

17240

T.C.
FIRAT UNIVERSITESI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTITUSU

INFERTİL EŞLERDE
ANTI SPERMA ANTİKOR (ASA) ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

SELMA AY
F.Ü.Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Araştırma Görevlisi

ELAZIG - 1991

İÇİNDEKİLER

	BAYFA
A- GİRİŞ VE AMAC	1
B- GENEL BİLGİLER	2
1- KADINDA İNFERTİLİTE'NİN NEDENLERİ	4
2- ERKEKTE İNFERTİLİTE'NİN NEDENLERİ	6
3- SEMEN ANALİZİ	8
4- İMMUNİTE	11
5- ERKEKTE İMMUNİTE MEKANİZMASI	11
6- KADINDA İMMUNİTE MEKANİZMASI	13
7- İMMUNİTEDE OLUŞAN ANTİKORLAR	14
8- ASA SAPTAMA YÖNTEMLERİ	15
9- TEDAVİ	17
C- BEREÇ VE YÖNTEM	18
I- BEREÇLER	18
II- YÖNTEM	20
1- SERUM ÖRNEKLERİ	20
2- SEMEN ÖRNEKLERİ	20
3- ANTİJEN HAZIRLAMA	23
4- İFAT TEKNİĞİ	23
D- BULGULAR	26
E- TARTIŞMA	30
F- SONUÇ	40
G- ÖZET	42
H- KAYNAKLAR	43

TABLO VE RESİMLER

Sayfa

Resim - 1: Eozin ile Boyalı Preparatta Spermlerin Görünümü	21
Resim - 2: Meyer's Hematoksileni ile Boyalı Preparatta Spermlerin Görünümü.....	22
Resim - 3: Floresan Mikroskopta Spermlerin Görünümü.....	24
Resim - 4: Floresan Mikroskopta Spermlerin Görünümü.....	25
Tablo - 1: infertil Olguların Yaş Gruplarına Dağılımı...	26
Tablo - 2: infertil Çiftlerin Evlilik Süre Dağılımı.....	27
Tablo - 3: infertil Eşlerde ASA Dağılımı	28
Tablo - 4: infertil Kadınlarda ve Kontrol Grubunda ASA'ların Dağılımı	28
Tablo - 5: infertil Eşlerde Sperm Sayısı ve ASA Dağılımı.....	29

A- GİRİŞ VE AMAÇ

Evli çiftlerin %10-15'ini kapsayan kısırlık, en eski çağlardan beri, toplumun üzerinde durduğu ve hemen daima kadının suçlandığı bir konu olmuştur. Fakat üreme fizyolojisi aydınlatıldıkça batıl inançlara dayanan uygulamalar ve tek taraflı suçlamaların neden olduğu mutsuzluklar eski önemlerini yitirmeye başlamıştır (1,2,3).

infertiliteden kadın %40, erkek %30 ve her iki eş %30 oranında sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle her iki eşin de birlikte muayene edilmesi ve incelenmesi gereklidir (1,4,5).

Kadın ve erkekte infertiliteye yol açan bir çok faktör vardır. Son yıllarda üzerinde önemle durulmaya başlanan immun kompleksler bunlardan birisidir. Çeşitli etkiler altında, kadın ve erkekte spermlere karşı antikor oluştuğu bilinmektedir. infertil eşlerde bu antikorlar yüksek oranda saptanabilmektedir. Sperme karşı oluşan anti sperma antikorlar, üremenin çeşitli dönemlerinde ve değişik seviyelerde etkili olmaktadır (3,4,5,6,7).

Bu bilgiler doğrultusunda; hastahanemize çocuk istemiyenle başvuran ve açıklanamayan infertilitesi olan eşlerde anti-sperma antikorlarının sıklığını araştırmayı ve konuya açıklık getirmeyi amaçladık.

B- GENEL BİLGİLER

Spermatozoidin yumurtayı aşılabilmesi, aşılınmış yumurtanın **gebelik** boyunca normal gelişmesi ve doğumu, üreme fonksiyonunu yöneten nöro-endokrin sistemin düzgün çalışmasına ve genital organların normal yapısına bağlıdır (1).

Cinsel birleşme ile başlayan ve doğumla sona eren üreme sürecinin, her halkasındaki bir sapma infertilite ile, yumurtanın aşılınmasını önleyen nedenler de sterilite ile sonuçlanır (1,2).

Fertilite: Kadının canlı ve yaşama gücü bulunan çocuk doğurma yeteneğini ifade eder.

Sterilite (Kısırlık): Düzenli cinsel ilişkilere ve istenmesine **karşın** gebe kalamama yada gebe bırakamama anlamındadır.

Infertilite ise: Bir yıllık düzenli, korunmasız temasa rağmen çocuk sahibi olamama olarak açıklanabilir. Infertilite yerine subfertilite terimi de kullanılır. Infertilite; primer infertilite ve sekonder infertilite olarak ikiye ayrılır. Primer infertilite; cinsel olgunluk çağına rağmen hiç gebe kalmamış olanlar için kullanılır. Sekonder infertilite ise evvelce çocuk doğurmuş bir kadının tekrar gebe kalamamasıdır (1,2,3).

Infertil çiftlerin genel popülasyondaki oranının %10-15 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Infertil çiftlerin çoğunda klinik **muayene** sonucunda bir veya her iki eşte infertiliteye neden olan bulgu saptanır. Bununla beraber infertil çiftlerin %10-20'sinde semen analizi, ovulasyon, uterus, post-

koidal test normal olduğu halde infertilite mevcuttur. Bu tip hastalarda " Açıklanamayan infertilite "den bahsedilir (1,2,3,4,5).

Hamile kalma olasılığı yaş, koitus sıklığı gibi faktörlerle yakından ilgilidir. Kadınlarda maksimum doğurganlık yaşı 24-30 arasındır. 30 yaşından sonra azalır. 18 yaşındaki bir kadının hamile kalma olasılığı 24 yaşındaki bir kadının yarısı kadardır. Erkeklerde verimlilik oranı 24-25 yaşlarında en yüksek noktadadır. 40 yaşından sonra azalmaya başlar (1,2,3).

Yeni evli çiftlerde, hamile kalma olasılığı ilk üç ayda %60 iken, ilk on iki ayda %85'e yükselir. Bu nedenle çocuk isteyen çiftlerde, düzenli ilişkilere rağmen, bir yıl geçtiği halde gebelik başlamazsa, o zaman infertiliteden söz edilebilir (1,2,3,6).

Infertiliteye yol açan kusurların %40'ı kadında, %30'u erkekte ve %30'u da her iki eştedir. Infertil çiftlerin %90'ında bir veya daha fazla infertilite nedeni bulunabilir. Uygun tedavi gören hastaların hemen hemen yarısında gebelik süreci başlayabilir. Bunun için de doğru tanı ve uygun tedavi verilmesi gereklidir (2,3,6).

Infertilitede üç esas amaç vardır:

- 1- Infertilite nedenini saptamak,
- 2- Hastalığın ne kadar zamandır olduğunu belirlemek,
- 3- Uygun tedavi vermek.

Infertiliteden genel olarak ilk sorumlu tutulan eş daima kadın olmuştur. Halbuki erkek eş de en az kadın kadar bundan sorumludur (2,3,6,7).

1- KADINDA INFERTİLİTE'NİN NEDENLERİ

Fertil bir kadında;

- 1- Ovaryum fonksiyonu ve endokrin salgılar normal,
- 2- Uterus gebeliğe uygun,
- 3- Servikal mukus sperm taşıma işlevini iyi yapmalı,
- 4- Koitus için anatomik yapı uygun olmalı,
- 5- Tubal fonksiyon normal olmalıdır (1,2,8,9,10,11).

Kadında infertilitede rol oynayan faktörler çok çeşitlidir. Bunlar şöyle sıralanabilir:

a- Vajen anormallikleri:

Normal vajenin pH'sı:3-5 dir. Bu pH'da spermeler kısa sürede inaktive olurlar. Seminal sıvı ise alkalidir. Serviks mukusu ile birlikte tampon görevi yaparak vajinanın üst kısımlarını daha alkali yapar. Böyle bir ortam, sperm taşınması için uygundur. Vajinitis olgularında, mikroorganizmalar toksinleri ile spermatozoidlere zarar verirler. Bu ise fertilitayı azaltabilir. Bununla birlikte, şiddetli vajinal infeksiyonlarda da gebe kalılabilmektedir (1,2).

b- Servikal Anormallikler:

Serviks salgısının üremede önemli rolü vardır. Spermeler servikal mukus ve civarında bulunurlar. Mukusun en önemli görevi sperm rezervuarı olmasıdır. Servikal mukus, endoserviks hücrelerinden salgılanır, %92-98 oranında su içerir. Servikal mukusun esas yapısını karbonhidrattan zengin glikoprotein oluşturur. Diğer maddeler serum tipi immunglobulin ol-

mayan proteinler, lipit, enzim ve inorganik tuzlardır. Sperm-ler enerji ihtiyacı için gerekli olan maddeleri mukusdan sağ-larlar. Servikal mukus sekresyonu yumurtalık hormonları tara-fından düzenlenir. Östrojen mukus salgısını stimüle ederken projesteron salgı işlevini inhibe eder. Kronik infeksiyonlara neden olan mikroorganizmalar mukusun bileşimini değiştirir, spermatozoidlerin hareketi bozulur. Lökositler ise spermeleri fagosite ederek geçişine izin vermezler. Bazen de çeşitli ne-denlerle mukus salgısı kesilebilir, normal fonksiyonlarını yerine getiremez. Bu da infertiliteye yol açabilir (1,2,8,9).

