser von über 12 mm mit und ohne zystische Veränderung wurden als Hinweise auf eine Obstruktion gewertet [53] (**Abbildung 5**). Eine Begleithydrozele wurde als Hinweis auf eine entzündliche Reaktion angesehen. Eine Sonographie des Nebenhodenschwanzes gehörte zu dieser Zeit in der andrologischen Sprechstunde auf Grund der limitierten Technik nicht zur Standarddiagnostik. Verbunden wurde diese Untersuchung mit einer sonographischen Beurteilung des Hodenparenchymbildes, um einen palpatorisch nicht erfassten Hodentumor zu entdecken [52, 54].

### Abbildung 5

#### Sonographie des Nebenhodens mit verdicktem Nebenhodenkopf

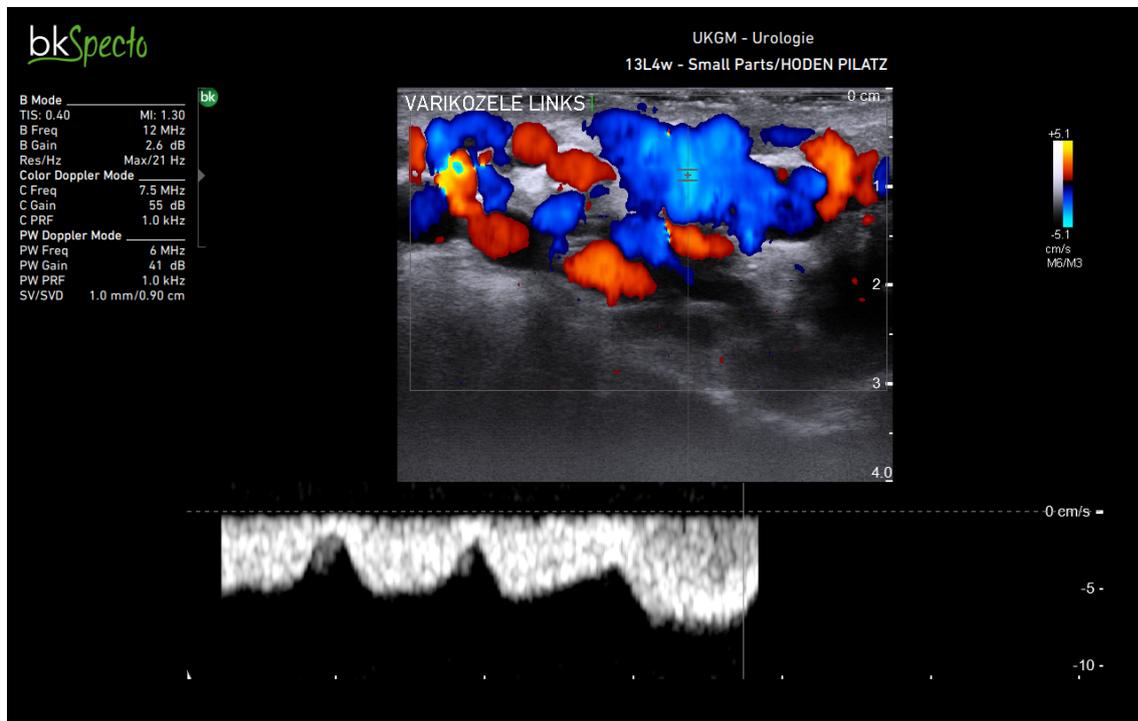


Quelle: Prof. Dr. Adrian Pilatz (2022)

Zusätzlich wurde bei klinischem Verdacht (unter Valsalva) eine Vergrößerung des Plexus Pampiniformis verifiziert [51, 52] (**Abbildung 2**). In Einzelfällen erfolgte bereits damals ein sonographischer Nachweis von erweiterten Plexusvenen und die Darstellung eines venösen Refluxes durch Duplexsonographie [55] (**Abbildung 6**).

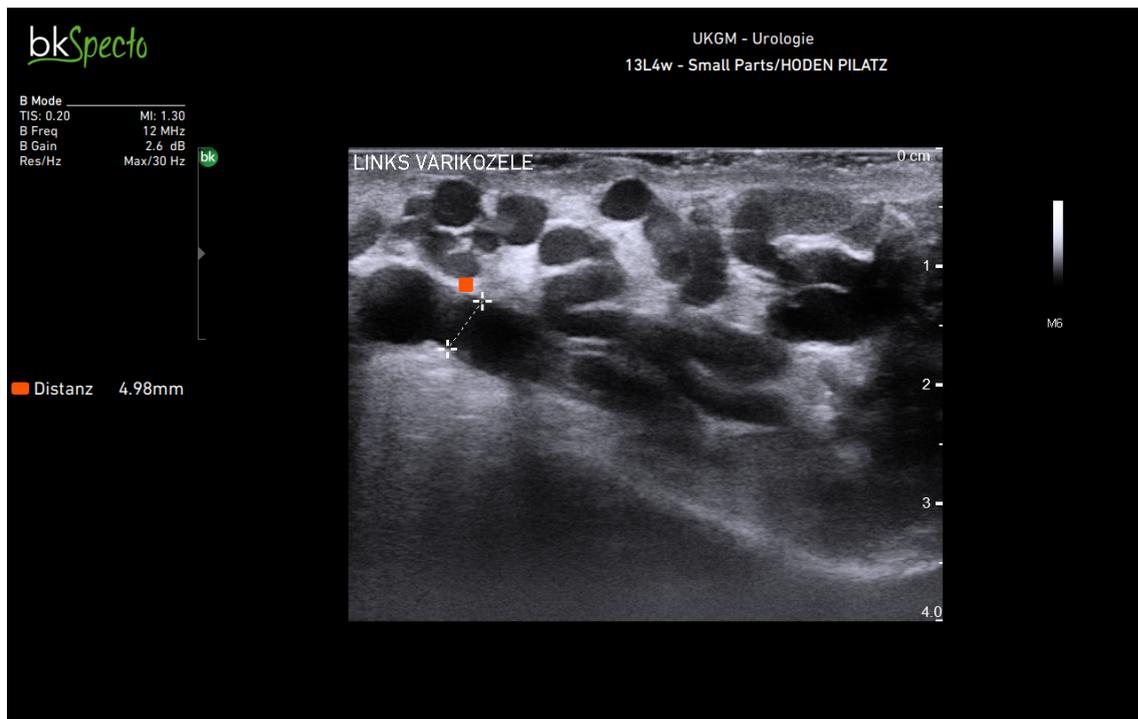
## Abbildung 6

### a Farbduplexsonographie einer Varikozele mit venösem Reflux



Quelle: Prof. Dr. Adrian Pilatz (2022)

### b Sonographischer Nachweis von erweiterten Plexusvenen

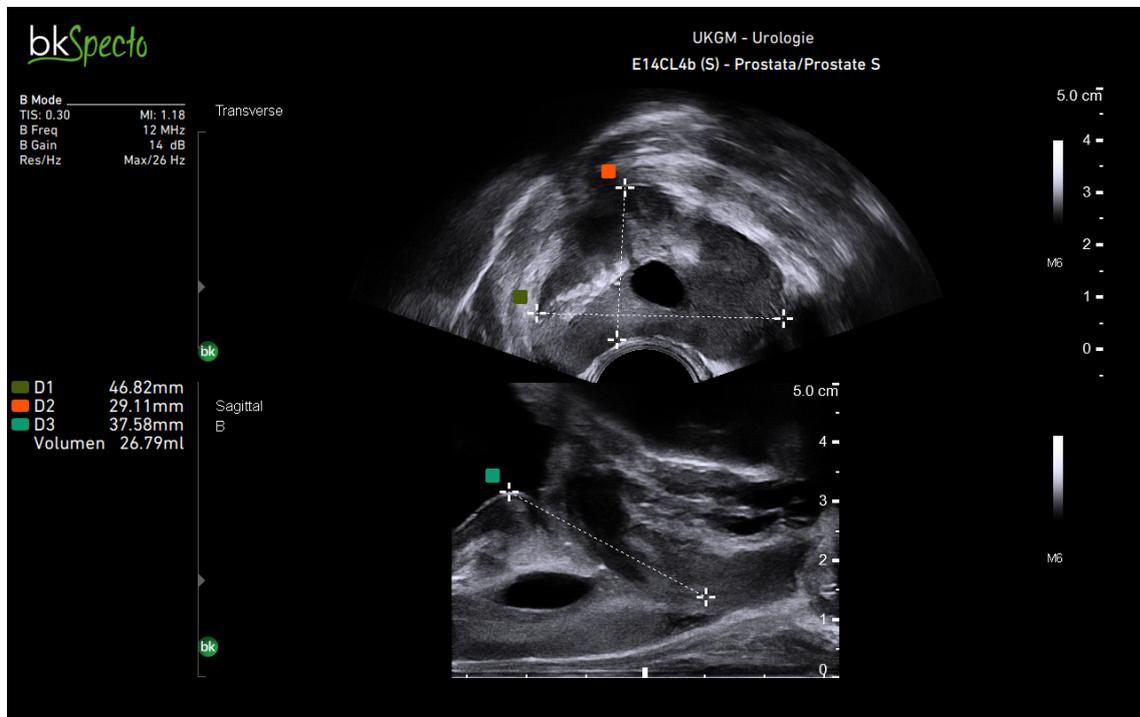


Quelle: Prof. Dr. Adrian Pilatz (2022)

Bei einem Ejakulatvolumen von  $<1,5\text{ml}$  wurde eine Prostatapalpation und ein TRansrektaler UltraSchall (TRUS) mit hochauflösenden, hochfrequenten (7 MHz) Schallköpfen der Prostata durchgeführt, um zystische Prostataveränderungen als Ursache einer zentralen Obstruktion auszuschließen [8, 19] (**Abbildung 7**). Darüber hinaus wurde versucht, zystische Veränderungen der Bläschendrüsen zu erfassen, da diese mit einer zentralen Obstruktion assoziiert sein könnten [56] (**Abbildung 8**). Dies war jedoch technisch limitiert und wurde daher nicht für diese Auswertung verwendet.

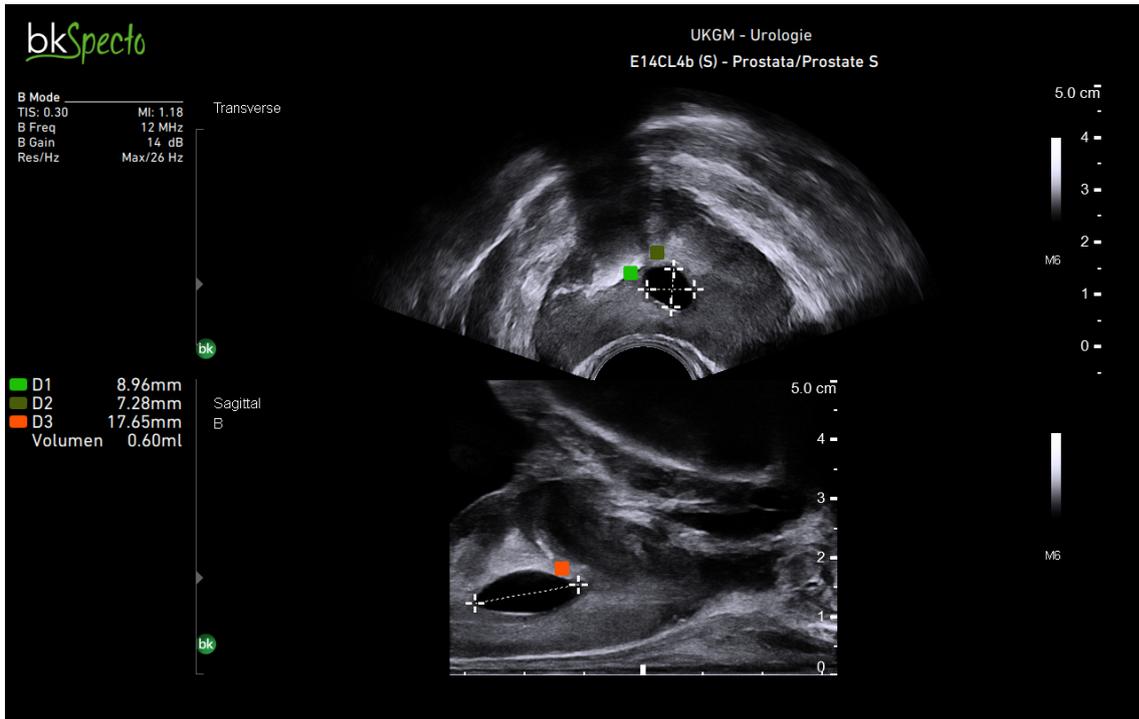
## Abbildung 7

### a TRansrektaler UltraSchall (TRUS) mit Prostatazyste



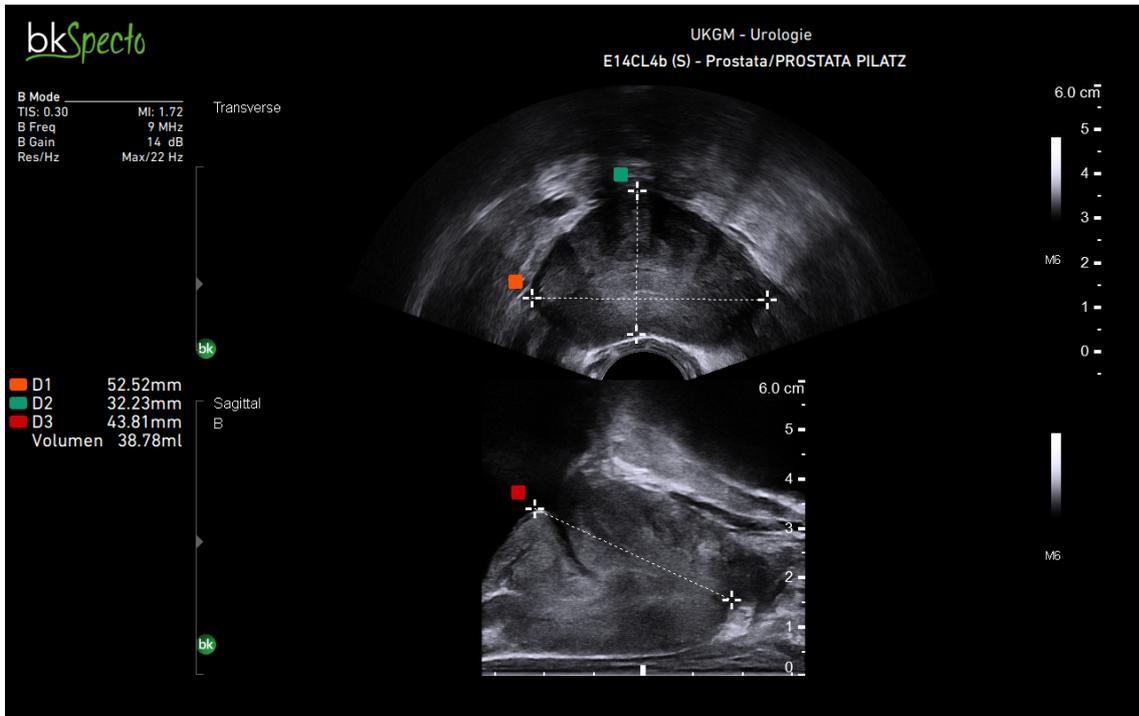
Quelle: Prof. Dr. Adrian Pilatz (2022)

**b** TRansrektaler UltraSchall (TRUS) mit Volumetrie der Prostatazyste



Quelle: Prof. Dr. Adrian Pilatz (2022)

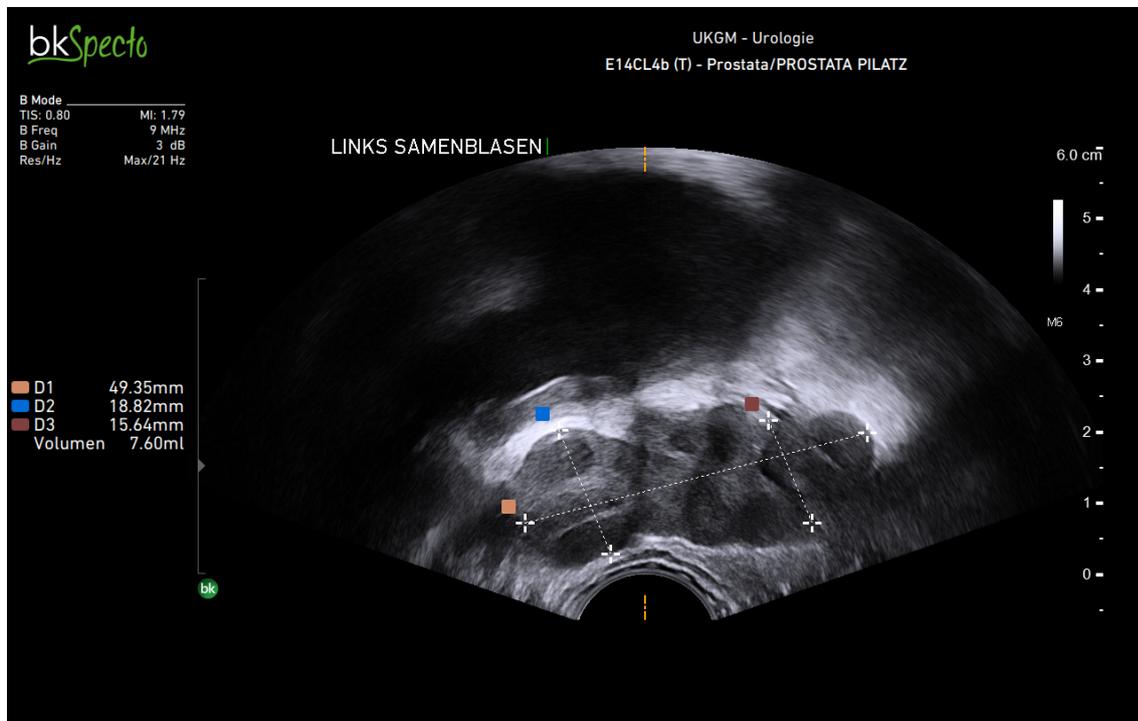
**c** TRansrektaler UltraSchall (TRUS) der Prostata ohne zystische Veränderung



Quelle: Prof. Dr. Adrian Pilatz (2022)

## Abbildung 8

### TRansrektaler UltraSchall der Bläschendrüse ohne zystische Veränderung



Quelle. Prof. Dr. Adrian Pilatz (2022)

Bei allen Patienten wurde jede Ejakulatanalyse nach den Richtlinien der WHO [14] und analog dem gültigen Labor-Manual des EAA Zentrums Gießen<sup>3</sup> im andrologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Universitätsklinik Gießen durchgeführt. Diese Analysen stützten sich insbesondere auf labortechnische Ausführungen zur optimalen Durchführung [57]. Zwei Ejakulatanalysen mussten analog zu den Richtlinien der WHO [14] und dem gültigen Labor-Manual des EAA Zentrums Gießen die Diagnosen der Azoospermie absichern. Im Labor mussten sowohl in der nativen Probe als auch im Pellet nach 15 minütiger Zentrifugation mit 3000g keine Spermatozoen vorhanden sein.

Das vom urologischen andrologischen Labor verwendete Spermogramm des EAA Zentrums Gießen ist in **Tabelle 1** dargestellt. Bei einer Azoospermie wurde die Spermatozoendichte mit Null, auch im Zentrifugat, angegeben.

<sup>3</sup> Labor-Manual Andrologische Labordiagnostik: Spermogramm nach WHO 2010, EAA Zentrum Gießen siehe Anhang 11.1.

Mein Dank gilt den Medizinisch-Technischen Assistenten Frau Kerstin Wilhelm, Frau Barbara Fröhlich und Frau Tanja Bloch für die technische Analyse und Auswertung der Ejakulatparameter.

Bezüglich der Seminalplasma Parameter wurde einzig die Bestimmung der alpha-Glucosidase als eventueller Indikator einer vorhandenen Obstruktion berücksichtigt [58]. Als sicher pathologisch wurden Werte von  $<20$  mU/Ejakulat angegeben (Labor-Manual EAA Zentrum Gießen). Nur bei 2 Männern der gesamten Patientengruppe war dies der Fall, so dass diese als mögliche gemischte testikuläre-epididymale Azoospermie klassifiziert wurden (**Tabelle 4**).

Tabelle 1

Spermogramm: Urologisch-Andrologisches Labor

**Med. Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie der Justus-Liebig-Universität Gießen**  
**Urologisch-Andrologisches Labor**

Klinikstraße 29, 35385 Gießen, Tel 0641/99-44534, Fax 0641/99-44539

---

**SPERMIOGRAMM**

Nachname: \_\_\_\_\_

Vorname: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

**Anforderung**

B     SPAK

S     MS

E     G

**PHYSIKALISCHER BEFUND:**

Volumen.

pH-Wert.

Aussehen

Verflüssigung

**DICHTE und MOTILITÄT:**

Spermatozoendichte[Mio/ml]

im Zentrifugat

Motilität WHO a [%]

Motilität WHO b [%]

Motilität WHO c [%]

Motilität WHO d [%]

Agglutinate/  
Agglomerate

**Eosintest (Vitalität) [%]:**

**Peroxidasetest [Mio/ml]:**

**MAR-Test [%]:** Ig G                      Ig A

**MORPHOLOGIE:**

Normal geformte Spermatozoen [%]

Kopfdefekte [%]

Mittelstückdefekte [%]

Schwanzdefekte [%]

Zytoplasmatische Tropfen [%]

**ZYTOGRAMM:**

Spermatogenezellen [Mio/ml]

Leukozyten [Mio/ml]

Erythrozyten [Mio/ml]

Makrophagen [Mio/ml]

---

**BIOCHEMIE:**

Fruktose [µmol/ml]

alpha-Glucosidase [mU/ml]

Elastase [ng/ml]

Zink [µmol/ml]

Interleukin 8 [pg/ml]

---

**Bemerkungen:** Mikrobiologie-Verdünnung: 1/

---

**REFERENZWERTE**

Volumen ≥ 2 ml

pH-Wert ≥ 7.2

Dichte ≥ 20 Mio/ml

Gesamtpermatozoenzahl ≥ 40 Mio/Ejakulat

Verflüssigungszeit < 30 min

Motilität 50% a+b oder 25% a

Vitalität ≥ 50%

Leukozyten < 1 Mio/ml

MAR-Test < 50%

Morphologie ≥ 15% Normalformen

Fruktose > 13 µmol/Ejakulat

alpha-Glucosidase

normal > 60 mU/Ejakulat

Grauzone 20 - 60 mU/Ejakulat

sicher pathologisch < 20 mU/Ejakulat

Elastase

keine Entzündung < 250 ng/ml

mäßiggradige Entzündung 250 - 1000 ng/ml

massive Entzündung > 1000 ng/ml

Zink ≥ 2.4 µmol/Ejakulat

Quelle: Medizinisches Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Urologisch-Andrologisches Labor

Allen Patienten ohne vorliegende endokrinologische Befunde wurde morgens routinemäßig zwischen 8-11 Uhr Blut abgenommen, um im Labor der Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie die Serumspiegel von Gesamttestosteron, Luteinisierendes Hormon (LH) und FSH zu messen<sup>4</sup>. Normwerte für den LH-Serumspiegel lagen bei 2-10 IU/l und für den FSH-Serumspiegel bei 1-7 IU/l.

Männern mit einem klinischen Verdacht auf einen Isolierten Hypogonadalen Hypogonadismus (IHH) als Ursache einer Azoospermie fallen bei der klinischen Untersuchung üblicherweise durch fehlende pubertäre Reifung insbesondere der Hoden auf [59, 60]. Diese Patienten wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht berücksichtigt. Üblicherweise wurden zur damaligen Zeit Gesamttestosteronwerte unter 12 nmol/l<sup>-1</sup> als hinweisend und unter 8 nmol/l<sup>-1</sup> als Beweis für einen Hypogonadismus angesehen und als therapiewürdig bewertet [61]. Patienten mit einem gesicherten Hypogonadismus, das heißt Gesamttestosteronspiegel unter 8 nmol/l<sup>-1</sup>, wurden in der Kohortenstudie nicht aufgenommen.

Bei phänotypisch klinischem Verdacht auf ein Klinefelter Syndrom (KS) ohne einen auswertigen humangenetischen Befundbericht wurde eine genetische Karyotypanalyse an peripheren Blutlymphozyten durchgeführt, um dieses auszuschließen [8, 32]. Diese Analyse erfolgte im Humangenetischen Institut der Universitätsklinik Gießen<sup>5</sup>.

Ein „Screening“ des Y-Chromosoms auf Mikrodeletionen der Azoospermiefaktoren (AZF) Region (*a,b,c*) [8] erfolgte nur in der Studiengruppe „Low Chance NOA“ durch das Humangenetische Institut der Universitätsklinik Gießen, in Einzelfällen in Kooperation mit der Humangenetik der Universitätsklinik Heidelberg und dem Andrologischen Institut der Universität Florenz. Ein routinemäßiges Screening auf Mikrodeletionen der AZF Region (*a,b,c*) war während der Studie kein klinischer Standard.

---

<sup>4</sup> Mein Dank gilt Prof. Dr. Dr. W.B. Schill (Leiter der Klinik für Dermatologie und Allergologie), in dessen endokrinologischen Labor die Blutproben ausgewertet wurden.

<sup>5</sup> Mein Dank gilt Prof. Dr. U. Müller und Prof. Dr. D. Nolte für die Analyse der Blutproben.

### 3.2. Chirurgisches Vorgehen

Alle Patienten wurden über die allgemeinen Risiken und mögliche Komplikationen der Operation sowie über ihre Teilnahme an der durchgeführten Kohortenstudie (Informed Consent: Local Ethic Committee, November 2006<sup>6</sup>) aufgeklärt. Aufgrund des speziellen operativen Verfahrens mit Entnahme multipler Biopsien erfolgte eine gesonderte Aufklärung zum Risiko einer Nachblutung und Infektion, die unter Umständen mit einem Hodenverlust einhergehen könnten. Die Aufklärung erfolgte mit einem standardisierten Formblatt zur Hodenbiopsie mit handschriftlichen Erläuterungen. Alle Patienten willigten ein. Die Patienten wurden auf Grund der mikrochirurgischen Technik in Vollnarkose operiert, um optimale Bedingungen für die mikrochirurgische Tubuluspräparation zu gewährleisten. Die Operationen wurden durch die nachgenannten erfahrenen Mikrochirurgen durchgeführt (Prof. Dr. Wolfgang Weidner, PD Dr. Thomas Diemer, Dr. Marcelo Marconi). Der Eingriff dauerte durchschnittlich 45 bis 60 Minuten. Alle Patienten wurden nach klinischem Befund und einer Ultraschalluntersuchung des Hodens (Ausschluss eines größeren Hämatoms) entlassen. Bei starker skrotaler Symptomatik wurde postoperativ zusätzlich eine Duplex Sonographie zur Verifizierung einer intakten Hodendurchblutung durchgeführt. Unter Umständen blieben diese Patienten eine Nacht stationär in der Klinik und wurden am nächsten Tag bei unauffälligem lokalem Befund entlassen.

Die Operationen wurden auf einer nicht synchronisierten Basis durchgeführt, das heißt, ohne Abhängigkeit vom Zyklus der Partnerin [22, 25]. Dies bedeutete, dass alle entnommenen testikulären Proben kryokonserviert wurden und mit der Hormonstimulation der Partnerin zum Erreichen des ICSI Zyklus nur dann begonnen wurde, wenn elongierte Spermatozoen zur Befruchtung in der Biopsie nachgewiesen wurden. Eine Einverständniserklärung zur Gewebekonservierung von allen Biopsiestellen musste durch die Patienten akzeptiert werden (Informed Consent: Local Ethic Committee, November 2006<sup>5</sup>). Jedes Skrotalfach wurde durch eine longitudinale Inzision von ungefähr 3cm eröffnet, ohne die Tunica albuginea zu verletzen. Analog der septalen Hodenmorphologie wurden alle Tunica-Inzisionen zur Biopsieentnahme vom

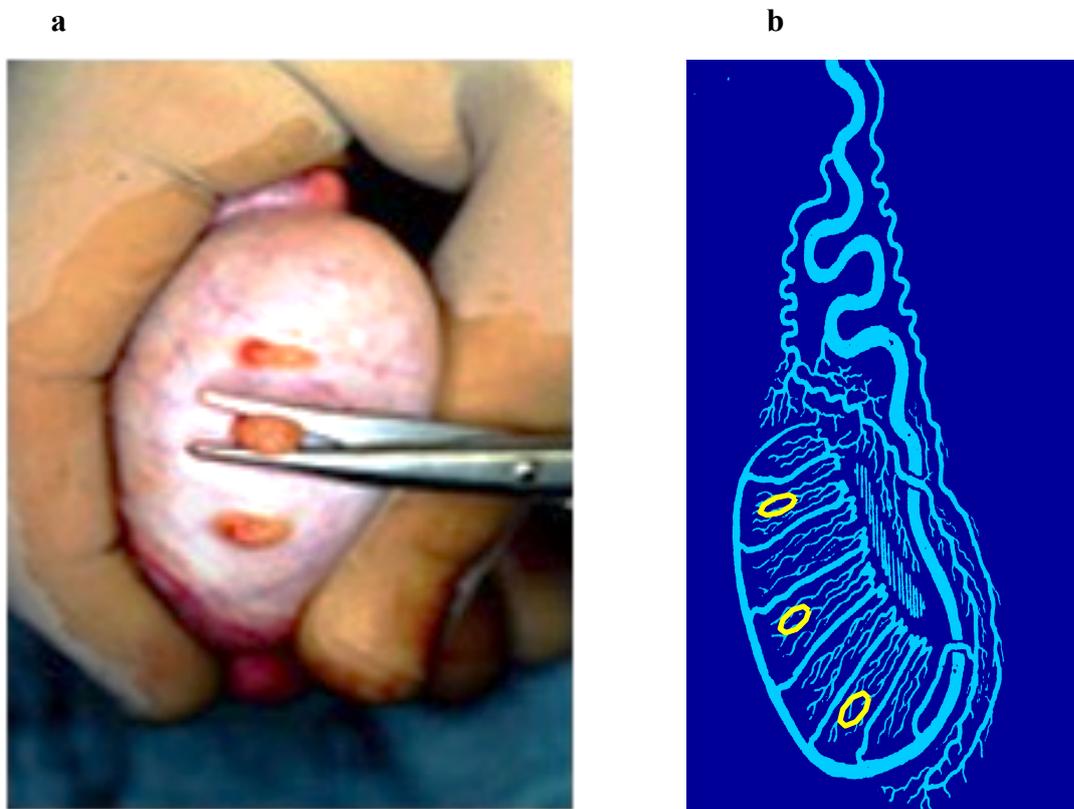
---

<sup>5</sup> Einverständniserklärung zur Kohortenstudie und Gewebekonservierung Ethikkomitee siehe Anhang 11.2. Marcelo Marconi, Andreas Keudel, Thorsten Diemer, Martin Bergmann, Klaus Steger, Hans-Christian Schuppe, Wolfgang Weidner Combined Trifocal and Microsurgical Testicular Sperm Extraction Is the Best Technique for Testicular Sperm Retrieval in “Low-Chance” Nonobstructive Azoospermia European Urology (2012).

freien Rand des Hoden quer zur Hodenlängsachse durchgeführt. Mit dieser Technik sollten die quer verlaufenden Gefäße weitgehend geschont werden (**Abbildung 9**). Das operative Vorgehen als Schema und OP-Bild bei der Trifokalen Makro-TESE ist nachfolgend unten wiedergegeben. Unter leichtem Druck wurde dann Hodengewebe mit der chirurgischen Schere aufgenommen (**Abbildung 9**).

