

## Non-obstrüktif azospermik hastalarda mikrocerrahi testiküler sperm ekstraksiyonu ilk sonuçlarımız: Harran Üniversitesi Üroloji Kliniği

The first report from Harran University Department of Urology on microscopic testicular sperm extraction results in non-obstructive azoospermic patients

Eyyup Sabri Pelit<sup>1</sup> , Halil Çiftçi<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

### Öz.

**Amaç:** Mikroskopik testiküler sperm ekstraksiyonu (mikro-TESE), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu için sperm bulma oranı en yüksek olan tekniktir. Bu çalışmanın amacı, mikro-TESE'deki deneyimlerimizi sunmak ve önceki sperm alım müdahalelerinin yanı sıra, sperm bulma oranı ile hastaların özellikleri, testis fonksiyonları ilişkisini değerlendirmektir.

**Materyal ve Method:** 2017-2018 yılları arasında mikro-TESE yapılan 83 non-obstrüktif azospermi hastalarını retrospektif olarak inceledik. Tüm işlemler reyonel anestezi altında kliniğimiz ameliyathanesinde mikroskop altında 18-22 büyütme kullanılarak (Karl Zeiss, Almanya) tek cerrah tarafından yapıldı. Folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinize edici hormon (LH), total testosteron seviyeleri, karyotip analizi, Y mikrolelesyonları ve testiküler hacim skrotal ultrasonografi skalası ile ölçülüp veriler kayıt edildi. Elde edilen sperm hücreleri kriyo-prezervasyona tabi tutuldu. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) prosedürü elde edilen sperm hücreleri kullanılarak başka seansta gerçekleştirilecektir.

**Bulgular:** Çalışmaya toplam 83 hasta dahil edildi. Hastaların ortalama yaşı 27,7±5 olarak bulundu. Mikro-TESE pozitif olan hastaların ortalama yaşı 26,8±6, negatif olanların ortalama yaşı 28,3±5 olarak saptandı. Ortalama infertilite süresi 5,2 ± 3,5 yıldır. Genel sperm elde etme oranı %51,8 (43) idi. Hastaların yaşı, testiküler boyut, serum FSH, LH ve testosteron düzeyleri sperm elde etme oranları üzerinde anlamlı bir etki göstermedi. **Sonuç:** Micro-TESE, non- obstrüktif azospermik hastalarda cerrahi olarak sperm hücrelerini almanın en kesin ve başarılı yöntemidir. Sonuçlarımız referans merkezlerinin oranları ile paraleldir.

**Anahtar Kelimeler:** Mikro-TESE, İnfertilite, Azospermi

### Abstract

**Background:** Microscopic testicular sperm extraction (micro-TESE) is the technique with the highest sperm retrieval rate for intracytoplasmic sperm injection. The aim of this study is to present our experience in micro-TESE and to assess the relationship between sperm retrieval rate and patient characteristics, testicular functions as well as previous sperm retrieval.

**Methods:** We retrospectively investigated 83 non-obstructive azoospermic patients who underwent micro-TESE between 2017-2018. All procedures were performed by a single surgeon under regional anesthesia using the microscope (Karl Zeiss, Germany) the 18-22 magnification in our clinic's operating room. Follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), total testosterone levels, karyotype analysis, Y microdeletions and testicular volume scrotal ultrasonography scale were recorded. The obtained sperm cells were subjected to cryopreservation. Furthermore, ICSI procedure was performed by use of the obtained sperm cells in another session.

**Results:** A total of 83 patients were included in the study. The mean age of the patients was 27.7 ± 5 years. The mean age of micro-TESE positive patients was 26.8 ± 6, and the mean age of those with negative TESE was 28.3 ± 5. The mean duration of infertility was 5.2 ± 3.5 years. Overall sperm retrieval rate was 51.8% (43). Age of the patients, testicular size, serum FSH, LH and testosterone did not show any statistically significance on sperm retrieval rates.

**Conclusion:** Micro-TESE is the most accurate and successful method of surgically retrieval of sperm cells in non- obstructive azoospermic patients. Our results are consistent with the rates of reference centers.