c- Uterus Anormallikleri:

Endokrin bozukluğu uterusun gelişmesini azaltır. Ye-tersiz projesteron veya endometriumun yetersiz stimülasyonu ovum oluşmasını önleyebilir. Endometrium iltihapları sperm ta-şınmasını ve döllenmiş yumurtanın implantasyonunu engelleye-bilir. Uterus tümörleri, doğumsal uterus bozuklukları genel-de infertilite ile birlikte dir. Erken doğum ve düşük nedeni olabilirler. Spermde prostaglandinler bol miktarda bulunur. Uterotubal aktiviteyi değiştirdiği bilinmekte olup, sperm ta-şınmasındaki rolü henüz açıklık kazanmamıştır (2,10,11).

d- Tuba uterina Anormallikleri:

Kadın infertilitesinde tubal tıkanıklık %20-40 arasın-da görülür. Genellikle salpinjitis nedeniyledir. Fakat tubal spazm veya endometrium iltihaplarında olduğu gibi sekonder de olabilir. Endometrium infeksiyonuna infertil kadınlarda sık rastlanır. Over tümörleri, fallop tüplerinde doğuştan bozuk-

luklar infertilite nedeni olabilir (1,2,3).

e- Ovaryum Fonksiyon Bozuklukları:

Infertil kadınların %15'inde yumurtlamada bozukluk vardır. Overlere ilişkin fonksiyon bozukluklarının arkasında çoklukla yukarı kontrol merkezlerinin (hipotalamus ve hipofiz) lezyonları ve fonksiyon bozuklukları vardır. Daha az olarak over tümörleri, sistemik hastalıklar da yumurtlamayı önler (1,2,3).

f- Psikojenik Bozukluklar

Çok şiddetli çocuk isteği, soğukluk, vajinismus, aile geçimsizlikleri infertiliteye neden olabilecek ruhsal gerilimler arasında yer almaktadır (1,2,3,6).

2- ERKEKTE INFERTİLİTE'NİN NEDENLERİ

Infertil erkeklerin %85'inde spermatogenetik bozukluk vardır. Seminifer tübüllerde spermatozoidlerin yapımı doğuştan kusurlu olabilir. Olgunlaşmamış spermatozoidler hypogonadizm ve hipopituitarizm sonucu oluşabilir. Travma, orşit, X-ışını, ürogenital sistem infeksiyonları, inmemiş testisler sperm yapımında bozukluğa neden olur (1,2,4,6,7,12).

a-Tıkanma

İki taraflı epididim iltihapları kanalların tıkanmasına yol açar. Vas deferens ve epididim arasındaki bağlantı doğumsal veya sonradan bozulmuş olabilir (7,12).

b- Hipotiroidizm

Genellikle infertilite ile birlikte dir. Bilimsel açıklaması yapılamamıştır. Fakat tiroid hormonu verilen infertil erkeklerde sperm sayısının normale döndüğü görülmüştür (2,7).

c- Hiperadrenalizm

Semen volümünde artışa neden olur. Spermilerin sayısı ve hareketi azalır. Normal sperm sayısı azalırken, anormal formların oranı artar. Hipofizden salgılanan gonadotropinler baskılanarak germinal fonksiyon bozukluğuna yol açar (2,6,7,12).

d- Hipopituitarizm

Hipofiz ön lobundan salgılanan hormonların yetersiz olması sonucu testisler küçük ve fibrotiktir. Spermilerin olgunlaşması önlenir (2,3,6,7).

e- Hipogonadizm

Cinsiyet bezlerinin yetersiz hormon salgılaması seminfer tüplerde dejenerasyona yol açar (6,7,12).

f- Varikosel

En sık 18-30 yaş arasında görülür. %99 sol tarafta ve %1 oranında da iki taraflıdır. Varikosel'li hastalarda olgunlaşmamış spermilerin sayısı artar, sperm sayısında azalma ve %10-20 oranında da hareket azalması görülür (1,2,3,6,7,12).

Erkek infertilitesinde, sayılan bu faktörlerden başka

yaş, beslenme, sıcaklık, sistemik hastalıklar, sigara ve alkol alışkanlığı, ilaç kullanımı, radyasyon, vazektomi, vovostomi, vovovazostomi ve ürogenital sistem infeksiyonları infertiliteden sorumlu olabilir (1,2,3,4,6,7,12,13,14,15,16,17,18).

3- SEMEN ANALIZI

Infertilitede yapılacak olan en önemli tetkik spermogramdır. Erkeğin fertil olup olmadığı semen muayenesi ile belli olur. Spermatozoidlerin sayı, motilite ve morfolojisi esas kriterlerdir. Sağlıklı bir inceleme için 4-7 günlük perhizden sonra alınan semen tercih edilmelidir. Sperm kalitesi perhizin 5 ve 7.gününe kadar yükselir, sonra durur. Muayeneler hep aynı günde yapılırsa, bulguların karşılaştırılması daha anlamlı olur (1,2,3,6,7,12). Kondomla alınan örneklerde ancak sayı ve morfolojik inceleme yapılabilir. Çünkü kondomlar; spermisid maddeler, talk ve başka kimyasal maddeler içerdiğinden spermatozoidleri etkiler, kısa sürede hareketlerini ve canlılıklarını yitirirler. Semen örnekleri steril cam veya porselen kap içine alınmalı ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır (1,3,12).

a- Miktar

Normal semenin miktarı 1,5-4,5 ml, ortalama 3 ml'dir. Miktarın bu değerlerin üzerinde olması spermleri dilüe eder ve ml'deki spermatozoid sayısı rölatif olarak düşer. Normal değerlerin altında olması ise, konsantrasyonu arttırırken vajende spermlerin depo edilmesini azaltır.Miktar 1 ml'den az ve

sayı da 10 milyonun altında ise infertilite görülür (1,3,6,7)

b- Viskozite

Ejakülasyondan hemen sonra semen, jelatinöz beyaz renkte ve yer yer sarı granüler pelteler yapmış sperm toplulukları halindedir. 10-30 dakikada sıvılaşır, viskoz bir hal alır. Viskozitenin azalıp çoğalması infertilite sebebi olabilir. Viskozitenin fazla olması spermlerin hareketini yavaşlattığı gibi, kısmen de aglutine olmalarına yol açar (1,3,7,12).

c- pH

Normal semen alkali olup pH:7,2 - 7,8 arasında değişir. Asit olması spermler üzerinde olumsuz etki yaparak infertilite nedeni olabilir (1,6,7,12).

d- Sayı

Otoritelere göre normal semenin 1 ml'sinde en az 40 milyon spermatozoid bulunmalıdır. Spermatozoid sayısı 40 milyondan az ise OLIGOZOOSPERMİ, normal sayıda olması NORMOZOOSPERMİ, 250 milyonun üzerinde ise POLIZOOSPERMİ'dir. Ejakülat- ta hiç spermatozoid bulunmaması ASPERMİ, normal morfoloji mevcut fakat hareketlilik %60'ın altında ise ASTHENOZOOSPERMİ, anormal tipler %40'dan fazla ise TERATOZOOSPERMİ olarak isimlendirilir.

Sperm sayısı milyon/ml olarak verilir. Normal değerleri:40-120 milyon/ml'dir, %60-90 canlı ve hareketli, %70-90 normal yapılı olmalıdır (1,7).

Sperm sayımı için; lökosit sayma pipetine 0.5 çizgisine kadar sperm ve 11 çizgisine kadar da spermiogram solüsyonundan çekilir, iyice karıştırılır, 3 damla dışarı atılır. Thoma lamına lamel yapıştırılıp arasına pipetten semen solüsyon karışımı damlatılır. İki büyük alandaki spermler sayılır. 1 ml'deki sperm sayısı şu formüle göre hesaplanır:

$$\frac{N(\text{iki büyük karedeki spermatozoid sayısı}) \times 10 \times 20 \times 1000}{2}$$

1ml'deki spermatozoid sayısı = $N \times 100\ 000$ (19).

e-Motilite

Normal semende 1 saat sonunda hareketlilik oranı %60-90 arasındadır. Aktif ve normal bir spermatozoanın ileri doğru hareket etmesi gerekir. Sağa sola düzensiz hareket edenlerin ve olduğu yerde sallananların fertiliteye etkisi yoktur (1,6,7).

f- Morfoloji

Spermatozoidlerin morfolojileri boyalı preparatlarda incelenir. Normal yapılı olanların oranı %70'in üzerinde olmalıdır. Sayı azaldıkça patolojik tipler ve olgunlaşmamış hücrelerin oranı artar (1,19). Spermatozoid; oval bir baş, ince boyun ve gövde ile ince-uzun bir kuyruktan yapılandır. Anormal şekiller büyük başlı, deforme amorf başlı, küçük başlı, çift başlı ve çift kuyruklu olabilir (1,6,7). Semen analizinde sayı, morfoloji ve motilite birlikte değerlendirilmelidir (1,6,12,19).

4-IMMUNİTE

Landsteiner bundan 40 yıl önce yeni doğanlarda ve fötüsde hemolitik hastalıktan bahsetmiştir. Aynı zamanda spermlerin antijenik yapıda olduğunu da ortaya koymuştur. Spermlere karşı antikor oluşumunu ilk olarak Rumke ve Helling infertil bir erkekte göstermişlerdir (4). Daha sonra yapılan araştırmalarda; seminal sıvı veya testiküler materyal ile immunize edilen memeli hayvanlarda fertilité azalması meydana geldiği gözlenmiştir (1,2,3,4,5,6,7).