### Abbildung 9

- a Trifokale Makro-TESE mit Gewebeentnahme an der mittleren Inzision
- b Biopsieentnahmestellen analog der septalen Hodenmorphologie und Gefäßarchitektur



Quelle: Prof. Dr. Wolfgang Weidner

Die mittlere Inzision wurde mit einer Mikroschere nach zentral erweitert (**Abbildung 10**) und ein OP-Mikroskop mit 20-25facher Vergrößerung zur Inspektion des Hodenparenchyms eingeschwenkt. Dabei wurden gezielt vaskuläre Areale ausgespart (**Abbildung 11**) und systematisch in Anlehnung an die Technik von Schlegel [44] nach vergrößerten Hodentubuli weißlich-opaker Farbe gesucht, die im Vergleich zum umliegenden Gewebe eine deutliche Dilatation aufwiesen (**Abbildung 11**). Unter

leichtem mechanischem Lösen des Gewebes (Scherenrücken, Pinzette) wurden die Biopsien aus den sich so darstellenden Arealen gewonnen (**Abbildung 12**).

### **Abbildung 10**

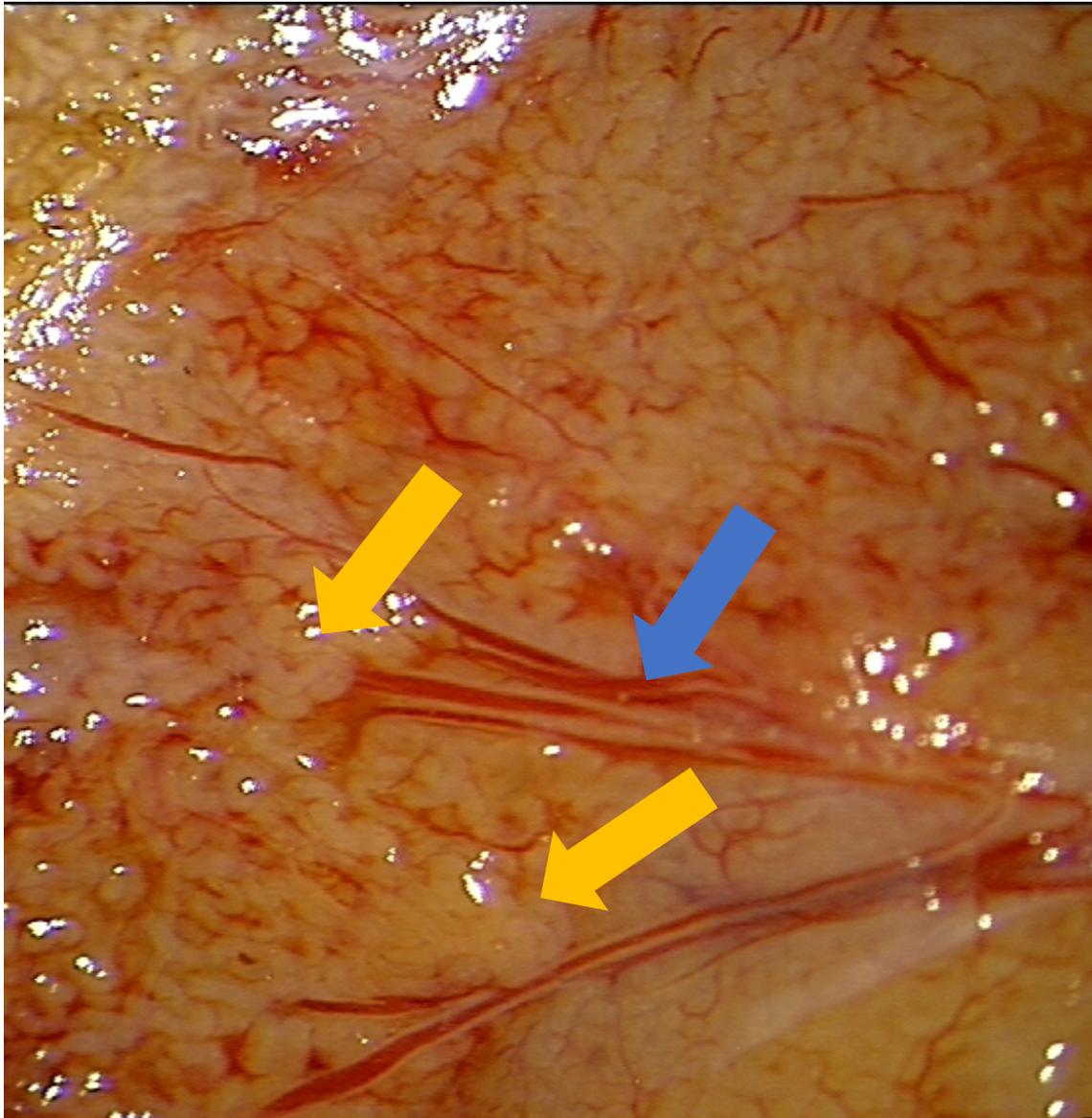
#### **Erweiterte mittlere Inzision: Zustand vor Mikro-TESE**



Quelle: Prof. Dr. Adrian Pilatz

## Abbildung 11

Vaskuläre Struktur des Hodenparenchyms in mikroskopischer Darstellung  
(blauer Pfeil) mit vergrößerten weißlich-opaken Hodentubuli (gelbe Pfeile)  
(x 25 Vergrößerung)

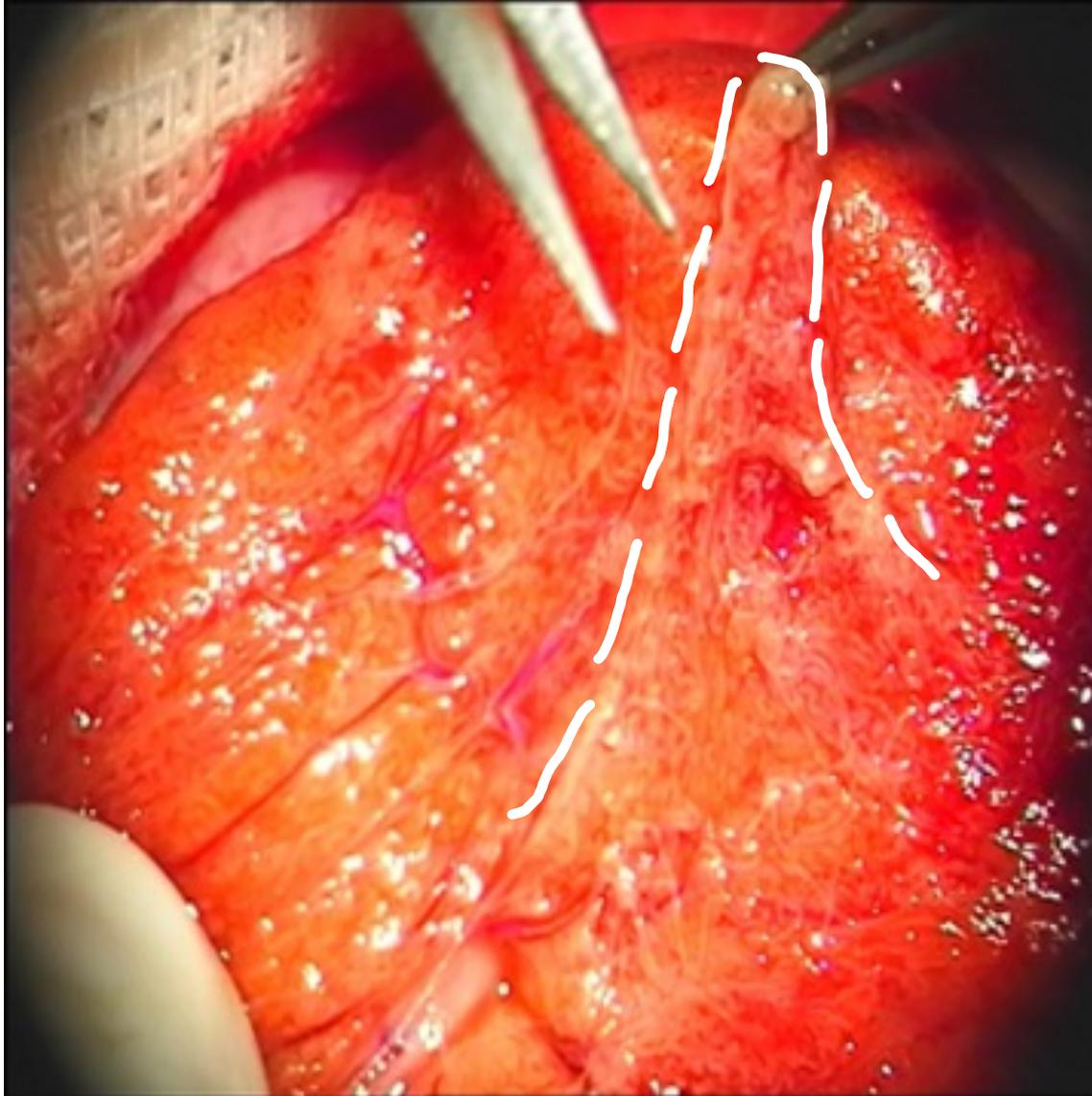


Quelle: Dr. Marcelo Marconi

## Abbildung 12

### Biopsieentnahme Mikro-TESE

### Hochgezogener Tubulus an Pinzette



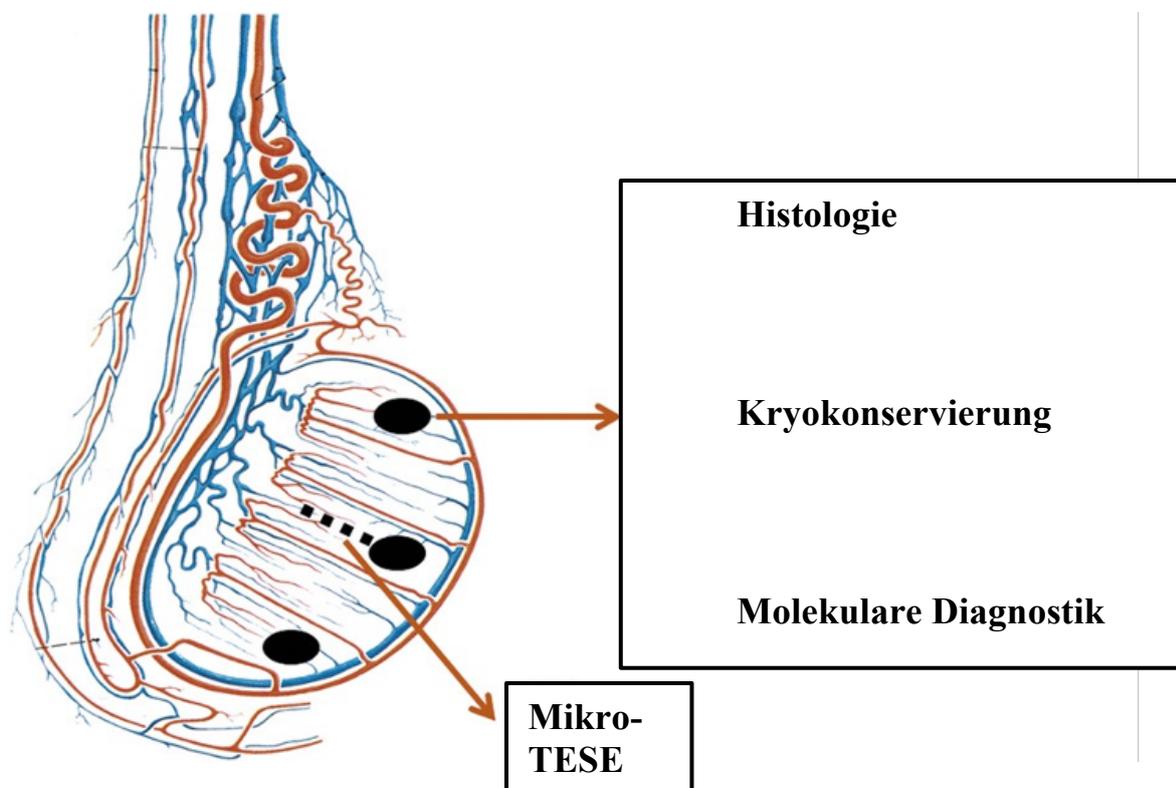
Quelle: Prof. Dr. Wolfgang Weidner

An jedem Hoden wurden folgende Exzisionen durchgeführt und getrennt ausgewertet: Unifokale-Makro TESE (Biopsie mittig an einer Stelle), Trifokale-Makro TESE (Biopsie an zwei weiteren Stellen am oberen und unteren Pol des Hodens), Mikro-TESE aus der erweiterten mittleren Inzision und Kombination aus Trifokaler-Makro TESE plus Mikro-TESE.

Aus jeder Inzision wurden drei Proben entnommen, eine für die reguläre Histologie mit Spermidennachweis, eine für die Kryokonservierung für eine spätere IVF/ICSI sowie eine für eine nachfolgende molekulare Diagnostik. Der Gewebeanteil für die molekulare Diagnostik wurde kryokonserviert, wird in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bewertet, da diese nicht zur Standarddiagnostik zählte [62]. Pro Hoden entsprach dies einem Probenanfall von 12 Gewebeanteilen (**Abbildung 13**) [45].

### **Abbildung 13**

#### **Dreiteilige Aufarbeitung des testikulären Biopsiematerials**



Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [25, 45]

Nach einer vorsichtigen Mikrokoagulation zur Blutstillung wurden die Inzisionen mit Vicryl® Naht 4.0 vernäht, die oberflächliche skrotale Haut wurde mit Vicryl Rapide® 3.0 verschlossen. Die standardisierte chirurgische Technik wurde bereits detailliert durch die Gießener Arbeitsgruppe beschrieben [22, 25].

### 3.3. Gewebeaufarbeitung, testikuläre Histologie und Nachweis von elongierten Spermatisden

Das testikuläre Biopsiematerial wurde wie oben beschrieben dreigeteilt aufgearbeitet: für die Histologie mit Spermatisdenachweis, die Kryokonservierung und die molekulare Diagnostik [25, 45].

Für die histologische Untersuchung wurde das testikuläre Biopsiematerial in Bouin Lösung fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und in fünf Mikrometer Schnitten aufgearbeitet<sup>7</sup>. In der Regel erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE).

Zur histologischen Diagnose und Beurteilung der Spermatisdenese, analog dem Vorgehen der Münsteraner Arbeitsgruppe [63], wurde eine semiquantitative Bewertung der Spermatisdenese durchgeführt [63, 64]. In jeder Probe wurden alle elongierten Spermatisden in den erfassten Hodentubuli ausgewertet. Dazu wurde der modifizierte Bergmann/Kliesch Score verwendet [63]. Dieser basiert darauf, den Anteil der Tubuli mit mindestens einer elongierten Spermatisde zu bestimmen. Das Scoring erfolgte wie folgt:

$$\frac{\text{Anzahl der elongierten Spermatisden in den Tubuli}}{\text{Gesamte Anzahl der Tubuli im Schnittbild}} \times 10$$

Die histologischen Befunde der Spermatisdenese wurden in folgende Gruppen eingeteilt und je nach Punktzahl dem entsprechenden Score zugeordnet [63]: Normale Spermatisdenese (Punktzahl: 10-8), Hypospermatisdenese, „Mixed Atrophy“ (7-1), Überwiegende tubuläre Atrophie (0,1-0,9), Maturationsarrest (0), Sertoli Cell-Only Syndrom (SCO) (0) und Totale Atrophie (0).

Dabei wurde die nachfolgende Klassifikation zur Beschreibung der Spermatisdeneseveränderungen verwendet (**Tabelle 2**) [22].

---

<sup>7</sup> Mein Dank gilt Prof. Dr. M. Bergmann (Institut für Veterinärantomie, Histologie und Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) Prof. Dr. H.C. Schuppe und Dr. M. Marconi für die Auswertung der Hodenbiopsieberichte und Auswertung der Befunde.

**Tabelle 2**

**Klassifikation der Spermatogeneseveränderungen**

<b>Histologische Diagnosen</b>	<b>Definition</b>
<b>Normale Spermatogenese</b>	Alle Stadien der Spermatogenese sind in den Hodentubuli vorhanden.
<b>Hypospermatogenese</b>	Hauptmerkmal ist eine reduzierte Anzahl von Keimzellen, die durch eine abnehmende Anzahl von intakten Tubuli gekennzeichnet ist.
<b>Sertoli Cell-Only Syndrom (SCO)</b>	Keimzellen im Hodengewebe fehlen vollständig. Es sind nur Sertoli Zellen vorhanden.
<b>Maturationsarrest</b>	Arrest der Spermatogenese auf der Ebene der frühen runden Spermatiden, primären Spermatozyten oder Spermatogonien.
<b>Totale Atrophie</b>	Keimzellen und Sertoli Zellen sind nicht vorhanden, die Lamina Propria ist verdickt.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [22]

Sowohl die semiquantitative Auswertung (Score) als auch die morphologische Analyse im Detail<sup>8</sup> wurden über einen Beurteilungsbogen für Hodenbiopsien erfasst (**Tabelle 3**). Bei mikroskopischem Verdacht im Zellbild auf eine Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie (TIN) wurde zur Bestätigung bzw. Ausschluss die PLazentare Alkalische Phosphatase (PLAP) Färbung als Tumormarker im spezialisierten Labor verwendet [63, 64]. Bei dem Nachweis auf ein TIN erfolgte ein handschriftlicher Vermerk auf dem Hodenbiopsiebericht.

---

<sup>8</sup> Mein Dank gilt Prof. Dr. M. Bergmann (Institut für Veterinärantomie, Histologie und Embryologie der Universität Gießen) Prof. Dr. H.C. Schuppe und Dr. M. Marconi für die Auswertung der Hodenbiopsieberichte und Auswertung der Befunde.

**Tabelle 3**  
**Hodenbiopsiebericht**

**Beurteilungsbogen für Hodenbiopsien**

Name, Vorname:

Geburtsdatum:

Biopsie erfolgte am:

Klinik:

Auswärtige Biopsie zur Beurteilung angefordert:

Institut/Klinik:

Patientenbetreuung durch:

Klinische Diagnose(n):

<b>Beurteilungskriterien</b>	Biopsie rechts	Biopsie links
<i>Semiquantitativ</i>	Anzahl der Tubuli (n)	Anzahl der Tubuli (n)
Spermatogenese bis zu elongierten Spermatiden		
Spermatogenese bis zu runden Spermatiden		
Spermatogenese bis zu primären Spermatozyten		
Spermatogenese bis zu Spermatogonien		
Sertoli-Cell-Only-Tubuli		
Tubulusschatten		
<b>Gesamtzahl der untersuchten Tubuli</b>		
<b>Score</b>		
<i>Morphologische Differenzierung</i>		
Tubuli mit mehrkernigen Spermatiden		
Tubuli mit mehrkernigen primären Spermatozyten		
Tubuli mit mehrkernigen Spermatogonien		
Tubuli mit Megalospermatozyten		
Tubuli mit Megalospermatogonien		
Tubuli mit degenerierten Keimzellen		
Tubulusdivertikel		
Verdickung der Lamina propria		
Morphologie der Sertoli-Zellen		
Morphologie der Leydig-Zellen		
Interstitium		
<b>Besonderheiten</b>		
<b>Beurteilung</b>		

Quelle: [63]

Das Biopsiematerial für die Kryokonservierung wurde im Medium SpermFreeze® (FertiPro NV Belgien) platziert und asserviert. In der Gießener Arbeitsgruppe wurde das Biopsiematerial nur dann einer mechanischen und enzymatischen Aufarbeitung [65] zur Isolierung von Spermatisden zur ICSI unterzogen, wenn aus dem Score der für die Histologie entnommenen Probe ein Hinweis auf eine intakte Spermatogenese für diese Probe abgelesen werden konnte [25]. Technisch hat die Gießener Arbeitsgruppe das entnommene Gewebe nach der bahnbrechenden Arbeit von Salzbrunn et al. [65] im Jahr 1996 nach oberflächiger mechanischer Gewebetrennung, enzymatisch für den Nachweis von Spermatisden unter Verwendung von Kollagenase präpariert (Arbeitsanweisung 003<sup>9</sup>). Nach Zentrifugation mit 800g wurde dann die Lösung auf den Nachweis von Spermatisden analysiert. Eine zusätzliche direkte intraoperative Suche von Spermatisden in Abklatschpräparaten wurde nicht vorgenommen [25].

Die dritte Probe wurde für eine eventuelle molekulare Aufbereitung, z.B. der Analyse einer Protaminexpression, kryokonserviert [62]. Die Ergebnisse dieser Aufarbeitung wurden für die vorliegende Arbeit nicht berücksichtigt [45].

### **3.4. Nachkontrollen**

Die klinischen Nachkontrollen fanden eine Woche, drei und sechs Monate nach der Operation statt. Eine Woche postoperativ erfolgte eine palpatorische Kontrolle des Skrotums und ein skrotaler Ultraschall zum Ausschluss eines intratestikulären Hämatoms und peritestikulärer Einblutung (Hämatozele). Nach drei und sechs Monaten wurde ein skrotaler Ultraschall und bei Bedarf ein testikulärer Doppler Ultraschall zur Untersuchung der Hodenvolumina und eines intakten arteriellen Blutflusses im Hoden durchgeführt. Nach sechs Monaten wurde Blut abgenommen und der Serumspiegel des morgendlichen (8.00Uhr–10.00Uhr) Gesamttestosterons bestimmt.

### **3.5. Statistik**

Die vorhandenen Rohdaten wurden von dem Autor der vorliegenden Arbeit unter Anleitung von Dr. M. Marconi (Master of Statistics) nach dem von der Gießener

---

<sup>9</sup> Arbeitsanweisung 003, Aufbereitung von Hodengewebe (TESE-Test), Klinisch-andrologisches Labor/Kryobank siehe Anhang 11.3.

Arbeitsgruppe ausgearbeiteten Auswertungsschema digitalisiert und mit dem Programm Prisma für Windows v.5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) analysiert.

Die folgende statistische Auswertung bezieht sich nur auf die „Low Chance NOA“ Gruppe. Aufgrund der gepaarten Stichprobe wurden der Friedman Test (Anzahl der auswertbaren Tubuli, Vergleich des Bergmann/Kliesch Scores) und der Cochran-Q Test („Sperm Retrieval“) verwendet, um die verschiedenen Erfolgsraten zwischen den verschiedenen chirurgischen Ansätzen (Unifokale Makro-TESE, Mikro-TESE, Trifokale Makro-TESE und Trifokale Makro-TESE plus Mikro-TESE) zu vergleichen. Um den spezifischen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zu beurteilen, wurden der McNemar Test (Histologische Auswertung, „Sperm Retrieval“) und der Wilcoxon Test (Vergleich des Bergmann/Kliesch Scores) angewendet. Der Student t-Test wurde zur Analyse des Serum-FSH Wertes und des Hodenvolumens verwendet. Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Kurven wurden verwendet, um die Vorhersagekraft und diagnostische Genauigkeit dieser Parameter für eine erfolgreiche testikuläre Spermengewinnung zu berechnen. ROC-Kurven-Analysen wurden für die FSH-Werte invers und für das Hodenvolumen regulär durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  erreicht. Bei allen p-Werten wurden alle Hodeneinheiten berücksichtigt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der Patientenzuordnung

In den Jahren 2008-2010 haben sich 182 Männer bei auswärtiger Verdachtsdiagnose einer testikulären Azoospermie mit der Indikation „Sperm Retrieval“ vorgestellt.

Bei 32 Patienten fand sich keine Azoospermie bei wiederholter Ejakulatanalyse. Dabei handelte es sich überwiegend um eine Kryptozoospermie, das heißt es werden sehr wenige Samenzellen im zentrifugierten Ejakulat gefunden [14, 16].

Nach entsprechender Diagnostik (s.o.) wurden 59 Patienten mit einem obstruktiven Faktor assoziiert, die festgestellten Ursachen können aus **Tabelle 4** entnommen werden. Bei 8 beziehungsweise 2 Patienten lag eine Kongenitale Bilaterale Aplasie des Vas Deferens (CBAVD) und ein zentraler Verschluss vor.

Bei 26 Patienten fand sich eine gemischte Azoospermie, das heißt es wurde ein testikulärer Schaden und ein posttestikulärer Verschluss vermutet.

**Tabelle 4** fasst die klinische Arbeitsdiagnosen nach der klinischen Diagnostik mit der entsprechenden Patientenzuordnung zusammen.

**Tabelle 4**

**Klinische Zuordnung des Überweisungskollektiv zur TESE bei auswärtiger Verdachtsdiagnose Azoospermie mit testikulärem Faktor (Patienten mit Verdacht auf Hodentumor wurden aus der Studie ausgeschlossen)**

<b>Klinische Arbeitsdiagnose</b>	<b>Klinische Diagnostik</b>	<b>n = 182</b>
<b>Keine Azoospermie</b>	<b>Ausschluss Azoospermie durch doppelte Ejakulatanalyse</b>	<b>32</b>
<b>Verschlussazoospermie nach Vasektomie bzw. nicht erfolgreicher Refertilisierung (VV, TV)</b>	<b>Anamnese (VV, TV ohne Erfolg) TESE Wunsch additiv bei VV bzw. TV</b>	<b>36</b>
<b>Epididymaler Verschluss</b>	<b>Palpatorisch, sonographisch</b>	<b>13</b>

	<b>Zeichen für Nebenhoden Induration und/oder Vergrößerung</b>	
<b>CBAVD (Kongenitale Bilaterale Aplasie des Vas deferens)</b>	<b>Palpatorisch diagnostizierte Agenesie des Ductus deferens</b>	<b>8</b>
<b>Zentraler Verschluss</b>	<b>Sonographisch (TRUS) Zentrale Prostatzyste, reduziertes Ejakulatvolumen</b>	<b>2</b>
<b>Gemischte Azoospermie (testikulär, epididymal)</b>	<b>Unklarer Verschluss (Nebenhoden) Hodenvolumen <math>\geq 8</math> ml Normales, leicht erhöhtes FSH <math>\leq 12,4</math> IU/l Pathologische alpha-Glucosidase <math>&lt; 20</math> mU/Ejakulat (n=2)</b>	<b>26</b>
<b>Studiengruppe „Low Chance NOA“</b>	<b>Hodenvolumen <math>&lt; 8</math> ml FSH <math>&gt; 12,4</math> IU/l</b>	<b>65</b>

Quelle: Eigene Darstellung

65 Männer wurden der Studiengruppe „Low Chance NOA“ [50] zugeordnet, bei denen im gleichen Eingriff eine Trifokale Makro-TESE (Inzision oberer, mittlerer und unterer Pol) und eine Mikro-TESE (erweiterte mittlere Inzision mit Hilfe des OP-Mikroskop) pro Hoden durchgeführt wurde. Diese 65 Patienten wiesen ein reduziertes Gesamthodenvolumen  $< 8$  ml und/oder einen erhöhten FSH Serumspiegel von  $> 12,4$  IU/l entsprechend dem Vorschlag Tüttelmanns auf und werden für ein „Sperm Retrieval“ negativ prognostisch bewertet [50].

Die Altersspanne der Patienten lag zwischen 28 und 56 Jahren, im Median bei 38 Jahre. Diese Kohorte wurde für den Vergleich eines „Sperm Retrievals“ mit unterschiedlichen

Entnahmeorten und Techniken, insbesondere zwischen Trifokaler Makro-TESE und Mikro-TESE verwendet<sup>10</sup>.

#### 4.1.1. Obstruktionszeichen und klinische Risikofaktoren

Für die Einordnung in die „Low Chance NOA“ Gruppe wurden alle Patienten mit Verdacht auf eine Obstruktion oder mit einer pathologisch veränderten alpha-Glucosidase von der Kohortenstudie ausgeschlossen [64] (**Tabelle 4**), ebenso Patienten mit einer AZFa und/oder AZFb Y-Chromosom Mikrodeletion [33]. Zwei der vier Fälle mit einer AZFc Mikrodeletion, bei welcher eine partiell erhaltene Spermatogenese vorliegt [33], wurden alio loco diagnostiziert.

Darüberhinaus wurden Patienten mit objektivierten Hypogonadismus (Gesamttestosteron  $<8 \text{ nmol/l}^{-1}$  [61] nicht berücksichtigt. Fünf Patienten waren jedoch präoperativ grenzwertig hypogonadal mit Gesamttestosteronwerten zwischen  $8 \text{ nmol/l}^{-1}$  und  $12 \text{ nmol/l}^{-1}$ .

Die in dieser Gruppe festgestellten Risikofaktoren, die jedoch die Indikation zur einer TESE nicht bestimmten, finden sich in **Tabelle 5**.

Bei sechzehn Patienten wurde lediglich ein Hoden aufgrund einer einseitigen testikulären Atrophie (n=10), eines Zustandes nach Hodentumor (n=3), eines Zustandes nach Hodentrauma (n=2) und eines Zustandes nach Hodentorsion (n=1) berücksichtigt.

Insgesamt wurden 114 testikuläre Einheiten in der Studiengruppe „Low Chance NOA“ ausgewertet.

---

<sup>10</sup> Auszüge der Ergebnisse siehe Anhang 11.2. Marcelo Marconi, Andreas Keudel, Thorsten Diemer, Martin Bergmann, Klaus Steger, Hans-Christian Schuppe, Wolfgang Weidner. Combined Trifocal Microsurgical Testicular Sperm Extraction Is the Best Technique for Testicular Sperm Retrieval in “Low-Chance” Nonobstructive Azoospermia. *European Urology* (2012).

**Tabelle 5**

**Klinische Risikofaktoren der Azoospermie in der Studiengruppe „Low Chance NOA“**

<b>Risikofaktoren bei Azoospermie</b>	<b>Patienten, n (%)</b>
<b>Zustand nach Hodenhochstand</b>	<b>20 (30,8%)</b>
<b>Hodentumoranamnese</b>	<b>3 (4,6%)</b>
<b>Zustand nach Mumpsorchitis</b>	<b>3 (4,6%)</b>
<b>Zustand nach Hodentrauma</b>	<b>2 (3,1%)</b>
<b>Zustand nach Hodentorsion</b>	<b>1 (1,5%)</b>
<b>Klinefelter Syndrom (2x Mosaik, 4x komplett)</b>	<b>6 (9,2%)</b>
<b>Y-Chromosom Mikrodeletion (AZFc)</b>	<b>4 (6,2%)</b>
<b>Keine Risikofaktoren bekannt</b>	<b>26 (40%)</b>
<b>Gesamt</b>	<b>65 (100%)</b>

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [45].

#### **4.2. Histologische Auswertung der Hodenbiopsien**

Die Beurteilung der histologischen Befunde der vier biopsierten Bereiche des Hodens ergab, dass in 79 der 114 auswertbaren testikulären Einheiten die histologischen Diagnosen in allen entnommenen Bereichen gleich war. **Tabelle 6** zeigt die testikulären Einheiten, bei denen die histologische Diagnose in allen vier entnommenen Arealen übereinstimmte.

Bei 35 Hoden variierten die Befunde innerhalb einer testikulären Einheit ohne Präferenz für eine histologische Diagnose. Dies bedeutet, dass bei einer signifikanten Anzahl der histologische Befund innerhalb der vier biopsierten Areale unterschiedlich war ( $p < 0,01$ , McNemar Test).

