

SEMİNAL PLAZMA TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ: İNFERTİLİTE PATOGENEZİNDEKİ ÖNEMİ VE SEMİNAL PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ

SEMİNAL PLAZMA TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY: SIGNIFICANCE IN THE PATHOGENESIS OF INFERTILITY AND THE RELATIONSHIP WITH SEMEN PARAMETERS

BAŞAR, M.M., ÜNAL, M.S., ATAN, A., AYDOĞANLI, L.

ÖZET

Amaç: Çalışmanın amacı, idiopatik infertil hastalar ile normal spermiyogram parametreleri olan fertil kontrol grubu bireyler arasında seminal plazma anti-oksidan düzeyini karşılaştırarak, total anti-oksidan kapasitenin (TAK) idiopatik infertil bireylerdeki düzeyini değerlendirmektir.

Yöntem: Detaylı anamnez, fizik muayene, serum hormon profili, ve 2 defa tekrar edilen spermiyogram sonra 38 hasta çalışma grubu olarak seçildi. Herhangi bir ürolojik problem ile üroloji polikliniğine başvuran ve infertilite problemi olmayan 20 hasta ise kontrol grubu olarak seçildi. Çalışmaya dahil edilen bireyler oligoastenospermi, azospermi ve kontrol olarak üç gruba ayrıldı. Gruplar arasında semen parametreleri ve seminal plazma TAK ortalamaları arasındaki fark Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Ayrıca, infertil grupta varikozel saptanan vakalarda, varikozel varlığı ile TAK arası ilişki regresyon analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: Çalışma sonunda 28 hasta (%73.6) Oligoastenospermi, 10 hasta (%26.4) azospermi olarak değerlendirildi. Gruplar arasında TAK değerlerinde anlamlı olarak farklılık izlendi ($p=0.001$, $p<0.05$). Buna karşın, varikozel varlığı ile TAK düzeyi değerlendirilmesinde ise arada ilişki bulunmadı ($p=0.2040$, $p>0.05$).

Sonuç: Sonuç olarak, TAK idiopatik infertilite etiyolojisinde önemli bir parametre olduğu ve antioksidan ilaçların tedavide etkinliğinin değerlendirilmesi gerektiği kanısına varıldı.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to evaluate the total antioxidant capacity in idiopathic infertile patients by comparing the seminal plasma antioxidant levels of infertile patients with normal control cases.

Method: After a detailed history, physical examination, serum hormone profile and a twice repeated sperm analysis, 38 patients were enrolled into the study. Twenty fertile patients who came to urology out-patient for general urologic problems were selected as control group. The patients were divided into 3 groups as oligoasthenospermia, azospermia and control. The differences in semen parameters and seminal plasma antioxidant level in all groups were assessed statistically by using Kruskal Wallis variant analysis. Moreover, the relationship between the existence of varicocele and total antioxidant levels were evaluated with regression analysis.

Result: At the end of the study, 28 patients were evaluated as OAT, and 10 as azospermia. Among the groups, statistically significant differences were observed ($p<0.05$). On the contrary, no relationship between the existence of varicocele and total antioxidant capacity was found ($p>0.05$).

Conclusion: In conclusion, TAC is an important parameter in the etiology of idiopathic male infertility, and the efficacy of antioxidant drugs should be taken into consideration in the treatment of infertility.

ANAHTAR KELİMELELER: İnfertilite, antioksidan kapasite, antioksidan ilaçlar

KEY WORDS: Infertility, antioxidant capacity, antioxidant drugs

Dergiye geliş tarihi: 11.01.1999

Yayına kabul tarihi: 04.06.1999

Ankara Numune Hastanesi I. Üroloji Kliniği/ANKARA

GİRİŞ:

Genel popülasyondaki evli çiftler arasında %5-10 oranında görülen infertilitenin %40-50'sinde sebep erkek faktörüdür. Tanı yöntemlerindeki tüm gelişmelere rağmen infertil çiftlerin %25-30'unda etiyolojik neden belirlenemez ve bu durum idiopatik infertilite olarak adlandırılır^{1,2}.