**Keywords:** Micro-TESE, Infertility, Azospermia

### Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Dr. Eyyup Sabri Pelit

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Üroloji Anabilim Dalı Osmanbey  
Kampüsü, Şanlıurfa, Türkiye

Tel: + 90 506 388 3186

E-mail: dreyyupsabri@hotmail.com

**Geliş tarihi / Received:** 30/10/2018

**Kabul tarihi / Accepted:** 31/01/2019

## Giriş

İnfertilite seksüel olarak aktif çiftlerde korunmasız ilişkiye rağmen 1 yıl boyunca spontan gebelik oluşmamasıdır. İnfertilite çiftlerin ortalama olarak %15'ini etkilemektedir. İnfertil vakaların ortalama %50'sinden erkekler, %50'sinden kadınlar sorumludur (1,2). Ejakülatta sperm hücrelerinin toplam yokluğu azospermi olarak tanımlanmaktadır. Azoospermi, en az iki kez santrifüj edilmiş spermin mikroskopik değerlendirilmesinden sonra ejakülatta spermatozoanın olmaması durumunda tanısı konulmaktadır. Azospermi obstrüktif ve non-obstrüktif olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Obstrüktif azospermide testisteki sperm üretimi normal olup genital trakttaki bir obstrüksiyondan dolayı ejakülata dışarı yeterli miktarda atılmamaktadır. NOA'de hipotalomo- hipofizer-gonadal aks boyunca olan sorun ya da sorunlardan dolayı testisteki sperm üretimi kusurundan kaynaklanmaktadır. Genel popülasyonun % 1'inde ve infertil erkeklerin % 10-15'inde görülmektedir.(1,2)

Azospermik hastalarda testisküler sperm elde etmek için değişik teknikler mevcuttur. Testiküler Sperm Aspirasyonu (TESA), Perkütan Sperm Aspirasyonu (PESA), Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) bu yöntemlerdendir (3-5). Mikro-TESE (%35-%77), NOA hastalarında sperm elde etmede bahsedilen yöntemlerin yerini almıştır. Mikro-TESE, fokal sağlıklı görünümlü tübüllerin örneklenmesini sağlamak, böylece spermatozoa verimini en üst düzeye çıkarmak, kaybedilen testiküler doku miktarını azaltmak, sperm elde etme oranını artırmak ve subtunikal damarları korumak için önerilen yöntem olmuştur (6,7).

Bu çalışmada hasta demografik özellikleri, testis fonksiyonları, hormon parametreleri ve genetik özellikler ile mikro TESE işleminde sperm elde etme oranları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Method

Mayıs 2017'den Haziran 2018'e kadar, non-obstrüktif azospermi (NOA) nedeni ile üroloji kliniğine başvuran ve mikro TESE yapılan 83 hastanın verileri geriye dönük olarak değerlendirildi. Tüm hastalardan anamnez alınıp, fizik muayene yapıldıktan sonra semen analizi ve hormon profili istendi. Semen örnekleri 3-5 günlük cinsel perhizden sonra masturbasyon ile elde edildi ve steril kaplara toplandı. Azoospermiminin varlığı 2 hafta ara ile yapılan en az iki semen örneği ile belgelendi, hepsi 3000 g'da santrifüje edildi ve yeniden süspanse edilen pellet kapsamlı bir şekilde tekrar incelendi. Fizik muayenede, testis boyutları, varikosel varlığı, sekonder seks karakterlerinin gelişimi, orşit bulguları, vasdeferens palpe edilerek incelendi. Preoperatif folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinize edici hormon (LH), total testosteron düzeyleri, karyotip analizi, Y mikro delesyon mevcudiyeti ve

sperm ekstraksiyonu için önceki müdahalelerin sonuçları için tıbbi kayıtlar gözden geçirildi. Testis boyutları, skrotal ultrasonografi sonuçlarına göre hesaplandı. Elde edilen sperm hücreleri kriyoprezervasyona tabi tutuldu. ICSI prosedürü, elde edilen sperm hücreleri kullanılarak başka seansta gerçekleştirilecektir.