Teorik olarak immunolojik faktörler insan üreme sürecinde herhangi bir dönemde etkili olabilirler. Normalde ovum, ovum hormonlarına, dokulara ve salgılara karşı antikor oluşma olasılığı azdır. Semen çeşitli yapıda antijenler içermesine karşın kadında allerjik reaksiyonlar çok seyrek görülür (2,5).

5-ERKEKTE IMMUNİTE MEKANİZMASI

Spermatozoidler seminifer tüplerdeki germinal hücrelerden meydana gelir. Olgunlaşmış spermatozoidler ilk olarak puberte döneminde (13-14 yaş) görülürler.

Epididimler geçici bir süre için spermatozoid rezervuarı ödevini görür. Epididim salgısı spermatozoidleri kısmen olgunlaştırır.

Prostat salgısında çinko magnezyum ve sitrik asit bulunur. Alkali olan bu salgı spermleri sulandırıp, hareketini kolaylaştırır.

Esas sperm rezervuarı veziküla seminalisdir. Veziküler sıvı bol miktarda fruktoz içerir. Bu sıvı ile karşılaşan spermatozoidler fruktozdan faydalandıktan sonra hareketli

hale gelirler. Spermatozoidler enerjilerini fruktoz'dan sağlarlar (1,3,6,7,12).

Spermatozoidler, veziküla seminalis salgısı ve prostat salgısı ile karışarak semeni oluştururlar. Seminal sıvı kompleks yapıdadır. Fibronektin, relaksin, prostaglandinler, fruktoz, çinko, magnezyum, sitrik asit gibi maddeleri içerir. Erkeklerde spermlerin antijenik yapısına karşı tolerans gelişmiştir (1,2,3,5,7,14,15).

Spermler normalde immun sistemle temas etmezler, kan-testis bariyeri (sertoli hücreleri ve epitel hücreleri) kana karışmalarını önler. Fakat herhangi bir nedenle (vazektomi, travma, tubullerde tıkanıklık, vazovazostomi, infeksiyonlar) bariyeri geçebilen spermlere karşı anti sperma antikor (ASA) oluşumu stimüle edilmiş olur. Erkeklerde üreme sisteminin geçirgenliğinin artması da spermatozoidlerin testis-kan bariyerini aşarak kana sızmasına neden olur. Üreme organının yapısı anormal spermatozoidlerin üremeye katılmalarını önler. Fakat spermlerin kana nasıl ve hangi yolla geçtiği, antijenin tipi, oranı, immun cevabın ne zaman ortaya çıktığı gibi sorular henüz cevapsız kalmaktadır (13,14,16,17,18,20,21,22,23).

Spermlerin antijenik yapısı infertilitede immunolojik rol oynayabileceğini açıkça göstermektedir. Semende bulunan antijen tipleri şöyle sıralanabilir:

Oto antijenler: T-membran spermatoksik antijen

Hiyaluronidaz

Akrozomal proteinaz

Akrozomal proteinaz inhibitör

S-akrozom protein

Sperm nöraminidaz

Nükleer protein antijen

Sperm immobilizan antijen

Izo antijenler: ABO

Histocompatibility (2).

6-KADINDA IMMUNITE MEKANIZMASI

Infertil kadında immunité gelişiminin mekanizması biraz daha karanlıktır. Koitusdan sonra spermier fagositler ve nötrofiller tarafından fagosite edilirler. Seminal sıvıda bulunan bir veya daha fazla immunosupresif faktör, kadında spermilere karşı duyarlaşmayı önler. Fakat bilinmeyen nedenlerle bazı kadınlarda ASA meydana gelmektedir. Kadında ASA'lar lokal olarak veya dolaşım kanında dolaşan antikorlar şeklinde bulunabilir. Bazı kadınlarda, ürogenital yolda absorbe edilen spermilere karşı lokal ya da serumda antikorlar ortaya çıkabilir (2,4,5).

Kadın üreme organı ve salgıları T-lenfosit, makrofoj ve Immunglobulinleri ihtiva eder (2,8,24). Vaginal sekresyonda saptanan IgG ve IgA immunglobulinlerinin orijinlerini saptamak zordur. Serviks ve endometriumdan üretildikleri muhtemeldir. Servikal mukusda IgA ve IgG oranı serumdakinden daha da yüksek olabilir. Immunglobulin seviyeleri menstrual sıklusa bağılı olarak değişmektedir. Bu antikorların lokal olarak sentezlendiğini destekleyen raporlar vardır. Serviks dokusunda IgA, endometrial örneklerin hepsinde IgG baskın olarak bulunmuştur (2,3). Serviks ve endometriumda bulunan IgA, IgG ve IgM komplemanı

aktive edip spermatozoidin erimesine yol açmakta ve serviks mukusuna yapışmasını engellemektedir (2,3,8,10,20,21,22).

7-İMMUNİTEDE OLUŞAN ANTİKORLAR

Kadın ve erkekte anti-sperma antikorlar üç mekanizma ile meydana gelir. Bunlar;

1-Erkekte otoimmunizasyon,

2-Kadında serumda antikor oluşumu,

3-Kadında semene karşı lokal antikor oluşumu (3,7).

Immunité sonucu üç tip antikor ortaya çıkar:

1-Presipitasyon yapan antikorlar (presipitinler)

Bu tip antikorların büyük bir kısmı IgG sınıfından ve daha az bir kısmı da IgM tipi antikorlardır.

2-Aglutinasyon yapan antikorlar (aglutininler)

En fazla IgA sınıfından antikorlardır.

3-Hareketi durduran antikorlar (immobilizinler)

Bu tip antikorlar IgM ve IgG sınıfındadırlar (3,7,11,16,20,21,22,24,25,26,27,28,29,30).

Immunglobulin sınıfından olan bu antikorların sperme yapıştıkları bölgeler de birbirinden farklıdır.

IgG:Baş ve kuyruğa bağlanır, sadece kuyruğa bağlanma zayıftır.

IgA:Baş ve kuyruğu bağlanır. Kuyruğa bağlanma daha fazla olur.

IgM:Sadece kuyruk kısmına bağlanma sözkonusudur (21).

8-ASA SAPTAMA YÖNTEMLERİ

Serum, semen ve seminal plazmadaki ASA'ları saptamak amacıyla aglutinasyon, sperm immobilizasyon, Immunobead Binding Test, ELISA, IFAT, Radiolabeled antiglobulin Assay teknikleri kullanılmaktadır (4,13,17,21,23,27,28).

Aglutinasyon yöntemleri arasında Gelatin aglutinasyon, Tube slide aglutinasyon, Tray aglutinasyon ve Mixed aglutinasyon tekniklerinde taze semene ihtiyaç vardır (18,23,27,31).

Gelatin aglutinasyon test (GAT): Fertil donörden alınan semen ve dilüe edilmiş hasta serumu Baker'in tamponlu, %5'lik jelatinli besiyerinde karıştırılır. 37°C de 30 dakika inkübe edilir. Aglutinasyon makroskopik olarak gözlenir (18, 23,31).

Tube slide agglutination (TSAT) ve Tray Agglutination test (TAT) yöntemlerinde taze semen ve dilüe edilmiş hasta serumları mikropleytlerde karıştırılır. 37°C de 2 saat inkübe edilir. Aglutinasyon mikroskop altında değerlendirilir (18, 23,27).

Mixed agglutination Reaction (MAR) test: Bu testin esası Coombs testine benzer, human IgG anti Rh antikorları ile duyarlaştırılmış Rh+ insan eritrositleri kullanılır. Duyarlı Rh+ eritrositler semenle karıştırılır. Anti human IgG ilave edilir. Semende ASA var ise anti human IgG ile de birleşir. Aglutinasyon 2-3 dakika içinde ve mikroskop altında değerlendirilir (4,27,28).

Passif Hemaglutinasyon: Bu yöntemde sperm veya seminal plazma ekstraktları eritrositlere bağlanmıştır. Serum, semen ve biyolojik sıvılarda ASA araştırmalarında kullanılır (14).

Complement depending sperm immobilization test (SIT=CSI): Kompleman varlığında antikora bağlı spermlerin hareketlerinin durdurulması esasına dayanan bir yöntemdir. Test kontrollü olarak yapılır. Fertil donörden alınan sperm, inaktive hasta serumu ve kompleman karışımı oda ısısında 1 saat inkübe edilir. Inkübasyon sonunda hareketli spermlerin yüzdesi kontrole karşı değerlendirilir (4,21,23).

Immunobead Binding Test (IBT): Bu yöntemde, insan IgG, IgM ve IgA ile immünize edilmiş tavşandan elde edilen antikolar 5-10 μ m'lik poliakrilamid küreler üzerine bağlanmıştır. IBT ile serum, semen ve lokal sekresyonlarda ASA aranabilir. ASA araştırılacak semen 37°C de 1 saat antikoların (eğer var ise) bağlanması için inkübe edilir. Daha sonra yıkama işlemi ile antikora bağlanmayan spermler ortamdaki çıkarılır. IgG, IgA ve IgM ihtiva eden immünobead ilave edilir. Faz-kontrast mikroskopunda değerlendirilir. Serumda veya salgılarda ASA aranacaksa; bu sıvılara ASA (-) olduğu bilinen semen ilave edilir, 1 saat 37°C de inkübe edilir. Yıkama işlemi yapılır. Immünobead ilave edilip yine faz-kontrast mikroskopta incelenir (4,21,26,30).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Antijen olarak tüm sperm veya sperm membran ekstraktları kullanılır. Semen, serum ve biyolojik sıvılarda ASA aranabilir (4,32,33).