**Tabelle 6**

**Häufigkeit der histologischen Befunde, mit gleichen Diagnosen in allen biopsierten Arealen (Testikuläre Einheiten n=79)**

<b>Befund</b>	<b>Häufigkeit</b>
Normale Spermatogenese	11,4%
Hypospermatogenese	30,6%
Maturationsarrest	11,3%
Sertoli Cell-Only Syndrom (SCO)	43,5%
Totale Atrophie	3,2%
<b>Total</b>	<b>100%</b>

Quelle: Eigene Darstellung

#### **4.2.1 Anzahl auswertbarer Tubuli**

Für diese Auswertung wurden alle 114 testikulären Einheiten verwendet. Die Gesamtanzahl auswertbarer Tubuli pro Biopsie bei makroskopisch und mikroskopischer Vorgehensweise lag bei 35176. Dies ergab sich aus der Addition der Trifokalen Makro-TESE (29431) plus Mikro-TESE (5745). Bei der alleinigen Unifokalen Makro-TESE lag die Anzahl auswertbarer Tubuli bei 10337.

Beim Vergleich der Anzahl auswertbarer Tubuli pro Biopsie, war die Ausbeute der Trifokale Makro-TESE mit 29431 Tubuli im Vergleich zur Mikro-TESE mit 5745 signifikant höher ( $p < 0,01$  Friedman Test, **Tabelle 7**).

**Tabelle 7**

**Anzahl auswertbarer Tubuli**

**p-Wert (Friedman Test) <0,01**

	<b>Unifokale Makro TESE</b>	<b>Mikro-TESE</b>	<b>Trifokale Makro-TESE</b>	<b>Trifokale Makro-TESE plus Mikro- TESE</b>
<b>Auswertbare Tubuli</b>	<b>10337</b>	<b>5745</b>	<b>29431</b>	<b>35176</b>

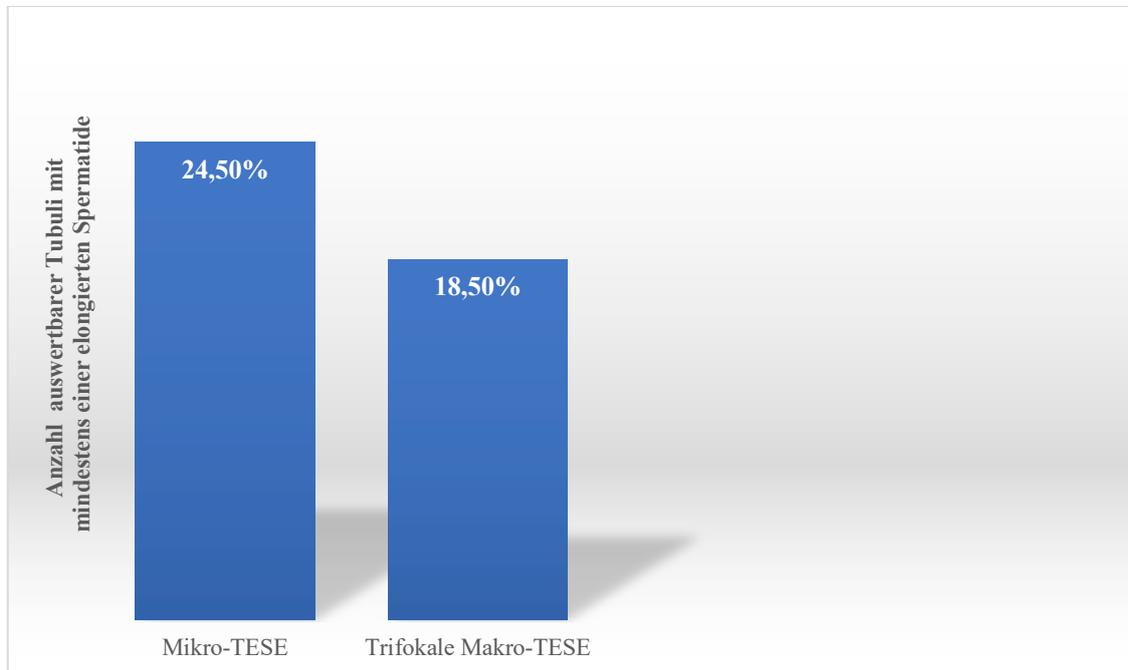
Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [45].

Die Anzahl auswertbarer Tubuli mit mindestens einer elongierten Spermatozoen pro Biopsie, lag bei der Mikro-TESE bei 1410 von 5745 (24,5%) gegenüber 5457 von 29 431 Tubuli (18,5%) bei der Trifokalen Makro-TESE (**Tabelle 8**) und war damit signifikant höher ( $p < 0,01$  Friedman Test).

Zur Verdeutlichung ist die Anzahl der auswertbaren Tubuli mit mindestens einer elongierten Spermatozoen bei Mikro-TESE und Trifokaler Makro-TESE grafisch dargestellt (**Tabelle 8**).

**Tabelle 8**

**Anzahl auswertbarer Tubuli mit mindestens einer elongierten Spermatoide**  
**p-Wert (Friedman Test) <0,01**



Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [45]

#### **4.2.2. Vergleich des Bergmann/Kliesch Scores zwischen den biopsierten Arealen**

Um zu analysieren, in welchen Bereichen des Hodens Tubuli mit elongierten Spermatoziden vorhanden sind, wurde der histologische Score der biopsierten Areale (Unifokale Makro-TESE, Mikro-TESE, Trifokale Makro-TESE und Trifokale Makro-TESE plus Mikro-TESE) verglichen. Es wurden nur die testikulären Einheiten berücksichtigt, bei denen die Trifokale Makro-TESE plus Mikro-TESE erfolgreich war, also ein Tubulus mit elongierten Spermatoziden in mindestens einer Biopsie vorhanden waren. Dies war bei 68 testikulären Einheiten der Fall. Es wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den vier biopsierten Bereichen beobachtet ( $p < 0,01$  Friedman Test, **Tabelle 9**), wobei der Score bei der Mikro-TESE mit 5,2 am höchsten war.

**Tabelle 9**

**Vergleich des Bergmann/Kliesch Scores zwischen den biopsierten Arealen**

**p-Wert (Friedman Test) <0,01**

	<b>Unifokale Makro-TESE</b>	<b>Mikro-TESE</b>	<b>Trifokale Makro-TESE</b>	<b>Trifokale Makro-TESE plus Mikro- TESE</b>
<b>Score</b>	<b>4,3</b>	<b>5,2</b>	<b>4,2</b>	<b>4,3</b>

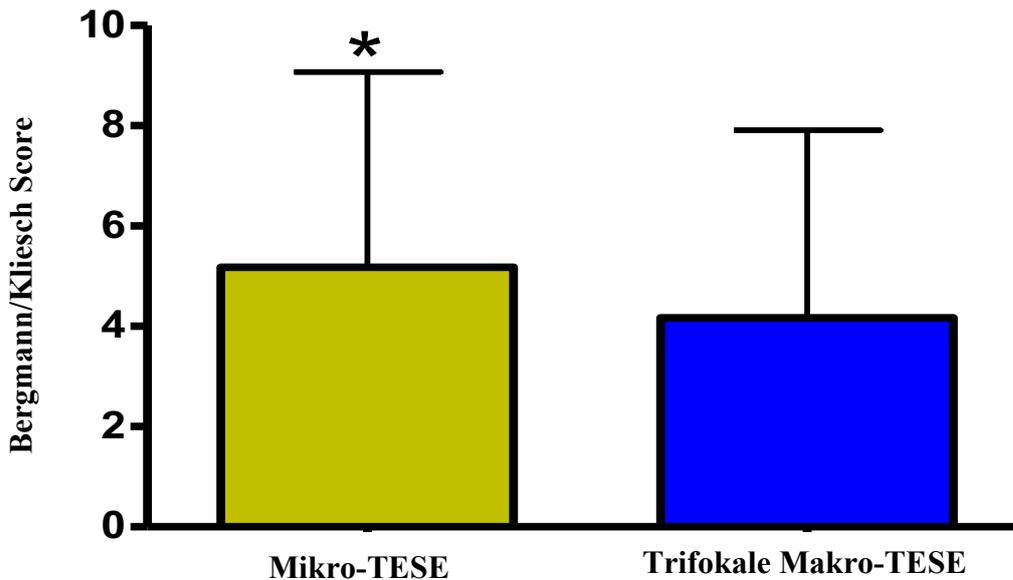
Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [45]

Zusätzlich wies beim Vergleich des durchschnittlichen Scores zwischen Mikro-TESE und Trifokaler Makro-TESE, der Score der Mikro-TESE eine signifikant höhere Anzahl an Tubuli auf, die elongierte Spermatozoen enthielten ( $p < 0,01$  Wilcoxon Test, **Tabelle 10**). Es wurden nur die testikulären Einheiten berücksichtigt, bei denen die Trifokale Makro-TESE plus Mikro-TESE erfolgreich war, das heißt ein Tubulus mit elongierten Spermatozoen musste in mindestens einer Biopsie vorhanden sein.

**Tabelle 10**

**Vergleich des Bergmann/Kliesch Scores zwischen mikroskopisch und makroskopisch gewonnenen Biopsien**

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung:  $5,2 \pm 3,9$  versus  $4,2 \pm 3,7$   $p < 0,01$ ; Wilcoxon Test)



Quelle: Eigene Darstellung

#### **4.3. „Sperm Retrieval“ in Abhängigkeit des chirurgischen Vorgehens**

Das „Sperm Retrieval“, das heißt der Anteil der Patienten, bei denen im Vergleich zur unterschiedlichen chirurgischen Technik mindestens ein Tubulus elongierte Spermatozoen enthielt, weist einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf ( $p < 0,01$ ; Cochran-Q Test) (**Tabelle 11**). Dazu wurden alle testikulären Einheiten berücksichtigt. Bei der Analyse des „Sperm Retrievals“ erwies sich nur die Kombination aus Trifokaler Makro-TESE und Mikro-TESE als signifikant besser als die unifokale-Makro-TESE mit einer Erfolgsrate von 66,2% versus 53,8% ( $p = 0,01$  McNemar Test).

Die Kombination aus Trifokaler Makro-TESE plus Mikro-TESE war bei acht Patienten, bei denen bei der unifokalen Makro-TESE keine elongierten Spermatozoen gefunden wurden, erfolgreich.

Fünf Patienten profitierten allein von der Trifokalen Makro-TESE, drei allein von der Mikro-TESE.

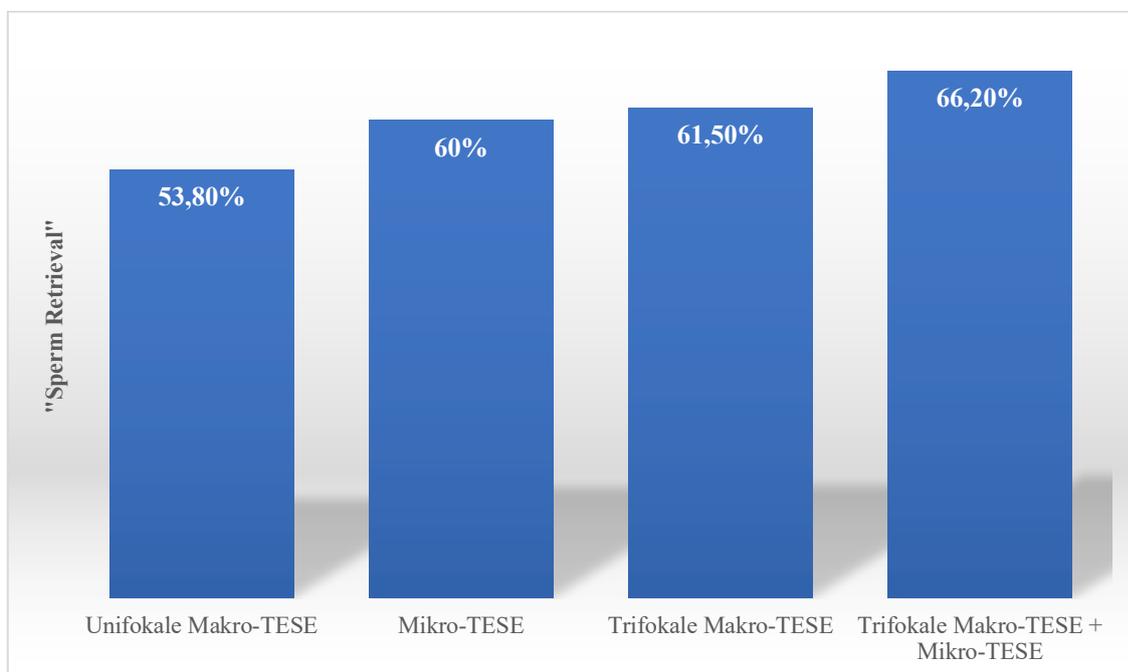
Die „Number Needed to Treat“ (NNT) lag bei 9 Patienten, das bedeutet nur 1 Patient von 9 profitiert von der Kombination aus Trifokaler Makro-TESE plus Mikro-TESE.

Alle anderen chirurgischen Vorgehensweisen wie Unifokale Makro-TESE versus Trifokale Makro-TESE ( $p=0,07$  McNemar Test), Unifokale Makro-TESE versus Unifokale Makro-TESE plus Mikro-TESE ( $p=0,07$  McNemar Test), Unifokale Makro-TESE plus Mikro-TESE versus Trifokale Makro-TESE ( $p=0,68$  McNemar Test), Trifokale Makro-TESE versus Trifokale Makro-TESE plus Mikro-TESE ( $p=0,25$  McNemar Test) und Mikro-TESE versus Trifokale Makro-TESE ( $p=0,25$  McNemar Test), zeigten keine signifikante Verbesserung des „Sperm Retrievals“. Die „Number Needed to Treat“ wurde nicht berechnet, da kein signifikanter Unterschied vorlag.

**Tabelle 11**

**„Sperm Retrieval“ abhängig von den verschiedenen chirurgischen Vorgehensweisen**

**p-Wert <0,01 (Cochrane-Q Test)**



Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [45]

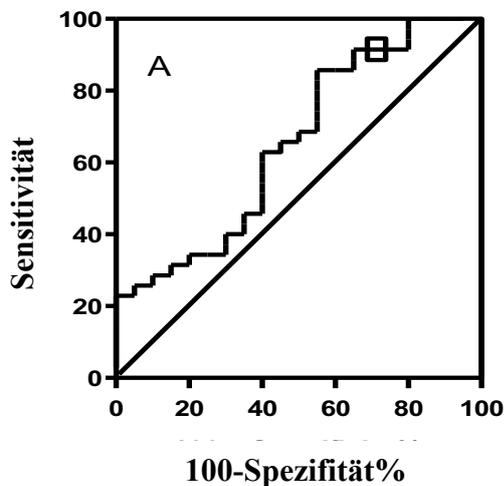
#### 4.4. Vorhersagekraft und prognostische Wertigkeit von Serum-FSH für das „Sperm Retrieval“

Das Serum-FSH war signifikant höher bei Patienten, bei denen keine elongierten Spermatozoen gefunden wurden im Vergleich zu Patienten mit einem erfolgreichen „Sperm Retrieval“ (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung:  $26,5 \pm 13,0$  IU/l versus  $18,3 \pm 7,5$  IU/l;  $p = 0,02$  Student t-Test).

Der „Cut-Point“ zur Unterscheidung zwischen erfolgreichem und nicht erfolgreichem „Sperm Retrieval“ war  $28,0$  IU/l mit einer Spezifität von  $35\%$  und einer Sensitivität von  $90\%$  (**Tabelle 12**). Es besteht eine inverse Beziehung für den FSH-Spiegel zum erfolgreichen „Sperm Retrieval“, wobei höhere Werte zu niedrigeren Erfolgsraten führten (Area Under the Curve :  $AUC=0,65$ ).

**Tabelle 12**

**Serum FSH: Analyse der ROC (Receiver Operating Characteristic) Kurve**



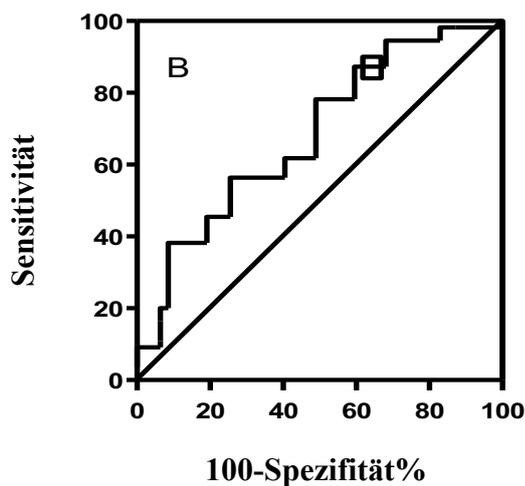
Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [45]

#### 4.5. Vorhersagekraft und prognostische Wertigkeit des Hodenvolumens für das „Sperm Retrieval“

Patienten, bei denen keine elongierten Spermatozoen gefunden wurden, hatten signifikant geringere Hodenvolumina als Patienten mit einem positiven Ergebnis (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung  $5,4 \pm 2,1$  versus  $6,9 \pm 1,6$ ;  $p < 0,01$  Student t-Test). Der „Cut-Point“ zur Unterscheidung zwischen erfolgreichem und nicht erfolgreichem „Sperm Retrieval“ war ein Volumen von 4,5 ml mit einer Spezifität von 32% und einer Sensitivität von 90% (Tabelle 13). Es besteht eine reguläre Beziehung für das testikuläre Volumen zum erfolgreichen „Sperm Retrieval“, geringere Hodenvolumina führten zu niedrigeren Erfolgsraten (Area Under the Curve : AUC=0,64).

**Tabelle 13**

**Hodenvolumen: Analyse der ROC (Receiver Operating Characteristic) Kurve**



Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [45]

**4.6. Postoperative Komplikationen**

Bei 54 von 65 Männern (83 %) wurden keine postoperativen Komplikationen festgestellt. Bei vier Männern kam es zu einer postoperativen Blutung mit Ausbildung eines intratestikulären Hämatoms, das mittels Ultraschalles nachgewiesen wurde. Drei Patienten konnten konservativ behandelt werden (Kühlung, Antiphlogistika). Bei einem Patienten wurde das intratestikuläre Hämatom durch Nadelaspiration entlastet. Keiner dieser vier Männer entwickelte eine Hodenatrophie oder einen Hypogonadismus unmittelbar postoperativ. Insgesamt sieben Patienten benötigten 6 Monate nach der

Operation eine Testosteron Substitution, fünf waren bereits präoperativ grenzwertig hypogonadal (Tabelle 14).

**Tabelle 14**

**Postoperative Komplikationen (nach 12 Wochen)**

<b>Komplikationen</b>	<b>n</b>
<b>Intratestikuläres Hämatom</b>	<b>4 (3 konservativ behandelt, 1 durch Nadelaspiration evakuiert)</b>
<b>Hypogonadismus</b>	<b>7 (Testosteron Substitution)</b>
<b>Hodenatrophie</b>	<b>0</b>
<b>Keine Komplikationen</b>	<b>54</b>
<b>Total</b>	<b>65</b>

Quelle: Eigene Darstellung

## 5. Diskussion

Die Kriterien der Infertilität, definiert durch die WHO, sind die Unfähigkeit eines sexuell aktiven, nicht empfängnisverhütenden Paares, innerhalb eines Jahres eine Schwangerschaft zu erreichen [2]. In einer neueren Definition ist sie durch das Ausbleiben einer klinisch nachweisbaren Schwangerschaft nach mehr als 12 Monaten bei regelmäßig ungeschütztem Geschlechtsverkehr beschrieben [7]. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Infertilität nach den letztgenannten Kriterien definiert.

Das Fehlen von Spermatozoen im Ejakulat nach Kriterien der WHO [2, 14-16], das heißt eine Azoospermie, wird bei 4-10 Prozent aller Männer in einer infertilen Partnerschaft vermutet [8]. In neueren Untersuchungen [10, 11, 17] tritt die Azoospermie bei 10-15 % der Männer auf, die wegen Unfruchtbarkeit in der Partnerschaft ärztliche Hilfe suchen. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Diagnose einer Azoospermie durch zwei Ejakulatanalysen bestätigt werden muss, wobei sowohl in der nativen Proben als auch im Pellet nach 15 minutiger Zentrifugation mit 3000 g keine Spermatozoen vorhanden sein dürfen [14]. Dies entsprach dem Vorgehen der Gießener Arbeitsgruppe (Labor-Manual EAA Zentrum Gießen).

Für die nachfolgend diskutierte Kohortenstudie wurde bei auswärtiger Verdachtsdiagnose einer Azoospermie, bei 182 Männern eine Indikation zum „Sperm Retrieval“ gestellt. Das heißt, diese Patienten wurden zur TESE vorgestellt.

Bei 32 Männern dieses Überweisungskollektivs lag bemerkenswerterweise keine Azoospermie vor, was durch Sedimentanalyse des zentrifugierten Ejakulats verifiziert wurde. Das Ejakulat ist nach WHO Kriterien [14] in dem Gießener EAA zertifizierten Ejakulatlabor immer in der entsprechende Art und Weise aufgearbeitet worden (s.o). Eine Diagnose Azoospermie wurde nur bei zweifach identischem Laborbefund gestellt. Folglich muss in vielen Fällen ohne eine entsprechende subtile Diagnostik in einem speziellen Ejakulatlabor, eine Fehlanalyse vorgelegen haben. Hierfür ursächlich werden insbesondere eine inkorrekte Volumenerfassung und nicht fehlerfreie Beschickung einer Samenanalysekammer genannt [58]. Dementsprechend könnte eine Azoospermie falsch diagnostiziert worden sein. Diese Diskrepanz kann nur so erklärt werden.

Patientenzuordnungen sind natürlich abhängig vom untersuchten Überweisungskollektiv. Eine Untersuchung des Gießener EAA Zentrums [13] von 1834 konsekutiven Patienten mit Fertilitätsproblemen zeigte in 6,9% (n=126) der Fälle eine obstruktive Azoospermie und in 37,7% (n=692) der Fälle eine nicht näher beschriebene, vermutete testikuläre

Ursache einer Fruchtbarkeitsstörung. Bei 35,1% (n=243) dieser 692 Patienten wurde eine Varikozele diagnostiziert, die in dieser Untersuchung als möglicher Hinweis auf einen testikulären Schaden gewertet wurde, ohne diesen direkt mit einer Azoospermie zu assoziieren. Selbstverständlich muss bei jedem Verdacht auf eine Azoospermie eine Vasektomie oder eine fehlgeschlagene Refertilisierung anamnestisch ausgeschlossen sein [8]. Es wird vermutet, dass bei Patienten mit einer obstruktiven Azoospermie in bis zu 67% der Fälle eine epididymal lokalisierte Verschlussstörung anamnestisch vermutet und häufig als postinfektiös eingeschätzt werden muss [8].

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals eine routinemäßige Ultraschalluntersuchung des Nebenhodens eingesetzt [52], um weitere Hinweise auf eine epididymale Ursache, das heißt Lokalisation eines Verschlusses zu finden. Einschränkend ist hierbei zu sagen, dass die routinemäßige Ultraschalluntersuchung der Nebenhoden zum damaligen Zeitpunkt nur eine Beurteilung des Nebenhodenkopfes umfasste [52]. Dabei wurde eine Ausdehnung des Nebenhodenkopfes von über 12mm als Hinweis auf eine Obstruktion gewertet [53]. Zum Zeitpunkt der damaligen Untersuchung war leider eine differenziertere sonographische Untersuchung durch hochauflösende Ultraschallgeräte, wie kürzlich von der EAA Ultraschallgruppe um Lotti publiziert [66], noch nicht möglich. Mit neuen Geräten und feinerer Auflösung ist es heute sogar möglich, Nebenhodenstauungen bis in den Nebenhodenschwanz und das Fehlen des Ductus deferens sonographisch zu erkennen [66]. In der Gießener EAA Arbeitsgruppe wurden diese Parameter erst kürzlich als Standard aufgenommen und implementiert. Dies bedeutet, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit diskrete Hinweise eines epididymalen Verschlusses in der vorliegenden Untersuchung übersehen worden sein könnten. Diese Fälle wurden auch retrospektiv im Überweisungskollektiv mit der Diagnose „gemischte Azoospermie“ klassifiziert. Das heißt, die Differenzierung zwischen testikulärer oder epididymaler Ursache blieb unklar. Weiter muss auch hier noch die Wertigkeit der alpha-Glucosidase angesprochen werden. Eine Reduktion des alpha-Glucosidase Gehalts im Seminalplasma wurde bereits 1990 als Zeichen einer entzündlichen Reaktion, insbesondere des Nebenhodens bewertet [67]. Obwohl immer wieder zur Differenzierung zwischen obstruktiver und testikulärer Azoospermie diskutiert [68], wurden in der Gießener Arbeitsgruppe nur Männer mit Werten <20 mU/Ejakulat (Labor-Manual EAA Zentrum Gießen) als eventuell obstruktiv eingeordnet und wie in **Tabelle 4** beschrieben nicht in die Gruppe „Low Chance NOA“ aufgenommen.

Eine CBAVD, das heißt eine fehlende Anlage der ductus deferentes, als Ursache einer Verschlussazoospermie wurde im Überweisungskollektiv in 8 Fällen palpatorisch diagnostiziert. Wie oben beschrieben war eine sonographische Erfassung zum damaligen Zeitpunkt gerätetechnisch nicht möglich. Retrospektiv spielt dies jedoch eine untergeordnete Rolle, da üblicherweise die Palpation ausreicht, um die Nichtanlage des Ductus deferens zu erkennen (50).

Die CBAVD ist eine seltene Ursache der obstruktiven Azoospermie und dem Formenkreis der zystischen Fibrose zuzurechnen, wobei in 85 % der Fälle Mutationen im zystischen Fibrosegen nachgewiesen werden können [20]. In der Gießener Arbeitsgruppe wurden alle Patienten mit einem derartigen Befund einer humangenetischen Beratung zugeführt. In dieser wurde entschieden, ob ein erhöhtes Risiko für das gezeugte Kind besteht, an einer zystischen Fibrose nach einem erfolgreichen „Sperm Retrieval“ und nachfolgender IVF/ICSI zu erkranken [20]. Bei einer CBAVD ist eine MESA die Therapie der Wahl [25], weil üblicherweise durch diese Technik ausreichend Material für mehrere IVF/ICSI Versuche gewonnen werden kann [21].

In dem vorliegenden Überweisungskollektiv waren zystische Prostataveränderungen selten [19]. Diese wurden nur bei 2 Patienten als Ursache einer zentralen Obstruktion mit einem Ejakulatvolumen unter 1,5 ml diagnostiziert. Zur Diagnosestellung wurde der TRUS verwendet. Die häufig begleitenden zystischen Veränderungen der Bläschendrüsen konnten zum damaligen Zeitpunkt nicht ausreichend erfasst werden [56]. Therapeutisch kann in Einzelfällen eine Eröffnung der paracolliculären Verschlüsse in der prostatistischen Harnröhre durch transurethrale Inzision bzw. Aufresektion erfolgreich sein [19]. Bereits im Jahr 2000 wurde durch die Gießener Arbeitsgruppe über diese Technik berichtet [19].

Nach Ausschluss einer Verschlussazoospermie wurde bei der klinischen Diagnostik der Patienten des Überweisungskollektiv gezielt nach Hinweisen für testikuläre Ursachen einer Azoospermie gesucht. Die Gießener Arbeitsgruppe musste nach der oben genannten Untersuchung des Gießener EAA Zentrums bei 1834 konsekutiven andrologischen Patienten bei mehr als einem Drittel aller Fälle von einer nicht näher definierte testikuläre Störung ausgehen [13]. Typisch anamnestisch zu evaluierende Faktoren sind in **Tabelle 5** dieser Arbeit beschrieben. Der häufigste Risikofaktor in der Studiengruppe „Low Chance NOA“ [45] war in 20 von 65 Fällen (30,8%) der Zustand nach operativer Korrektur eines Hodenhochstands. Diese hohe Häufigkeit ist abhängig von der untersuchten Population. Bei einer Untersuchung von Soldaten in den USA wurde ein

derartiger Befund in nur 4% aller Fälle bei Männern mit Infertilität nachgewiesen [69], was natürlich auch durch den Tauglichkeitsgrad beeinflusst sein kann, da entsprechende Männer dann bereits durch die militärärztliche Voruntersuchung ausgemustert waren.

Der Nachweis einer Varikozele wurde in der vorliegenden Untersuchung mit dokumentiert. Für die Entscheidung, für oder wider einem „Sperm Retrieval“ aber nicht verwendet. Zum damaligen Zeitpunkt war es völlig unklar, ob die operative Behandlung einer Varikozele, zum Beispiel durch eine Varikozelektomie, eine NOA positiv beeinflussen kann. Wenn in wenigen Fällen nach einer chirurgischen Intervention, tatsächlich Spermien in geringer Zahl auftraten, wurde in den meisten Fällen eine IVF/ICSI, wegen der schlechten Spermienqualität notwendig [35, 70].

Von besonderer Bedeutung ist die häufigste angeborene genetische Erkrankung mit Einfluss auf den Fortpflanzungstrakt, das Klinefelter Syndrom (KS) [71]. Die klassische Form des KS, die in 80-90% der Fälle auftritt, ist durch einen 47,XXY-Karyotyp definiert, der aus einer Aneuploidie der Geschlechtschromosomen resultiert, während höhergradige Aneuploidien (z.B. 48,XXXYY oder 48,XXYY), strukturell abnorme X-Chromosomen (z.B. 47,iXq,Y) oder Mosaikismen (z.B. 47,XXY/46,XY) etwa in den restlichen 10-20% der Fälle auftreten. Die Prävalenz des KS (zwischen 0,1 und 0,2% bei männlichen Neugeborenen) steigt auf bis zu 3-4% bei unfruchtbaren und 10-12% bei azoospermen Männern [32]. Damit ist sie die am häufigsten beobachtete Geschlechtschromosomenanomalie bei Männern [72, 73]. Typischerweise ist ein Klinefelter Syndrom mit kleinen Hodenvolumina unter 5 ml assoziiert [74]. In der Studiengruppe „Low Chance NOA“ [45] spielte das Klinefelter Syndrom eine nachgeordnete Rolle. Lediglich 6 von 65 Patienten (9,2%) waren davon betroffen, was eventuell darauf zurückzuführen sein kann, dass Patienten mit sehr kleinen Hodenvolumina zum damaligen Zeitpunkt nur in Ausnahmefällen für eine TESE zugewiesen wurden. Die andrologische Bedeutung wird jedoch kontrovers diskutiert. So zeigt eine Untersuchung aus dem Jahr 2014 von Bryson et al. [75], dass eine testikuläre Atrophie keinen Einfluss auf ein erfolgreiches „Sperm Retrieval“ bei der TESE haben soll. Beim Klinefelter Syndrom wird von einem Verlust von Spermatogensearealen nach der Pubertät ausgegangen, so dass zeitweilig ein „Sperm Retrieval“ in einem höheren Alter nicht empfohlen wurde [76]. Unabhängig davon konnten aber in Einzelfällen neben einer Hyperplasie der Leydig Zellen und einer interstitiellen Fibrose insbesondere bei Adoleszenten Spermatogeneseinseln nachgewiesen werden [73]. Hieraus resultiert auch die Empfehlung zur Durchführung einer Makro-TESE oder Mikro-TESE mit

Kryokonservierung des entnommenen Materials bei Adoleszenten [73]. In der Studiengruppe „Low Chance NOA“ [45] wurden Adoleszenten nicht berücksichtigt; der jüngste Patient war 25 Jahre alt. Die Gießener Arbeitsgruppe hat aber bereits 2014 gefordert, dass bei derartigen Patienten, bei denen eine TESE durchgeführt werden soll, eine 3-teilige Aufarbeitung des entnommenen Gewebes stattfinden soll [25]. Dabei sollte immer Probenmaterial für eine späterer IVF/ICSI, in einer Kryobank asserviert werden. Eine Analyse des Y-Chromosoms auf Mikrodeletionen der AZF Regionen (*a,b,c*) [8] war zum damaligen Zeitpunkt kein Standard, und wurde nur in der Studiengruppe „Low Chance NOA“ [45] durchgeführt. Die Azoospermiefaktoren *a* und *b* schließen eine erfolgreiche operative Spermengewinnung aus [33]. Im Falle des AZFc liegt eine partiell erhaltene Spermatogenese vor [33], so dass 4 von 65 Patienten (6,2%) mit dieser Veränderung nicht von der Studie ausgeschlossen werden mussten.