## Mikrocerrahi Testiküler Sperm Ekstraksiyonu: Cerrahi Teknik

Tüm hastalardan aydınlatılmış onam alındıktan sonra spinal anestezi altında cerrahi yapıldı. Cerrahi temizlik ve steril örtünmeyi takiben 2-3 cm'lik skrotal orta hat raphe insizyonu yapıldı. Dartos ve tunika vaginalis katları geçilerek testis orta hat raphe insizyonundan doğurtuldu. Tunica albuginea'nın avasküler alanından orta hat longitudinal insizyon yapıldı (**Şekil 1**). İnsize edilen her iki tunica albuginea yaprağı klemp ile tutularak testiküler parankim ortaya konuldu. Testiküler parankimin diseksiyonu, mikroskop (Karl Zeiss, Germany) altında 18-22 büyütmede germ hücrelerini içermesi daha muhtemel olan, genişlemiş ve opak tübüller seçilerek gerçekleştirildi (**Şekil 2**). Gerekirse yüzeysel ve derin testiküler bölgeler incelendi ve mikrocerrahi forsepsler kullanılarak genişlemiş ve opak tübüllerin dikkatlice çıkarılmasıyla mikrocerrahi eşliğinde testis biyopsileri yapıldı. Genişlemiş tüpler görülmezse, üst, orta ve alt testiküler bölgelerden iki ila üç adet random mikro biyopsi yapıldı. Cerrahi ile elde edilen testiküler dokular bir embriyolog tarafından, bir çift steril steril iğneler kullanılarak kıyıldı ve parçalandı, daha sonra x250 büyütme kullanılarak bir invert mikroskop altında spermatozoanın varlığı araştırıldı. Tüm Petri kabı kontrol edildi ve spermatozoa görülmediyse, tüm doku ve tamponlu ortam konik bir tüpte konulup çökmeye bırakıldı. Süpernatant temiz bir tüpe alındı ve 5 dakika 300 g'de santrifüjlendi. Pellet, 50 ul tamponlu ortam içinde yeniden süspanse edildi ve embriyolog tarafından spermatozoanın mevcudiyeti için tekrar kontrol edildi. Tunica albuginea kontinü emilmeyen 5-0 naylon sütür kullanılarak kapatıldı. Hemostazın ardından, katlar anatomisine uygun olarak kapatıldı. Hastalar postoperatif 1. gün taburcu edildi. Komplikasyon durumunda skrotal ultrason yapıldı.

**İstatistiksel analiz:** Veriler SPSS v.17 programı ile değerlendirildi. Bağımsız gruplar ki kare testi ve grup oranları student's t test ile karşılaştırıldı. P değeri < 0,05 ise anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Çalışmaya toplam 83 hasta dahil edildi. Hastaların ortalama yaşı  $27,7 \pm 5$  olarak bulundu. Mikro-TESE pozitif olan hastaların ortalama yaşı  $26,8 \pm 6$ , negatif olanların ortalama yaşı  $28,3 \pm 5$  olarak saptandı. Ortalama infertilite süresi  $5,2 \pm 3,5$  yıldır. Genel sperm elde etme oranı %51,8 (43) idi. Hastaların yaşı, testiküler boyut, serum FSH ( $24,8 \pm 12,1 - 27,9 \pm 10,8$ ), LH ( $9,2 \pm 5, - 10,7 \pm 4,6$ ) ve testosteron

(290,4 ± 28- 343±234) düzeyleri sperm elde etme oranları üzerinde anlamlı bir etki göstermedi. On üç hastada (% 15,6) Klinefelter sendromu vardı (Tablo 1). Tese pozitif ve Tese negatif gruplar karşılaştırıldığında FSH ve testosteron düzeyi hasta yaşı, klinefelter sendromu mevcudiyeti ile sperm elde etme oranları arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (P>0,005). Daha önce TESE başarısız olup Re-TESE (8/2) yapılan hastalarda sperm elde etme oranı primer hastalara göre düşük bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,005). Elde edilen sperm hücreleri kriyoprezervasyona tabi tutuldu. ICSI prosedürü elde edilen sperm hücreleri kullanılarak gerçekleştirilecektir. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan 3 hasta bilateral orşiopeksi, 2 hasta tek taraflı orşiopeksi, 7 hasta varikosektomi, 2 hasta inguinal herni operasyonu geçirmiştir. Postoperatif 2 hastada yara yeri enfeksiyonu, 1 hastada skrotal hematoma gelişti. Medikal tedavi ile komplikasyonlar tedavi edildi.