Son yıllarda, seminal plazmada tesbit edilen ve reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan oksijen radikalleri, idiopatik infertilitenin nedenleri arasında görülmektedir^{3,4}. Spermatozoa, plazma membranındaki yüksek konsantrasyonundaki yağ asidi içeriğinden dolayı ROS ile reaksiyonlara karşı duyarlıdır. ROS oluşumu hücre membranında oksidatif hasara yol açabilir. Böylece hücre membranının bütünlüğü bozulurak permeabilite artar ve DNA içeriğindeki bozulmalar sonucu hücre ölümü gerçekleşir⁵. Diğer taraftan, spermatozoa ROS'un hasar yaratıcı etkilerine karşı çeşitli koruma mekanizmaları geliştirmiştir. Enzimatik ve non-enzimatik anti-oksidanlar olarak adlandırılan bu maddeler ROS'ni direkt olarak yakalar ve zincirleme reaksiyonları önlerler^{6,7,8}. Bu mekanizmaların ortaya konulmasından sonra idiopatik erkek infertilitesinin tedavisinde antioksidan maddelerin kullanımı gündeme gelmiştir.

Biz çalışmamızda, infertilite nedeni ile polikliniğimize başvuran ve yapılan tetkikler sonucunda oligoastenoteratospermi (OAT) veya azospermi saptanan hastalar ile normal spermiyogram parametreleri olan fertil kontrol grubu bireyler arasında seminal plazma antioksidan düzeyini karşılaştırarak, total antioksidan kapasitenin (TAK) idiopatik infertil bireylerdeki düzeyini değerlendirdik.

GEREÇ VE YÖNTEM:

Bu çalışma Eylül-1997 ile Ağustos 1998 tarihleri arasında Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniğine infertilite nedeni ile başvuran hastalar üzerinde yapıldı. İnfertil hastalar en az 1 yıl süre ile evli olup, herhangi bir kontrol yöntemi kullanmaksızın çocuk sahibi olamayan hastalar arasından seçildi. Poli-

kliniğimize değişik ürolojik yakınmalar ile başvuran ve fertil olduğu bilinen 20 birey ise kontrol grubu olarak seçildi. Rutin fizik muayene, laboratuvar testleri ve spermiyogram çalışılmasından önce tüm hastalar ile kontrol grubu bireylerin onayı alındı.

Bütün hastalardan detaylı anamnez alındı, evlilik hikayesi, koital alışkanlıklar, geçirilmiş operasyonlar, daha önce alınan infertilite tedavileri, geçirilmiş bulaşıcı hastalık öyküsü, sigara ve alkol kullanımı sorgulandı. Fizik muayenede sekonder seks karakterleri, testis boyutu ve kıvamı değerlendirildi, varikozel muayenesi yapıldı. Rutin biyokimya analizi, FSH, LH, total testesteron, serbest testesteron ve prolaktin içeren hormon analizi tüm hastalara uygulandı. Fizik muayenede varikozel saptanan tüm hastalara renkli skrotal Doppler ultrasonografi yapıldı. Sperm analizi 3-4 günlük cinsel perhiz sonrası alınan ejakulatta 1 ay ara ile 2 defa yapıldı. Normal sperm parametreleri⁹:

- Sperm sayısı ≥ 20 milyon/ml,
- Motilite $\geq 50\%$ (Grade-4 mükemmel progressif ileri hareketli sperm + grade-3 progressif ileri hareketli sperm)
- Morfoloji $\geq 50\%$ (WHO kriterlerine göre)
- Lökosit $\leq 1M/ml$ olarak kabul edildi.

Tüm bu rutin değerlendirmelerden sonra 38 hasta çalışmaya dahil edildi. Sperm analizinde lökosperti saptanan veya geçirilmiş cinsel ilişki ile bulaşan hastalık öyküsü olanlar, daha önce varikozel nedeni ile opere edilenler, hormonal patolojisi olanlar, daha önce antioksidan tedavi almış olanlar ve kontrol grubu bireylerde varikozel saptananlar çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmaya dahil edilen 38 infertil hasta ile 20 kontrol grubu bireyden tekrar 3 günlük cinsel perhiz sonrası ejakulat örneği alınarak seminal plazmada TAK çalışıldı.

TAK Ölçüm Metodu: Ejakulat 3000 rpm hızda 5 dakika süre ile santrüfuj edildikten sonra seminal plazma elde edildi. Randox NX 2332 numaralı kiti kullanılarak TAK düzeyi ölçüldü.

Bu yöntemde, 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiozoline sulfonate=ABTS) peroksidaz ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonunda, $ABTS^+$ radikal katyonunu oluşturur ve spektrofotometrede mavi-yeşil renk elde edilir. Bu renk 600nm'de spektrofotometre ile değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilen bireyler, OAT, azoospermi ve kontrol olarak üç gruba ayrıldı. Ayrıca infertil hasta grubu, varikozel varlığına göre de olan ve olmayan olarak iki grupta değerlendirildi.