An dieser Stelle wird auf die Wertigkeit subnormaler Hodenvolumina und erhöhter FSH-Serumwerte als prognostische Faktoren für ein erfolgreiches „Sperm Retrieval“ bei der TESE eingegangen. Seit Jahren besteht Konsens darüber, dass die Hodengröße mit der testikulären Funktion invers assoziiert ist [77-80], das heißt kleine Hodenvolumina wurden als prognostisch ungünstig gewertet. Dabei erfolgte in der vorliegenden Untersuchung die Bestimmung des Hodenvolumens immer nach vergleichender Palpation mit dem Orchidometer nach Prader [51] und sonographisch [52] nach der Ellipsoidformel. Da die sonographische Bestimmung des Hodenvolumens nach der Ellipsoidformel technisch einfacher und genauer ist [66], wurde in der vorliegenden Untersuchung die Bestimmung des Hodenvolumens durch Sonographie für die Auswertung herangezogen.

Bezüglich kleiner Hodenvolumina ist jedoch die Möglichkeit eines erfolgreichen „Sperm Retrieval“ auch bei Patienten mit einem testikulären Volumen von weniger als 8 ml [81] nicht ausgeschlossen. Daher sollte das Vorhandensein eines geringeren Hodenvolumens auf Grund einer heterogenen Spermatogenese nicht als Ausschlusskriterium für eine TESE bei Patienten mit NOA angesehen werden [81]. Dies entsprach dem Vorgehen der Gießener Arbeitsgruppe und wurde bereits bei der Definition „Low Chance NOA“ [45] berücksichtigt.

In den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung wiesen die Patienten, bei denen keine elongierten Spermatozoen gefunden wurden, ein signifikant geringeres Hodenvolumina auf im Vergleich zu Patienten mit einem positiven Ergebnis. Der „Cut-Point“ zur Unterscheidung zwischen erfolgreichem und nicht erfolgreichem „Sperm Retrieval“ war

ein Volumen von 4,5 ml mit einer geringen Spezifität und einer hohen Sensitivität in der Analyse der ROC Kurve [45]. Dies entspricht den Angaben von Bromage et al. [82], die von einer reduzierten Spermatogenese bei Hodenvolumina <4ml ausgehen.

Es ist bekannt, dass der Effekt von FSH in den Tubuli auf die Sertoli Zellen in Interaktion mit intratestikulärem Testosteron entscheidend ist für eine intakte Spermatogenese [83]. Allgemein akzeptiert ist, dass bei einer Azoospermie ein normaler FSH Serumspiegel bei gleichzeitig normalem Hodenvolumen eher für eine obstruktive und nicht testikuläre Ursache spricht [84-87]. Unabhängig davon ist auch bei normwertigen Serum-FSH eine gestörte Spermatogenese nicht auszuschließen [8, 53]. In dem Überweisungskollektiv zur TESE wurde bei 26 von 182 Patienten die Verdachtsdiagnose „gemischte Azoospermie“ gestellt, wobei ein normaler, leicht erhöhter FSH-Serumspiegel  $\leq 12,4$  IU/l nachgewiesen wurde. Die Bedeutung einer entsprechenden Erhöhung konnte nicht weiter eingegrenzt werden. Es liegen Untersuchungen vor [88], die bei erhöhtem FSH Serumspiegel >20 IU/l von einem geringeren Ertrag beim „Sperm Retrieval“ und geringer IVF/ICSI Rate ausgehen. In einer anderen Untersuchung [82] wird bereits bei FSH Serumspiegeln >10 IU/l von einer reduzierten Spermatogenese ausgegangen. Bereits 2008 wurde durch die EAU Working Group on Male Infertility [8] postuliert, dass, wie oben erwähnt, ein normaler FSH Serumspiegel eine gestörte Spermatogenese nicht ausschließt und damit nur einen indirekten Prädiktor für ein erfolgreiches „Sperm Retrieval“ darstellt. Daraufhin wurde durch verschiedene Autoren versucht, eine Subgruppe von Patienten zu definieren, die als „Low Chance NOA“ Patienten bezeichnet wurden [50, 82]. Diese Definition wurde auch durch die Gießener Arbeitsgruppe übernommen. Das heißt, bei 65 Patienten wurde eine „Low Chance NOA“ definiert mit FSH Serumspiegel Werten über 12,4 IU/l und einem Hodenvolumen unter 8 ml [45]. Wie erwartet war das Serum-FSH signifikant höher bei Patienten, bei denen keine elongierten Spermatozoen gefunden wurden, im Vergleich zu Patienten mit einem erfolgreichen „Sperm Retrieval“. Der „Cut-Point“ zur Unterscheidung zwischen erfolgreichem und nicht erfolgreichem „Sperm Retrieval“ war 28,0 IU/l mit einer geringen Spezifität und einer hohen Sensitivität in der Analyse der ROC Kurve [45].

Um präoperativ die Prognose für die Spermatogenese besser abschätzen zu können, wurden kompliziertere Algorithmen bereits vor über 15 Jahren eingeführt, die hormonell nicht nur Serum-FSH und Testosteron, sondern auch den Inhibin Plasmawert in einer komplizierten Formel zusammenführten [89]. Diese haben sich nicht durchgesetzt. Auch

neuere Metaanalysen [81, 90] bestätigen, dass sich Serum-FSH allein nicht als Prädiktor für ein erfolgreiches „Sperm Retrieval“ eignet.

Bezüglich der biologischen Wirkung von Testosteron ist zu sagen, dass es notwendig ist um eine ausreichende Spermatogenese zu initiieren und gemeinsam mit FSH die Bildung von Spermatischen aufrechtzuerhalten [59]. Erst diese Kombinationswirkung von Testosteron und FSH erlaubt eine quantitativ und qualitativ ausreichende Spermatogenese [59]. Männer mit Isolierten Hypogonadalem Hypogonadismus (IHH), das heißt eine hypothalamisch-hypophysär bedingte Ursache, fallen bei einer Azoospermiediagnostik üblicherweise durch fehlende pubertäre Reifung insbesondere der Hoden auf, die phänotypisch einem präpubertären Bild entsprechen [59]. Diese Patienten wurden in der Kohortenstudie nicht berücksichtigt. Histologisch wird das Bild durch unreife Sertolizellen und Spermatogonien bestimmt. Durch Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) Gabe kann die Testosteron Produktion der Leydig Zellen über LH stimuliert werden [59]. Unglücklicherweise bleiben 20-30% dieser Männer trotz Therapie azoosperm.

Patienten mit einem gesicherten manifesten Hypogonadismus, das heißt Gesamtestosteronspiegel unter  $8 \text{ nmol/l}^{-1}$ , wurden bei der Zuordnung der Patienten ebenso nicht berücksichtigt. 5 Männer der „Low Chance NOA“ Gruppe waren bereits präoperativ grenzwertig hypogonadal, das heißt der Gesamtestosteron-Serumspiegel lag zwischen  $8 \text{ nmol/l}^{-1}$  und  $12 \text{ nmol/l}^{-1}$ . 7 Männer benötigten eine Testosteronsubstitution 6 Monate postoperativ. Diese kurze Beobachtungszeit ist kritisch zu diskutieren, da die Bewertung des Gesamtestosteron-Serumspiegel über einen längeren Zeitraum erfolgen sollte. Dies war jedoch nicht immer möglich, da der Großteil der „Low Chance NOA“ Gruppe Zuweisungspatienten waren, so dass diese Daten nicht erhoben werden konnten. In den Jahren 1992-1994 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen erstmals berichtet, dass mit direkt aus den Hoden entnommenen Spermatischen eine erfolgreiche intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion der Partnerin (IVF/ICSI) durchgeführt werden konnte [3-6]. Damit wurde eine andrologisch chirurgische Technik Grundlage für eine erfolgversprechende Therapie bei azoospermen Männern, die bis dahin als unfruchtbar galten und nicht Vater werden konnten. Voraussetzung war in diesem Bereich eine enge Kooperation mit Reproduktionsmedizinern, die unter verschiedenen Indikationen bereits mit ejakulierten Spermatozoen Schwangerschaften nach IVF/ICSI herbeigeführt hatten [91]. Die EAU Leitlinien Gruppe für männliche Infertilität hat im Jahre 2002 erstmals über die andrologisch chirurgische Technik berichtet, wobei eine

multifokale TESE oder multiple testikuläre Punktionen als mögliche Verfahren angesprochen wurden [92]. In dieser Leitlinie wurde über 616 TESE Proben berichtet, wobei in 373 Fällen (60,6 %) Spermatozoen für eine ICSI gewonnen werden konnten [92]. Diese „Sperm Retrieval“-Raten decken sich in etwa mit den „Low Chance NOA“-Daten der vorliegenden Untersuchung, unter Verwendung der Trifokalen Makro-TESE und Mikro-TESE [45]. Bereits im Jahr 2002 wurde angemerkt, dass der TESE Erfolg nicht eindeutig vom Patientenalter, Serum-FSH, Hodenvolumen oder der Hodenhistologie abhängig war [92]. Dies bedeutet, dass ein erhöhter FSH-Serumspiegel und das Alter, kein Ausschluss für eine operative Maßnahme darstellten. Die Gießener Arbeitsgruppe definierte im Jahr 2008 [22] die Trifokale Makro-TESE als Standardverfahren. Feinnadelbiopsien, zum Beispiel als „Testicular Fine Needle Aspiration“ (TEFNA) oder „Testicular Sperm Aspiration“ (TESA), die später in einer Übersicht aus dem Jahr 2017 für asthenozoosperme Patienten empfohlen wurden [93], wurden von der Gießener Arbeitsgruppe zu diesem Zeitpunkt nicht als sinnvolles Operationsverfahren bei NOA angesehen [25]. Derartige Operationen waren additiv nur bei obstruktiver Azoospermie denkbar [25]. Die Mikrochirurgische Epididymale SpermatozoenAspiration (MESA) wurde als Standardverfahren in solchen Fällen empfohlen [9, 22].

Wie oben erwähnt, ist die Trifokale Makro-TESE durch die Giessener Arbeitsgruppe als Standardverfahren festgelegt worden [22], basierend auf dem Wissen um eine heterogene Spermatogenese bei Männern mit NOA [94-96]. In der vorliegenden „Low Chance NOA“-Kohorte variierten die Befunde [45] innerhalb einer testikulären Einheit ohne Präferenz für eine histologische Diagnose bei 35 von 114 testikulären Einheiten (30,7%). Diese Ergebnisse sind ein wichtiges Argument für eine multifokale TESE, wobei üblicherweise durch die Gießener Arbeitsgruppe eine TESE Biopsie aus oberem, mittlerem, und unterem Hodenpol am lateralen freien Gefäßrand entnommen wurde [22, 24, 42]. Dies entsprach auch dem Vorgehen anderer Arbeitsgruppen [40, 97]. Auch die Ergebnisse einer aus dem Jahr 2019 vorliegenden Meta-Analyse von Corona et al. [81] bestätigen den Trend zu einer Mehrfachbiopsie.

Die Testikuläre SpermatozoenExtraktion (TESE) als offene Biopsie ohne OP-Mikroskop wird als Makro-TESE bezeichnet. Diese Technik hat die Gießener Arbeitsgruppe in ihrer Trifokalen Form über Jahre als die effektive Methode zur Spermatozoengewinnung aus den Hoden bei Patienten mit NOA [22, 24, 42] durchgeführt. Im Jahr 1999 hat die Arbeitsgruppe um Schlegel [44] erstmals über eine TESE mit Hilfe eines OP-Mikroskops berichtet, die sogenannte Mikro-TESE. Dabei wird unter dem Mikroskop, nach Inzision

der Tunica albuginea und Öffnung des Hodenparenchyms, nach vergrößerten Tubuli mit weißlich-opaker Farbe gesucht, die vermehrt elongierte Spermatozoen enthalten sollen [44, 98]. Diese werden dann gezielt entnommen [44]. Die Gießener Arbeitsgruppe hat diese Technik aufgenommen und nach Trainingseinheiten in verschiedenen mikrochirurgisch-reproduktionsmedizinischen erfahrenen Zentren in Gießen etabliert.

Bis heute bleibt es abschließend unklar, ob die Mikro-TESE tatsächlich ein signifikant höheres „Sperm Retrieval“ im Vergleich zur konventionellen Trifokalen Makro-TESE erzielen kann. Die unterschiedlichen Einflussmöglichkeiten auf die Erfolgsrate sind bereits oben ausführlich dargestellt und auch zitiert worden [22, 24, 38-43, 47, 48]. Erschwerend kommt hinzu, dass unterschiedliche Techniken zur Aufnahme und Aufarbeitung der Spermatozoen eingesetzt werden [25], wobei in der Gießener Arbeitsgruppe das aufgenommene Material immer 3-teilig aufgearbeitet wurde, für die Histologie, die Kryokonservierung und die molekulare Diagnostik [25]. Technisch wurde das entnommene Gewebe mechanisch und enzymatisch aufbereitet, um Spermatozoen zu isolieren [65] (Arbeitsanweisung 003).

Auch bei Vorhandensein einer präoperativen Histologie mit Nachweis von Spermatozoeninseln [29] wird diskutiert, dass diese nicht sicher einen TESE Erfolg voraussagen können [99]. In einem „Letter to the Editor“ [100] sprach Song von einem erfolgreichen „Sperm Retrieval“ von 30-70% bei der Mikro-TESE, was eine sehr große Spannweite darstellt und praktisch keine Aussagekraft hat. Weiterhin wurde das von Schlegel eingeführte Verfahren, mit dem OP-Mikroskop nach vergrößerten Tubuli mit weißlich-opaker Farbe zu suchen, die vermehrt elongierte Spermatozoen enthalten sollen, angezweifelt. Dies sei in vielen Fällen nicht zielführend [100]. In ähnlicher Weise kritisch äußerten sich auch Anderson und Hotaling [101] im Jahr 2015 und Jensen et al. [102] im Jahr 2017, wobei Anderson und Hotaling [101] vor allem die unterschiedlichen Patientencharakteristika der untersuchten Kollektive ansprachen, wie z.B. Patientenalter, unterschiedliche FSH-Serumspiegel, unterschiedliche Hodenvolumina und nicht ausreichende standardisierte genetische Voruntersuchungen. Weiterhin ist es praktisch unmöglich, die Stelle der präoperativen Histologie bei einer späteren TESE zu identifizieren und tatsächlich zu treffen. Ein Ausweg aus dieser Situation wäre, besonders geeignete Spermatozoenareale durch eine perkutane testikuläre Spermatozoenaspiration (TESA, TEFNA) vorab zu identifizieren [30]. Jensen et al. sind in dieser neuen Untersuchung der Meinung, dass bei negativer Nadelbiopsie eine TESE

nur zu einem „Sperm Retrieval“ von etwa 11% führt [30, 102] und eventuell unterlassen werden sollte.

Bezüglich des Vorteils einer Mikro TESE, desillusionierte eine Cochrane Analyse der bisher publizierten Daten aus dem Jahre 2008 [49] die Verfechter der Mikro-TESE. Diese kam zum damaligen Zeitpunkt zu dem Schluss, dass eher kein Vorteil für das „Sperm Retrieval“ durch das Einbringen des Operationsmikroskop bei NOA gesehen werden konnte [49]. Eine Arbeitsgruppe der „EAU Section of Andrological Urology“ (ESAU) unter Mitarbeit der Gießener Arbeitsgruppe scheiterte 2019 erneut bei der Auswertung einer Meta-Analyse von 56 konventionellen Makro-TESE Serien und 43 Mikro-TESE Serien, einen Vorteil für die Mikro-TESE statistisch nachzuweisen [81]. Fazit war, dass randomisierte Studien mit einer eindeutigen Standardisierung gefordert wurden, was bereits durch Carrell und Simoni [103] 2017 in einem Editorial in „Andrology“ angesprochen wurde. Insbesondere wird eine standardisierte Gewebeaufarbeitung zum Nachweis von Spermatisden in den TESE-Proben gefordert. Weiterhin werden auch vergleichbare Patientenauswahlkriterien vorgeschlagen.

Diese Diskussion beschreibt in vielen Aspekten den Stand des Wissens der Gießener Arbeitsgruppe in den Jahren 2008-2010 mit allen Unwägbarkeiten [45]. Da eine randomisierte vergleichende Betrachtung nicht möglich erschien, war der Grundgedanke damals, bei der Trifokalen Makro-TESE die mittlere Inzision nicht nur als Makro-TESE durchzuführen, sondern dann in der gleichen Region mikrochirurgisch mit Hilfe des OP-Mikroskops als Mikro-TESE zu erweitern. Damit erhoffte man sich, dass unterschiedliche „Sperm Retrievals“ für die Makro- versus Mikro-TESE intraindividuell verglichen werden konnten [45]. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob der zusätzliche Einsatz der Mikro-TESE im Trifokalen Makro-TESE Konzept die Ausbeute des „Sperm Retrieval“ verbessern könnte. Wie erwartet wurden bei der Trifokalen Makro-TESE signifikant mehr auswertbare Hodentubuli im Vergleich zur Mikro-TESE gefunden. Jedoch war die Anzahl auswertbarer Tubuli mit mindestens einer elongierten Spermatisde bei der Mikro-TESE signifikant höher als bei der Trifokalen Makro-TESE. Auch der Bergmann/Kliesch Score war bei der Mikro-TESE signifikant höher als bei der Trifokalen Makro-TESE. Bei der Analyse des „Sperm Retrievals“ erwies sich nur die Kombination aus Trifokaler-Makro-TESE plus Mikro-TESE als statistisch nachweisbar besser im Vergleich zur Unifokalen-Makro-TESE. Diese Daten [45] waren ein Hinweis darauf, dass wie auch von anderen Autoren festgestellt [40], eine multifokale Makro-TESE und eine zusätzliche Mikro-TESE ein besonders erfolgreiches Verfahren darstellen

könnte, wenn zum Beispiel hierdurch Tubuli mit einem höheren Gehalt an elongierten Spermatisden identifiziert werden könnten.

Aus der Diskussion wird klar, dass bis heute keine eindeutigen intra-und präoperativen Kriterien vorliegen, die es erlauben im Hoden Areale zu identifizieren, welche für eine erfolgreiche TESE besonders geeignet wären. Die Gießener Arbeitsgruppe hat sich daher insbesondere mit der hochauflösenden Ultraschalldiagnostik der Hoden beschäftigt [104]. Hierbei wurde durch eine Kombination von B-Mode Sonographie und Duplex Sonographie versucht, heterogene Spermatogeneseareale, die Spermatisden enthalten, besser zu identifizieren. Dies gelang leider nicht ausreichend [104]. Hilfreich war die Verwendung dieser Technik für den Nachweis eines sonographisch inhomogenen Hodenparenchyms, zum Beispiel einer Mikrolitihasis bei angeborenem und erworbenem unilateralem Hodenhochstand und kontralateralem normalem Hoden [105]. Derartige Befunde könnten eventuell für ein vorhandenes Carcinoma in Situ sprechen [105], waren aber für die genannte Fragestellung, eine Verbesserung des „Sperm Retrievals“ bei NOA, nicht relevant.

Unabhängig davon ist ein Testikuläres Dysgenese Syndrom [34] routinemäßig in der Semidünnschnittdiagnostik in allen TESE Proben nach auffälligen Zellarealen (Bergmann persönliche Mitteilung) gesucht worden. Diese wurden dann durch eine Immunhistologie mit Plazentarer Alkalischer Phosphatase (PLAP) Färbung als Tumormaker im spezialisierten Labor als Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie (TIN) diagnostiziert [63, 64]. Bei dem Nachweis auf ein TIN erfolgte ein handschriftlicher Vermerk auf dem Hodenbiopsiebericht (**Tabelle 3**). Eine onkologische Weiterbehandlung wurde in diesen Fällen dringend angeraten. Erhobene Befunde eines TIN, die postoperativ nach Wochen vorlagen, waren nicht Gegenstand dieser Untersuchung.

Ein weiterer Schwerpunkt der Gießener Arbeitsgruppe fokussierte sich auf den Nachweis einer urogenitalen Infektion oder Entzündung als Einflussfaktor für ein „Sperm Retrieval“ bei Azoospermie [106]. Leider fand sich auch in einer neueren Untersuchung keine Beziehung zwischen dem Nachweis von Erregern und fokalen Immunzellinfiltraten zu den Ergebnissen des „Sperm Retrieval“ [106].

Als Surrogatparameter wurde versucht, die Bestimmung des Protamin-1, Protamin-2 Quotienten zur Beurteilung der Fertillisierungskapazität von entnommenen Spermatisden [107, 108] zu verwenden. Leider wurden diese Untersuchungen nicht fortgeführt.

Kritisch anzusprechen für die „Low Chance NOA“ Gruppe ist das Fehlen von Daten zum IVF/ICSI Erfolg mit den testikulär entnommenen Spermatozoen. Hier ist einzuräumen, dass es aufgrund der externen Patientenzuweisung und der auf die OP-Entnahmetechnik fokussierten Ausrichtung nicht möglich war, für die mit TESE Material befruchteten Frauen ausreichend Daten zu Schwangerschaft und Geburt von extern zu erhalten. Das Fehlen einer eigenen IVF/ICSI Gruppe an dem Gießener EAA Zentrum musste leidvoll anerkannt werden. Aus diesem Grund plädierte die Gießener Arbeitsgruppe für die Integration aller Bereiche in ein Reproduktionsmedizinisches Zentrum, das speziell die Paarproblematik aufgreift [25].

Abschließend soll angemerkt werden, dass die vorgelegte Untersuchung zum „Sperm Retrieval“ bei der Hochrisikogruppe „Low Chance NOA“ mit der Trifokalen Makro-TESE und zusätzlicher Mikro-TESE mit 66,2% erfolgreichem „Sperm Retrieval“ sehr gute Werte erzielte. Nach der vorliegenden Auswertung war die Trifokale Makro-TESE in Kombination mit der Mikro-TESE besonders erfolgreich.

## **6. Zusammenfassung**

### **6.1. Deutsch**

Am Standort Gießen bestand ein chirurgischer Konsens darüber, dass eine Trifokale Makro-TESE bei der Diagnose NOA durchgeführt werden sollte. Nach der internationalen Einführung der Mikro-TESE, die zu einer Verbesserung des „Sperm Retrievals“ bei NOA führen sollte, folgte ein sprunghafter Anstieg an Zuweisungspatienten am Standort Gießen, an dem diese mikrochirurgische Technik etabliert und jede zusätzliche Mikro-TESE eine weitere Chance für ein erfolgreicheres „Sperm Retrieval“ bieten sollte.

Ziel der Arbeit war eine Optimierung der Patientenauswahl, Implementierung der chirurgischen Technik und vergleichende Beurteilung zwischen Makro- und Mikro-TESE.

Die Gießener Arbeitsgruppe hat dazu beim Überweisungskollektiv von 182 Patienten zur TESE eine entsprechende subtile Diagnostik zwecks Optimierung der Patientenauswahl eingeführt. Bei 32 Patienten fand sich keine Azoospermie bei wiederholter Ejakulatanalyse, 59 Patienten wurden mit einem obstruktiven Faktor assoziiert. Bei 8 beziehungsweise 2 Patienten lag eine Kongenitale Bilaterale Aplasie des Vas Deferens (CBAVD) und ein zentraler Verschluss vor. Bei 26 Patienten wurde eine gemischte Azoospermie diagnostiziert, das heißt, neben einem testikulären Schaden lag auch der Verdacht auf eine obstruktive Azoospermie vor.

Zur vergleichenden Beurteilung des „Sperm Retrieval“ wurden 65 Patienten einer „Low Chance NOA“ Gruppe nach Tüttelmann zugeordnet, das heißt mit gesicherter testikulärer Azoospermie, mit einem erhöhtem FSH-Serumspiegel über 12,4 IU/l und einem geringem Hodenvolumen unter 8ml für beide Hoden.

Die Gießener Arbeitsgruppe nutzte als chirurgisches Standardverfahren eine Trifokale Makro-TESE aus oberem, mittlerem und unterem Hodenpol am lateralen freien Gefäßrand. Ergänzt wurde dies um eine mikrochirurgische Erweiterung der mittlerern Inzision, die sogenannte Mikro-TESE. Ziel war unterschiedliche „Sperm Retrieval“ Raten für die Makro- versus Mikro-TESE intraindividuell vergleichen zu können.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob der Einsatz der Mikro-TESE im Trifokalen Makro-TESE Konzept die Ausbeute des „Sperm Retrieval“ verbessern könnte.

Wie erwartet wurden bei der Trifokalen Makro-TESE signifikant mehr auswertbare Hodentubuli im Vergleich zur Mikro-TESE gefunden. Jedoch war die Anzahl auswertbarer Tubuli mit mindestens einer elongierten Spermatische bei der Mikro-TESE signifikant höher als bei der Trifokalen Makro-TESE. Auch der Bergmann/Kliesch Score war bei der Mikro-TESE signifikant höher als bei der Trifokalen Makro-TESE.

Bei der Analyse des „Sperm Retrievals“ erwies sich nur die Kombination aus Trifokaler-Makro-TESE plus Mikro-TESE als statistisch nachweisbar besser im Vergleich zur Unifokalen-Makro-TESE.

Die vorgelegte Untersuchung zum „Sperm Retrieval“ erzielte in der Hochrisikogruppe „Low Chance NOA“ bei der Trifokalen Makro-TESE und zusätzlicher Mikro-TESE mit 66,2% erfolgreichem „Sperm Retrieval“ sehr gute Werte. Damit war die Trifokale Makro-TESE in Kombination mit der Mikro-TESE besonders erfolgreich.

## **6.2. Englisch**

At the Giessen site, there was a surgical consensus that trifocal macro-TESE should be performed for the diagnosis of NOA. After the international introduction of micro-TESE, which was supposed to lead to an improvement in sperm retrieval in NOA, a surge in referral patients followed at the Giessen site, where this microsurgical technique was to be established and each additional micro-TESE was to provide a further opportunity for more successful sperm retrieval.

The aim of the work was to optimise patient selection, implementation of the surgical technique and comparative assessment between macro- and micro-TESE.

To this end, the Giessen working group introduced appropriate subtle diagnostics in the referral collective of 182 patients for TESE in order to optimise patient selection. In 32 patients, no azoospermia was found on repeated ejaculate analysis, 59 patients were associated with an obstructive factor. Congenital Bilateral Aplasia of the Vas Deferens (CBAVD) and central obstruction were present in 8 and 2 patients, respectively. In 26 patients, mixed azoospermia was diagnosed, that means in addition to testicular damage, obstructive azoospermia was also suspected.

For the comparative assessment of sperm retrieval, 65 patients were assigned to a "low chance NOA" group according to Tüttelmann, that means with confirmed testicular azoospermia, with an elevated FSH serum level above 12.4 IU/l and a low testicular volume below 8ml for both testes.

The Giessen working group used a trifocal macro-TESE from the upper, middle and lower testicular pole at the lateral free vascular margin as a standard surgical procedure. This was supplemented by a microsurgical extension of the middle incision, the so-called micro-TESE. The aim was to compare different sperm retrieval rates for macro- versus micro-TESE intraindividually.

In addition, it was to be investigated whether the use of micro-TESE in the trifocal macro-TESE concept could improve the yield of sperm retrieval.

As expected, significantly more evaluable testicular tubules were found with trifocal macro-TESE compared to micro-TESE. However, the number of evaluable tubules with at least one elongated spermatid was significantly higher in micro-TESE than in trifocal macro-TESE. The Bergmann/Kliesch score was also significantly higher for micro-TESE than for trifocal macro-TESE.

In the analysis of the sperm retrieval, only the combination of trifocal macro-TESE plus micro-TESE proved to be statistically demonstrably better compared to unifocal macro-TESE.