Şekil 1. Tunica albuginea'nın avasküler alanından orta hat longitudinal insizyonu

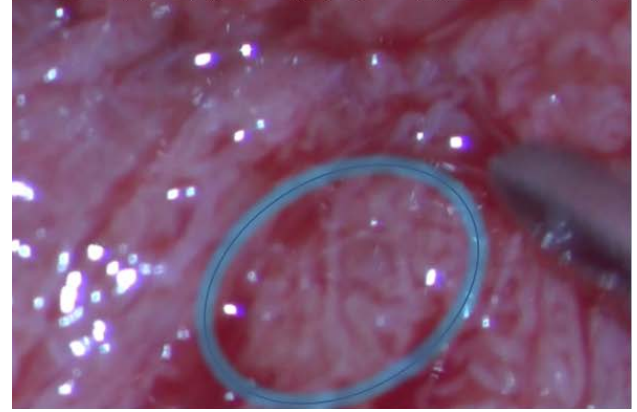
### Tartışma

NOA olan hastalarda testiküler spermatozoa elde etmek için ince iğne aspirasyonu, standart TESE ve perkütan biyopsi dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılabilir. (8,9). Teknolojik gelişmelere paralel olarak gelişen Mikro-TESE uygulaması, spermatozoa elde etme oranını en üst düzeye çıkarmıştır, daha az testis doku kaybı ve geleneksel prosedürlere göre daha az akut ve kronik komplikasyona sahip bir yöntemdir (6,7)

Mikro-TESE sperm elde etme oranı çalışmalarda % 33,3 ile % 63 arasında bildirilmiştir (10,11). Bizim makalemizde ise literatürle uyumlu olarak sperm elde etme oranımız %51,8 olarak bildirilmiştir.

Testis hacmi, sperm elde etmeyi tahmin etmek için geniş çapta araştırılan bir parametredir. NOA'lı hastaların testiküler hacimlerinin, obstrüktif azospermikli hastalardan genellikle daha az olduğu bildirilmiştir (12). Ancak, düşük volümlü testisler de bile normal spermatogenezin olabileceği gösterilmiştir. NOA'lı hastalarda atrofik testis varlığı

mikro- TESE için kontraendikasyon olmaması gerektiğini önermişlerdir (13). Bizim çalışmamızda ise testiküler hacmin TESE pozitif ve negatif 2 grup arasında fark olmadığı, yani sperm elde etmede prediktif bir parametre olarak kullanılamayacağı gösterilmiştir.



Şekil 2. Mikroskop altında 18-22 büyütmede germ hücrelerini içermesi daha muhtemel olan genişlemiş ve opaktübüller

Tablo 1. Hormon, testis boyutu ve karyotip analizinin sperm elde etme oranıyla ilişkisi

	TESE (+)	TESE (-)	P
Sayı	43 (%51,8)	40 (%48,2)	
Yaş	26,8±6	28,3±5	>0,005
Testis Hacmi			
Sağ testis (cc)	11,8±6,3	12,6±4,9	>0,005
Sol Testis (cc)	12,2± 4,4	13,2 ±5,7	>0,005
Fsh (iu/l)	24,8± 12,1	27,9±10,8	>0,005
Lh (iu/l)	9,2±5,8	10,7±4,6	>0,005
T.testosteron (ng/dl)	290,4 ± 284	343±234	>0,005
Karyotip			
Normal	37	29	>0,005
Klinefelter	4	9	>0,005
Re-TESE	2	6	<0,005

Serum FSH düzeyi, TESE'de sperm elde oranını tahmin etmede uzun yıllardır araştırılan bir diğer parametredir. FSH düzeyi spermatogonia sayısı ile ters orantılıdır. FSH değeri yüksek olanlarda sperm elde etme başarısı ve dolayısıyla çocuk sahibi olma ihtimali düşüktür (14). Ancak FSH seviyesi, spermatogenez mevcudiyetini doğru bir şekilde tahmin etmez çünkü maturasyon arresti histolojisine sahip erkekler normal FSH ve testis hacmine sahip olup halen azospermik olabilirler (15). Serum FSH düzeyinin konvansiyonel TESE ile alınabilecek spermin varlığını tahmin edebileceği bildirilmiştir (16). Bununla birlikte, diğer bazı çalışmalar FSH'nın TESE' de sperm elde etmede zayıf bir prediktif değere sahip olduğunu göstermiştir (17,18). Bizim çalışmamızda FSH düzeyi TESE pozitif ve negatif 2 grup arasında fark olmadığı yani sperm elde etmede prediktif bir parametre olarak kullanılamayacağı gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak, FSH sadece spermatogenez fonksiyonunu yansıtabilir, ancak