Radiolabeled antiglobulin assay : Radyoaktif işaretli antiglobulinler kullanılarak sperme bağlı immunglobulinler ortaya çıkarılabilir (4).

Immunofluorescence teknik: Antijen olarak ORh- ve fertil olduğu bilinen donör spermleri kullanılır. Antijen

lamlara formaldehit veya metanol ile tespit edilir. Serumda bulunan ASA'ları ortaya çıkarmakta kullanılan bir yöntemdir (4).

Shaking phenomenon: Sperm-servikal mukus kontakt testi olarakta bilinir. Semen ve mukus bir lam üzerinde karşılaştırılır. Mikroskop altında incelenir. Semende veya servikal mukusda ASA bulunması halinde spermler servikal mukusa yapışmazlar (Shaking reaksiyonu).Fertil donörden alınan spermler kullanılarak ASA'ların kadına veya erkeğe ait olup olmadığı belirlenebilir (1,4).

9- TEDAVİ

Immunolojik faktörlerin rol oynadığı infertilite vakalarında immunosupresif tedavi, kondom kullanılması ve uterus içi aşılama önerilmektedir. Fakat henüz etkili bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Uterus içi aşılama öncesinde yapılan sperm yıkama işlemi sırasında sperm miktarının azalacağı ve spermde bulunan antikörlere bağlı spermlerde fonksiyon kaybı olacağı bildirilmektedir. Immunosupresif tedavi yan etkileri fazla olduğundan bazı araştırmacılar tarafından önerilmemektedir. Kondom tedavisinin de ne derece etkili olduğu tam olarak bilinmemektedir (2,3,4,6,34,35).

C.GEREÇ VE YÖNTEM

I- GEREÇLER

1- Serum örnekleri

infertil eşlerin her ikisinden de serum örnekleri alındı. Serumlar çalışacağı güne kadar - 18°C de derin dondurucuda bekletildi.

2- Semen örnekleri

infertil erkek eşlerden serum örnekleri yanında sperm örnekleri de alındı. Semen analizi perhizin 5. gününde yapıldı. Motilite, viabilite ve sayısı belirlendi.

3- Kullanılan Antiserum

Anti-human IgG + IgM + IGA Fluorescein Conjugated (Behring).

4- Kimyasal Maddeler

a- Nigrosin

b- NaCl

c- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

d- KH_2PO_4

e- % 40 formaldehit

f- % 5'lik sulu eozin (Eozin Gelbich)

- g- % 3 Trisodyum sitrat
- h- Gliserin
- ı- Potasyum alum
- j- Hemotoxilin
- k- Sitrik asit
- l- Chloral-hydrat
- m- NaIO₃

5- Kullanılan Antijen

O Rh(-) kan grubuna sahip ve fertil olduğu bilinen erkekten alınan semen örneğinden laboratuvarımızda hazırlandı.

6- Diğer Aletler

- a- Thoma lamı
- b- Lökosit pipeti
- c- Pastör pipeti
- d- Etüv
- e- Santrifüj
- f- Deep-freeze
- g- pH kağıdı
- h- Floresan Mikroskop (OLYMPUS)

II- YÖNTEM

1- Serum örnekleri

Çalışmada; F.Ü.Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastahanesi, Üroloji ve Kadın-Doğum Polikliniğine çocuk iste- miyle başvuran açıklanamayan infertilitesi bulunan eşlerden serum örnekleri alındı. Kontrol grubunu oluşturan serum örnekleri ise normal hamile kadınlardan sağlandı. Genital yol enfeksiyonu olan hastalar bu çalışma kapsamına alınmadı. Se- rumlar testin yapılacağı güne kadar -18°C de dondurularak saklandı.

2- Semen örnekleri

Infertil erkek eşlerden perhizin 5. günü semen örne- kleri alındı. 30 dakika 37°C 'lik etüvde bekletildi. İlk aşamada miktar, renk, koku, pH, viskozite özellikleri belir- lendi. Lam-lamel arası preparat yapılarak 40x10 büyütmede lö- kosit ve eritrosit varlığı araştırıldı.

a- Sperm Sayımı

Sperm sayım solüsyonu şu şekilde hazırlandı: 1 ml %40' lık formaldehit alınarak, %3'lük trisodyum sitrat ile 100 ml' ye tamamlandı (19).

Sayım için lökosit pipetine 0,5 çizgisine kadar semen ve 11 çizgisine kadar sayım için hazırlanan solüsyondan çekil- di. Pipet iki ucu kapatılarak iyice çalkalandı. 3 damla dışarı altıldı. Daha sonra thoma lamina yapıştırılan lamel'in

arasına bu semen solüsyonu karışımından konuldu. Thoma lamın da iki büyük sahadaki spermatozoid sayısı bulundu. Bu sayıya beş sıfır eklenerek 1ml'deki spermatozoid sayısı hesaplandı (19).

b- Sperm Motilitesi

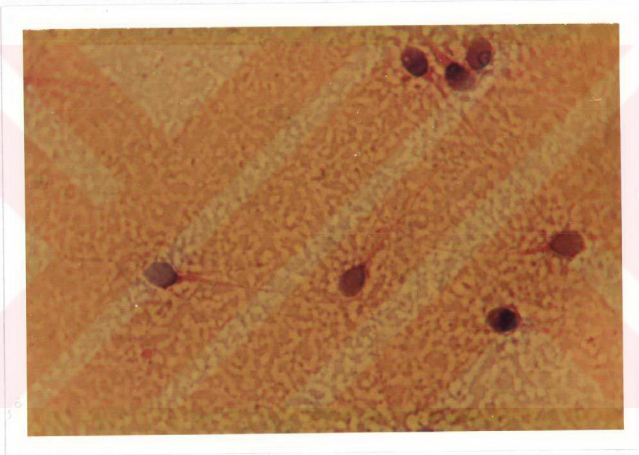
Bu amaçla 1 damla semen üzerine 2 damla %5' lik eozin ve 2 damla da nigrosin damlatılıp karıştırıldı. Yayma yapıp havada kurutuldu. Alevde tespit edilip 10X100 büyütme ile canlı ve ölü spermler sayıldı, yüzdeleri belirlendi. Bu yöntemde canlı spermler eozin ile boyanmadığı halde, ölü ve patalojik tipler eozinle kırmızıya boyanmaktadır (1,3,19), (Resim - 1).



Resim-1:Eozin ile boyalı preparatta spermlerin görünümü.

c- Sperm Morfolojisi

Sperm yaymaları yapıp, Schaudinn fiksatifini ile tespit edildi. Daha sonra Meyer's Hematoksilin'i ile 1,5 dakika boyandı. 10X100 büyütmede spermelerin morfolojisi incelendi. Çift başlı, küçük başlı, büyük başlı ve çok kuyruklu anormal spermle immatur şekillerin oranı, 100 sperm sayılarak saptandı (3,19), (Resim-2).



Resim-2: Meyer's Hematoksilin'i ile boyalı preparatta spermelerin görünümü

Meyer's Hematoksilin boyasının hazırlanması

Hemotoksilen	1 g
Potasyum Alum	50 g
Sitrik Asit	1 g
Chloral Hydröte	50 g
Na-Iodat	0.2 g
Distile su	1000 ml

Hematoksilen distile su içinde ısıtılarak eritildi. Potasyum Alum, sitrik asit, Chloral hydrate ve Na-Iodat ilave edildi. Kırmızı-menekşe renginde olan bu boya renkli şişede saklandı (36).

3- Antijen Hazırlama

a- Fertil olduğu bilinen ORh (-) kan grubuna sahip erkekten alınan semen 2000 rpm'de santrifüj edildi. Üstteki sıvı atıldı. Atılan sıvı kadar fosfat buffer solüsyonu (PBS) konularak üç defa 8-10 dakika yıkandı.

b- Yıkama işlemi sonunda her sahaya 12-15 sperm düşecek şekilde PBS ile sulandırıldı. Temiz lamlar üzerine 1'er damla damlatıldı. Havada kurutulduktan sonra tespit edildi. Tespit amacıyla %1 oranında formaldehit içeren PBS kullanıldı. Tespit işlemi 4°C 'de 10 dakika bekletilmek suretiyle yapıldı.

4- IFAT (Indirect Fluoresan Antibody Technic)

a- Hasta serumları temiz tüplerde 1/32 oranında PBS ile sulandırıldı. Hazırlanıp tespit edilen antijen üzerine 1 damla damlatıldı. Oda derecesinde 1 saat inkübe edildi.

b- Inkübasyon süresi sonunda PBS ile 8-10 dakika yıkandı.