İstatistiksel değerlendirme, SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows 5.0) istatistik programı kullanılarak yapıldı. Kontrol grubu ve çalışma grupları arasında TAK ve sperm parametreleri ortalamaları arasında fark olup olmadığı Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. p değeri 0.05'den küçük ise aradaki fark anlamlı olarak kabul edildi. Bu durumda farkın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için Tukey HSD yöntemi ile ikili gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Ayrıca, infertil grupta varikozel saptanan vakalarda varikozel varlığı ile TAK arası ilişki regresyon analizi ile değerlendirildi.

SONUÇLAR:

Çalışmaya dahil edilen 38 infertil hastanın 28'i (%73.6) OAT, 10'u (%26.4) azoospermi olarak değerlendirildi. Çalışmaya alınan tüm vakalarda serum hormon değerleri ve biyokimyasal tetkikler normal sınırlarda idi. Kontrol grubu bireyler ile infertil hasta gruplarının yaş, sperm parametreleri ve TAK değerleri tablo-1'de izlenmektedir. Gruplar arasında sperm parametreleri ve TAK değerleri arasında anlamlı farklılık izlenirken ($p<0.05$), hasta yaşları açısından fark gözlenmedi ($p>0.05$).

TAK değerleri arasında izlenen farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak amacı ile yapılan Tukey HSD testinde ise infertil hasta grupları ortalamaları arasında fark gözlenmez iken ($p>0.05$), kontrol grubu bireyler ile infertil gruplar arasında belirgin farklılık bulundu ($p<0.05$).

Skrotal renkli Doppler ultrasonografi ile infertil 38 hastanın 9'unda (%23.6) varikozel mevcut iken, kontrol grubu bireyler ile 29 infertil hastada varikozel saptanmadı ($n=49$). Varikozel varlığı ile TAK düzeyi değerlendirilmesi regresyon analizi ile yapıldı ve arada ilişki bulunmadı ($p=0.2040$, $p>0.05$).

	Normal	OAT	Azoospermi	p Değeri
Yaş (Yıl)	29.9+/-1.22	28.5+/-0.86	28.9+/-1.35	0.7319*
Sayı ($10^6/ml$)	68.8+/-6.62	16.4+/-1.39	-	0.0000
Motilite (%)	72.75+/-2.87	26.46+/-2.9	-	0.0000
Morfoloji (%)	75.25+/-2.31	44.5+/-4.23	-	0.0000
TAK (mmol/L)	1.99+/-0.09	1.69+/-0.03	1.68+/-0.06	0.0001

Tablo-1: Kontrol grubu bireyler ile infertil hasta gruplarının yaş, sperm parametreleri ve TAK değerleri (* $p>0.05$ ise aradaki fark anlamsız).

TARTIŞMA:

İnfertilite değerlendirilmesinde bütün araştırmalara rağmen hastaların %25'inde etiyolojik faktör bulunamamakta ve bu durum idiyopatik infertilite olarak adlandırılmaktadır^{1,2}. Erkek

infertilitesinde tedavinin başarıya ulaşması için etiyolojinin doğru olarak tesbit edilmesi gerekir.

İdiyopatik infertil erkeklerin tedavisinde ampirik tedavi yaklaşımları ile spermatogenez kalitesinin iyileştirilmesi amaçlanır. Bu amaçla

çeşitli hormonal preparatların yanında kallikrein, pentoksifilin ve E vitamini gibi ajanlar da kullanılmaktadır^{1,10} lipsch

Son yıllarda serbest radikallerin oluşumu ve buna karşı anti-oksidan defans mekanizmasının ortaya konulması ile erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde yeni bir bakış açısı olmuştur^{11,12}. Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) sperm parametrelerini, özellikle motilite ve morfolojiyi bozarak infertiliteye yol açabileceği belirtilmektedir^{13,14}. Sperm membranı yüksek konsantrasyonda poliansatüre yağ asidi içeriği ve defansif mekanizmaların bozulması nedeni ile ROS hasarına karşı duyarlı olabilir^{4,7}. ROS etkilerine karşı antioksidan mekanizmaların ve antioksidan maddelerin saptanması ve bunların infertilite tedavisinde kullanılabileceği yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur^{15,16}.

Seminal plazmadaki ROS, lökositler ve spermatozoanın kendisinden kaynaklanır. Fizyolojik durumda seminal plazma ve normal motil spermatozoanın çok fazla ROS üretmeyeceği belirtilmektedir. ROS'un asıl olarak inmotil, morfolojisi bozuk spermatozolar tarafından salındığı ileri sürülmektedir^{3,7,17}.