The presented study on sperm retrieval achieved very good values in the high-risk group "low chance NOA" with trifocal macro-TESE and additional micro-TESE with 66.2% successful sperm retrieval. This means that trifocal macro-TESE in combination with micro-TESE was particularly successful.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AUC	Area Under the Curve
AZF	AZoospermieFaktor
CBAVD	Congenital Bilateral Aplasia of the Vas Deferens
EAA	European Academy of Andrology
EAU	European Association of Urology
ESAU	EAU Section Andrological Urology
FSH	FollikelStimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICSI	IntraCytoplasmic Sperm Injection
IHH	Isolierter Hypogonadaler Hypogonadismus
IVF	In-Vitro-Fertilisation
KS	Klinefelter Syndrom
LH	Luteinisierendes Hormon
MESA	Mikrochirurgische Epididymale SpermatozoenAspiration
NNT	Number Needed to Treat
NOA	Non-Obstruktive Azoospermie
OA	Obstruktive Azoospermie
OP	OPeration
PESA	Perkutane Epididymale SpermatozoenAspiration
PLAP	PLazentare Alkalische Phosphatase
ROC	Receiver Operating Characteristic
SCO	Sertoli Cell-Only syndrom
TESA	TEstikuläre SpermatozoenAspiration
TESE	TEstikuläre SpermatozoenExtraktion
TEFNA	TEsticular Fine Needle Aspiration
TIN	Testikuläre Intraepitheliale Neoplasie
TRUS	TRansrektaler UltraSchall
WHO	World Health Organisation

## **8. Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1 Klinische Vorgehensweise Azoospermie**

**Abbildung 2 Varikozele links: Füllung der Venen unter Valsalvabedingungen im Stehen**

**Abbildung 3 Orchidometer nach Prader**

**Abbildung 4**

- a Sonographische Bestimmung des Hodenvolumens**
- b Sonographische Bestimmung des Nebenhodenvolumens**

**Abbildung 5 Sonographie des Nebenhodens mit verdicktem Nebenhodenkopf**

**Abbildung 6**

- a Farbduplexsonographie einer Varikozele mit venösem Reflux**
- b Sonographischer Nachweis von erweiterten Plexusvenen**

**Abbildung 7**

- a TRansrektaler UltraSchall (TRUS) mit Prostatazyste**
- b TRansrektaler UltraSchall (TRUS) mit Volumetrie der Prostatazyste**
- c TRansrektaler UltraSchall (TRUS) der Prostata ohne zystische Veränderung**

**Abbildung 8 TRansrektaler UltraSchall der Bläschendrüse ohne zystische Veränderung**

**Abbildung 9**

- a Trifokale Makro-TESE mit Gewebeentnahme an der mittleren Inzision**
- b Biopsieentnahmestellen analog der septalen Hodenmorphologie und Gefäßarchitektur**

**Abbildung 10** Erweiterte mittlere Inzision: Zustand vor Mikro-TESE

**Abbildung 11** Vaskuläre Struktur des Hodenparenchyms in mikroskopischer Darstellung (blauer Pfeil) mit vergrößerten weißlich-opaken Hodentubuli (gelbe Pfeile)  
(x 25 Vergrößerung)

**Abbildung 12** Biopsieentnahme Mikro-TESE  
Hochgezogener Tubulus an Pinzette

**Abbildung 13** Dreiteilige Aufarbeitung des testikulären Biopsiematerials

## **9. Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1</b>	<b>Spermiogramm: Urologisch-Andrologisches Labor</b>
<b>Tabelle 2</b>	<b>Klassifikation der Spermatogeneseveränderungen</b>
<b>Tabelle 3</b>	<b>Hodenbiopsiebericht</b>
<b>Tabelle 4</b>	<b>Überweisungskollektiv zur TESE bei auswärtiger Verdachtsdiagnose Azoospermie mit testikulärem Faktor</b>
<b>Tabelle 5</b>	<b>Klinische Risikofaktoren der Azoospermie in der Studiengruppe „Low Chance NOA“</b>
<b>Tabelle 6</b>	<b>Häufigkeit der histologischen Befunde, mit gleichen Diagnosen in allen biopsierten Arealen</b>
<b>Tabelle 7</b>	<b>Anzahl auswertbarer Tubuli</b>
<b>Tabelle 8</b>	<b>Anzahl auswertbarer Tubuli mit mindestens einer elongierten Spermamide</b>
<b>Tabelle 9</b>	<b>Vergleich des Bergmann/Kliesch Scores zwischen den biopsierten Arealen</b>
<b>Tabelle 10</b>	<b>Vergleich des Bergmann/Kliesch Scores zwischen mikroskopisch und makroskopisch gewonnenen Biopsien</b>
<b>Tabelle 11</b>	<b>„Sperm Retrieval“ abhängig von den verschiedenen chirurgischen Vorgehensweisen</b>
<b>Tabelle 12</b>	<b>Serum FSH: Analyse der ROC (Receiver Operating Characteristic) Kurve</b>

**Tabelle 13 Hodenvolumen: Analyse der ROC (Receiver Operating Characteristic) Kurve**

**Tabelle 14 Postoperative Komplikationen**

## 10. Literaturverzeichnis

1. Howards, S.S., *Antoine van Leeuwenhoek and the discovery of sperm*. Fertil Steril, 1997. **67**(1): p. 16-7.
2. WHO, *WHO Manual for the Standardized Investigation Diagnosis and Management of the Infertile Male*. 2000, Cambridge UK: Cambridge University Press.
3. Palermo, G., H. Joris, P. Devroey, and A.C. Van Steirteghem, *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*. Lancet, 1992. **340**(8810): p. 17-8.
4. Devroey, P., J. Liu, Z. Nagy, H. Tournaye, S.J. Silber, and A.C. Van Steirteghem, *Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 1994. **62**(3): p. 639-41.
5. Schoysman, R., P. Vanderzwalmen, M. Nijs, L. Segal, G. Segal-Bertin, L. Geerts, E. van Rosendaal, and D. Schoysman, *Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa*. Lancet, 1993. **342**(8881): p. 1237.
6. Craft, I., V. Bennett, and N. Nicholson, *Fertilising ability of testicular spermatozoa*. Lancet, 1993. **342**(8875): p. 864.
7. Zegers-Hochschild, F., G.D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, and S. Vanderpoel, *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. Fertil Steril, 2009. **92**(5): p. 1520-4.
8. Dohle, G.R., G.M. Colpi, T.B. Hargreave, G.K. Papp, A. Jungwirth, and W. Weidner, *EAU guidelines on male infertility*. Eur Urol, 2005. **48**(5): p. 703-11.
9. Jungwirth, A., Diemer, T., Kopa, Z., Krausz, C., Tournaye, H., *EAU Guidelines on Male Infertility*. 2019, Arnhem: EAU Guidelines Office.
10. Tournaye, H., C. Krausz, and R.D. Oates, *Concepts in diagnosis and therapy for male reproductive impairment*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017. **5**(7): p. 554-564.
11. Pan, M.M., M.S. Hockenberry, E.W. Kirby, and L.I. Lipshultz, *Male Infertility Diagnosis and Treatment in the Era of In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection*. Med Clin North Am, 2018. **102**(2): p. 337-347.
12. Eisenberg, M.L., R.B. Lathi, V.L. Baker, L.M. Westphal, A.A. Milki, and A.K. Nangia, *Frequency of the male infertility evaluation: data from the national survey of family growth*. J Urol, 2013. **189**(3): p. 1030-4.
13. Weidner, W., Diemer, Th., Wagenlehner, F.M.E., *Male infertility in chronic urogenital infections and inflammation with special reference to ejaculate findings*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Björndahl, Giwercman, A., Tournaye, H., Weidner, W., Editor. 2010, Informa healthcare: New York, London. p. 293-300.
14. WHO, *Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Vol. 5. 2010, Geneva WHO. 271.
15. WHO, *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Vol. 6. 2021, Geneva: WHO.

16. Haidl, G., Krause, W., *Untersuchungen des Ejakulates nach Zentrifugation*. Andrologie Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane, ed. W. Krause, Weidner, W. Vol. 3. 1998, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag. p. 75-95.
17. Krausz, C., *Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. **25**(2): p. 271-85.
18. Belker, A.M., A.J. Thomas, Jr., E.F. Fuchs, J.W. Konnak, and I.D. Sharlip, *Results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group*. J Urol, 1991. **145**(3): p. 505-11.
19. Schroeder-Printzen, I., M. Ludwig, F. Köhn, and W. Weidner, *Surgical therapy in infertile men with ejaculatory duct obstruction: technique and outcome of a standardized surgical approach*. Hum Reprod, 2000. **15**(6): p. 1364-8.
20. Oates, R.D. and J.A. Amos, *The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis*. J Androl, 1994. **15**(1): p. 1-8.
21. Schroeder-Printzen, I., J. Zumbé, L. Bispink, S. Palm, U. Schneider, U. Engelmann, and W. Weidner, *Microsurgical epididymal sperm aspiration: aspirate analysis and straws available after cryopreservation in patients with non-reconstructable obstructive azoospermia*. MESA/TESE Group Giessen. Hum Reprod, 2000. **15**(12): p. 2531-5.
22. Pantke, P., T. Diemer, M. Marconi, M. Bergmann, K. Steger, H.-C. Schuppe, and W. Weidner, *Testicular Sperm Retrieval in Azoospermic Men*. European Urology Supplements, 2008. **7**(12): p. 703-714.
23. Schroeder-Printzen, I., T. Diemer, and W. Weidner, *Vasovasostomy*. Urol Int, 2003. **70**(2): p. 101-7.
24. Diemer, T., A. Hauptmann, and W. Weidner, *[Treatment of azoospermia: surgical sperm retrieval (MESA, TESE, micro-TESE)]*. Urologe A, 2011. **50**(1): p. 38-46.
25. Weidner, W.H.G., H.-C. Schuppe, A. Pilatz, B. Altinkilic, and T. Diemer, *Sperm Cells for Artificial Reproduction and Germ Cell Transplantation*. European Urology Supplements, 2014. **13**(4): p. 83-88.
26. Levine, L.A. and E.W. Lisek, *Successful sperm retrieval by percutaneous epididymal and testicular sperm aspiration*. J Urol, 1998. **159**(2): p. 437-40.
27. Bergmann, M., *Spermatogense*. Andrologie Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane, ed. W. Krause, Weidner, W. Vol. 3. 1998, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag. p. 9-14.
28. Abdel Raheem, A., G. Garaffa, N. Rushwan, F. De Luca, E. Zacharakis, T. Abdel Raheem, A. Freeman, P. Serhal, J.C. Harper, and D. Ralph, *Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia*. BJU Int, 2013. **111**(3): p. 492-9.
29. Colpi, G.M., Piedeferro, G., Scropo, F.J., Colpi, E.M, Sulpizio, M. , *Surgery for male infertility: surgical sperm retrievals*. Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines, ed. L. Björndal, Giwercman, A., Tournaye, J., Weidner, W. 2010, New York: Informa Healthcare. p. 95-104.
30. Jensen, C.F., D.A. Ohl, M.R. Hiner, M. Fode, T. Shah, G.D. Smith, and J. Sonksen, *Multiple needle-pass percutaneous testicular sperm aspiration as first-line treatment in azoospermic men*. Andrology, 2016. **4**(2): p. 257-62.
31. Corona, G., A. Pizzocaro, F. Lanfranco, A. Garolla, F. Pelliccione, L. Vignozzi, A. Ferlin, C. Foresta, E.A. Jannini, M. Maggi, A. Lenzi, D. Pasquali, and S.

- Francavilla, *Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2017. **23**(3): p. 265-275.
32. Forti, G., G. Corona, L. Vignozzi, C. Krausz, and M. Maggi, *Klinefelter's syndrome: a clinical and therapeutical update*. Sex Dev, 2010. **4**(4-5): p. 249-58.
  33. Hopps, C.V., A. Mielnik, M. Goldstein, G.D. Palermo, Z. Rosenwaks, and P.N. Schlegel, *Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions*. Hum Reprod, 2003. **18**(8): p. 1660-5.
  34. Skakkebaek, N.E., E. Rajpert-De Meyts, and K.M. Main, *Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects*. Hum Reprod, 2001. **16**(5): p. 972-8.
  35. Sigman, M., *Varicoceles and treatment of infertility--have we made any progress?* J Urol, 2012. **187**(1): p. 13-4.
  36. Ghanem, M., N.I. Bakr, M.A. Elgayaar, S. El Mongy, H. Fathy, and A.H. Ibrahim, *Comparison of the outcome of intracytoplasmic sperm injection in obstructive and non-obstructive azoospermia in the first cycle: a report of case series and meta-analysis*. Int J Androl, 2005. **28**(1): p. 16-21.
  37. Amer, M., A. Ateyah, R. Hany, and W. Zohdy, *Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: follow-up by serial ultrasound examinations*. Hum Reprod, 2000. **15**(3): p. 653-6.
  38. Mulhall, J.P., S.W. Ghaly, N. Aviv, and A. Ahmed, *The utility of optical loupe magnification for testis sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia*. J Androl, 2005. **26**(2): p. 178-81.
  39. Ghalayini, I.F., M.A. Al-Ghazo, O.B. Hani, R. Al-Azab, I. Bani-Hani, F. Zayed, and Y. Haddad, *Clinical comparison of conventional testicular sperm extraction and microdissection techniques for non-obstructive azoospermia*. J Clin Med Res, 2011. **3**(3): p. 124-31.
  40. Turunc, T., U. Gul, B. Haydardedeoglu, N. Bal, B. Kuzgunbay, L. Peskircioglu, and H. Ozkardes, *Conventional testicular sperm extraction combined with the microdissection technique in nonobstructive azoospermic patients: a prospective comparative study*. Fertil Steril, 2010. **94**(6): p. 2157-60.
  41. Schwarzer, J.U., H. Steinfatt, M. Schleyer, F.M. Köhn, K. Fiedler, I. von Hertwig, G. Krüsmann, and W. Würfel, *No relationship between biopsy sites near the main testicular vessels or rete testis and successful sperm retrieval using conventional or microdissection biopsies in 220 non-obstructive azoospermic men*. Asian J Androl, 2013. **15**(6): p. 795-8.
  42. Diemer, T., I. Schroeder-Printzen, and W. Weidner, *[Surgical sperm retrieval]*. Urologe A, 2007. **46**(7): p. 789-98; quiz 799.
  43. Colpi, G.M., E.M. Colpi, G. Piediferro, D. Giacchetta, G. Gazzano, F.M. Castiglioni, M.C. Magli, and L. Gianaroli, *Microsurgical TESE versus conventional TESE for ICSI in non-obstructive azoospermia: a randomized controlled study*. Reprod Biomed Online, 2009. **18**(3): p. 315-9.
  44. Schlegel, P.N., *Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision*. Hum Reprod, 1999. **14**(1): p. 131-5.
  45. Marconi, M., A. Keudel, T. Diemer, M. Bergmann, K. Steger, H.C. Schuppe, and W. Weidner, *Combined trifocal and microsurgical testicular sperm extraction is*

- the best technique for testicular sperm retrieval in "low-chance" nonobstructive azoospermia.* Eur Urol, 2012. **62**(4): p. 713-9.
46. Vernaeye, V., Tournaye, H., *Assisted reproduction with surgically retrieved sperm*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Björndahl, Giwercman, A., Tournaye, H., Weidner, W., Editor. 2010, Informa Healthcare: New York, London. p. 116-123.
  47. Tsujimura, A., K. Matsumiya, Y. Miyagawa, A. Tohda, H. Miura, K. Nishimura, M. Koga, M. Takeyama, H. Fujioka, and A. Okuyama, *Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study.* Hum Reprod, 2002. **17**(11): p. 2924-9.
  48. Ramasamy, R. and P.N. Schlegel, *Microdissection testicular sperm extraction: effect of prior biopsy on success of sperm retrieval.* J Urol, 2007. **177**(4): p. 1447-9.
  49. Van Peperstraten, A., M.L. Proctor, N.P. Johnson, and G. Philipson, *Techniques for surgical retrieval of sperm prior to intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) for azoospermia.* Cochrane Database Syst Rev, 2008. **2008**(2): p. Cd002807.
  50. Tüttelmann, F., F. Werny, T.G. Cooper, S. Kliesch, M. Simoni, and E. Nieschlag, *Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy.* Int J Androl, 2011. **34**(4): p. 291-8.
  51. Krause, W., Weidner, W., *Anamnese und klinische Untersuchung*, in *Andrologie Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, W. Krause, Weidner, W., Editor. 1998, Ferdinand Enke Verlag: Stuttgart. p. 50-56.
  52. Weidner, W., *Bildgebende Diagnostik*, in *Andrologie Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, W. Krause, Weidner, W., Editor. 1998, Ferdinand Enke Verlag: Stuttgart. p. 56-65.
  53. Dohle, G., *Clinical investigation of the infertile male*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Björndahl, Giwercman, A., Tournaye, J., Weidner, W., Editor. 2010, Informa Healthcare: New York, London. p. 9-17.
  54. Pierik, F.H., G.R. Dohle, J.M. van Muiswinkel, J.T. Vreeburg, and R.F. Weber, *Is routine scrotal ultrasound advantageous in infertile men?* J Urol, 1999. **162**(5): p. 1618-20.
  55. Pilatz, A., B. Altinkilic, E. Köhler, M. Marconi, and W. Weidner, *Color Doppler ultrasound imaging in varicoceles: is the venous diameter sufficient for predicting clinical and subclinical varicocele?* World J Urol, 2011. **29**(5): p. 645-50.
  56. Colpi, G.M., L. Negri, R.E. Nappi, and B. Chinea, *Is transrectal ultrasonography a reliable diagnostic approach in ejaculatory duct sub-obstruction?* Hum Reprod, 1997. **12**(10): p. 2186-91.
  57. Cooper, T.G., B. Hellenkemper, J. Jonckheere, N. Callewaert, A.J. Grootenhuis, W.M. Kersemaekers, A. Leung, and C. Wang, *Azoospermia: virtual reality or possible to quantify?* J Androl, 2006. **27**(4): p. 483-90.
  58. Björndahl, L., *Basic semen analysis and laboratory quality for clinicians*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Björndahl, Giwercman, A., Tournaye, H., Weidner, W., Editor. 2010, Informa health care: New York, London. p. 28-38.
  59. Zitzmann, M., *Androgen effects in reproductive and nonreproductive organs*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Björndahl, Giwercman, A.,

- Tournaye, H., Weidner, W., Editor. 2010, Informa Healthcare: New York, London. p. 216-225.
60. Arver, S., *Testosterone deficiency syndrome*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Björndahl, Giwercman, A., Tournaye, H., Weidner, W., Editor. 2010, Informa Healthcare: New York, London. p. 260-268.
  61. Wang, C., E. Nieschlag, R. Swerdloff, H.M. Behre, W.J. Hellstrom, L.J. Gooren, J.M. Kaufman, J.J. Legros, B. Lunenfeld, A. Morales, J.E. Morley, C. Schulman, I.M. Thompson, W. Weidner, and F.C. Wu, *ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations: investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males*. *Int J Impot Res*, 2009. **21**(1): p. 1-8.
  62. Steger, K., J. Wilhelm, L. Konrad, T. Stalf, R. Greb, T. Diemer, S. Kliesch, M. Bergmann, and W. Weidner, *Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men*. *Hum Reprod*, 2008. **23**(1): p. 11-6.
  63. Bergmann, M., Kliesch, S., *Hodenbiopsie*, in *Andrologie Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, W. Krause, Weidner, W., Editor. 1998, Ferdinand Enke Verlag: Stuttgart. p. 66-71.
  64. McLachlan, R.I., E. Rajpert-De Meyts, C.E. Hoei-Hansen, D.M. de Kretser, and N.E. Skakkebaek, *Histological evaluation of the human testis--approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review*. *Hum Reprod*, 2007. **22**(1): p. 2-16.
  65. Salzbrunn, A., D.M. Benson, A.F. Holstein, and W. Schulze, *A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI)*. *Hum Reprod*, 1996. **11**(4): p. 752-5.
  66. Lotti, F., F. Frizza, G. Balercia, A. Barbonetti, H.M. Behre, A.E. Calogero, J.F. Cremers, F. Francavilla, A.M. Isidori, S. Kliesch, S. La Vignera, A. Lenzi, M. Marcou, A. Pilatz, O. Poolamets, M. Punab, M.F. Peraza Godoy, O. Rajmil, G. Salvio, O. Shaeer, W. Weidner, E. Maseroli, S. Cipriani, E. Baldi, S. Degl'Innocenti, G. Danza, A.L. Caldini, A. Terreni, L. Boni, C. Krausz, and M. Maggi, *The European Academy of Andrology (EAA) ultrasound study on healthy, fertile men: clinical, seminal and biochemical characteristics*. *Andrology*, 2020. **8**(5): p. 1005-1020.
  67. Cooper, T.G., W. Weidner, and E. Nieschlag, *The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alpha-glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid*. *Int J Androl*, 1990. **13**(5): p. 329-36.
  68. Kopa, Z., Berényi, M., *Inflammatory parameters of the ejaculate*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Björndahl, Giwercman, A., Tournaye, H., Weidner, W., Editor. 2010, Informa Healthcare: New York, London. p. 301-308.
  69. Gudeman, S.R., B. Townsend, K. Fischer, R.C. Walters, and D. Crain, *Etiology of azoospermia in a military population*. *J Urol*, 2015. **193**(4): p. 1318-21.
  70. Schlegel, P.N., *The role of varicocele repair in nonobstructive azoospermia must be evaluated with controlled trials rather than observational studies*. *Fertil Steril*, 2011. **95**(2): p. 486.

71. KLINEFELTER, H.F., JR., E.C. REIFENSTEIN, JR., and F. ALBRIGHT, JR., *Syndrome Characterized by Gynecomastia, Aspermatogenesis without A-Leydigism, and Increased Excretion of Follicle-Stimulating Hormone*<sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1942. **2**(11): p. 615-627.
72. Bonomi, M., V. Rochira, D. Pasquali, G. Balercia, E.A. Jannini, and A. Ferlin, *Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism*. *J Endocrinol Invest*, 2017. **40**(2): p. 123-134.
73. Zitzmann, M., L. Aksglaede, G. Corona, A.M. Isidori, A. Juul, G. T'Sjoen, S. Kliesch, K. D'Hauwers, J. Toppari, J. Słowikowska-Hilczler, F. Tüttelmann, and A. Ferlin, *European academy of andrology guidelines on Klinefelter Syndrome Endorsing Organization: European Society of Endocrinology*. *Andrology*, 2021. **9**(1): p. 145-167.
74. Lanfranco, F., A. Kamischke, M. Zitzmann, and E. Nieschlag, *Klinefelter's syndrome*. *Lancet*, 2004. **364**(9430): p. 273-83.
75. Bryson, C.F., R. Ramasamy, M. Sheehan, G.D. Palermo, Z. Rosenwaks, and P.N. Schlegel, *Severe testicular atrophy does not affect the success of microdissection testicular sperm extraction*. *J Urol*, 2014. **191**(1): p. 175-8.
76. Okada, H., K. Goda, Y. Yamamoto, N. Sofikitis, I. Miyagawa, Y. Mio, M. Koshida, and S. Horie, *Age as a limiting factor for successful sperm retrieval in patients with nonmosaic Klinefelter's syndrome*. *Fertil Steril*, 2005. **84**(6): p. 1662-4.
77. Takihara, H., J. Sakatoku, M. Fujii, T. Nasu, M.J. Cosentino, and A.T. Cockett, *Significance of testicular size measurement in andrology. I. A new orchimeter and its clinical application*. *Fertil Steril*, 1983. **39**(6): p. 836-40.
78. Takihara, H., M.J. Cosentino, J. Sakatoku, and A.T. Cockett, *Significance of testicular size measurement in andrology: II. Correlation of testicular size with testicular function*. *J Urol*, 1987. **137**(3): p. 416-9.
79. Lenz, S., A. Giwercman, A. Elsborg, K.H. Cohr, J.E. Jelnes, E. Carlsen, and N.E. Skakkebaek, *Ultrasonic testicular texture and size in 444 men from the general population: correlation to semen quality*. *Eur Urol*, 1993. **24**(2): p. 231-8.
80. Sakamoto, H., Y. Ogawa, and H. Yoshida, *Relationship between testicular volume and testicular function: comparison of the Prader orchidometric and ultrasonographic measurements in patients with infertility*. *Asian J Androl*, 2008. **10**(2): p. 319-24.
81. Corona, G., S. Minhas, A. Giwercman, C. Bettocchi, M. Dinkelman-Smit, G. Dohle, F. Fusco, A. Kadioglou, S. Kliesch, Z. Kopa, C. Krausz, F. Pelliccione, A. Pizzocaro, J. Rassweiler, P. Verze, L. Vignozzi, W. Weidner, M. Maggi, and N. Sofikitis, *Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis*. *Hum Reprod Update*, 2019. **25**(6): p. 733-757.
82. Bromage, S.J., D.A. Falconer, B.A. Lieberman, V. Sangar, and S.R. Payne, *Sperm retrieval rates in subgroups of primary azoospermic males*. *Eur Urol*, 2007. **51**(2): p. 534-9; discussion 539-40.
83. Behre, H.M., Nieschlag, E., *Endokrine Regulation der Hodenfunktion und endokrinologische Labordiagnostik*, in *Andrologie Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, W. Krause, Weidner, W., Editor. 1998, Ferdinand Enke Verlag: Stuttgart. p. 101-107.

84. Bergmann, M., H.M. Behre, and E. Nieschlag, *Serum FSH and testicular morphology in male infertility*. Clin Endocrinol (Oxf), 1994. **40**(1): p. 133-6.
85. Ramasamy, R., K. Lin, L.V. Gosden, Z. Rosenwaks, G.D. Palermo, and P.N. Schlegel, *High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia does not affect success of microdissection testicular sperm extraction*. Fertil Steril, 2009. **92**(2): p. 590-3.
86. Mitchell, V., G. Robin, F. Boitrelle, P. Massart, C. Marchetti, F. Marcelli, and J.M. Rigot, *Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels*. Int J Androl, 2011. **34**(4): p. 299-305.
87. Boitrelle, F., G. Robin, F. Marcelli, M. Albert, B. Leroy-Martin, D. Dewailly, J.M. Rigot, and V. Mitchell, *A predictive score for testicular sperm extraction quality and surgical ICSI outcome in non-obstructive azoospermia: a retrospective study*. Hum Reprod, 2011. **26**(12): p. 3215-21.
88. Zitzmann, M., V. Nordhoff, V. von Schönfeld, A. Nordsiek-Mengede, S. Kliesch, A.N. Schüring, C.M. Luetjens, A. Kamischke, T. Cooper, M. Simoni, and E. Nieschlag, *Elevated follicle-stimulating hormone levels and the chances for azoospermic men to become fathers after retrieval of elongated spermatids from cryopreserved testicular tissue*. Fertil Steril, 2006. **86**(2): p. 339-47.
89. Tsujimura, A., K. Matsumiya, Y. Miyagawa, T. Takao, K. Fujita, M. Koga, M. Takeyama, H. Fujioka, and A. Okuyama, *Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia*. J Urol, 2004. **172**(5 Pt 1): p. 1944-7.
90. Li, H., L.P. Chen, J. Yang, M.C. Li, R.B. Chen, R.Z. Lan, S.G. Wang, J.H. Liu, and T. Wang, *Predictive value of FSH, testicular volume, and histopathological findings for the sperm retrieval rate of microdissection TESE in nonobstructive azoospermia: a meta-analysis*. Asian J Androl, 2018. **20**(1): p. 30-36.
91. Tournaye, H., *IVF and ICSI for treating male infertility*, in *Clinical Andrology EAU/ESAU Course Guidelines*, L. Björndahl, Giwercman, A., Tournaye, H., Weidner, W., Editor. 2010, Informa Healthcare: New York, London. p. 79-84.
92. Weidner, W., G.M. Colpi, T.B. Hargreave, G.K. Papp, J.M. Pomerol, and C. Ghosh, *EAU guidelines on male infertility*. Eur Urol, 2002. **42**(4): p. 313-22.
93. Al-Malki, A.H., K. Alrabeeah, E. Mondou, V. Brochu-Lafontaine, S. Phillips, and A. Zini, *Testicular sperm aspiration (TESA) for infertile couples with severe or complete asthenozoospermia*. Andrology, 2017. **5**(2): p. 226-231.
94. Bergmann, M., Kliesch, S., *Testicular biopsy and histology*, in *Andrology*, E. Nieschlag, Behre, HM, Nieschlag, S., Editor. 2010: Heidelberg. p. 155-167.
95. Hauser, R., A. Botchan, A. Amit, D. Ben Yosef, R. Gamzu, G. Paz, J.B. Lessing, L. Yogev, and H. Yavetz, *Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia--is it necessary?* Hum Reprod, 1998. **13**(11): p. 3081-5.
96. Amer, M., S.E. Hagggar, T. Moustafa, T. Abd El-Naser, and W. Zohdy, *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): p. 3030-4.
97. Deruyver, Y., D. Vanderschueren, and F. Van der Aa, *Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: a systematic review*. Andrology, 2014. **2**(1): p. 20-4.

98. Ramasamy, R., E.S. Fisher, J.A. Ricci, R.A. Leung, and P.N. Schlegel, *Duration of microdissection testicular sperm extraction procedures: relationship to sperm retrieval success*. J Urol, 2011. **185**(4): p. 1394-7.
99. Kalsi, J., M.Y. Thum, A. Muneer, H. Abdullah, and S. Minhas, *In the era of microdissection sperm retrieval (m-TESE) is an isolated testicular biopsy necessary in the management of men with non-obstructive azoospermia?* BJU Int, 2012. **109**(3): p. 418-24.
100. Song, S.H., *It is time for a more standardized approach to identifying surgical outcome of non-obstructive azoospermia*. Andrology, 2017. **5**(3): p. 401-402.
101. Anderson, R.E. and J.M. Hotaling, *Inherent difficulties of meta-analysis for surgical techniques in male infertility: an argument for standardizing reporting and outcomes*. Fertil Steril, 2015. **104**(5): p. 1127-8.
102. Jensen, C.F., J.M. Dupree, J. Sonksen, D. Ohl, and J.M. Hotaling, *A call for standardized outcomes in microTESE*. Andrology, 2017. **5**(3): p. 403.
103. Carrell, D.T. and M. Simoni, *Big clinical problem, big advancement, big questions to still address: the status of microTESE*. Andrology, 2017. **5**(3): p. 399-400.
104. Altinkilic, B., A. Pilatz, T. Diemer, J. Wolf, M. Bergmann, S. Schönbrunn, U. Ligges, H.C. Schuppe, and W. Weidner, *Prospective evaluation of scrotal ultrasound and intratesticular perfusion by color-coded duplex sonography (CCDS) in TESE patients with azoospermia*. World J Urol, 2018. **36**(1): p. 125-133.
105. van Brakel, J., S.M. de Muinck Keizer-Schrama, N.J. van Casteren, F.W. Hazebroek, and G.R. Dohle, *Scrotal ultrasound findings in previously congenital and acquired unilateral undescended testes and their contralateral normally descended testis*. Andrology, 2015. **3**(5): p. 888-94.
106. Pilatz, A., J. Kilb, H. Kaplan, D. Fietz, H. Hossain, C.G. Schüttler, T. Diemer, M. Bergmann, E. Domann, W. Weidner, F. Wagenlehner, and H.C. Schuppe, *High prevalence of urogenital infection/inflammation in patients with azoospermia does not impede surgical sperm retrieval*. Andrologia, 2019. **51**(10): p. e13401.
107. Rogenhofer, N., T. Dansranjavin, M. Schorsch, A. Spiess, H. Wang, V. von Schönfeldt, H. Cappallo-Obermann, V. Baukloh, H. Yang, A. Paradowska, B. Chen, C.J. Thaler, W. Weidner, H.C. Schuppe, and K. Steger, *The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme*. Hum Reprod, 2013. **28**(4): p. 969-78.
108. Cavalcanti, M.C., C. Steilmann, K. Failing, M. Bergmann, S. Kliesch, W. Weidner, and K. Steger, *Apoptotic gene expression in potentially fertile and subfertile men*. Mol Hum Reprod, 2011. **17**(7): p. 415-20.

## 11. Anhang

### 11.1.

Deutsche Gesellschaft für Andrologie (DGA) e. V.  
26. Jahrestagung • Gießen, 18.-20. September 2014



## Andrologische Labordiagnostik: Spermiogramm nach WHO 2010



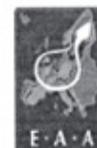
**18. September 2014**

**Hörsaal & Klinisch-andrologisches Labor  
im Gebäude der Hautklinik  
Gaffkystraße 14 • 35392 Gießen**



*Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg - Standort Gießen*

*Hessisches Zentrum für Reproduktionsmedizin  
Ausbildungszentrum der Europäischen Akademie für Andrologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen*



## Andrologische Labordiagnostik: Spermiogramm nach WHO 2010

*Interaktiver Kurs für Ärztinnen/Ärzte und Assistenzpersonal*

### **Programm**

ab 10:00	<b>Registrierung</b> (nur für den Kurs; Hörsaal Hautklinik)	
10:30	<b>Begrüßung und Einführung</b> <i>H.-C. Schuppe, Gießen</i>	
10:35	<b>Das Spermiogramm nach WHO – was, wann, wofür?</b> <i>F.R. Ochsendorf, Frankfurt</i>	
11:00	<b>Praktische Übungen zum Basis-Spermiogramm (Teil I)</b> - Team -	
11:15	<b>Cyto-morphologische Ejakulatdiagnostik – Pflicht oder Kür?</b> <i>G. Haidl, Bonn</i>	
11:35	<b>Praktische Übungen zum Basis-Spermiogramm (Teil II)</b> - Team -	
11:45	<b>QuaDeGA &amp; RiLiBÄK – Notwendiges zur Qualitätskontrolle</b> <i>B. Hellenkemper, Münster</i>	
12:05	<b>Rationelle Differentialdiagnostik bei Azoospermie</b> <i>F.-M. Köhn, München</i>	
12:25	<b>Infektions- und Entzündungsdiagnostik im Ejakulat</b> <i>A. Pilatz, Gießen</i>	
12:45-13:15	Pause - Imbiss	
13:15	<b>Praktische Übungen zum Basis-Spermiogramm (Teil III): Tipps &amp; Tricks im Labor</b> <i>T. Bloch, G. Hecker, S. Pinkl, B. Schuster &amp; K. Wilhelm, Gießen</i>	<b>Spermatologisch-diagnostisches Fallseminar</b> <i>H.-C. Schuppe, Gießen &amp; G. Haidl, Bonn</i>
	<u>Stationen 1-4 / 1. OG</u>	<u>Hörsaal</u>
14:55	Verabschiedung, Ausgabe der Zertifikate	
15:00	Ende des Seminars	

### Vorbemerkungen

Das Ejakulat stellt einen komplexen Spiegel verschiedener Funktionen des männlichen Reproduktionssystems und ihrer Störungen dar (Abb. 1). Somit kommt der Ejakulatuntersuchung eine zentrale Bedeutung bei der Diagnostik männlicher Fertilitätsstörungen zu, für die andererseits eine fundierte Erhebung der Anamnese sowie die körperliche Untersuchung, endokrine Parameter und ggf. weiterführende diagnostische Schritte unerlässlich sind.