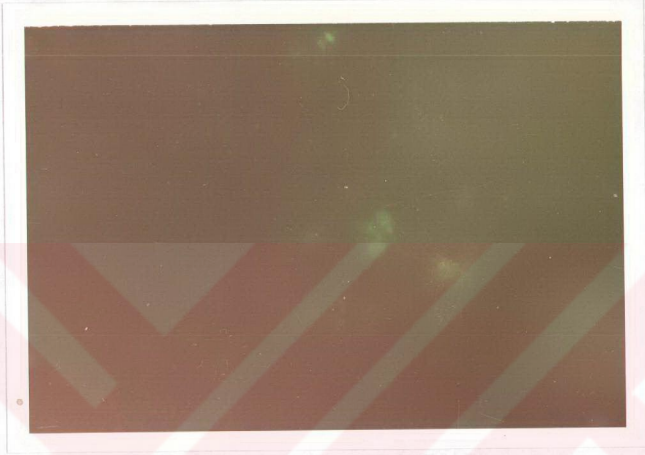
c- Konjugat 1/32 oranında sulandırılıp lamlar üzerine birer damla karanlıkta damlatıldı. Bundan sonraki işlemlere karanlıkta devam edildi. Oda ısısında 30 dakika bekletildi.

d- Inkübasyon süresi sonunda PBS ile 40-50 dakika yıkandı. PBS solüsyonu her 10 dakikada bir değiştirildi.

e- Havada kurutulduktan sonra 1 damla gliserin damlatılarak floresan mikroskopta UV objektifi ile 10X100 büyütmede 525 nm'lik filtre kullanılarak incelendi. Sarımsı yeşil floresan görülmesi pozitif olarak kabul edildi (Resim-3,4).



Resim-3: Floresan mikroskopta spermilerin görünümü (10X100)



Resim-4: Floresan mikroskopta spermlerin görünümü (40X10)

D- BULGULAR

Bu çalışma F.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastahanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında Eylül-Kasım 1991 tarihleri arasında yapıldı. Hastanemiz Kadın doğum ve Üroloji Polikliniğine çocuk istemiyle başvuran ve açıklanamayan infertilitesi bulunan 25 çiftten (25'i kadın,25'i erkek) ve 30 fertil, hamile kadından serum örnekleri alındı.

Infertil çiftlerden alınan serum örneklerinin 18 (%36)'inde ASA(+) olarak saptandı. Kontrol grubundan alınan örneklerin ise 2(%6.6)'sinde ASA pozitif bulundu.

Infertil olguların yaş gruplarına dağılımı yapıldığında; hastahanemize çocuk istemiyle başvuran infertil hastaların, en fazla 25-30 yaş grubunda olduğu belirlendi (Tablo-1).

Tablo-1: Infertil Olguların Yaş Gruplarına Dağılımı.

Yaş Grupları	Kadın	Erkek	Toplam
19 - 24	9	2	11
25 - 30	11	13	24
31 - 35	5	10	15
Toplam	25	25	50

Infertil çiftlerin, evlilik sürelerinin dağılımı Tablo-2 de gösterilmiştir. Çocuk istemiyle başvuran infertil hastalardan 15'inin evlilik süresi 5 yıldan azdır. Bunu 6-10 yıl arasında 9 çift ve 11-15 yıllık evli 1 çift izlemektedir.

Tablo-2. Infertil Çiftlerin Evlilik Sürelerinin Dağılımı

Evlilik Süresi	Infertil Çift Sayısı
5 yıldan az	15
6-10 yıl	9
11-15 yıl	1
Toplam	25

1/32 dilusyonda ASA (+)'liğinin infertil eşlerde dağılımı incelendiğinde; ASA oranı 18 olguda %36 olarak saptandı. Bu grupta kadın eşlerde ASA bulunma oranı 10 hastada %20 iken erkek eşlerde 8 olguda ve %16 olarak belirlendi. Infertil gruptaki kadın ve erkek eşler arasında ASA(+)'liği açısından istatistiksel anlamda bir fark olup olmadığı " χ^2 " testi ile araştırıldı (37). Yapılan test sonucunda, iki eşey arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptandı ($\chi^2=0.086$ $df=1$ $p>0.05$), (Tablo-3).

Tablo-3: Infertil Eşlerde ASA Dağılımı

Eşey	ASA (+)		ASA (-)		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Kadın	10	20	15	30	25	50.0
Erkek	8	16	17	34	25	50.0
Toplam	18	36	32	64	50	100.0

($\chi^2=0.086$ $df=1$ $p>0.05$)

ASA pozitifliğinin kontrol grubunda dağılımı incelendiğinde; 30 olgunun 2 (%6,6)sinde ASA pozitif bulundu.Bu grup ile infertil gruptaki kadınlar arasında ASA (+)'liği açısından farkın anlamlı olduğu saptandı ($X^2=7.03$ $df=1$ $p<0.05$), (Tablo-4).

Tablo-4 : Infertil Kadınlarda ve Kontrol Grubunda ASA'ların Dağılımı

Gruplar	ASA (+)		ASA (-)		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Kontrol Grubu	2	(6.6)	28	(93.3)	30	(99.99)
Infertil Kadın	10	(40)	15	(60)	25	(100.0)

($X^2=7.03$ $df=1$ $p<0.05$)

Infertil erkeklerden alınan semen örneklerinde sperm sayımı yapıldı. Sayım sonucuna göre hastalar Normozoospermili ve Oligozoospermili (sperm sayısı 20-40 milyon/ml arasındaki 7 olgu) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Bu iki gruptaki erkekler ve kadınlarda ASA bulunması ile sperm sayısı arasında bir ilişki olup olmadığı ki-kare testi yapılarak araştırıldı. Test sonucunda oligozoospermili ve normozoospermili grupta yer alan kadınlarla erkekler arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlendi (Tablo-5), ($X^2=0.40$ $df=1$ $p>0.05$), ($X^2=0.49$ $df=1$ $p>0.05$).

Tablo-5: Infertil Eşlerde Sperm Sayısı ve ASA Dağılımı

Sperm Sayısı	Erkek		Kadın		Toplam	
	ASA(+)	ASA(-)	ASA(+)	ASA(-)	ASA(+)	ASA(-)
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
Normozoospermi	6(12)	12(24)	7(14)	11(22)	13(26)	23(46)
Oligozoospermi	2(4)	5(10)	3(6)	4(8)	5(10)	9(18)
Toplam	8(16)	17(34)	10(20)	15(30)	18(36)	32(64)

E-TARTIŞMA

Deniz kestanesi yumurtasının çevresine salgıladığı fertilizinlerin, spermatozoidlerin başlarında bulunan reseptörlerle birleşerek, bir kısmını aglutine , bir kısmını da bloke ettikleri saptandıktan sonra, infertilitede immünite faktörü gündeme gelmiştir (1,2,3,4,5).

Anti sperm antikorlar (ASA), ilk olarak infertil bir erkekte Rumke ve Helling tarafından gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda nedeni anlaşılmayan infertilite vakalarının bir bölümünde, serumlarında ASA (+) bulunmuştur. Yine hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda; genital yollarda hücrelere bağlı değişik tipte antikorlar saptanmıştır. Kadında genital yollarda lokal antikor sekresyonunu destekleyen bulgular da vardır (1,2,3,4,7,8,9).

Spermatozoidler değişik yapıda bir çok antijene sahiptirler. Bu antijenler sperm yüzeyinde değişik bölgelerde bulunabilir. Üremeye etkileri de değişik olabilir. ASA'lar etkili olduğu bölgeye göre;

1- Spermatogenezi (aspermatojenesis, oligospermatojenesis, anormal spermatozoid oluşumu gibi) etkileyebilir.

2- Semen veya servikal mukusta yer alan immunglobulinler, kadında üreme yollarındaki sperme bağlı antikorlar nedeniyle spermlerin hareketi bozulabilir.

3- Makrofajların işe karışmasıyla spermler erir veya makrofajlar tarafından fagosite edilmeleri kolaylaşır.

4- Sperme bağlı antikorlar makrofajların Fc reseptörlerine yapışıp, gametleri etkileyebilir.

5- ASA'lar spermin aşılama olgunluğunu bozar.

6- Akrozom reaksiyonunu bozar.

7- Spermin yumurtaya yapışmasını ve bağlanmasını önler.

8- ASA'lar embriyo üzerine etkili olup, implantasyonu bloke edebilir. Yada implantasyondan sonra kendiliğinden düşüklere, kısmen de olsa fötüs ölümlerine neden olabilirler (2,4,5,8,9,11,20,24,25,30).

Spermlerin antijenik yapılarına karşı duyarlı kadınlarda bir veya birkaç çeşit lokal antikor meydana gelebilir. Böyle duyarlı bir kadında; spermler servikal mukusa penetre olamazlar. Immobilizan ve aglutinan antikorlar da taşınma sırasında etkili olurlar (2,3).

Erkeklerde seminal sıvı yada sperm antijenlerine karşı antikor oluşabilir. Spermleri örten bu antikorlar spermlerin servikse doğru hareketini engeller (3,13,22,34,38,39).

Sperme karşı oluşan antikorlar serumda, servikal mukusta, seminal plazmada bulunabilir. Aglutinasyon yapan antikor bulunduran hastalarda prognoz immobilizan antikor bulunduranlardan daha iyidir (3,4,6).

Acıktanamayan infertil kadınların %20'sinin serviks mukusunda aglutininler ve immobilizan antikorlar saptanmıştır. Bu immunglobulinler lokal olarak sentezlenmektedir. Aglutinasyon yapan IgA, serviks mukusunda en fazla bulunan immunglobulindir. Serviks mukozasından salınan IgA'nın salgısal tipte (sIgA) olduğu gösterilmiştir. Immobilizan antikorlar ise; yine lokal olarak sentezlenen IgG ve IgM sınıfından antikorlardır. Genital yolda bulunan bu antikorların tümü komplemanı da bağlar (3,18).