testiste izole bir alanın fonksiyonunu değerlendiremez. Mikro- TESE, spermatojenik alanı bulmak için testisin her bir parçasının dikkatli bir incelemesini sağlar. Bu nedenle, mikro- TESE yöntemi ile, global spermatogenezi işlevi çok düşük, lokal spermatogenesis olan testislerden sperm elde edilebilir (19).FSH'nin mikro-TESE'nin sperm elde etme başarısını tam olarak öngörememesi nedeni bu olabilir. NOA bağlı en sık görülen kromozom anomalisi, Klinefelter sendromudur (20,21). Bu genetik anormallik, vakaların çoğunda 47, XXY genotipine bağlı olarak mayotik direnç göstermeyebilir (22).Klinefelter sendromlu erkeklerde mikro-TESE ile sperm elde etme oranı % 21-72 arasında değişmektedir. (23-24). Mozaik olmayan Klinefelter sendromlu hastalarda % 38,5 oranında sperm elde etme oranı bildirmiştir (25). Yapmış olduğumuz çalışmada ise Klinefelter sendromlu azospermik hastalarda sperm elde etme oranımız %30,7 (4/13)'dir.

Serum total testosteron ve LH düzeyi ile NOA'de sperm bulma arasındaki ilişki tartışmalıdır. Reifsnnyder ve ark. testosteron seviyesini optimize etmenin sperm elde etme üzerine etkisini araştıran çalışmalarında toplam 1.054 hastaya mikro-TESE yapmışlar. 300 ng / dl'den düşük preoperatif testosteron düzeyi olan hastalar, testosteron düzeylerini optimize etmek amacıyla operasyon öncesinde aromataz inhibitörleri, klomifen sitrat veya insan korionik gonadotropin ile tedavi edilmiş. Nonobstrüktif azospermi ve hipogonadizm olan erkekler genellikle hormonal tedaviye testosteron düzeylerinde bir artışla yanıt verirler, fakat ne başlangıçtaki testosteron seviyesi ne de hormonal tedaviye yanıt genel sperm alma, klinik gebelik veya canlı doğum oranlarını etkilemediğini saptamışlardır (26).

Güncel araştırmalar, doku çıkarılmasına gerek kalmadan sperm üreten tübüllerin tanımlanmasına yardımcı olabilecek yeni araçlara odaklanmaktadır. Multiphoton mikroskopu, bir ex vivo hayvan modelinde anormal spermatogenezi normalden ayırt etmek için başarılı bir şekilde uygulanmıştır (27). Ayrıca, sperm kalitesi üzerinde zararlı hiçbir etkisi olmayan güvenli bir ışık kaynağı kullanan tam alan optik koherens tomografi, son zamanlarda bir ex vivo kemirgen modelinde spermatogenezin gerçek zamanlı görüntülenmesini kolaylaştırmak için yararlı bir araç olarak tanımlanmıştır (28).Yukarıda bahsedilen yöntemler, çalışma mikroskobu ile birleştirilip mikro-TESE'ye yardımcı olma potansiyeline sahip ve gelecek vaat edebilecek tekniklerdir.

### Sonuç

Mikro-TESE, yüksek sperm elde etme oranları ve düşük komplikasyon oranı ile sperm elde etmede tercih edilen yöntemdir. Hastaların yaşı, testis büyüklüğü, klinefelter sendromu varlığı, serum FSH ve testosteron düzeyi ile sperm elde etme oranları arasında ilişki yokken, başarısız önceki sperm alma girişimleri sperm elde etmede tek

anamlı parametre olarak karşımıza çıkmaktadır.