Seminal plazmada antioksidan kapasitenin araştırılması nonenzimatik veya enzimatik yolla olabilir. Nonenzimatik yolla askorbat, ürat, vitamin-E, alfa tokoferol ve proteinler araştırılırken, enzimatik yolla süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi ölçülebilmektedir^{6,7,8,18}.

Lewis ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada fertil ve infertil hastaların seminal plazmalarında total antioksidan düzeylerini araştırmışlar ve astenozoospermi saptanan fertil hastaların total antioksidan düzeylerini, normozoospermi olan fertil hastalara göre düşük bulmuşlardır. Böylece, total antioksidan kapasitenin motilite ile bağlantılı olabileceğini ileri sürmüşlerdir^{14,18}. Bu bulgu ROS'un yok eden enzimler içinde geçerli olabilir. Yapılan çalışmalarda oligozoospermik hastaların katalaz ve süperoksit dismutaz seviyelerinin normozoospermik hastaların enzim seviyelerine göre düşük olduğu gösterilmiştir^{19,20}.

Smith ve arkadaşları da 101 infertil ve 15 fertil erkeği kullanarak yaptıkları çalışmada, infertil hastaların total antioksidan kapasitesini düşük bulmuşlar ve bozulmuş antioksidan defans mekanizmasının infertilide rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir²¹. Daha sonra yapılan çalışmalarda da seminal plazma süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve total sülfidril grup seviyeleri infertil hastalarda düşük bulunmuş, düşük seminal plazma antioksidan seviyesi veya yükselmiş ROS üretiminin idiyopatik erkek infertilisinde rol oynayabileceğini ileri sürülmüştür²².

Bizim çalışmamızda, infertil hastalar ile fertil bireylerde enzimatik yöntemle seminal plazmada TAK düzeyleri değerlendirildi ve infertil hastalarda TAK düzeylerini fertil bireylerden daha düşük olarak saptandı.

Lewis ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, TAK'ı oluşturan maddeleri tek tek değerlendirmişler ve sadece askorbat düzeyinde astenospermik hastalar ile diğerleri arasında fark gözlemişler, ürat, alfa tokoferol ve sülfidril düzeylerinde ise fark bulamamışlardır. Askorbat düzeyi düşük olan astenospermik hastalarda ROS seviyesi de yüksek bulunmuş ve askorbatın ROS ile reaksiyona girerek tüketildiği ve seviyesinin azaldığı ileri sürülmüştür¹⁸.

Therond ve arkadaşları ise alfa tokoferol düzeyini sperm motilitesi, antioksidanenzim düzeyi ve lökosit miktarıyla karşılaştırdıklarında motil sperm yüzdesini seminal plazma alfa tokoferol düzeyi ile orantılı olarak bulmuşlardır¹⁶. Ayrıca, lökosperti varlığında alfa tokoferol ve antioksidan enzim düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak, alfa tokoferolün antioksidan enzimlerle birlikte spermatozoayı oksidatif hasardan koruyucu rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.

Bütün bu çalışmaların yanında, antioksidan kapasite seviyesinin fertil veya infertil gruplar arasında farklı olmadığını ileri süren çalışmalar da vardır. Jozwik ve arkadaşlarının 112 hasta ile yaptıkları bir çalışmada infertil ve fertil bireyler arasında TAK açısından fark olmadığı belirtilmiştir¹². Yine aynı çalışmada, lökosperti ve

sigara içmenin TAK'yi etkilemediği ileri sürülmüştür.

Kodama ve arkadaşları ise, 90 infertil ve 17 fertil birey içeren çalışmalarında infertil grup spermatozoalarında anlamlı miktarda DNA hasarı tesbit etmişler ve bunun antioksidan tedavi ile düzeldiğini belirtmişlerdir²³. Lopes'de yaptığı benzer bir çalışmada antioksidan tedavi ile DNA hasarının azaldığını göstermiştir²⁴.

Süleiman ve arkadaşları lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit düzeyini spermatozoada ve seminal plazmada incelemişler ve spermatozal malondialdehit düzeyi yüksekliğinin motiliteyi bozduğunu saptamışlardır²⁵. Aynı çalışmada, oral vitamin-E tedavisi sonrasında malondialdehit düzeyinin azalarak motilitenin düzeldiğini saptamışlardır.