ASA (+) olan eşlerde antikora bağılı spermler lenfosit aktivatörü olarak işler ve gama-interferon yapımına yol açar. Bu interferonun makrofaj aktive edici faktör (MAF) olduğu bilinmektedir (38,39,40).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kadınlarda antisperm antikor oluşumu yanında otoantikorlar da oluşabileceği bildirilmektedir. Kadınlarda polinükleotid, histon hatta histon alt birimlerine karşı ve kardiyolipin antiijenine karşı oto antikorlar saptanmıştır. Bu tip antikorların da antisperm antikorlar gibi infertilite nedeni ve açıklanamayan düşüklerden sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (5,10,11,41).

Sistemik lupus eritematosuslu ve endometriosisuslu kadınlarda serumlarında ovaryum antiijenlerine karşı organa özgül antikorlar da saptanmıştır (42).

Infertilitede immunité faktörünün oynadığı rolün anlaşılması üzerine bu konu ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır (20,21,22,23,24,25,27,28,29).

London ve arkadaşları Kuzey Karolina'da; kadın üreme yollarındaki makrofajların antikora bağılı spermleri fagosite ettiklerini invitro ortamda göstermişlerdir. Bunun da ovuma ulaşabilecek sperm sayısını azaltıp, infertiliteye neden olabileceğini bildirmişlerdir (8).

Gleicher ve arkadaşları Chicago'da; 26'sı infertil, 24'ü açıklanamayan ve tekrarlayan düşük yapan kadınlardan aldıkları serum örneklerinde Radioimmuno diffussion yöntemi ile polinükleotid ve histonlarına karşı antikor araştırmışlardır. 26 hastanın 23 (%88)'ünde ve 24 hastanın 17 (%70.8)'sinde otoantikorları pozitif saptamışlardır. 26 hastanın 10 (%38.46)'

unda ve 24 hastanın 11 (%45.8)'inde IgM antikorları bulunurken bunu sırasıyla IgG ve IgA tipi antikorlar izlemiştir (10).

Meek ve arkadaşları Michigan'da; endometriosisli 20 infertil kadında Ouchterlony ve Immuno diffusion teknikleri ile serumlarında endometrial antikorları 15 (%75) olguda pozitif saptamışlardır (11).

Jarow ve arkadaşları Kuzey Karolina'da kronik nonbakteriyel prostatitisli 28 erkek hastanın serumlarında Gelatin aglutinasyon (GAT) tekniği ile ASA araştırmışlardır. Bu hastaların 7 (%25)'sinde, kontrol grubu olarak alınan 69 normal erkeğin serumlarının 5 (%7.2)'inde ASA'yı pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Nonbakteriyel prostatitisli hastalarda ASA oluşumunun stimüle edildiğini vurgulamışlardır (17).

Kay Avusturalya'da infertil 3 erkekten aldığı serum, seminal plazma ve epididim sıvılarında GAT, Tube slide agglutination test (TSAT), Sperm immobilization test (SIT) yöntemlerini kullanarak ASA araştırmıştır. TSAT yöntemi ile 2 hastanın sadece serumlarında, GAT ve SIT ile hem serum hem epididim sıvısında, SIT testi ile de sadece bir hastanın seminal plazmasında ASA pozitif saptadığını bildirmiştir (18).

Lehmann İsviçre'de immunobead binding test (IBT) ile 11 infertil erkek hastanın serumlarında 1 (%9.0) olguda ASA saptamıştır (20).

Upadhyaya İngiltere'de; 200 infertil erkeğin serumlarında GAT testi ile 20 (%10)'sinde, TSAT ile 10 (%5)'unda ve SIT testi ile 19 (%9)'unda ASA saptamıştır. Kontrol grubundan alınan 65 örneğin sadece 1 (%1)'inde aglutinasyon yapan ve immobilizan antikor bulunduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada GAT

ve SIT testleri arasında uyum bulunduğu belirtilmektedir (23).

Goldberg Ohio'da; 93 infertil kadının serumlarında IBT yöntemi ile 10 (%10.8)'unda ASA'ları pozitif saptamıştır (26).

Hinting Belçika'da 164 infertil çiftten aldığı serum örneklerinde Tray agglutination test (TAT) ile 33 (%20)'ünde 1/32 titrenin üzerinde ASA(+) saptamıştır. Aynı çalışmada 110 erkekten alınan semen örneklerinde Mixed agglutination reaction (MAR) testi ile ASA araştırılmış, TAT ve MAR testi sonuçları karşılaştırıldığında MAR testi ile %13 oranında yanlış pozitiflik saptanmıştır. Semende ASA araştırmak amacıyla MAR testi kullanıldığında bunun yeterli olamayacağı, IBT gibi ilave testlere gereksinim duyulacağı bildirilmiştir (27).

Aynı araştırmacı yaptığı başka bir çalışmada; 64 infertil erkek hastanın serumlarında ASA'ları MAR testi ile %100 oranında pozitif bulmuştur. Bu çalışmada antikor tipleri IBT yöntemi ile belirlenmiş olup, IgA %20, IgM ise %17 oranında saptanmıştır (30).

Meinzert Danimarka'da; MAR testi ile 537 infertil erkekten alınan serumların 43 (%8)'ünde ASA'ları pozitif bulunduğunu bildirmektedir (28).

Rumke Hollanda'da GAT testini kullanarak açıklanamayan infertilitesi olan 1709 kadının serumlarından 110 (%6.4) unda ASA saptamıştır (31).

Wolff Batı Almanya'da 178 infertil erkeğin serumlarında ELISA yöntemi ile ASA'ları %9.6 oranında saptamıştır. Bilinen infertilite problemi olan hastaların serumlarında %0 iken, seminal plazmalarında %7.3 oranında pozitif bulmuştur. Infertilite problemi olmayan hastalarda ise ASA oranınının %4 olduğu-

nu bildirmiştir (32).

Coulam Minnessota'da 57 açıklanamayan infertil çiftin serumlarında Radiolabeled antiglobulin assay yöntemi ile ASA'ları 3 (%5) olguda pozitif bulmuştur. ASA pozitif serumlarda Ig tipleri IFAT yöntemi ile tespit edilmiş ve 2'sinde IgG, 1'inde IgM antikorları saptanmıştır (43).

Witkin New York'da 27 infertil kadının 11 (%41)'inin serumlarında ELISA yöntemiyle ASA(+) bulunduğunu bildirmektedir (44).

Sinton Kolorado'da IFAT yöntemini kullanarak 125 infertil kadının %21.6'sında sperme karşı antikor, erkek eşlerin ise 51(%40)'inde serum veya seminal plazmalarında antikor tespit etmiştir. Erkek hastalardan 18 (%14.4)'inde serum ve seminal plazmada, 19 (%15.2)'unda sadece seminal plazmada, 14 (%11.2)'ünde ise sadece serumlarında ASA saptamıştır (45).

Yergök ve arkadaşları Ankara'da nedeni açıklanamayan infertilitesi bulunan 2500 çiftte IFAT tekniği ile ASA araştırmışlardır. Olgular erkek eşlerde yapılan spermiogram sonucuna göre; fertil, muhtemel fertil ve infertil olarak 3 gruba ayrılmıştır. 267 fertil olguda erkek eşlerde 93 (%34.83), kadınlarda 71 (%26.51) olguda, 1991 muhtemel fertil çiftte erkeklerde 392 (%19.6), kadınlarda 548 (%27.52) olguda ve infertil gruptaki 242 esten erkeklerde 76 (%31.40), kadınlarda 57 (%23.55) olguda ASA'ları 1/32 sulandırımında pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Azospermi olarak değerlendirilen 65 olgunun 22 (%33,84)'sinde, 177 oligospermili hastanın 54 (%30.50)'ünde ASA pozitif saptamışlardır (46).

Ergüven ve arkadaşları Ankara'da abortus ve intrauterin

fötal ölüm hikayesi olan 63 kadında ASA ve antikardiyolipin antikorlarını araştırmışlardır. ASA saptamak amacıyla IFAT yöntemini, antikardiyolipin antikorları için de ELISA yöntemini kullanmışlardır. ASA'ları %28.5 oranında, antikardiyolipin antikorlarını da %33.3 olguda saptamışlardır. Olguların 7 (%11.1)'sinde hem ASA hemde antikardiyolipin antikorları birlikte bulunmuştur (41).

Biz bu çalışmamızda; açıklanamayan infertilitesi olduğu bilinen 25 çiftten (25'i kadın 25'i erkek) ve kontrol grubu olarak da fertil olduğu bilinen 30 hamile kadından alınan serum örneklerinde IFAT (İndirekt Floresan Antikor Tekniği) yöntemi ile ASA araştırdık.

Hasta grubunu oluşturan kadın ve erkek eşlerden genital yol infeksiyonu olanlar bu çalışma kapsamına alınmadı. Kontrol grubunu oluşturan kadınlar abortus, ölü doğum öyküsü olmayan, gebeliklerinin 8. ve 9. ayındaki sağlıklı hamilelerden secildi.

İnfertil çiftlerden alınan serum örneklerinin 18(%36)'inde ve kontrol grubundan alınan serumların 2 (%6.6)'sinde 1/32 sulandırımında ASA pozitif saptandı.

İnfertil grupta yer alan kadın eslerde ASA 10(%20)olguda, erkek eşlerde ise 8(%16) olguda pozitif bulundu. İnfertil gruptaki kadın ve erkek eşler arasında ASA pozitifliği açısından farkın anlamlı olmadığı belirlendi ($\chi^2=0.086$ df=1 $p>0.05$).