Die Basisuntersuchung des Ejakulats, das Spermogramm, umfasst bereits zahlreiche makroskopische, mikroskopische, biochemische und immunologische Parameter (Tab. 1), die durch eine mikrobiologische Diagnostik und ggf. auch weiterführende Tests für Spermienintegrität und funktion ergänzt werden. Für die Erhebung verwertbarer Befunde ist eine Standardisierung und Qualitätssicherung der Ejakulat-Analysen sowie korrekte Beschreibung der Ergebnisse unerlässlich. Grundlage sind die im *WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates* ausführlich dargestellten Empfehlungen (WHO 2010; 5. deutschsprachige Auflage: Springer, 2012). Seit 2011 sind darüber hinaus die Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen ("RiLiBÄK") mit ihrem speziellen Teil B4 in Kraft (Mitteilungen der Bundesärztekammer 2011).

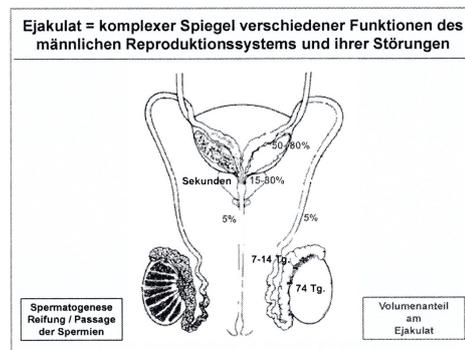


Abb. 1

Die Ejakulatanalyse dient in der Diagnostik männlicher Fertilitätsstörungen folgenden Aspekten:

- Identifizierung und Lokalisierung möglicher Ursachen
- Erfassung des Schweregrades zugrunde liegender Störungen
- Informationen zum Befruchtungspotential der Spermien
- Hinweise auf Therapieoptionen (oder auch fehlende Therapierbarkeit)

Das Spermogramm allein erlaubt allerdings keine Diagnosestellung. Begriffe wie Asthenozoospermie, Oligozoospermie oder Oligoasthenoatozoospermie (OAT) haben nur deskriptiven Charakter, wenngleich sie immer wieder als "Diagnosen" verwendet werden. Die Ursache hierfür ist unter anderem darin zu suchen, dass männlichen Fertilitätsstörungen häufig eine multifaktorielle Genese zugrunde liegt. Oligozoospermie kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Störungen bedingt sein, wie z.B. anlagebedingte (z.B. nach Hodenhochstand) oder entzündliche testikuläre Schäden, Samentransportstörungen (z.B. partielle retrograde Ejakulation) oder passagere Beeinträchtigungen der Spermatogenese (z.B. Streßfaktoren, Medikamente). Zu berücksichtigen sind auch die bereits bei gesunden, fertilen Männern nachweisbaren Schwankungen der Ejakulatqualität.

**Das Spermogramm kann und darf eine fundierte Untersuchung durch eine(n) andrologisch geschulte(n) Ärztin oder Arzt nicht ersetzen!**

### Probengewinnung

Schon im Vorfeld der Ejakulatuntersuchung sind verschiedene Aspekte zu beachten. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse sollte der Patient eine Karenzzeit von mindestens 2 bis maximal 7 Tagen einhalten. Die Ejakulatgewinnung durch Masturbation sollte diskret in geeigneten Räumlichkeiten am Untersuchungsort erfolgen können, bei häuslicher Gewinnung ist das Ejakulat innerhalb einer Stunde in einem geeigneten Transportgefäß (siehe Volumenbestimmung) körperwarm zu überbringen. Ist die Ejakulatgewinnung durch Masturbation nicht möglich, stehen nichtpermizide Spezialkondome zur Verfügung.

Mit Blick auf die erheblichen intraindividuellen Schwankungen der Ejakulatqualität sollen nach den Richtlinien der WHO mindestens zwei Ejakulate untersucht werden, wobei ein Abstand von 7-21 Tagen empfohlen wurde (WHO 1999). Unter Berücksichtigung der Kinetik der Spermatogenese und möglicher Störungen der Hodenfunktion, z.B. durch fieberhafte Infekte, hat sich andererseits ein Intervall von 4-6 Wochen bewährt, nach den derzeit gültigen Vorgaben des Gemeinsamen Bundesausschusses (G-BA) über ärztliche Maßnahmen zur künstlichen Befruchtung wird seitens der Krankenversicherungen ein Abstand von mindestens 12 Wochen gefordert.

**Bereits die Gewinnungsbedingungen können einen erheblichen Einfluss auf die Qualität des Spermas haben.**

**Tabelle 1. Wesentliche Ejakulatparameter ("Basisspermogramm")**

Ejakulatparameter	Konsensus-basierte Normwerte*	Untere Grenzwerte fertiler Männer <sup>#</sup> 5. Perzentile (95% Konfidenzintervall) (WHO 2010)
Verflüssigungszeit	< 60 Min.	
Volumen		<b>1,5</b> (1,4-1,7)
pH-Wert	≥ 7.2	
Spermienkonzentration		<b>15</b> (12-16)
Gesamt-Spermienzahl		<b>39</b> (33-46)
Motilität [PR] <sup>§</sup>		<b>32</b> (31-34)
Globalmotilität [PR+NP]		<b>40</b> (38-42)
Morphologie ["strict criteria"]		<b>4</b> (3,0-4,0)
Vitalität (Eosin-Test) <sup>§</sup>		<b>58</b> (55-63)
Leukozyten	< 1 x 10 <sup>6</sup> / ml	
Membrangebundene Spermien-Antikörper (z.B. MAR-Test) <sup>§</sup>	< 50% der motilen Spermien mit anhaftenden Partikeln	

\*WHO 1999 = WHO 2010.

<sup>#</sup>Evidenz-basierte Daten aus einer Referenzpopulation fertiler Männer ("time-to-pregnancy" in der Partnerschaft ≤ 12 Monate; WHO 2010; Cooper et al. 2010).

<sup>§</sup> fakultative Tests, siehe Text.

<sup>§</sup>Bisherige Differenzierung (WHO 1999) in schnelle/ lineare progressive Beweglichkeit (≥ 25 µm/s bei 37°C) [a] bzw. langsame/ träge progressive Beweglichkeit [b] jetzt zusammengefasst als Progressivmotilität [PR]; nicht progressive Beweglichkeit (< 5 µm/s bei 37°C; bisher [c]) = [NP]; Immotilität (bisher[d]) = IM.

Tabelle 2. Praktisches Vorgehen bei der Ejakulatanalyse (WHO 2010)

In den ersten 5 Min.	Versorgung der Probe (Raumtemp. oder 37 °C)
Zwischen 30 und 60 Min.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Makroskopische Beurteilung</li> <li>• Nativpräparate zur mikroskopischen Beurteilung /</li> <li>• Abschätzen der Verdünnung zur Messung der Konzentration</li> <li>• Bestimmung der Spermien-Motilität</li> <li>• Bestimmung der Spermien-Vitalität (<i>fakultativ</i>)</li> <li>• Anfertigen von Ausstrichpräparaten</li> <li>• Verdünnung des Ejakulats, Messung der Konzentration</li> <li>• Durchführung des MAR-Tests (<i>fakultativ</i>)</li> <li>• Bestimmung Peroxidase-positiver Zellen</li> <li>• Zentrifugation des Ejakulats zur Gewinnung von Seminalplasma für biochemische Analysen</li> </ul>
Innerhalb von 3 Std.	Probenversand für die mikrobiologische Diagnostik ( <i>fakultativ</i> )
Nach 4 Std.	Fixierung, Färbung und Auswertung der Ausstrichpräparate für die Spermienmorphologie
Später	Biochemische Analysen etc.

### Makroskopische Untersuchung des Ejakulats

Die korrekte Erstellung eines Spermiogramms erfordert eine genaue Beobachtung der Beschaffenheit des Ejakulats. Unmittelbar nach der Ejakulation koaguliert das Sperma und hat eine zähflüssige, fadenziehende Konsistenz. Die anschließende **Verflüssigungszeit** sollte 60 Minuten nicht überschreiten, die Fädenlänge des aus einer Pipette abtropfenden, verflüssigten Ejakulats beträgt weniger als 2 cm. Bei unvollständiger oder fehlender Verflüssigung (Viskopathie) kann das Ejakulat mit Medium (siehe Spermienaufbereitung) vor weiteren Untersuchungsschritten verdünnt oder  $\alpha$ -Chymotrypsin bzw. Bromelain zugesetzt werden. Das normale Ejakulat ist grau-gelblich und homogen trüb. Blutbeimengungen (Hämatospermie) erzeugen einen bräunlichen Farbton, Proben mit geringen Spermienkonzentrationen erscheinen wäßrig-durchsichtig.

### Ejakulatvolumen

Die Bestimmung des Ejakulatvolumens kann direkt in geeichten, für die Ejakulatgewinnung benutzten Glaszylindern erfolgen. In der Regel werden heute jedoch Einweggefäße verwendet (z.B. verschließbare, sterile Urinbecher; cave: auf Toxizität prüfen!), die keine genaue Volumenbestimmung erlauben. Der Transfer des Ejakulats in Pipetten, Spritzen oder graduierte Zylinder führt zu falsch niedrigen Ergebnissen (-0.3 bis -0.9 ml; WHO 2010), so dass zur indirekten Volumenbestimmung die Messung des Ejakulatgewichts im ursprünglichen Gefäß empfohlen wird (Dichte des Ejakulats ca. 1 g/ml).

Bei erniedrigtem Volumen (< 2 ml) sollten zunächst Fehler bei der Gewinnung und Karenzzeit ausgeschlossen werden. Darüber hinaus sind Samentransportstörungen, z.B. eine partiell retrograde Ejakulation, zentrale Verschlüsse der Samenwege sowie anlagebedingte oder erworbene Störungen der Adnexe zu berücksichtigen. Bei den genannten Störungen kann auch ein erniedrigter pH-Wert vorliegen und auf die vorherrschende Gewinnung von Prostatasekret hinweisen.

### *pH-Wert des Ejakulats*

Zur Messung des pH-Wertes eignet sich Indikator-Papier. Die WHO empfiehlt entsprechende Teststreifen mit einer Meßbreite von 6.0-10.0 (z.B. Neutralit Indikator, Merck, Darmstadt). Diese haben den Nachteil, dass sie in dem am häufigsten auftretenden Meßbereich zwischen 7.0 und 8.0 zu wenig differenzieren. Im eigenen Labor hat sich deshalb zusätzlich noch Spezial-Indikatorpapier mit einer Meßbreite von 6.4-8.0 bewährt.

- Bestimmung des pH-Wertes nach vollständiger Verflüssigung des Ejakulates, innerhalb einer Stunde nach Abgabe
- Gleichmäßige Benetzung des Indikatorbereiches durch Auftragen von Ejakulat mit der Pipette
- Ablesung nach ca. 30 Sekunden

- pH  $\geq$  7,2 = normal
- pH < 7,2
  - Ejakulatvolumen? Fruktose? Azoospermie?
  - z.B. nur Prostatasekret, Samenwegsverschluß
- pH > 8,0
  - Längeres Stehenlassen der Proben!
  - Verwendung von Gleitmitteln?
  - Entzündungszeichen im Ejakulat?

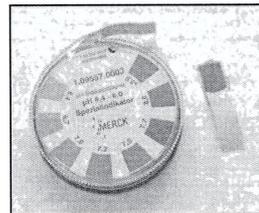


Abb. 2: Spezial-Indikatorpapier

### **Mikroskopische Untersuchung des Ejakulats**

Bei der Entnahme von Aliquots für einzelne Bestimmungen sollte das Ejakulat jeweils gut durchmischt werden, aufgrund der viskösen Beschaffenheit der Proben müssen **Pipetten mit positiver Verdrängungstechnik ("positive displacement")** verwendet werden. Die orientierende Untersuchung eines Nativpräparates (z.B. 10  $\mu$ l Ejakulat auf Objektträger mit 22 x 22 mm Deckglas; Phasenkontrastmikroskop, 400fache Vergrößerung) erlaubt neben der Beurteilung der Spermienmotilität eine Abschätzung der Spermienkonzentration und kann bereits Hinweise auf morphologische Störungen der Spermien, das Vorhandensein anderer zellulärer Elemente sowie unspezifische Agglomerationen (Verklumpung immotiler Spermien; Anhaften an Debris etc.) oder Agglutinationen (Aneinanderhaften motiler Spermien) geben. Letztere weisen auf die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen Spermien hin.

### **Bestimmung der Spermienmotilität**

Die Durchführung der Messungen erfolgt zunächst innerhalb von 60 Minuten nach Ejakulation entweder bei Raumtemperatur oder bei 37°C (beheizbarer Mikroskoptisch). Bei besonderen Fragestellungen kommen Verlaufsmessungen nach 4 Std. bzw. 24 Std. in Betracht.

- Ejakulat nicht auskühlen lassen
- Bestimmung unmittelbar nach vollständiger Verflüssigung
- Ejakulat gut mischen
- Phasenkontrast-Mikroskop (400fache Vergrößerung)
- 10  $\mu$ l auf die Mitte des Objektträgers geben, mit Deckgläschen (22 x 22 mm) abdecken (Volumen z.B. für 18 x 18 mm = 6,5  $\mu$ l, für 21 x 26 mm = 11  $\mu$ l etc.)
- 200 aufeinanderfolgende Spermien differenzieren; Angaben in Prozent (agglomerierte bzw. agglutinierte Spermien nicht berücksichtigen)
- Doppelbestimmung in getrenntem Aliquot
- Mittelwerte; Abweichungen der Doppelbestimmungen beachten, ggf. wiederholen (s. Abb. 3)

Tabelle 3. Kategorien der Spermienmotilität

	WHO 1999	WHO 2010
a	Schnelle, linear- <b>PR</b> ogressive Beweglichkeit ( $\geq 25 \mu\text{m/s} \cong 5$ Kopf­längen bzw. 0,5 Schwanz­längen bei 37°C)	<b>PR</b>
b	Langsame oder träge <b>PR</b> ogressive Beweglichkeit	
c	Nicht-Progressive, lokale Beweglichkeit ( $< 5 \mu\text{m/s}$ bei 37°C)	<b>NP</b>
d	Keine Beweglichkeit ( <b>IM</b> motilität)	<b>IM</b>

## Übungsergebnisse

WHO a (%)						
WHO b (%)						
WHO c (%)						
WHO d (%)						
Gesamt (100%)						

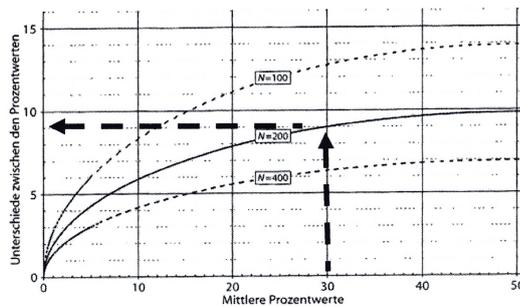


Abb. 3. Ergebniskontrolle Spermienmotilität:

z.B. 2 x 200 gezählte Spermien (Kurve N=200); z.B. Mittelwert für eine Kategorie 30% = Differenz zwischen Einzelbestimmungen bis max. 9% tolerabel

(WHO 1999, 2010)

Angesichts erheblicher Untersucher-abhängiger Abweichungen bei der Beurteilung progressiv motiler Spermien werden in der Neufassung der WHO-Empfehlungen die Kategorien "a" und "b" nicht mehr getrennt, sondern alle progressiv motilen Spermien zusammengefasst (Tab. 1). Die Spermienmotilität sollte über 4 Stunden nicht mehr als 15% abnehmen. Für detaillierte Messungen der Spermienmotilität stehen auch computerassistierte Systeme (CASA) zur Verfügung.

**Bei einer Progressivmotilität <40% sind die Bedingungen der Ejakulatgewinnung, die Konsistenz des Ejakulats, die Spermienvitalität und die Morphologie der Spermenschwänze kritisch zu prüfen.**

**Bestimmung der Spermienkonzentration**

Zur Bestimmung der Spermatozoenkonzentration wird ein Aliquot des vollständig verflüssigten Ejakulats mit einer Spermien immobilisierenden Lösung verdünnt und in einem Hämocytometer ausgewertet (empf. **Zählkammer: Neubauer improved**, Tiefe 100  $\mu\text{m}$ , Volumen 900 nl; Abb. 4). Wichtig ist ausreichendes Mischen der Probe vor Entnahme der Aliquots sowie die Verwendung einer "positive displacement"-Pipette.

Fixierung der Spermien:

- WHO-Ansatz / Verdünnungslösung: 50 g Natriumbicarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), 10 ml 35% (v/v) Formalin, falls kein Phasenkontrastmikroskop verwendet wird, 5 ml gesättigtes wässriges Gentianaviolett auf 1000 ml Aqua destillata auffüllen

Vorverdünnung des Ejakulats:

WHO 1999		WHO 2010	
Spermien/Blickfeld (400fach)	Verdünnung	Spermien/Blickfeld (400fach)	Verdünnung
< 15	1:5 (1 + 4)	< 2	1:2 (1 + 1)
15-40	1:10 (1 + 9)	2-15	1:2 (1 + 1)
40-200	1:20 (1 + 19)	16-100	1:5 (1 + 4)
> 200	1:50 (1 + 49)	> 100	1:20 (1 + 19)

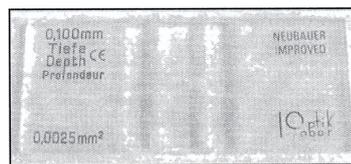


Abb. 4. "Neubauer improved"-Zählkammer

Durchführung:

- Zwei unabhängige Verdünnungen herstellen
- Beide Kammern der Zählkammer mit je 10  $\mu\text{l}$  der gut durchmischten Proben bestücken
- Zählkammer für 5 Min in feuchte Kammer (z.B. Petrischale mit Deckel, in die ein feuchtes Papiertuch gelegt wird)
- Beurteilung im Phasenkontrastmikroskop bei 400facher Vergrößerung
- z.B. zentrales Raster (5) mit 25 Klein-Quadraten: Mittellinie (---/---) zeigt die relevante Begrenzung; alle Spermien innerhalb des Quadrates zählen; für auf den Begrenzungslinien liegende Spermien mitberücksichtigte Seiten festlegen (z.B. links/unten; s. Abb. 5)

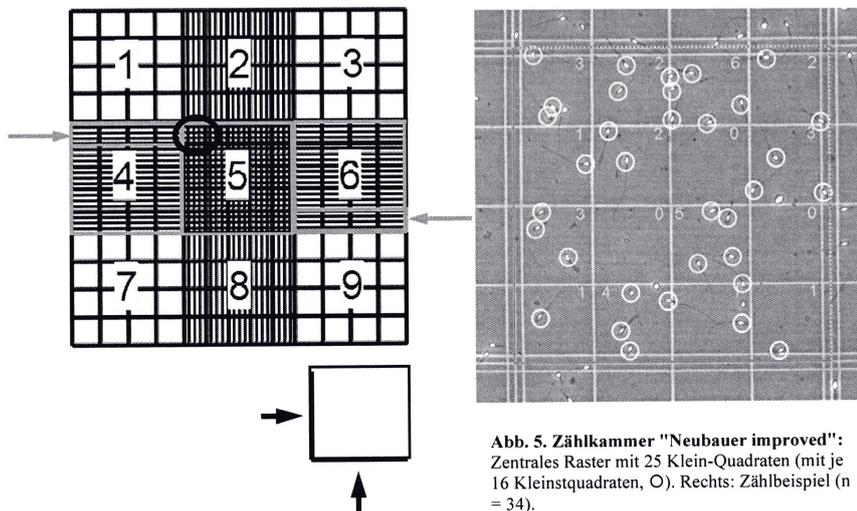
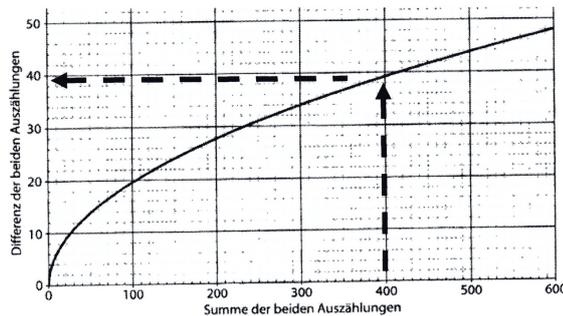


Abb. 5. Zählkammer "Neubauer improved": Zentrales Raster mit 25 Klein-Quadraten (mit je 16 Kleinstquadraten, O). Rechts: Zählbeispiel (n = 34).

- Quadrate 4 und 6 sind anders unterteilt, die Volumina einer Zeile sind jedoch identisch mit Quadrat 5; Auswertung erfolgt deshalb zeilenweise, es sind mind. 200 Spermien pro Aliquot in ganzen Zeilen je Quadrat (5, ggf. zusätzlich 4 und 6) auszuzählen; in der eigenen Praxis bewährt es sich, das gesamte zentrale Raster auszuwerten.
- Insgesamt 2 x 200 Spermien auszählen
- Pinheads (Stecknadelköpfe) oder Spermienköpfe ohne Flagellum nicht mit berücksichtigen
- Berechnungsformel für Quadrate 5, 4 + 6:  
Anzahl gez. Spermien (N) / Anzahl gez. Zeilen (n) x 1/20 x Verdünnungsfaktor = Konzentration (C);  
10<sup>6</sup> Spermien/ml  
Ergebnisbeispiel: Verdünnung 1:20 (10 µl Ejakulat + 190 µl Verdünnungslösung); 220 in 4 Zeilen; (220/4) x (1/20) x 20 = 55 x 10<sup>6</sup> Spermien/ml)
- Mittelwerte berechnen; Abweichungen der Doppelbestimmungen beachten, ggf. zwei neue Verdünnungen herstellen und wiederholen (s. Abb. 6)



**Abb. 6. Ergebniskontrolle Spermienkonzentration:**

z.B. 400 gezählte Spermien  
= Differenz zwischen  
beiden Einzelbestimmungen  
bis max. 39

(WHO 1999, 2010)

#### Vorgehen bei "Azoospermie"

Bei fehlendem Nachweis von Spermien in Nativpräparaten zwei unabhängiger Aliquots des Ejakulats kann eine Azoospermie vorliegen (s. Tab. 5). Zur Bestätigung muß das Ejakulat zentrifugiert und das Sediment ausgewertet werden. Die Spermienzahl im Pellet von "azoospermen" Proben nimmt mit der Zentrifugationszeit und -kraft sowie der Intensität der Sedimentuntersuchung zu. Selbst unter den geforderten Bedingungen - 3000 x g, 15 Min. - können Spermien im Überstand verbleiben.

#### Sind Spermien nachweisbar?

- **1 ml** des vollständig verflüssigten, gut durchmischten Ejakulats bei **3000 x g für 15 min** zentrifugieren
- Überstand dekantieren, ~50 µl Überstand belassen, Pellet resuspendieren
- 2 x 10 µl der Suspension unter 22 x 22 mm Deckglas (ergibt 20 µm Tiefe)
- Beide Präparate komplett untersuchen (~2 x 480 Blickfelder; Phasenkontrast; 200fache Vergrößerung)
- Falls Spermien vorhanden = "**Kryptozoospermie**"

#### Sind einige motile Spermien vorhanden?

- **Keine Zentrifugation, keine Verdünnung bzw. Fixation**
- 40 µl Ejakulat unter 24 x 50 mm Deckglas (ergibt 33 µm Tiefe)
- Präparat komplett untersuchen (~1200 Felder)

Die Angaben beziehen sich auf Empfehlungen in der 5. Auflage des WHO-Laborhandbuchs; mit dem Befund sollte jeweils die verwendete Methode und deren untere Nachweisgrenze angegeben werden (z.B. Untergrenze der Quantifizierung für die „Neubauer improved“-Zählkammer < 56.000 Spermien/ml).

**Sind im untersuchten Aliquot keine Spermien nachweisbar, schließt dies die Anwesenheit in der übrigen Probe nicht sicher aus!**

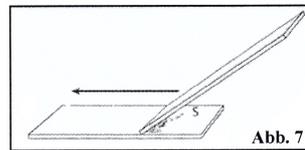
### **Beurteilung der Spermienmorphologie**

Exakte Beurteilung gefärbter Ejakulat-Ausstrichpräparate und Differenzierung der Spermienmorphologie sind zentrale Bestandteile der andrologischen Labordiagnostik. Der Anteil normal geformter Spermien ist hierbei ein wichtiger Parameter für die Fertilitätsprognose. Die Ausstrichpräparate eines unauffälligen Ejakulates bieten grundsätzlich ein "buntes" Bild, d.h. neben normal geformten Spermien finden sich sehr unterschiedliche Abweichungen von der Normalform. Ausprägung und Häufigkeit bestimmter Formstörungen der Spermien spiegeln Schäden der Spermato- und Spermiogenese im Hoden, aber auch Störungen der Nebenhodenfunktion wider.

In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß der von der WHO vorgeschlagene Referenzwert für den Anteil normal geformter Spermien im Ejakulat in den vergangenen 20 Jahren mehrfach herabgesetzt wurde. Die beste Orientierung erlauben Studien, in denen normal geformte Spermien auf der Basis sog. strenger Kriterien ("strict criteria") erfasst wurden und eine Korrelation der Ergebnisse mit dem Fertilisierungspotential gezeigt werden konnte (s. Tab. 4).

### **Anfertigen von Ejakulat-Ausstrichpräparaten:**

- 1 Tropfen (10-20 µl) Nativejakulat auf beschichteten Objektträger geben (z.B. "Super Frost Plus"; Menzel-Gläser)
- Ansetzen eines zweiten Objektträgers, im spitzen Winkel gekantet (Abb. 6)
- Ejakulat über gesamten Objektträger dünn und gleichmäßig ausstreichen (vgl. Blutausstriche)
- Lufttrocknen



### **Empfohlene Färbemethoden (WHO 1999, 2010):**

- Papanicolaou, modifiziert
- Shorr
- Diff-Quik (entspricht Hemacolor®)

### **HEMACOLOR®-Schnellfärbung**

HEMACOLOR®-Schnellfärbung (z.B. Merck, Darmstadt; Art.-Nr. 11674; 3 x 100 ml; ggf. Puffer Art.-Nr. 9468) ist ein Farbeset zur manuellen Schnellfärbung von Blutausstrichen, das auch für Sperma-Ausstriche geeignet ist.

Jede der drei Lösungen wird in eine verschließbare Küvette oder einen Farbtrog gefüllt. Luftgetrocknete Sperma-Ausstriche werden nach Vorschrift des Herstellers durch Eintauchen in die Lösungen 1 bis 3 fixiert und gefärbt (Anfärbezeit ca. 30 Sekunden):

- Objektträger 5 x je 1 Sek. in Lösung 1 eintauchen.
- Lösung abtropfen lassen.
- Objektträger 3 x je 1 Sek. in Lösung 2 eintauchen.
- Objektträger 6 x je 1 Sek. in Lösung 3 eintauchen.
- Lösung abtropfen lassen.
- Mit Pufferlösung pH 7,2 nach WEISE spülen.
- Pufferlösung: 1 Puffertablette in 1 L Aqua dest.; 4 Wochen haltbar.

Die Beurteilung gefärbter Ausstrichpräparate des Ejakulates erfolgt bei 1000-facher Vergrößerung unter Ölimmersion. Die Ergebnisse werden durch die gewählte Färbemethode maßgeblich beeinflusst. Die Analyse beschränkt sich nicht nur auf

- normal geformte Spermien
- Differenzierung pathologischer Formen der Spermien

sondern erfasst auch folgende zelluläre Elemente und nicht-zelluläre Phänomene:

- Spermatogenezellen
- Entzündungszellen: Granulozyten, Makrophagen, (Lymphozyten)
- Erythrozyten
- Epithelzellen
- Bakterien (anhaftend, intrazellulär)
- Agglomerationen, Agglutinationen
- Hintergrundanfärbung (z.B. "schollig" bei Viskosipathie)

Das normal geformte Spermium (Tab. 4; Abb. 8-10):

- Die Spermienmorphologie im Ausstrichpräparat spiegelt Spermato- und Spermiogenese im Hoden wider.
- Die Definition des normal geformten Spermiums stützt sich unter anderem auf die Beobachtung von Spermien im peri-ovulatorischen Zervixsekret.
- Eine orientierende Beurteilung der Spermienmorphologie ist bereits im Nativejakulat mit Hilfe der Phasenkontrast-Mikroskopie möglich.
- Zu beachten ist die nicht rotationssymmetrische Form des Spermienkopfes, der in der Seitenansicht entenschnabelartig zugespitzt ist.