Varikoselli hastaların seminal plazmalarında ROS üretiminin varikoseli olmayanlara göre daha yüksek miktarda olduğu belirtilmektedir⁷. Ancak, varikoseli olan hastaların TAK'leri hakkında literatürde henüz yeterli sayıda çalışma yoktur. Biz çalışmamızda, az sayıda varikoselli hasta tesbit etmemize rağmen, varikoselin TAK'yi etkilemediğini gözlemledik.

Yapılan in-vivo ve invitro çalışmalarda yüksek seminal plazma ROS düzeyinin antioksidan maddeler ile azaldığının gözlenmesi ile bu maddelerin tedavide etkin olarak kullanılabileceği belirtilmektedir^{22,23,24}.

Sonuç olarak, idiyopatik erkek infertilitesinin fizyopatolojisinde reaktif oksijen radikallerinin büyük oranda rol oynadığı düşünülmektedir. Bu maddelerin spermatozoaya verdiği hasarlar TAK'nin araştırılmasını popüler hale getirmiştir. Antioksidan maddelerin kullanılarak reaktif oksijen radikallerinin etkilerinin azaltılabileceğinin gösterilmesi tedavide önemli bir aşamadır. Bunun yanında, henüz net olarak ortaya konulamamış varikoselin infertile yapıcı etkisi konusunda TAK ve reaktif oksijen radikallerinin de etkili olabileceği düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

1- Sigman M., Howards S.: Male infertility; in Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED

(6th Eds): Campbell's Urology vol.1, 661-706, 1992.

- 2- Özdiler E., Aydos K.: Erkek infertilitesi; in Goğuş O, Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y. (eds) Temel Üroloji, 975-1042, 1998.
- 3- Iwasaki A, Gagnon C: Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril. 57: 409-416, 1992.
- 4- Oeda T, Henkel R, Ohmori H, Schill WB: Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility. Androl. 29: 125-131, 1997.
- 5- Katz DF, Diel L, Overstreet JW: Differences in the movements of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. Biol Reprod. 26: 556-570, 1982.
- 6- Halliwell B: Free radicals, antioxidant, and human disease: curiosity, cause or consequence? Lancet. 344: 721-724, 1994.
- 7- Sharma RK, Agarwal A: Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology. 48: 835-850, 1996.
- 8- Aitken RJ, Clarkson JS: Significance of ROS and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl. 9: 367-376, 1988.
- 9- Cooper TG: Basic (WHO) semen analysis. Postgraduate Course. The 6th International Congress of Andrology, 7-13, 1997.
- 10- Jarow JP: Nonsurgical treatment of male infertility: Empiric therapy; in Lipschultz LI, Howard SS (eds): Infertility in the Male, 410-422, 1997.
- 11- Mortimer D: Sperm preparation techniques and iatro-genic failures of invitro fertilization. Hum Reprod. 6: 173-176, 1991.
- 12- Jozwik M, Jozwik M, Kuczynski W, Szamoto-wicz M: Nonenzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. Fertil Steril. 68: 154-157, 1997.
- 13- Irwine DS: Glutathione as a treatment for male infertility. Rev Reprod. 1: 6-12, 1996.
- 14- Lewis EM, Boyle PM, Mc Kinney KA, Young IS, Thompson W: Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertil Steril. 64: 868-870, 1995.
- 15- Palan P, Naz R: Changes in various antioxidant levels in human seminal plasma related to immunofertility. Arch Androl. 36: 139-43, 1996.
- 16- Therond P, Auger J, Legrand A, Jouannet P: Alpha tocopherol in human spermatozoa and seminal plas-ma: relationship with motility, antioxidant enzymes and leucocytes. Hum Reprod. 2:739-744, 1996.

- 17- Kovalski N, de Lamirande E, Gagnon C: Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil Steril.* 58: 809-816, 1992.
- 18- Lewis EM, sterling SL, Young IS, Thompson W: Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 67: 142-147, 1997.
- 19- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R: Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 24: 185-196, 1989.
- 20- Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S: Protective role of superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod.* 6: 987-991, 1991.
- 21- Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E: Total antioxidant capacity of human seminal plasma *Hum Reprod.* 11: 1655-1660, 1996.
- 22- Alkan I, Şimşek F, Haklar G, Kervancıoğlu E, Özveri H, Yalçın S, Akdaş A: Reactive oxygen production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol.* 157: 140-143, 1997.
- 23- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T: Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 68:519-524, 1997.
- 24- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF: Reactive oxygen species: potential cause of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 13: 896-900, 1998.
- 25- Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Masr MA: Lipid peroxidation and human sperm motility: Protective role of vitamin-E. *J Androl.* 17: 530-537, 1996.