Kontrol grubundaki kadınlardan alınan 30 örneğin 2 (%6.6)'sinde ve infertil kadınların 10 (%40)'ında ASA pozitif saptandı. Bu iki grup arasında ASA pozitifliği yönünden istatistiksel farkın anlamlı olduğu görüldü ($\chi^2=7.03$ df=1 $p<0.05$). Bu konu ile ilgili olarak yurt dışında yapılan çalışmalar bul-

gularımızı destekler niteliktedir (5,31).

Infertil erkek eşlerden cinsel perhizin 5.günü alınan semen örneklerinde sperm sayımı yapıldı. 40 milyon/ml'nin altındaki örnekler oligozoospermi ve 40 milyon/ml'nin üzerindeki sayımlar normozoospermi olarak değerlendirildi (1,2,6,7,12).

Normozoospermili erkek hastaların 6 (%12)'sında ve bunların eşlerinin 7 (%14)'sinde ASA pozitif olarak saptandı. Buna karşın oligozoospermili erkek hastaların 2 (%4)'sinde ve bunların eşlerinin 3 (%6)'ünde ASA pozitif bulundu.

Normozoospermili ve oligozoospermili erkek olgular arasında ASA saptanması açısından istatistiksel farkın anlamlı olmadığı belirlendi ($\chi^2=0.49$ $df=1$ $p>0.05$).

Yine Normozoospermili ve oligozoospermili erkeklerin kadın eşlerinde ASA bulunması ile sperm sayısı arasındaki farkın önemli olmadığı saptandı ($\chi^2=0.40$ $df=1$ $p>0.05$).

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre eşeyler arasında ASA bulunması açısından bir fark görülmemektedir. Fakat kontrol grubu ile açıklanamayan infertilitesi bulunan kadınlar arasındaki fark anlamlıdır. Bu sonuç açıklanamayan infertil kadınlarda ASA'ların yüksek oranda saptanabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda oligozoospermili ve normozoospermili erkekler ve bunların eşlerinde sperm sayısı ile ASA saptanması arasında ilişki olmadığı görüldüyse de bunu kesin olarak söyleyebilmek için daha fazla sayıda örnek çalışılması gerektiği inancındayız.

ASA saptamada kullanılan yöntemlerin hemen hepsinin sağladığı avantajlar yanında dezavantajları da bulunmaktadır.

Yurt dışında yapılan yayınlarda aglutinasyon yöntemlerinin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Fakat aglutinasyon yöntemlerinin sağladığı fayda sınırlıdır. Çünkü bu yöntemlerde antijen olarak fertil donörden alınan semen kullanılmaktadır. Spermlerin kendilerine karşı oluşan antikolar yanında semende bulunabilecek mantar, bakteri, sex hormonları, amorf maddeler ve immünglobulin olmayan serum proteinleri ile de birleşerek yalancı aglutinasyon verebilecekleri bildirilmiştir. Ayrıca Ig'lerin bağlanma bölgelerini saptama olanağı yoktur (4,13,17,21,23,27,28). Değişik araştırmacılar tarafından yapılan 10 ayrı çalışmada aglutinasyon yöntemleri ile hamile kadınlardan alınan serumlarda %35-38 arasında değişen oranlarda sperme karşı antikor saptandığı bildirilmiştir. Açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda ise daha düşük oranlarda ve %15-23 arasında ASA (+) bulunmuştur. 7 ayrı çalışmada aglutinasyon yöntemleri kullanılarak açıklanamayan infertil kadınlarda %14-67 oranında antikor bulunduğu bildirilmiştir (4). Diğer bir aglutinasyon yöntemi olan MAR test tekniğinde antikoların bağlanma bölgelerini saptamak mümkün olmadığı gibi, bu yöntemle sadece IgG antikoları ortaya çıkarılabilmektedir (4,27,28).

SIT testi komplemana bağlı ve sitotoksik etkili antikoların saptanabildiği bir yöntemdir. Fakat komplemanı bağlamayan ve spermin başına bağlanan IgA izotipleri bu yöntemle saptanamamaktadır. Bu tip antikoların ise spermin yumurtaya yapışmasını engellediği ve bu şekilde infertiliteye neden olabileceği bildirilmiştir (4,21,23).

ELISA yönteminde antijen olarak kullanılan tam sperm veya sperm membran antijenlerinin fiksasyon sırasında denature olması nedeniyle yüksek oranlarda yalancı negatif ve pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Fakat ELISA yönteminin SIT, GAT, TAT yöntemlerine üstün olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (32).

IFAT yönteminde uygun antijen lamalar üzerine formaldehit veya metanol ile tespit edilmektedir. Fakat diğer yöntemlerin olduğu gibi bu yöntemin de bazı sakıncalı tarafları olabileceği bildirilmektedir. Antijenin tespit işlemi sırasında sperme ait iç antijenlerin açığa çıkacağı ve bu antijenlere antikorun nonspesifik bağlanması ile yalancı pozitif sonuç alınacağı öne sürülmektedir. Spermin iç yapısındaki antijenlerin fertilité üzerinde etkisi olmadığı bilinmektedir (4, 24, 45). IFAT yönteminin duyarlılığı yüksek ve antikorların sperme bağlanma bölgelerini gösteren bir test olması nedeniyle diğer yöntemlere üstün tarafları vardır. Bu yöntemin ASA araştırmak amacıyla kullanılabilen uygun bir yöntem olduğu kanısındayız.

Semende bulunan T-supresör (Ts) lenfositler normalde kadında inmmun cevap gelişmesini baskılar (8, 10, 25). Genital yolda infeksiyona neden olan mikroorganizmalar ve ürünleri adjuvan görevi yaparak spermlerin antijenik yapısı üzerinde etkili olabilir. Yada Ts lenfositler üzerinde inhibitör etki yaparak çoğalmalarını önleyebilir. Ts lenfositlerin geçici olarak baskılanması ASA oluşumunu stimüle edebilir (2, 4, 5). Bu nedenle bu çalışmada genital yol infeksiyonu bulunan eşler çalışma kapsamı dışında bırakıldı.

Genel özellikleri ile ele alındığında çalışmalarımızın sonuçlarının literatürlerle uyumlu olduğu görülmektedir.

F- SONUÇ

Infertil eşlerde Antisperma antikor (ASA) araştırılması çalışmalarında saptanan bulguların değerlendirilmesinden varılan sonuçlar şunlardır:

1- Yaşları 19-35 arasında değişen 50 açıklanamayan infertil kişiden (25'i kadın, 25'i erkek) alınan serum örneklerinde IFAT yöntemi ile 1/32 sulandırımında 18 (%36) olguda ASA pozitif saptandı. Bu oran açıklanamayan infertilite olgularında ASA'ların yüksek oranda saptanabileceğini göstermektedir.

2- Kontrol grubunu oluşturan fertil olduğu bilinen 30 hamile kadından alınan serum örneklerinin 2(%6.6)'sinde ASA pozitif bulundu. Bu sonuca göre fertil kişilerde ASA oranının daha düşük seviyelerde saptanabileceği söylenebilir.

3- Infertil gruptaki kadın eşlerle kontrol grubundaki kadınlar arasında ASA bulunması yönünden istatistiksel farkın anlamlı olduğu belirlendi ($\chi^2=7.03$ df=1 $p<0.05$).

4- Açıklanamayan infertil gruptaki eşeyler arasında ASA pozitifliği açısından farkın anlamlı olmadığı saptandı ($\chi^2=0.086$ df=1 $p>0.05$).

5- Oligozoospermili ve normozoospermili erkeklerde ASA bulunması ile sperm sayısı arasında bir ilişki olmadığı gözlemlendi ($\chi^2=0.49$ df=1 $p>0.05$).

6- Oligozoospermili ve normozoospermili erkeklerin kadın eşlerinde sperm sayısı ve ASA arasında istatistiksel anlamda bir ilişki olmadığı görüldü ($\chi^2=0.40$ df=1 $p>0.05$).

7- Saptadığımız oranlar infertilitede diğer faktörlerin yanında ASA araştırılmasının da gerekli olduğunu göstermekte-

dir. Antisperma antikorlarının değerlendirilmediği bir infertilite araştırmasının tam olamayacağı kanısındayız.

8- IFAT (indirek floresan antikor tekniği)'in duyarlılığı yüksek ve antikorların bağlanma b6lgelerini g6steren bir test olması nedeniyle ASA araştırmalarında kullanılabilecek uygun bir y6ntem olduğu inancındayız.



8- ÖZET

Bu çalışma F.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Mikrobiyoloji laboratuvarında Eylül - Kasım 1991 tarihleri arasında yapıldı. Hastanemiz Üroloji ve Kadın Doğum Polikliniğine çocuk istemiyle başvuran 50 açıklanamayan infertil (25'i kadın 25'i erkek) hastadan serum örnekleri alındı. Kontrol grubu olarak da fertil olduğu bilinen sağlıklı 30 hamile kadından serum örnekleri alındı. Infertil erkeklerden semen örnekleri alınıp spermiogram yapıldı. Genital yol infeksiyonu bulunan kadın ve erkek hastalar bu çalışma kapsamına alınmadı.

Antijen fertil olduğu bilinen ORh- kan grubuna sahip erkekten alınan semenden laboratuvarımızda hazırlandı.

Alınan serum örneklerinde IFAT yöntemi ile 1/32 sulandırımında antisperma antikor (ASA) araştırıldı.

Infertil olguların 18 (%36)'inde, kontrol grubunda ise 2 (%6.6)'sinde ASA pozitif bulundu.