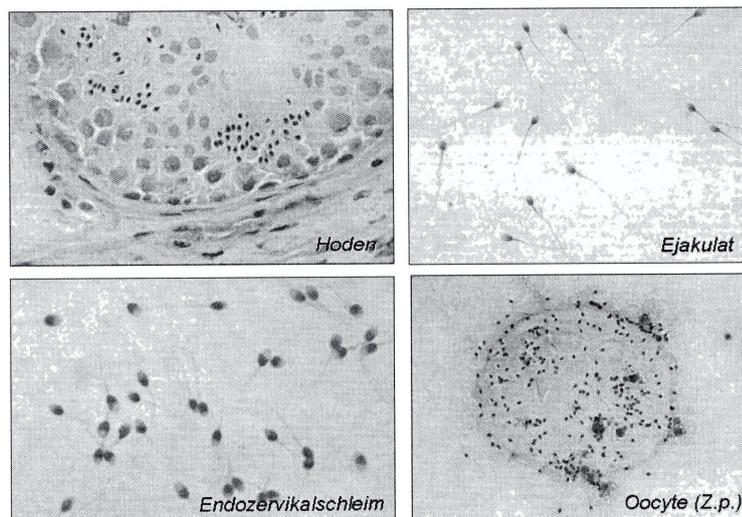


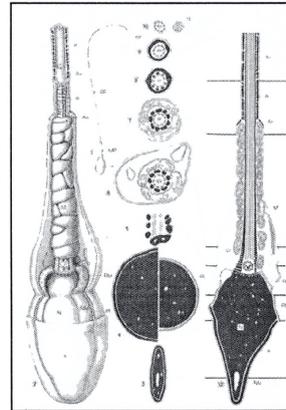
Abb. 8. Definition des normal geformten Spermiums

**Tabelle 4. Tygerberg-Kriterien ("strict criteria") des normal geformten Spermiums\***

<b>Kopf</b>		weich-ovale Konfiguration	
<b>Dimensionen<sup>§</sup></b>	<i>Färbung</i>	<i>Papanicolaou</i>	<i>Diff-Quik<sup>§</sup></i>
	Länge	4.0-5.0 µm	5.0-6.0 µm
	Breite	2.5-3.5 µm	2.5-3.5 µm
<b>Akrosom</b>		Akrosomale Region sollte 40 - 70 % der Kopffläche betragen	
<b>"Borderline"-Formen</b>		als nicht normal klassifiziert	
<b>Hals/ Mittelstück</b>		keine abaxiale Implantation; Breite ca. 1 µm, Länge 6-7 µm Zytoplasma-Tropfen max. 30% der Kopffläche	
<b>Flagellum</b>		Gleichmäßige Struktur, etwas dünner als Mittelstück; nicht aufgerollt oder abgекnickt; Hauptstück 45-50 µm, Endstück 4-6 µm	

\* Menkveld et al. (1990); Kruger und Franken (2004), § WHO (1992, 1999)

§ vergleichbare Ergebnisse mit Hemacolor<sup>®</sup>-Färbung (z.B. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 11674)



**Abb. 9. Ultrastruktur des normalen Spermiums**  
(Holstein & Roosen-Runge 1981)

#### Differenzierung verschiedener morphologischer Störungen:

##### *Abnorme Form und/oder Größe des Spermatozoenkopfes*

- Große Köpfe
- Kleine Köpfe
- Vakuolen (> 20% der Kopffläche)
- Überstreckungen (zigarrenförmig, birnenförmig)
- Amorphe Köpfe
- Doppelköpfe

##### *Defekte des Hals- und Mittelstückes*

- Fehlen des Schwanzes
- Irregulärer Ansatz des Flagellums mit Abknickungen
- Formstörungen des Mittelstückes (unregelmäßig geformt, geknickt, erweitert, dünn)

##### *Schwanzdefekte*

- Flagellum zu kurz
- Kaliberschwankungen
- Abknickungen des Flagellums
- Aufrollungen des Flagellums
- Doppel-/ Mehrfachschwänze

##### *Zytoplasmotropfen (> 30% des Spermienkopfes)*

#### Auswertung von 2 x 200 Spermien:

- Jeder beobachtete Defekt wird ausgewertet
- Pinheads (Stecknadelköpfe) zählen nicht zu den Kopfdefekten, gehäuftes Auftreten wird aber gesondert vermerkt
- Unreife Keimzellen werden nicht als Spermien klassifiziert



**Abb. 10. Papanicolaou-Färbung eines normalen Spermiums**  
(„strict criteria“; Olinmersion, 1000fache Vergrößerung)

### Beurteilung der Spermivitalität

#### Eosin-Test:

Der Test basiert auf der Membranintegrität der Spermienköpfe.

- Stammlösung: 1% (z.B. 100 mg Eosin auf 10 ml Ringer-Lösung)
- Gebrauchslösung: Verdünnung der Stammlösung 1:7 (1+ 6)
- 10 µl der Eosin-Gebrauchslösung und 10 µl natives Ejakulat auf Objektträger pipettieren
- 30-60 Sekunden stehen lassen, vorsichtig verrühren, Deckglas
- 200 Spermien auszählen: rote = tote vs. vitale = ungefärbte Spermien (400fache Vergrößerung)

Alternativ: Kombinierte Eosin-Nigrosin-Färbung (Nigrosin erzeugt dunklen Hintergrund, erleichtert Differenzierung).

#### HOS-Test:

Intakte Spermien reagieren im hypo-osmotischen Milieu mit einer Schwellung und Aufrollung des Flagellums und können so ohne Vitalfärbungen identifiziert werden. Der hypo-osmotische Schwell-Test spiegelt die Membranintegrität im Bereich der Spermischwänze wider.

### Weiterführende Untersuchungen

Besondere Aufmerksamkeit gilt der Erfassung von Infektionen und Entzündungsreaktionen im männlichen Genitaltrakt. Zur Basisuntersuchung des Ejakulats gehört die Bestimmung der Leukozytenkonzentration im Nativejakulat (s. Tab. 1). In der Praxis wird hierfür die Peroxidase-Methode eingesetzt, wenngleich immunzytochemische Verfahren eine höhere Sensitivität aufweisen und die Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen ermöglichen. Eine orientierende Beurteilung erlauben auch die gefärbten Ausstrichpräparate, wobei der Nachweis von Makrophagen auf chronisch-entzündliche Prozesse im Nebenhoden hinweist (s. Abb. 10). Als weitere Entzündungsindikatoren werden die Granulozytenelastase, proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 6 oder 8 sowie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies herangezogen.

**Mikrobiologische Untersuchungen** des unter möglichst sterilen Bedingungen gewonnenen Ejakulats dienen zur Erfassung behandlungsbedürftiger Infektionen und sind fester Bestandteil der Routinediagnostik. Bezüglich der Methodik gewinnt neben klassischen Kulturverfahren der PCR-basierte Erregernachweis zunehmend an Bedeutung.

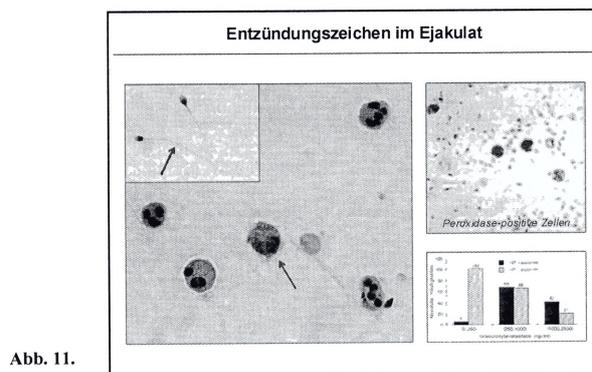


Abb. 11.

***Nachweis peroxidase-positiver Zellen***

Reagenzien: z.B. kommerziell erhältlicher Kit *LeucoScreen* (FertiKult Gück)

Durchführung der Färbung und Auswertung:

- 20 µl Ejakulat und 20 µl Arbeitslösung mischen
- 2 Min. bei Zimmertemperatur inkubieren
- 160 µl Medium zugeben
- In "Neubauer improved"-Zählkammer geben und bei 400facher Vergrößerung deutlich braun gefärbte Zellen auszählen
- Bei der Berechnung Verdünnung von 1:10 beachten! (siehe Bestimmung der Spermatozoenkonzentration)
- Angefärbt werden polymorphkernige Granulozyten
- Nicht angefärbt werden aktivierte polymorphkernige Zellen ohne Granula, Lymphozyten und Leukozyten ohne Peroxidase

Alternativ: Ortho-Toluidin-Blau-Färbung (*WHO 1999, 2010*)

[Vorsicht: Benzidin u. Ortho-Toluidin sind giftig/carcinogen!]

***Nachweis von Spermiantikörpern***

Agglutinationen, d.h. das Aneinanderhaften motiler Spermien im Nativpräparat, weisen auf die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen Spermien hin. Es werden Kopf-Kopf-, Kopf-Schwanz- und Schwanz-Schwanz-Agglutinationen unterschieden. Zum Nachweis membrangebundener Spermiantikörper eignet sich z.B. eine "mixed antiglobulin reaction" (MAR) oder ein Immunobead-Test (s. Tab. 1, Abb. 12).

**MAR-Test**

Reagenzien: z.B. kommerziell erhältlicher Kit (FertiKult Gück)

- Ejakulat innerhalb 1 h nach Gewinnung untersuchen (Raumtemperatur)
- Test nur anwendbar bei Ejakulaten mit motilen Spermien!
- IgG- bzw. IgA-Latexpartikel; IgG- bzw. IgA-Antiserum
- Objektträger: 10 µl frisches Ejakulat + 10 µl Latex-Partikel + 10 µl Antiserum
- Gründlich mischen; Deckglas; nach 2-3 und 10 min. bei 400facher Vergrößerung auswerten



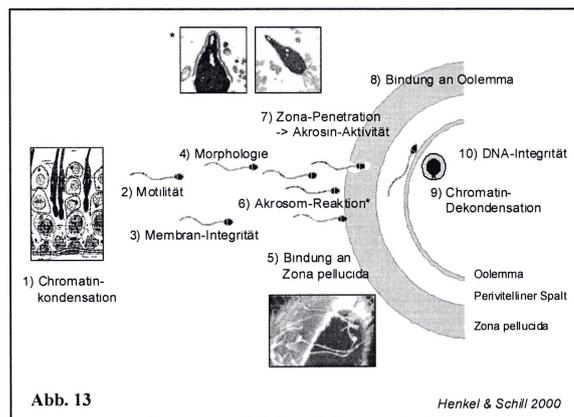
Abb. 12. Agglutinationen im Nativpräparat; MAR-Test

***Biochemische Marker***

Biochemische Marker im Seminalplasma erlauben eine Beurteilung der sekretorischen Funktion der akzessorischen Drüsen. Im Hinblick auf Samentransportstörungen bzw. Verschlüsse der Samenwege dient die Fruktose ( $\geq 13 \mu\text{mol/Ejakulat}$ ) als Funktionsparameter der Bläschendrüsen; Zitrat, saure Phosphatase und Zink ( $\geq 2,4 \mu\text{mol/Ejakulat}$ ) sind im Prostatasekret enthalten;  $\alpha$ -Glukosidase ( $\geq 20 \text{ mU/Ejakulat}$ ) und Carnitin stammen aus dem Nebenhoden.

### Spermienfunktionsdiagnostik

Über die Motilitätsbestimmung hinaus wurden Testsysteme entwickelt, um wichtige Spermieigenschaften und -funktionen wie z.B. Chromatinkondensation, Akrosinaktivität und akrosomale Reaktion zu charakterisieren (s. Abb. 13). Weiterhin kann das Penetrationsverhalten von Spermien im Zervixmucus, ihre Bindung an die Zona pellucida (Hemizona-Assay) sowie die Penetration von Hamsteroozyten *in vitro* untersucht werden.



**Die Einschätzung des Fertilisierungspotentials der Spermien lässt sich durch ergänzende Spermienfunktionstests verbessern; insbesondere klinisch relevante Störungen in der Spermien-Eizell-Interaktion sind in der Regel nicht mit Hilfe des Basis-Spermigramms zu erfassen!**

### Diagnostischer und prognostischer Stellenwert des Spermigramms

Im Hinblick auf die Fertilitätsprognose ist die Aussagekraft des Basis-Spermigramms begrenzt, kann jedoch durch die oben dargestellten ergänzenden Untersuchungen erhöht werden (s. Tab. 1; Abb. 13). Auch eine umfassende Ejakulatanalyse erlaubt jedoch keine Diagnosestellung im eigentlichen Sinne. Begriffe wie Oligozoospermie, Asthenozoospermie oder Oligoasthenoteratozoospermie haben lediglich deskriptiven Charakter, wenngleich sie immer wieder als "Diagnosen" verwendet werden (siehe Tab. 5). Sowohl bei der diagnostischen Zuordnung von Ejakulatbefunden als auch der Frage nach Therapiemöglichkeiten ist zu berücksichtigen, dass männlichen Fertilitätsstörungen häufig eine multifaktorielle Genese zugrunde liegt.

**"Spermienzahl, -motilität und -morphologie sind Laborparameter und keine Diagnosen!"**

Norbert Hofmann

Eine definitive Charakterisierung der Fertilität eines Mannes ist anhand des Spermigramms nicht möglich. Der Nachweis intakter motiler Spermien mit normaler Morphologie schließt eine absolute Zeugungsunfähigkeit aus, das Fertilisierungspotenzial sinkt jedoch dramatisch bei weniger als  $10^6$  motiler, normomorpher Spermien pro Ejakulat und ist nahezu aufgehoben, wenn dieser Wert 30.000 unterschreitet.

**Tabelle 5. Beschreibung von Ejakulatbefunden (nach WHO 2010)\***

<b>Normozoospermie</b>	Gesamtzahl (oder Konzentration), Prozentsatz progressiv motiler und morphologisch normaler Spermien $\geq$ unterer Grenzwert
<b>Oligozoospermie</b>	Gesamtzahl (oder Konzentration) Spermien unter Referenzgrenze
<b>Asthenozoospermie</b>	Prozentsatz progressiv motiler Spermien unter Referenzgrenze
<b>Teratozoospermie</b>	Prozentsatz morphologisch normaler Spermien unter Referenzgrenze
	Kombinationen der zuvor genannten Störungen, z.B. Oligoasthenoteratozoospermie ("OAT")
<b>Kryptozoospermie</b>	Keine Spermien im Nativpräparat, jedoch im Zentrifugat
<b>Azoospermie</b>	Keine Spermien im Ejakulat (Angabe der Methode und deren unterer Nachweisgrenze)
<b>Aspermie</b>	Kein Ejakulat (keine oder retrograde Ejakulation)

\*Untere Grenzwerte s. Tab. 1. Weitere deskriptive Terminologie: Leukospermie / Pyospermie; Haemospermie; Nekrozoospermie (sehr unpräzise als "wenige vitale, hoher Anteil immotiler Spermien" definiert); Parvisemie / Hypospermie (vermindertes Ejakulatvolumen) nicht mehr aufgeführt

In verschiedenen Kohortenstudien wurden für die Parameter des Basis-Spermiogramms Cut-off-Werte zur Unterscheidung zwischen fertilen und sub- bzw. infertilen Männern beschrieben, die niedriger als die früher verwendeten, Konsensus-basierten WHO-Referenzwerte sind. In einer dieser Studien ergab das statistische Modell eine breite Grauzone zwischen dem "subfertilen" und dem "fertilen" Bereich (z.B. Spermienkonzentration  $< 13,5$  vs.  $> 48$  Mio./ml; Guzick et al. 2001). Bei der Betrachtung einzelner Parameter kam der Spermienmorphologie (Differenzierung nach "strikten Kriterien") der größte prognostische Stellenwert zu. Andere Daten belegen die Bedeutung der schnellen progressiven Motilität (frühere Kategorie [a]) für das Fertilisierungspotential von Spermien in vivo und in vitro (Barratt et al. 2011). Sowohl zur Einschätzung der Konzeptionswahrscheinlichkeit als auch des Schweregrades der männlichen Subfertilität erwies sich in Querschnittsuntersuchungen der "total motile sperm count" als geeignet (Produkt aus Volumen, Spermienkonzentration und progressiver Motilität,  $[a+b]=[PR]$ )).

Für eine Revision der WHO-Referenzwerte wurden Daten von über 4.500 Männern aus 14 Ländern (4 Kontinenten) analysiert (Cooper et al. 2010). Als Referenz-Population dienten Väter, bei deren Partnerinnen weniger als 12 Monate bis zum Eintritt der Schwangerschaft vergangen waren (s. Tab. 1). Für die Berechnung der unteren Referenzgrenzen der in Tab. 1 aufgeführten Parameter wurde die 5. Perzentile zugrunde gelegt, obere Referenzgrenzen sind bei der Beurteilung der Ejakulatqualität nicht relevant.

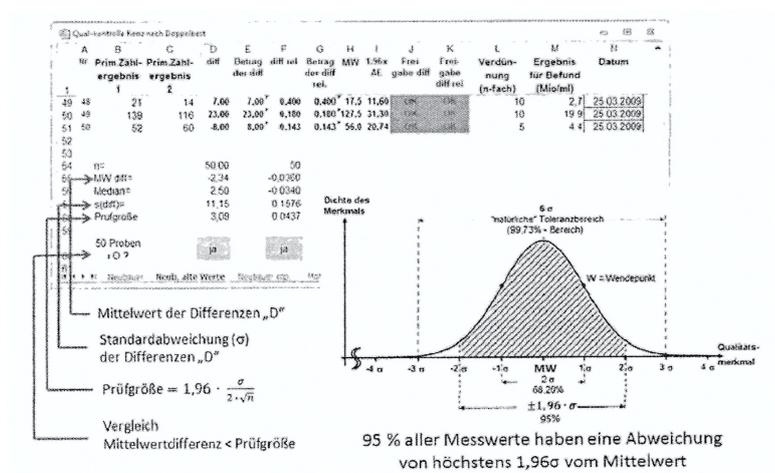
#### Qualitätssicherung

Man muss sich bewusst machen, dass man aus dem Ejakulat wenige  $\mu$ l (!) entnimmt und aus der Analyse dieses Aliquots auf die Verhältnisse im Gesamtejakulat ( $> 2000$   $\mu$ l) schließt. Kleinste Fehler des Untersuchers haben große Auswirkungen auf das Ergebnis. Um diese Fehler zu erkennen sind interne und externe Qualitätskontrollen unerlässlich. Grundsätzlich werden Doppelbestimmungen gefordert, die Abweichungen zwischen Doppelbestimmungen sollten im 95%-Vertrauensbereich liegen (siehe Abb. 3 u.6). Darüber hinaus gehören zur internen Qualitätskontrolle standardisierte Arbeitsvorschriften, Kontrolle und Korrelation der Einzelergebnisse einer Probe, soweit möglich Wiederholung von Bestimmungen durch verschiedene Personen und Kontrollen der monatlichen Mittelwerte eines Parameters zur Erfassung systematischer Fehler. Für die externe Qualitätskontrolle der Basisparameter Spermienkonzentration, -motilität und -morphologie wurde 2002 von der Deutschen Gesellschaft für Andrologie ein Programm gestartet (**QuaDeGA**; [www.dgandrologie.de](http://www.dgandrologie.de); [www.quadega.de](http://www.quadega.de); weitere Informationen über Frau B. Hellenkemper [[Barbara.Hellenkemper@ukmuenster.de](mailto:Barbara.Hellenkemper@ukmuenster.de)] & Dr. C. Mallidis [[Con.Mallidis@ukmuenster.de](mailto:Con.Mallidis@ukmuenster.de)]).

Die seit 2011 in Kraft getretenen Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen ("RiLiBÄK") mit ihrem speziellen Teil B4 schreiben für die drei wesentlichen Parameter des Basis-Spermogramms - Spermien-Konzentration, -Motilität und -Morphologie - neben der kontinuierlichen Dokumentation der internen Qualitätskontrolle die Teilnahme an Ringversuchen wie oben dargestellt zweimal jährlich vor (Mitteilungen der Bundesärztekammer 2011).

**Tabelle 6. RiLiBÄK zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen: Spezieller Teil B 4 – Ejakulatuntersuchungen**

Interne Qualitätssicherung	Externe Qualitätssicherung
<b>Dokumentation</b>	<b>Ringversuche (2 / Jahr)</b>
— Bezeichnung des medizinischen Laboratoriums	— Spermienkonzentration
— Bezeichnung des Messplatzes	— Motilität
— Zeitraum der Auswertung	— Morphologie
— Untersuchung, Probenmaterial, Einheit	
— Untersuchungsmethode (Zählkammer, Färbemethode)	
— Untersuchungsergebnisse einschließlich der Doppelbestimmungen	<b>Zertifikat nach Teilnahme am Ringversuch</b>
— Bewertung gemäß der Formeln	— 12 Monate Gültigkeit
— Freigabe- oder Sperrvermerk	— Dokumentation
— Ergriffene Korrekturmaßnahmen	
— Name des Untersuchers	



**Abb. 6. RiLiBÄK spezieller Teil B 4 – Ejakulatuntersuchungen: Dokumentation der internen Qualitätskontrollen (Doppelbestimmungen)**

## Musterbogen Ejakulatbefundung

Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie  
 Direktor: Prof. Dr. med. W. Weidner  
 Klinisch-andrologisches Labor - Kryobank  
 Leiter: Prof. Dr. med. H.-Chr. Schuppe  
 35385 Gießen, Galfkystraße 14 | Tel. 0641-865-43353 / Fax-43359 | www.ukgm.de

**UKGM**  
 UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
 GIESSEN UND MARBURG  
 Ausbildungsstelle der European Academy of Andrology (EAA)  
 Wissenschaftliches Zentrum für Reproduktionsmedizin

## Ejakulatanalyse (WHO 2010)

Name, Vorname:		Geb.-Datum:	
Pat-ID	Datum		
Karenz (Tage)			
Art / Zeitpunkt der Gewinnung (Uhrzeit)			
Analysebeginn (Uhrzeit)			
Probe vollständig aufgefangen?			
Volumen ( $\geq 1,5$ ml)			
Aussehen			
Verflüssigung ( $< 60$ Min.)			
Konsistenz / Viskosität			
pH-Wert ( $\geq 7,2$ )			
Spermien-Konzentration ( $\geq 15$ Mio./ml)			
Spermien-Gesamtzahl ( $\geq 39$ Mio.)			
Gesamt-Motilität (PR + NP) ( $\geq 40\%$ )			
Progressiv- motilität (PR) ( $\geq 32\%$ )	schnell progressiv (WHO a)*		
	langsam progressiv (WHO b)*		
Nicht-progressive Motilität (NP)			
Immotilität (IM)			
Vitalität ( $\geq 58\%$ lebendig)			
Rundzellen (Mio./ml)			
Peroxidase-pos. Zellen ( $< 1,0$ Mio./ml)			
Agglutinationen			
<b>Spermien-Morphologie / Zytologie</b>			
Normalformen ( $\geq 4\%$ )			
Kopfdefekte (%)			
Spez. Defekte			
Mittelsstückdefekte (%)			
Flagellumdefekte (%)			
Spez. Defekte			
Zytoplasma-Residuen (%)			
Unreife Keimzellen (/100 Sp.)			
Leukozyten (/100 Sp.)			
Makrophagen (/100 Sp.)			
Erythrozyten			
MAR-Test	IgG ( $\leq 50\%$ )		
	IgA ( $\leq 50\%$ )		
<b>Seminalplasma</b>			
$\alpha$ -Glucosidase ( $\geq 20$ mU/Ejak.)			
Fruktose ( $\geq 13$ $\mu$ mol/Ejak.)			
Zink ( $\geq 2,4$ $\mu$ mol/Ejak.)			
Elastase (ng/ml)			
IL-8 (pg/ml)			
Besonderheiten			

(\*WHO 1999)

Erstellt: \_\_\_\_\_

Validiert: \_\_\_\_\_

**Weiterführende Literatur**

- Björndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U, Alvarez JG, Haugen TB. A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
- Bundesärztekammer (2011) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. B 4, Ejakulatuntersuchungen. Deutsches Ärzteblatt 108:A55-A58
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 16, 231-245.
- Haidl G, Schuppe H-C (2006) Cytomorphological semen analysis. In: Schill W-B, Comhaire F, Hargreave TB (eds) Andrology for the Clinician, Springer, Heidelberg, 555-560.
- Mallidis C, Cooper TG, Hellenkemper B, Lablans M, Uckert F, Nieschlag E (2012) Ten years' experience with an external quality control program for semen analysis. Fertil Steril 98:611-616
- Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (Hrsg) Andrologie – Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 3. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2009
- Schuppe H-C, Köhn F-M, Weidner W (2013) Andrologie in der interdisziplinären Reproduktionsmedizin. In: Diedrich K, Ludwig M, Griesinger G (Hrsg) Reproduktionsmedizin. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 447-482
- World Health Organization (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed., WHO Press, Geneva, Switzerland.  
[Download: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789\\_ger.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_ger.pdf)]
- WHO Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates. 5. Auflage, Nieschlag E, Schlatt S, Behre HM, Kliesch S (Hrsg.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2012

**Kursleitung / Korrespondenz:**

Prof. Dr. med. Hans-Christian Schuppe

Bereich Andrologie  
Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH - Standort Gießen  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Gaffkystr. 14, 35385 Gießen

Tel. 0641-99 43251 / Fax 0641-99 43259  
E-Mail: Hans-Christian.Schuppe@derma.med.uni-giessen.de

**Mit freundlicher Unterstützung:**The logo for Olympus, featuring the word "OLYMPUS" in a bold, sans-serif font with a horizontal line underneath.

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)  
journal homepage: [www.europeanurology.com](http://www.europeanurology.com)



European Association of Urology



## Andrology

# Combined Trifocal and Microsurgical Testicular Sperm Extraction Is the Best Technique for Testicular Sperm Retrieval in “Low-Chance” Nonobstructive Azoospermia

Marcelo Marconi<sup>a,b,c,1</sup>, Andreas Keudel<sup>a</sup>, Thorsten Diemer<sup>a</sup>, Martin Bergmann<sup>d</sup>, Klaus Steger<sup>a</sup>, Hans-Christian Schuppe<sup>a</sup>, Wolfgang Weidner<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Department of Urology, Paediatric Urology and Andrology, University of Giessen, Giessen, Germany; <sup>b</sup> Andrology - Urology Unit, IVI Clinic; <sup>c</sup> Department of Urology, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile; <sup>d</sup> Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, University of Giessen, Giessen, Germany

### Article info

#### Article history:

Accepted March 5, 2012

Published online ahead of print on March 13, 2012

#### Keywords:

Nonobstructive azoospermia (NOA)

Male infertility

Trifocal testicular sperm extraction (TESE)

Microsurgical testicular sperm extraction (M-TESE)

### Abstract

**Background:** There is no consensus for the best testicular sperm extraction (TESE) technique in patients with “low-chance” nonobstructive azoospermia (NOA).

**Objective:** To determine sperm retrieval rates in an intraindividual comparison using three locations of the testicle with and without the assistance of a microscope (microsurgical TESE [M-TESE]).

**Design, setting, and participants:** A series of 65 patients with low-chance NOA presenting with low testicular volume (<8 ml) and high serum follicle-stimulating hormone (FSH) (>12.4 IU/l) underwent trifocal-TESE plus M-TESE bilaterally (four biopsies per testis).

**Intervention:** Sperm retrieval was performed as trifocal-TESE (upper, middle, and lower testicular pole) with and without the assistance of a microscope in the middle incision.

**Outcome measurements and statistical analysis:** The number of evaluated tubules, the mean spermatogenic scores, and the sperm retrieval rates were evaluated to determine retrieval locations and the use of the microscope. The Friedman and Cochran Q tests were applied to determine statistical differences. Receiver operating characteristic curves were used for the analysis of serum FSH and testicular volume as preoperative prognostic factors.

**Results and limitations:** The sperm retrieval success of 66.2% using the combined technique, meaning the percentage of patients with at least one tubule containing elongated spermatids, was the highest in the combination of trifocal- and M-TESE ( $p < 0.01$ ), indicating this technique as optimal for patients with low-chance NOA. M-TESE and trifocal-TESE alone were not significantly better. The mean spermatogenic score giving the number of tubules with elongated spermatids in relation to all tubules was significantly higher in M-TESE versus conventional TESE ( $p < 0.01$ ), indicating the superior quality of the tissue harvested using the microscope. These results are limited by the definition of “success” using “one” spermatid/tubule. Preoperatively, high serum FSH and low testicular volumes did not exclude successful sperm retrieval.

**Conclusions:** The combination of trifocal- and M-TESE is the best technique to reach high sperm retrieval rates in patients with low-chance NOA.

© 2012 European Association of Urology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

<sup>1</sup> These authors contributed equally.

\* Corresponding author. Department of Urology, Paediatric Urology and Andrology, University Hospital Giessen and Marburg GmbH – Giessen Campus, Justus-Liebig-University Giessen, Rudolf-Buchheim-Strasse 7, 35385 Giessen, Germany. Tel. +49 (0)641 985 44501; Fax: +49 (0)641 985 44509.

E-mail address: [wolfgang.weidner@chiru.med.uni-giessen.de](mailto:wolfgang.weidner@chiru.med.uni-giessen.de) (W. Weidner).

## 1. Introduction

Since the first successful intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure about 20 yr ago using sperm retrieved directly from the testis [1,2], numerous studies have addressed the best surgical technique for testicular sperm retrieval in azoospermic patients [3–5]. In patients with obstructive azoospermia (OA), conventional, not microscopically assisted testicular sperm extraction (TESE) or testicular fine-needle sperm aspiration have been used successfully to retrieve elongated spermatids with a success rate of about 100% [3]. However, patients with nonobstructive azoospermia (NOA) represent a different clinical scenario because the probability of finding elongated spermatids in the testes of these patients is significantly lower, about 50% compared with OA patients [3]. In a subgroup of “low-chance” patients, meaning NOA men with small testes (<8 ml) and high follicle-stimulating hormone (FSH) (>12.4 IU), the retrieval rates may be even lower [3,6,7] without reliable clinical markers to predict TESE success [6].

Two surgical innovations have been proposed to improve surgical sperm recovery rates. First, based on the heterogeneous spermatogenesis in patients with NOA [8–10], trifocal-TESE [3,6,11] using the upper, middle, and lower pole of the testis has frequently been used to increase retrieval rates. Second, with the introduction of microsurgical-assisted TESE (M-TESE) [12], a technique that identifies the dilated tubules more likely to contain foci of intact spermatogenesis, a further possibility to retrieve spermatids has become available. The results are generally excellent with retrieval rates of 57% [13], creating obvious advantages in comparison with macroscopic TESE [3], especially in men with high serum FSH [14,15].

In spite of these surgical improvements, a 2008 Cochrane database review concluded that there is no sufficient evidence to recommend any sperm retrieval technique for azoospermic men, leaving this important field of surgical andrology still open to debate [16]. Nevertheless, there seems to be a consensus to suggest a multifocal approach in NOA patients [3] and to consider M-TESE as an additional chance for better results in different forms of mixed pathology with heterogeneous tubular sizing [3,12,13,17].

Unfortunately, in the subgroup of low-chance NOA men with small testes and high FSH [6,7], these factors are not really helpful in forecasting individual success rates for sperm retrieval, and these patients require proper counselling preoperatively for the most effective procedure [6]. This study presents the retrieval rates of a combination of trifocal- and M-TESE in a selected series of NOA patients representing a subgroup of low-chance NOA patients, trying to identify for the individual patient the most efficient sperm retrieval technique.

## 2. Material and methods

### 2.1. Patients

Of 182 consecutive azoospermic patients in 2008–2010 referred to us for sperm retrieval, 65 men (25–58 yr of age; median: 38 yr) were

categorised as low-chance NOA patients due to reduced testicular volume (<8 ml) and/or increased serum FSH (>12.4 IU/l) according to Tüttelmann et al. [6]. All patients with any suspicion of obstruction, either clinically (eg, failed vasectomy reversal) or by altered ejaculate parameters (eg, low volume, decreased  $\alpha$ -glucosidase), were excluded in spite of the limited possibility to differentiate obstruction from nonobstruction preoperatively [18]. Patients with Y chromosome microdeletions of the AZFa and/or AZFb regions were also excluded.

### 2.1.1. Categorisation and evaluation of patients with nonobstructive azoospermia

The andrologic work-up included medical and andrologic history, physical examination, scrotal ultrasound, transrectal ultrasound of the prostate (ejaculate volume <1.5 ml), serum FSH, serum luteinising hormone, and morning (8–10 AM) total serum testosterone, as well as semen analysis according to the World Health Organisation [19,20]. For the diagnosis of azoospermia, at least two semen analyses had to show the absence of spermatozoa in the native sample and after centrifugation at 3000 g for 15 min and microscopic examination of the pellet [19]. The genetic evaluation included a karyotype analysis in peripheral blood lymphocytes and screening for microdeletions of the AZF regions a-b-c of the Y chromosome [20]. Table 1 lists the obvious clinical risk factors for NOA.

### 2.2. Surgery

All patients were counselled preoperatively and gave written informed consent to perform surgery at four sites of each testicle. Tissue conservation from all locations had to be accepted (informed consent; Ethic Local Committee, November 2006). All results were evaluated as if every patient underwent the following procedures per testis: unifocal-TESE (one-site biopsy), trifocal-TESE (three-site biopsy), M-TESE using the middle incision, and the combination of trifocal-TESE plus M-TESE (Fig. 1). All procedures were done in a standardised manner by two experienced microsurgeons (WW, TD: 25; WW or TD: 40). Surgically, after trifocal-TESE, the middle incision in the equatorial region was widened transversally and examined using a microscope with  $\times 25$  magnification, identifying tubules with increased diameter (Fig. 2). Tubule selection for retrieval depended exclusively on size [3,12]. In 16 patients, only one testicular unit was available, resulting in 114 testicular units. All operations were scheduled on a nonsynchronised basis, meaning that all testicular samples were cryopreserved. From each incision, three specimens were harvested: one for histology, one for cryopreservation, and a fragment snap-frozen for molecular investigations.