### Kaynaklar

1. Willott GM. Frequency of azoospermia. *Forensic Sci Int.* 1982;20:9-10.
2. Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol.* 1989;142:62-5.
3. Rosenlund B, Kvist U, Plüen L, Rozell BL, Sjöblom P, Hillensjö T. A comparison between open and percutaneous needle biopsies in men with azoospermia. *Hum Reprod.* 1998;13:1266-71.
4. Amer M, Ateyah A, Hany R, Zohdy W. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: Follow-up by serial ultrasound examinations. *Hum Reprod.* 2000;15:653-6.
5. Tournaye H. Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection: Which method is to be preferred? *Hum Reprod.* 1999;14:71-81.
6. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: Microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod.* 1999;14:131-5.
7. Amer M, Ateyah A, Hany R, Zohdy W. Prospective comparative study between microsurgical and conventional testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia: Follow-up by serial ultrasound examinations. *Hum Reprod.* 2000;15:653-6.
8. Friedler S, Raziell A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovskiy D, Ron-EI R. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1997;12:1488-93.
9. Rosenlund B, Kvist U, Plüen L, Rozell BL, Sjöblom P, Hillensjö T. A comparison between open and percutaneous needle biopsies in men with azoospermia. *Hum Reprod.* 1998;13:1266-71.
10. Tsujimura A, Miyagawa Y, Takao T, Takada S, Koga M, Takeyama M, et al. Salvage microdissection testicular sperm extraction after failed conventional testicular sperm extraction in patients with nonobstructive azoospermia. *J Urol.* 2006;175:1446-9.
11. Everaert K, De Croo I, Kerckhaert W, Dekuyper P, Dhont M, Van der Elst J, et al. Long term effects of micro-surgical testicular sperm extraction on androgen status in patients with non obstructive azoospermia. *BMC Urol.* 2006;6:9.
12. Moon MH, Kim SH, Cho JY, Seo JT, Chun YK. Scrotal US forevaluation of infertile men with azoospermia. *Radiology.* 2006;239:168-73.
13. Bryson CF, Ramasamy R, Sheehan M, Palermo GD, Rosenwaks Z, et al. Severe testicular atrophy does not affect the success of microdissection testicular sperm extraction. *J Urol.* 2014;191:175-8.
14. Zitzmann M, Nordhoff V, von Schonfeld V, Nordsiek-Mengede A, Kliesch S, Schuring AN, 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. *FertilSteril.* 2006; 86(2):339-347.
15. Hauser R, Temple-Smith PD, Southwick GJ, de Kretser D. Fertility in cases of hypergonadotropic azoospermia. *FertilSteril.* 1995; 63(3):631-636.
16. Ishikawa T. Surgical recovery of sperm in non-obstructive azoospermia. *Asian J Androl.* 2012;14:109-15.
17. Jezek D, Knuth UA, Schulze W. Successful testicular sperm extraction (TESE) in spite of high serum follicle stimulating hormone and azoospermia: correlation between testicular morphology, TESE results, semen analysis and serum hormone values in 103 infertile men. *Hum Reprod.* 1998;13:1230-4.
18. Ezech UI, Taub NA, Moore HD, Cooke ID. Establishment of

- predictive variables associated with testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1999;14:1005-12.
19. Silber SJ, van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, et al. Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturational arrest. *Fertil Steril*. 1996;66:110-7.
  20. Akslae L, Wikström AM, Rajpert-De Meyts E, Dunkel L, Skakkebaek NE, Juul A. Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(1):39-48.
  21. Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Marin P, Rossato M, Garolla A, et al. Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3807-3810.
  22. Harari O, Bourne H, Baker G, Gronow M, Johnston I. High fertilization rate with intracytoplasmic sperm injection in mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril*. 1995;63(1):182-184.
  23. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome analysis and outcome of IVF in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril*. 2000;74(5):925-929.
  24. Yarali H, Polat M, Bozdag G, Gunel M, Alpas I, Esinler I, et al. TESE-ICSI in patients with non-mosaic Klinefelter syndrome: a comparative study. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(6):756-760.
  25. Madureira C, Cunha M, Sousa M, Neto A, Pinho M, Viana P, et al. Treatment by testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection of 65 azospermic patients with non-mosaic Klinefelter syndrome with birth of 17 healthy children. *Andrology*. 2014;2(4):623-631.
  26. Reifsnyder JE, Ramasamy R, Hussein J, Schlegel PN. Role of optimizing testosterone before microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. *The Journal of urology*. 2012; 188(2):532-536.
  27. Ramasamy R, Sterling J, Fisher ES, Li PS, Jain M, Robinson BD, et al. Identification of spermatogenesis with multiphoton microscopy: An evaluation in a rodent model. *J Urol*. 2011;186:2487-92.
  28. Ramasamy R, Sterling J, Manzoor M, Salamoon B, Jain M, Fisher E, et al. Full field optical coherence tomography can identify spermatogenesis in a rodent sertoli-cell only model. *J Pathol Inform*. 2012;3:4.