Infertil gruptaki eşeyler arasında, infertil kadınlarla kontrol grubundaki kadınlar arasında ve sperm sayısı ile ASA arasında istatistiksel anlamda bir fark olup olmadığı araştırıldı. Sonuçlar değerlendirildi.

H- KAYNAKLAR

- 1-Arısan,K.: Kadın Hastalıkları. 308-324, 341-348, 1983, İstanbul.
- 2-Danforth, D. N.: Obstetrics and Gynecology. 928-935,941-943, 221-224, Fourth Ed. Philadelphia, 1982.
- 3-Benson, R. C.:Current Obstetrics and Gynecologic. Diagnosis and Treatment. 992-1009, 1982, USA.
- 4-Mandelbaum, S.L., Diamond, M.P., Decherney, A.H.: The Impact of Antisperm Antibodies on Human Infertility. The Journal of Urology, 138, July: 1-8, 1987, USA.
- 5-Taylor, P.V., Campbell, J.M., Scott, J.S.: Presence of Autoantibodies in Women with Unexplained Infertility. American Journal Obstetrics Gynecology, 161 (2): 377-379, 1989.
- 6-Bozkırlı, İbrahim.: Yeni Üroloji. 591-607, Gazi Üniv. Yayın no:100, Tıp Fak. Yayın no:7, 1987, Ankara.
- 7-Smith, D.R.: General Urology. 500-507, 9th. Edition, 1978, Canada.
- 8-London, S.N., Haney, A.F., Weinberg, J.B.: Macrophages and Infertility: Enhancement of Human macrophage-mediated sperm killing by Antisperm Antibodies.Fertility and Sterility, 43 (2): 274-278, 1985.
- 9-Mortimer, D., Pandya, I.J., Sawers, R.S.: Relationship between Human Sperm Motility Characteristics and Sperm Penetration into Human Cervical Mucus in vitro. Journals of Reproduction and Fertility, 78: 93-102, 1986.
- 10-Gleicher, N., EL-Roeiy, A., Confino, E.: Reproductive failure because of autoantibodies: Unexplained infertility and pregnancy wastage. American Journal Obstetric Gynecology,

- 160 (6): 1376 - 85, 1989
- 11-Meek, S.C., Hadge, D.D., Musich, J.R.: Autoimmunity in infertile patients with endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158 (6): 1365-73, 1988.
- 12-Korkud, G., Karabay, K.: Üroloji, 509-514, İst. Univ. Cer. Tıp Fak. Yay. Rektörlük no:3328, Dekanlık no:139,1985, İst.
- 13-Kojima, H. Wang, S.P., Kuo, C.C.: Local Antibody in Semen For Rapid Diagnosis of Chlamydia Trachomatis Epididymitis. *Journal Urology*, 140: 528-531, 1988.
- 14-Staufert, C.W., Parsons, C.L.: Fibronectin Levels in male Ejaculate and Evidence for its role in unexplained Infertility, *Urology*, 34 (2): 80-85, 1989.
- 15-Park, J.M., Ewing, K., Miller, F.: Effect of relaxin on the fertilization capacity of human spermatazoa. *Am.J. Obstet. Gynecol.*, 158 (4): 974-979, 1988.
- 16-Parslow, J.M., Paulton, T.A., Besser, G.M.: The clinical relevance of classes of immunoglobulins on spermatazoa from infertile and vasovasostomized males. *Fertil steril*, 43 (4): 623-627, 1985.
- 17-Jarow, J.P., Kirkland, J.A., Assimos, D.G.: Association of antisperm antibodies with chronic nonbacterial prostatitis. *Urology*, 36 (2): 154-156, 1990.
- 18-Kay, D.J., Hosken, B., Boettcher, B.: Antispermatozoal Antibodies in three men with infertility. Due to Congenital aplasia of the vasa-deferentia. *Am. J. Reprod. Immunol. and Microbiol.*, 17: 48-52, 1988.
- 19-Aras, K., Erşen, G.: Klinik Biyokimya. 855-859, Ankara Üniv. Diş Hek. Fak. Yay. Sayı: 2,1975, Ankara.

- 20-Lehmann, D., Temminck, B., Rugna, D.: Role of immunological factors in Male infertility. Immunohistochemical and serological Evidence. *Laboratory Investigation*, 57 (1):21-28, 1987.
- 21-Carson, S.A., Reicher, J., Scommegna, A.: Antibody binding patterns in infertile males and females as detected by immunobead test, gel-agglutination test, and sperm immobilization test. *Fertil Steril*, 49 (3): 487-492, 1988.
- 22-Witkin, S., Chaudhry A.: Relationship between circulating antisperm antibodies in women and autaintibodies on the ejaculated sperm of their partners. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 161 (4): 900-903. 1989.
- 23-Upadhyaya, M., Hibbard B.M., Walker, S.M.: Anti sperm Antibodies and Male Infertility. *British Journal of Urology*, 56: 531-536, 1984.
- 24-Hoas, G.G., D'Eruz. O.J., De Bault, L.E.: Assessment by fluorescence-activated cell sorting of whether sperm-associated Immunoglobulin (Ig) G and IgA occur on the same sperm population. *Fertil. Steril*, 54 (1):127-132, 1990.
- 25-Naz, R.K., Choudhry, A., Witkin, S.S.: Lymphocyte proliferative response to fertilization antigen in patients with antisperm antibodies. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 163 (2): 610-613, 1990.
- 26-Goldberg, J.M., Haering, F.L., Friedman C.I.: Antisperm antibodies in women undergoing intrauterine insemination. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 163 (1): 163-165, 1990.
- 27-Hinting, A., Vermeulen, L., Comhaire, F.: The indirect mixed antiglobulin reaction test using a commercially

- available kit for the detection of antisperm antibodies in serum. *Fertil Steril*, 49 (6): 1039-1044, 1988.
- 28-Meinertz, H., Hyort, T.: Detection of autoimmunity to sperm: Mixed antiglobulin reaction (MAR) test or sperm agglutination? A study on 537 men from infertile couples. *Fertil Steril*, 46 (1): 86-91, 1986.
- 29-Alexander, J.S., Galle, P.C., Haas, G.G.: Detection and titration of class-specific Antisperm Antibodies in serum Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Obstet. Gynecol.*, 71 (5): 681-684, 1988.
- 30-Hinting, A., Vermeulen, L., Comhaire, F.: Evaluation of simplified adenosine triphosphate release cytotoxicity test for the detection of sperm antibodies in human serum. *Journal Reproductive Immunol.*, 13: 123-131, 1988.
- 31-Rumke, D., Renckens, C.N., Bezemer, P.D.: Prognosis of fertility in women with unexplained infertility and sperm agglutinins in the serum. *Fertil Steril*, 42(4): 561-567, 1984.
- 32-Wolff, H., Schill, B.: A modified Enzyme-Linked Immunosorbent ASSAY (ELISA) for the Detection of Antisperm Antibodies. *Andrologia*, 17: 426-433, 1985.
- 33-Stedronska, J., Clarck, D.A., Hendry, W.F.: Antisperm antibodies detected by ZER-Enzyme Linked Immunosorbent assay kit are not those detected by TAT. *Am. J. of Rep. Immunol. and microbiol.*, 13: 76-77, 1987.
- 34- Smarr, S., Wing, R., Hammond, M.G.: Effect of Therapy on infertile couples with antisperm antibodies. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158 (4): 969-973, 1988.

- 35-Hendry. W., Treehuba, K., Hughes, L.: Cyclic prednisolone therapy for male Infertility associated with autoantibodies to spermatozoa. *Fertil-steril*, 45 (2): 249-253. 1986.
- 36-Manuel of Histologic and Special Staining Technics, Sec. ed., page: 27, 1960, USA.
- 37-Özdamar, K.: Biyoistatistik. s: 315-345, Bilim ve Teknik Yay. 1. Baskı, 1985, Istanbul.
- 38-Witkin, S.S.: Failure of sperm-induced immunosuppression: Association with antisperm antibodies in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 160 (5): 1166-1168, 1989.
- 39-Unat, E.K.: Temel Mikrobiyoloji, 228, 1985, Istanbul.
- 40-Bilgehan, H.: Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 326-328, 1987, Izmir.
- 41-Ergüven, S., Aşar, G., Gülmezoğlu, A.M.: Tekrarlayan Abor-tuslarda Antisperm ve Antikardiyolipin Antikorları. *Mikro-biyoloji Bülteni*, 24: 1-7, 1990.
- 42-Moncayo, H., Moncayo, R., Benz, R.: Organ-specific Antibodies against ovary in patients with systemic lupus erythematosus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 160 (5): 1227 - 9, 1989.
- 43-Coulam, C.B., Moore, S.B., O' Fallon, W: Investigation unexplained Infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158 (6): 1374-1381, 1988.
- 44-Witkin, S.S.: Failure of Sperm-induced immunosuppression: Association with antisperm antibodies in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 160 (5): 1166-1168, 1989.
- 45-Sinton, E.B., Riemann, D.C., Asthon, M.E.: Antisperm Antibody Detection Using Concurrent of Cytofluorometry and Indirect Immunofluorescence Microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.*, 95

(2) 242-240, 1991.

46-Yergök, Y.Z., Ülgenalp, İ., Fabuçcu, R: 2500 infertil
Olguda Anti-sperm Antikor Sıklığı, Türkiye Mikrobiyoloji
Cemiyeti Dergisi, 20 (1-2): 40-45, 1990.



TEŐEKKÜR

Çalıőmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Danıőman Hocam Doç.Dr. Sayın Mustafa YILMAZ'a ve tüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı personeline teőekkür ederim.