### 2.3. Histology

Biopsy material for histologic evaluation was fixed in Bouin solution. Histopathologic evaluation included any abnormal features such as the presence of testicular intraepithelial neoplasia, which was confirmed by placental-like alkaline phosphatase staining. The histologic diagnoses

**Table 1 – Analysis for clinical risk factors**

Risk factors	Patients, n
Undescended testis	20
Testicular tumor (including surgical treatment, radiotherapy, chemotherapy)	3
Mumps orchitis	3
Testicular trauma	2
Testicular torsion	1
Klinefelter syndrome (2 mosaic, 4 complete)	6
Microdeletion of the AZFc of the Y chromosome	4
Unexplained	26
Total	65

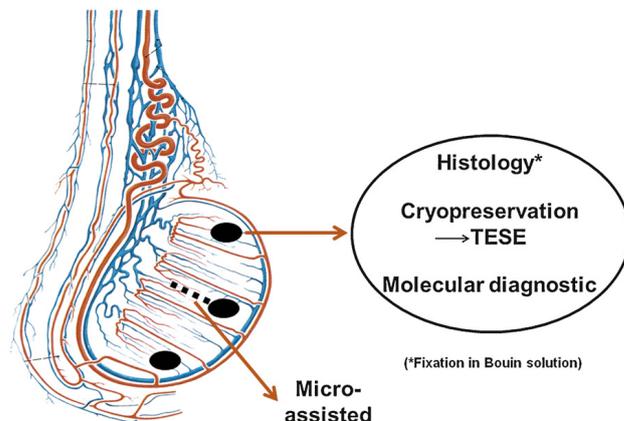


Fig. 1 – Testicular sperm extraction (TESE) schedule and tissue harvesting. The dissection for microsurgical TESE is done transversally around the “equator” of the testicle, leaving the tunica albuginea on the other side intact.

were classified into five groups [10]: normal spermatogenesis (score count: 10–8), hypospermatogenesis (7–1), predominant tubular atrophy (0.1–0.9), maturation arrest (0), Sertoli cell only (SCO) (0), and total atrophy (0) (Table 2). In each section, all tubules showing elongated spermatids were recorded (Fig. 3). A semiquantitative assessment of spermatogenesis was performed [10,18]. The latter was based on a score count calculating the percentage of tubules within the biopsy section showing elongated spermatids [10] (Table 2). The success for sperm retrieval was calculated based on the evidence of elongated spermatids in 29 431 tubules with the macroscopic approach and 5745 tubules with

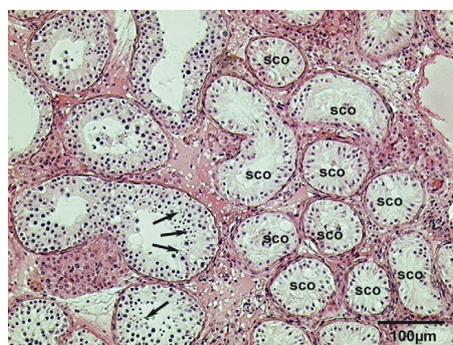


Fig. 3 – Testicular biopsy showing seminiferous tubules with intact spermatogenesis containing elongated spermatids (arrows) adjacent to tubules containing Sertoli cells only (SCOs). Bouin fixed paraffin section, haematoxylin and eosin (primary magnification ×20).

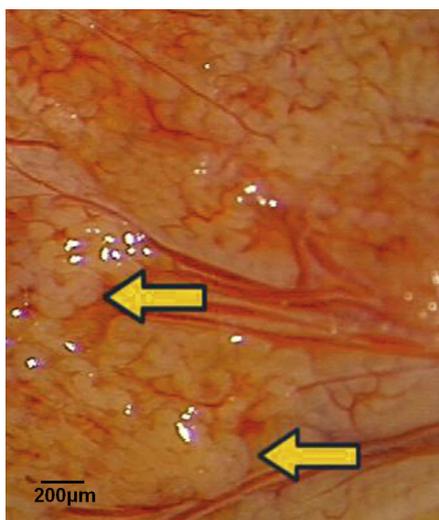


Fig. 2 – Microsurgical testicular sperm extraction in the extended middle incision with dilated seminiferous tubules (magnification ×25).

the microscopic approach. The mean spermatogenic score and the sperm retrieval rate per patient were calculated (Table 3).

2.4. Patient follow-up

Patients were reexamined 3 and 6 mo after surgery with scrotal ultrasound and testicular duplex to record testicular volume and

Table 2 – Score count of spermatogenesis

10–8	Normal spermatogenesis
7–1	“Mixed” atrophy
0.1–0.9	Predominant tubular atrophy
0	Spermatogenic arrest, Sertoli cell-only tubules; tubular shadows
$\frac{\text{No. of tubules with elongated spermatids}}{\text{No. of evaluated tubules}} \times 10$	

**Table 3 – Number of evaluated tubules, mean spermatogenic scores, and sperm retrieval success rates for different retrieval techniques<sup>a</sup>**

	Unifocal macro-TESE	Unifocal-M-TESE	Trifocal-TESE	Trifocal plus M-TESE	p value (test)
Evaluated tubules	10 337	5745	29 431	35 176	<0.01 (Friedman test)
Mean spermatogenic score (at least one spermatid present)	4.3	5.2	4.2	4.3	<0.01 (Friedman test)
Sperm retrieval success rate, %	53.8	60.0	61.5	66.2	<0.01 (Cochrane Q test)

TESE = testicular sperm extraction; M-TESE = microsurgical testicular sperm extraction.  
<sup>a</sup> Unifocal macro- and M-TESE are done in the middle incision.

intratesticular blood flow. During the follow-up visits, total serum testosterone was measured.

### 2.5. Statistical analysis

Data were analysed by the Prisma programme for Windows v.5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Because our sample was a paired sample (meaning that the same patient was exposed to four different surgical approaches [unifocal, M-TESE, trifocal, and trifocal plus M-TESE] with the possibility of four different outcomes), we used the Friedman test and Cochrane test to compare the success rate of sperm retrieval between the different surgical approaches. A total of four localisations (upper, middle, lower, and M-TESE) were analysed, and tubules were counted for elongated spermatids. The student *t* test was used to analyse the FSH, testicular volume, and testosterone values. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to calculate the predictive power and diagnostic accuracy of these parameters for successful testicular sperm retrieval. ROC curve analyses were performed in a regular fashion for testicular volume and in an inverse fashion for FSH levels. Statistical significance was achieved at  $p < 0.05$ ; all reported *p* values are two sided.

## 3. Results

### 3.1. Retrieval of spermatids for macro- and microtesticular sperm extraction

The number of evaluated tubules per excision was significantly higher in the conventional compared with the microscopic approach ( $p < 0.01$ ; Friedman test). The mean spermatogenic score, giving the number of tubules with elongated spermatids in relation to all tubules, was significantly higher in M-TESE versus conventional TESE

( $p < 0.01$ ). This score is based on 1410 of 5745 tubules (24.5%) in the microscopic approach versus 5457 of 29 431 tubules (18.5%) in the macroscopic approach. Analysing the sperm retrieval success, meaning the percentage of patients in whom at least one tubule contained elongated spermatids, only the combination of trifocal- and M-TESE proved to be significantly better than unifocal-TESE with a success rate of 66.2% versus 53.8% (Cochrane Q test). This combined technique was successful in eight patients in whom unifocal-TESE failed to reveal any sperm. All other surgical approaches including trifocal-TESE alone or M-TESE alone were not significantly better (Table 3).

### 3.2. Histopathologic diagnosis

When comparing the descriptive histopathologic diagnoses in the four retrieval areas of the 114 testicular units (upper, middle, lower, and M-TESE), 79 testes showed the same histologic pattern in all sites. The most common histopathologic diagnosis where the four biopsies matched ( $n = 79$ ) was SCOs (43.5%) followed by hypospermatogenesis (30.6%). In 35 testes, the histopathologic diagnosis was different within the same organ.

### 3.3. Predictive power and diagnostic accuracy of serum follicular-stimulating hormone and testicular volume for successful sperm retrieval

Serum FSH was significantly higher in patients in whom combined trifocal-TESE and M-TESE failed to retrieve sperm

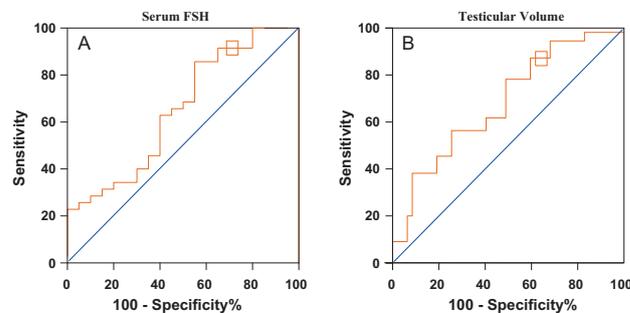


Fig. 4 – Predictive power and diagnostic accuracy of serum follicle-stimulating hormone (FSH) and testicular volume for successful sperm retrieval in patients with low-chance nonobstructive azoospermia. Receiver operating characteristic curve analysis showed an inverse relationship for FSH levels with higher levels resulting in lower success rates unlike for the testicular volume, which was lower in unsuccessful cases (FSH area under the curve [AUC]: 0.65; volume AUC: 0.64).

( $26.5 \pm 13.0$  IU/l vs  $18.3 \pm 7.5$  IU/l;  $p = 0.02$ ). The best cut point for discriminating between successful and unsuccessful sperm retrieval was 28.0 IU/l with a specificity of 35% and a sensitivity of 90% (Fig. 4). Patients with unsuccessful TESE had significantly lower testicular volumes than patients with a positive result ( $5.4 \pm 2.1$  vs  $6.9 \pm 1.6$ ;  $p < 0.01$ ). The cut point for discriminating between successful and unsuccessful TESE was a volume of 4.5 ml with a specificity of 32% and a sensitivity of 90% (Fig. 4).

### 3.4. Complications

No perioperative complications were recorded in 54 of 65 men (83%). In four men, postoperative bleeding with formation of intratesticular haematoma proven by ultrasonography became obvious. Three patients were handled conservatively; in one man intratesticular haematoma was evacuated by needle aspiration. None of these four men developed testicular atrophy or hypogonadism. Seven men needed testosterone supplementation 6 mo after surgery; five were already hypogonadal preoperatively.

### 4. Discussion

The introduction of ICSI provided a technique to achieve a pregnancy with only one live spermatozoon. In 1993, ICSI was successfully carried out using sperm retrieved from the testis of azoospermic men [1,2]. TESE has now been accepted as a standard procedure with retrieval rates up to 50% in patients with NOA as the only way to father a child [3,11,13].

When analysing the sperm retrieval results in our low-chance NOA patients, it is interesting that the combination of M-TESE with trifocal-TESE was the most efficient retrieval technique with a success rate of 66.2%. These data are in accordance with a recent report that suggested the combination of M-TESE with multifocal-TESE may give the best sperm retrieval rates in NOA patients [11]. For us, combining the multiple testicular biopsies with the microscopical technique is logical and reflects the patchy distribution of spermatogenesis (mixed atrophy) in the testes of these patients [5,8,9]. It is generally agreed that the best predictor is preoperative histology [21], but for M-TESE recent data suggest that histology may be less reliable in predicting success rates [22]. Because the sample is usually obtained at the same time as TESE, the dilemma is that histology proves at least useful for the clinician [21].

Challenging this problem, reports of Schlegel's group [12,13,15] provide evidence that in experienced hands retrieval rates increase up to 57% in NOA patients using M-TESE. Studies by others, however, showed that the increase in sperm retrieval success rate is highly variable in a range between 8% and 46% (overview in Pantke et al. [3]). This high variability of the results may be explained by the different microsurgical training of the surgeon (overview in Pantke et al. [3]), with a significant learning curve as a further problem [23], but also by the fact that M-TESE results may differ significantly between patients. Microsurgery is

especially useful in NOA men with high FSH values and very small testicles ( $< 8$  ml) [7,14]. It should be remembered that men in the low-chance NOA group have only a 30% probability of sperm recovery with standard procedures [6,7]. Even though M-TESE alone did not result in better sperm retrieval rates than trifocal-TESE in our study, the statistical analysis revealed that the quality of the tissue, meaning the evidence of spermatids per tubule, was significantly better than in tissue retrieved macroscopically. This observation, already reported by Schlegel [12], is relevant to select the most adequate sample of testicular tissue for ICSI. The probability of pregnancy is positively influenced by the testicular tubules containing elongated spermatids [24]. But the "success" in this study is based on semiquantitative histologic criteria, meaning the evidence of at least "one" elongated spermatid in a tubule.

There seems to be a consensus that serum FSH and testicular volume are standard prognostic factors that must be evaluated in NOA patients before surgery [3,6]. As reported by others [25], we also observed a negative influence of high serum FSH levels on the focal presence of intact spermatogenesis as reflected by spermatogenic score counts. However, especially the specificity of this hormone to predict the presence or absence of testicular sperm was limited in our series, meaning that even in patients with extremely high FSH, elongated spermatids may still be found [3]. In M-TESE, recent data demonstrate no association between sperm retrieval rates and high serum FSH [15]. The same association has been discussed for other endocrine markers such as inhibin B and anti-Müllerian hormone that also have been reported as nonprecise predictors of sperm retrieval in NOA patients [25,26]. Recently, a score including inhibin B levels seemed to improve the prediction of positive TESE results [27]. As with all the other parameters already mentioned, there is an ongoing debate that this prognostic schedule has to be confirmed as a robust predictor in this context [28]. Regarding testicular volume, the situation is that even at very low volumes, foci with preserved spermatogenesis may be found. In our series, mixed atrophy, which means different patterns of spermatogenesis, were observed in 30.7%, underlining the theoretical advantage of a multifocal compared with a unifocal approach even in cases with SCO syndrome [14]. Nevertheless, we must not forget that the comparative approach only focused on the middle of the testicle.

Regarding the role of genetics in retrieval failures, Y microdeletions are of prognostic value with a positive sperm retrieval chance in AZFc microdeletions of about 50% [3]. Our standard TESE protocol [3] excludes men who have complete AZFa and b microdeletions of the Y chromosome because the probabilities of finding sperm are negligible [16]. Karyotype alterations, such as Klinefelter syndrome, are normally not excluded for TESE [6,17]. In this series, Klinefelter syndrome was evident in six cases.

Finally, regarding perioperative complications of the combined trifocal- and M-TESE, it is a technique with a low complication rate. Theoretically, the advantages of M-TESE with the extraction of reduced amounts of tissue [12] may

become deteriorated by the multifocal approach [25]. However, our data of only seven men with postoperative hypogonadism after a follow-up of 6 mo are encouraging, although the final definition of a hypogonadal status certainly requires a longer follow-up [29].

## 5. Conclusions

Combined trifocal- and M-TESE significantly improve the sperm retrieval rates in patients with low-chance NOA. This may be explained by the heterogeneous distribution of foci with preserved spermatogenesis. The use of M-TESE improves the numbers of elongated spermatids, thus providing a higher success rate for in vitro fertilisation/ICSI.

**Author contributions:** Wolfgang Weidner had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study concept and design:** Weidner, Marconi, Diemer, Schuppe.

**Acquisition of data:** Keudel, Marconi, Weidner.

**Analysis and interpretation of data:** Marconi, Weidner, Keudel, Schuppe, Bergmann.

**Drafting of the manuscript:** Marconi, Weidner, Keudel, Diemer.

**Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** Weidner, Marconi, Schuppe.

**Statistical analysis:** Marconi, Keudel.

**Obtaining funding:** Weidner, Steger.

**Administrative, technical, or material support:** Schuppe, Steger.

**Supervision:** None.

**Other (specify):** None.

**Financial disclosures:** I certify that all conflicts of interest, including specific financial interests and relationships and affiliations relevant to the subject matter or materials discussed in the manuscript (eg, employment/affiliation, grants or funding, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, royalties, or patents filed, received, or pending), are the following: None.

**Funding/Support and role of the sponsor:** The support of the “Giessen TESE Program” by the German Research Foundation (DFG KFO 181 Male Factor Infertility Due to Impaired Spermatogenesis, grant no. 181/1 and 181/2) is gratefully acknowledged. The ongoing cohort study is also supported by “Hessen Excellence Initiative LOEWE: MIBIE, project B1.” Marcelo Marconi was a fellow in “Clinical Andrology” in Giessen (MIDEPLAN, Chile).

**Acknowledgement statement:** The laboratories at each of the participating hospitals are gratefully acknowledged for analysing serum hormones.

## References

- [1] Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet* 1993;342:864.
- [2] Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, et al. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; 342:1237.
- [3] Pantke P, Diemer T, Marconi M, et al. Testicular sperm retrieval in azoospermic men. *Eur Urol Supp* 2008;7:703–14.
- [4] 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.
- [5] Hauser R, Yogev L, Paz G, et al. Comparison of efficacy of two techniques for testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: multifocal testicular sperm extraction versus multifocal testicular sperm aspiration. *J Androl* 2006;27:28–33.
- [6] Tüttelmann F, Werny F, Cooper TG, Kliesch S, Simoni M, Nieschlag E. Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy. *Int J Androl* 2010;33: 1–8.
- [7] Bromage SJ, Falconer DA, Lieberman BA, Sangar V, Payne SR. Sperm retrieval rates in subgroups of primary azoospermic males. *Eur Urol* 2007;51:534–40.
- [8] Hauser R, Botchan A, Amit A, et al. Multiple testicular sampling in non-obstructive azoospermia—is it necessary? *Hum Reprod* 1998; 13:3081–5.
- [9] Amer M, Haggag SE, Moustafa T, Adb El-Naser T, Zohdy W. Testicular sperm extraction: impact of testicular histology on outcome, number of biopsies to be performed and the optimal time for repetition. *Hum Reprod* 1999;14:3030–4.
- [10] Bergmann M, Kliesch S. Testicular biopsy and histology. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Andrology*. Heidelberg, Germany: Springer; 2010. p. 155–67.
- [11] Turunc T, Gul U, Haydardeoglu B, et al. Conventional testicular sperm extraction combined with the microdissection technique in nonobstructive azoospermia patients in a prospective comparative study. *Fertil Steril* 2010;94:2157–60.
- [12] Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999;14: 131–5.
- [13] Ramasamy R, Fisher ES, Ricci JA, Leung RA, Schlegel PN. Duration of microdissection testicular sperm extraction procedures: relationship to sperm retrieval success. *J Urol* 2011;185:1394–7.
- [14] Colpi GM, Colpi EM, Piediferro G, et al. Microsurgical versus conventional TESE for ICSI in non-obstructive azoospermia: a randomized controlled study. *Reprod Biomed Online* 2009;18: 315–9.
- [15] Ramasamy R, Lin K, Gosden LV, Rosenwaks Z, Palermo GD, Schlegel PN. High serum FSH levels in men with nonobstructive azoospermia do not affect success of microdissection testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2009;4:590–3.
- [16] Van Peperstraten A, Proctor ML, Johnson NP, Philipson G. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) for azoospermia. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;CD002807.
- [17] Ramasamy R, Ricci JA, Palermo GD, Gosden LV, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Successful fertility treatment for Klinefelter's syndrome. *J Urol* 2009;182:1108–13.
- [18] McLachlan RI, Rajpert-De Meyts EK, Høi-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* 2007;22:2–16.
- [19] World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. ed. 4. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.
- [20] Dohle GR, Diemer T, Giwercman A, Jungwirth A, Kopa Z, Krausz C. European Association of Urology. Guidelines on male infertility. European Association of Urology Website. [www.uroweb.org/gls/pdf/Male%20Infertility%202010.pdf](http://www.uroweb.org/gls/pdf/Male%20Infertility%202010.pdf).
- [21] Colpi GM, Piediferro G, Scropo FJ, Colpi EM, Sulpizio M. Surgery for male infertility: surgical sperm retrievals. In: Björndal L, Giwercman A, Tournaye H, Weidner W, editors. *Clinical andrology EAU/ESAU course guidelines*. New York, NY: Informa Healthcare; 2010. p. 95–104.
- [22] 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.
- [23] Ishikawa T, Nose R, Yamaguchi K, Chiba K, Fujisawa M. Learning curves of microdissection testicular sperm extraction for non-obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2010;94:1008–11.
- [24] Zitzmann M, Nordhoff V, von Schönfeld V, et al. Elevated follicle stimulating hormone levels and the chances for azoospermic men to become fathers after retrieval of elongated spermatids from cryopreserved testicular tissue. *Fertil Steril* 2006;86:339–47.
- [25] Mitchell V, Robin G, Boitrelle F, et al. Correlation between testicular sperm extraction outcomes and clinical, endocrine and testicular histology parameters in 120 azoospermic men with normal serum FSH levels. *Int J Androl* 2010;34:299–305.
- [26] Mitchell V, Boitrelle F, Pigny P, et al. Seminal plasma levels of anti-Müllerian hormone and inhibin B are not predictive of testicular sperm retrieval in non-obstructive azoospermia: a study of 139 men. *Fertil Steril* 2010;94:2147–50.
- [27] Boitrelle F, Robin G, Marcelli F, et al. A predictive score for testicular sperm extraction quality and surgical ICSI outcome in non-obstructive azoospermia: a retrospective study. *Human Reprod* 2011;26:3215–21.
- [28] Tournaye H. How to predict fatherhood for men with non-obstructive azoospermia opting for TESE-ICSI? [Comment on *Hum Reprod* 2011;26:3215–21]. *Human Reprod* 2011;26:3213–4.
- [29] Takada S, Tsujimura A, Ueda T, et al. Androgen decline in patients with non-obstructive azoospermia after microdissection testicular sperm extraction. *Urology* 2008;72:114–8.

## Post Graduate Education at Its Best

Postgraduate education and training - covering the entire spectrum of the urological field - are core activities of the European Association of Urology. The aim of the European School of Urology is to stimulate, coordinate and organise all these teaching and education activities.

The ESU offers

- ESU Courses at the EAU Annual Congress
- ESU Courses at national society meetings
- The European Urology Residents Educational Programme (EUREP)
- ESU Masterclasses
- Stand alone events
- Several publications
- E-learning

ESU Activities are accredited within the EU-ACME programme by the EBU in compliance with UEMS/EBU regulations.

For further information, please consult [www.uroweb.org](http://www.uroweb.org)



**EAU**  
European  
Association  
of Urology

T +31 (0)26 389 0680 • F +31 (0)26 389 0684 • [esu@uroweb.org](mailto:esu@uroweb.org) • [www.uroweb.org](http://www.uroweb.org)

## 11.3.

	Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie <b>Klin.-androl. Labor / Kryobank</b>	
Seite: 1 von 3 Revision: r001	<b>Aufbereitung von Hodengewebe (TESE-Test)</b>	<b>Arbeitsanweisung 003</b>

- Kryoröhrchen bei RT auftauen lassen
- Gewebestücke aus dem Kryoröhrchen in eine mit 1,0 ml T9-HSA-Medium versehene Petrischale überführen.
- Mit zwei Kanülen die Gewebeprobe gut zerteilen.
- Die zerteilten Proben samt Medium in verschließbare Zentrifugenröhrchen überführen.
- 2 Stunden bei 37°C inkubieren.
- 1,0 ml Kollagenase-Lösung (800 mU/ml) hinzufügen, gut mischen und mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubieren; ggf. auch über Nacht.
- Nach der Inkubation die in der Kollagenase-Lösung aufgeschwemmten Proben 10 Min. bei 300 - 500 x g zentrifugieren.
- Überstand abnehmen und verwerfen.
- 50 µl T9-HSA auf jedes Sediment geben und gut mischen.
- Neubauer improved-Zählkammer mit der Suspension füllen und zur Sedimentation in eine feuchte Kammer legen.

### Auswertung:

- Gesamtes Zählnetz nach Spermien absuchen. Beweglichkeit angeben.
- Das Ergebnis entspricht der Anzahl der Spermien pro µl.
- Mit dem Faktor 50 multipliziert ergibt es die Gesamtzahl der Spermien in 50 µl Suspension.

### Mikrotropfen:

- Die Auszählung im Mikrotropfen erfolgt unter dem Mikro-Manipulator. Man pipettiert 5µl der Spermatozoensuspension in eine kleine Petrischale, verstreicht den Tropfen etwas und überschichtet ihn mit Mineralöl. Es wird der ganze Tropfen auf Spermien untersucht und die absolute Zahl angegeben.

AZ: HCS Datei: AA003_Andro_Aufbereit- Hodengewebe_21-11- 2011_r001.doc	Erstellt: Prof. Dr. H.-Chr. Schuppe 21.11.2011 Datum/Unterschrift	Geprüft: B. Schuster 22.11.2011 Datum/Unterschrift	Freigabe ab: 05.12.2011 Prof. Dr. W. Weidner 02.12.2011 Datum/Unterschrift
---	--	---	---

**Eignung der Proben für ICSI:**

NICHT GEEIGNET	keine Spermien auf beiden Seiten
BEDINGT GEEIGNET	< 3 Spermien auf beiden Seiten im Mikrotropfen
GEEIGNET	> 3 Spermien auf beiden Seiten im Mikrotropfen

**Mikrotropfen (vereinfachte Methode):**

- 5 µl Spermatozoensuspension auf einen Objektträger geben und mit einem Deckgläschen (18x18) bedecken.
- Gesamtes Präparat meanderförmig auf Spermien untersuchen; auf Beweglichkeit achten.
- Als Ergebnis wird die absolute Spermienzahl pro 5µl angegeben.

**Vorteile des Mikrotropfens als Nativpräparat:**

- Übersichtung der Probensuspension mit Mineralöl entfällt, daher gibt es keine „Zusammenballung“ des Tropfens mit einhergehender Unübersichtlichkeit bei der mikroskopischen Beurteilung.
- Größere Genauigkeit der ermittelten Spermienzahl und -beweglichkeit.
- Benutzung eines Mikromanipulators entfällt, ein normales Phasenkontrastmikroskop ist ausreichend.

AZ: HCS Datei: AA003_Andro_Aufbereit- Hodengewebe_21-11- 2011_r001.doc	Erstellt: Prof. Dr. H.-Chr. Schuppe 21.11.2011 Datum/Unterschrift	Geprüft: B. Schuster 22.11.2011 Datum/Unterschrift	Freigabe ab: 05.12.2011 Prof. Dr. W. Weidner 02.12.2011 Datum/Unterschrift
---	--	---	---

**Reagenzien:**

T9-Medium	(siehe Handbuch Ejakulatuntersuchung)
Albumin human 20% A20, 50ml	CSL Behring; P2N 0504775
Kollagenase (für therapeutische Zwecke) (gebrauchsfertig)	Gynemed; Art.-Nr. 4 GM501SA-050
Kollagenase (für diagnostische Zwecke)	Sigma; C-1889 (Ansatz s.u.)
Mineralöl	Sigma; M-8410

Ansatz Kollagenase-Lösung mit Kollagenase Typ IV-S (50 mg) Firma Sigma (nur diagnostisch!):

0,8 mg Kollagenase in 1,0 ml Medium lösen = 800 mU/ml

1,0 ml Kollagenase-Lösung + 1,0 ml Medium (aus der Gewebesaufbereitung, siehe Punkt 1) ergibt eine Endkonzentration (Gebrauchskonzentration) von 400 mU/ml.

Die Kollagenase-Lösung lässt sich vorbereiten, in 1,0ml-Portionen aliquotieren und bis zum Gebrauch bei -20°C einfrieren.

50 mg Kollagenase (Inhalt eines Fläschchens) + 62,5 ml T9-Medium ohne HSA

**Verbrauchsmaterial:**

Kryoröhrchen (2ml) 13,5x48mm	Nalgene	Hausliste 32406723
Petrischalen 35x10mm, steril	Greiner	Hausliste 32409434
Falcon-Röhrchen PP 17x120 (15ml)	Greiner	Hausliste 32406440
Kanülen 0,9x40mm (gelb)	Terumo	Hausliste 30404500
Röhrchen 3,5 ml (55x12)	Sarstedt	Hausliste 32406513
Stopfen für Röhrchen 3,5 (55x12)	Sarstedt	Hausliste 32407095
Pipettenspitzen gelb	Sarstedt	Hausliste 32412700
Pipettenspitzen blau	Sarstedt	Hausliste 32412701
Pipettenspitzen weiß	Sarstedt	Hausliste 32412698
Objekträger 26x76 klar	Langenbrinck	Hausliste 32404600
Deckgläschen 18x18	Langenbrinck	Hausliste 32405105

**Geräte:**

Brutschrank  
Eppendorfpipette 1-10µl  
Eppendorfpipette 10-100µl  
Eppendorfpipette 100-1000µl  
Zentrifuge  
feuchte Kammer  
Neubauer improved-Zählkammer  
Deckgläschen für Hämocytometer (20x26 plan geschliffen); Menzel, Hausliste 32404110  
Phasenkontrastmikroskop mit 10er Okular und 40er Objektiv  
Mikromanipulator

AZ: HCS Datei: AA003_Andro_Aufbereit- Hodengewebe_21-11- 2011_r001.doc	Erstellt: Prof. Dr. H.-Chr. Schuppe 21.11.2011 Datum/Unterschrift	Geprüft: B. Schuster 22.11.2011 Datum/Unterschrift	Freigabe ab: 05.12.2011 Prof. Dr. W. Weidner 02.12.2011 Datum/Unterschrift
---	--	---	---

## 12. Publikationverzeichnis

Marconi, M., Keudel, A., Diemer, Th., Bergmann, M., Steger, K., Schuppe, H.C., 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. **62**(4): p. 713-9

Impact Factor: 20,069

### **13. Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, 13.12.2022

Unterschrift

## 14. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen nachstehenden Personen herzlich bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Promotionsschrift unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Betreuern Prof. Dr. Wolfgang Weidner, Dr. Marcelo Marconi und Prof. Dr. Andreas Meinhardt bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Weidner, der mir die Promotion an seiner Klinik ermöglicht hat, und mit Unterstützung von Dr. Marcelo Marconi einem Zahnmediziner das Vertrauen geschenkt hat, in der Gießener andrologischen Arbeitsgruppe mitzuarbeiten. Danke auch für die während der gesamten Bearbeitungsphase der Dissertation gewährte Begleitung und Unterstützung in Form von fachlichen Ratschlägen und Diskussionen. Auch die vielen nicht-wissenschaftlichen Gespräche und die motivierenden, geduldigen Aufmunterungen in schwierigen Bearbeitungsphasen haben mir sehr geholfen, die Arbeit zu Ende zu schreiben.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Meinhardt möchte ich mich für den komplikationslosen Betreuungswechsel bedanken. Seine fachliche Expertise und konstruktiven Anregungen gaben den Anreiz für den Feinschliff der Arbeit.

Ein herzlicher Dank gehört weiterhin Herrn Prof. Dr. Adrian Pilatz, der mir freundlicher Weise aktuelles Bildmaterial zur Verfügung gestellt hat.

Ohne meine Familie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke meinem Schwiegervater und meinen Eltern für Ihre uneingeschränkte Unterstützung und Geduld. Danke auch an meine Schwägerin Nelly, die bei allen meinen Fragen immer ein offenes Ohr hatte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Nadia und meinen Kindern Luise, Valentin und Alicia. Danke Nadi, dass Du immer an mich geglaubt und mich in schweren Phasen motiviert hast. Meinen drei Kindern, die immer für die nötige Ablenkung gesorgt haben.