

İNFERTİL ÇİFTLERDE ANTİSPERM ANTİKORLARIN ENZİME BAĞLI IMMUNOSORBENT TEKNİĞİ (ELISA) İLE SAPTANMASI

Dr. Bülent BAYSAL*, Dr. İ. Halil ÖZEROL**,
Dr. Mahmut BAYKAN**, Dr. Ahmet SANIÇ**

ÖZET

Serum ve üreme yollarında spermatozoa üzerinde bulunan antijenlerle reaksiyona giren sperm antikörlerinin bulunması, sperm aglütinasyonuna veya komplemana bağımlı immobilizasyona sebep olur. Antisperm antikörler iki immünolojik sınıfa aittir: IgA ve IgG antikörler. Mevcut bazı veriler IgA'nın klinik olarak IgG den daha değerli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, IgA antikörleri hemen daima IgG antikörleri ile birlikte meydana çıkar. Bu nedenle IgG antikörlerini araştıran testler, rutin bir tarama metodu olarak yararlıdır. Biz infertil erkekler ve kadınların serumlarında bulunan anti-sperm antikörlerinin tesbiti için ELISA metodunu inceledik.

Anahtar Kelimeler: Antisperm antikörler, ELISA.

SUMMARY

The Detection of Antisperm Antibodies in Infertile Couples, with the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The presence of sperm antibodies reacting with antigens on the spermatozoa in sera and reproductive tracts can cause agglutination or complement-dependent immobilization of sperm or both, resulting in a reduction of their fertilizing capacity. Antisperm antibodies are belong to two immunological classes: IgA and IgG antibodies. There are some data indicating that IgA is clinically more important than IgG antibodies. However, IgA antibodies never occur without IgG antibodies. Therefore, testing for IgG antibodies is sufficient as a routine screening method. We examined the ELISA method for the detection of antisperm antibodies in the sera of infertile women and men.

Key Words: Antisperm antibodies, ELISA.

GİRİŞ

Seminal plasmada, kadın üreme yollarındaki sıvılarda ve kadın ya da erkeğin serumlarında bulunabilen antisperm antikörlerinin (ASA) immünolojik infertiliteye yol açabileceği bilinmektedir (1,2,21,30). İlk kez 1954 yılında Wilson, infertil iki erkekten elde ettiği serumlarla spermilerin aglütine olduğunu, bu serumların spermeleri aglütine etme aktivitesinin 56°C de 30 dk ısıtılmaya rağmen devam ettiğini ancak semenle karşılaştırıldığında bu aktivitenin kaybolduğunu, ayrıca aglütinasyonun serum ve spermatozoa arasındaki ABO ve Rh farklılıklarından etkilenmediğini tesbit etti. Wilson bu çalışmalara dayanarak sperm aglütinasyonuna otoantikörlerin sebep olduğunu düşündü. Rumke (1954), sperm aglütine eden seruma sahip bir erkekte, kompleman varlığında sperm immobilizasyonunda artış olduğunu buldu. Rumke ve Hellinga (1969), evvelkinden daha büyük bir grupla çalışarak sperm aglütinasyonuna yol açan faktörün ısıya rezistan, spermatozoa'lar tarafından absorbe edilebilen ve kağıt elektroforezinde euglobulin fraksiyonunda tesbit edilen bir antikör olduğunu bildirdiler. Sperm aglütinlerinin spermatozoa'lara spesifik olduğu, eritrosit, lökosit ve trombositleri aglütine etmediğini saptadılar (3).

* S.Ü.T.F. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D Öğr. Üye., Doç. Dr.

** S.Ü.T.F. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D. Araştırma Görevlisi, Dr.

Evli çiftlerden yaklaşık %10-15'i gebeliği arzuladıkları halde infertildirler. Infertil çiftlerden %10-20 sinde nedenin bulunması için yapılan tetkiklerinde anormal bir bulguya rastlanmaz; erkekte semen analizlerinin normal olduğu, kadında adetlerin düzenli, uterus kavitesi ve postkoital testlerin normal olduğu, peritubal adezyon veya endometriosis bulunmadığı ve fallop tüblerinin açık olduğu tesbit edilir. Bu çiftlerde korunmaksızın yapılan düzenli seksüel ilişkiye rağmen bir yıl içinde gebelik meydana gelmemesi halinde "açıklanamayan infertilite - unexplained infertility" denir. Açıklanamayan infertilite vakalarının büyük çoğunluğunda ise immünolojik faktörler sorumludur (9,10,11). Infertil çiftlerin incelenmesinde, erkeklerin %7 ve kadınların %13 ünde antisperm antikorlar tesbit edilmiştir. Infertil erkeklerde %14 germinal hücre antikorları, %21 sperm antikorları ve %33 makrofaj inhibitör faktörleri saptanmıştır. Normal kişilerde bu değerler %5 civarındadır (16). Güngör ve ark. infertil çiftlerde Franklin-Dukes mikroaglutinasyon testi, Sperm immobilizasyon testi ve indirekt floresan antikor testlerini karşılaştırmışlar ve sırasıyla %33, 3, %17.9 ve %51.06 oranında pozitiflik saptamışlardır (23,24).

Çeyrek asır önce Franklin ve Dukes tarafından açıklanamayan infertiliteli kadınların %79 unda antisperm antikorların bulunduğu bildirilmiştir (12). Yapılan araştırmalarda tavşan, fare gibi birçok fertil hayvandan ve insanlardan elde edilen serumlarda kendi türleri ve daha az derecede de diğer türlerin spermleri ile reaksiyon veren antikorlar bulunduğu görülmüştür (9). Bilindiği gibi spermatozoa'larda çeşitli antijenler bulunmaktadır. Spermatozoa'ların bu antijenik etkilerinden korunmada, erkek üretim sistemindeki epitelyal hücre bariyerleri ve seminifer tubuluslardaki sertoli hücrelerinin birbirlerine sıkıca yapışarak oluşturdukları kan-testis bariyeri önemli rol oynamaktadır. Bu antijenlere karşı doğal olarak antikorlar oluşabildiği gibi erkeklerde kan-testis bariyerini bozan herhangi bir neden (Vazektomi, vazektomi benzeri diğer proses'ler, testislerin irridiasyonu, travma, üreme kanallarına ait kanalların obstrüksiyona uğraması, enfeksiyonlar, enflamatuar reaksiyonlar) kadınlarda ise sperm ve antijenik özellikteki seminal sıvı ile kronik karşılaşma ya da enfeksiyon ve enflamatuar reaksiyonlar sonucunda antisperm antikorlar husule gelebileceği bildirilmiştir (9, 10, 13, 15, 22, 24, 27). Güngör ve ark. indirekt immülfloresan testi ile hayat kadınlarında %55.45 oranında antisperm antikor sıklığı tesbit etmişlerdir (22). Bütün bu olaylar sonucunda erkekte sperme karşı otoimmünizasyon ve otoantikorlar, kadında izoimmünizasyon ve izoantikorlar meydana gelir. Ayrıca homoseksüel erkeklerde yapılan araştırma sonuçlarına göre oral ya da anal ilişki sırasında spermin gastrointestinal sisteme bırakılması neticesinde de antisperm antikorlar oluşabilmektedir (10, 24). Erkekte otoimmün antikorlar sperm aglutinasyonu ve immobilizasyonuna yol açabilirken kadınlarda servikal mukusun spermiumlar tarafından delinebilmesini güçleştirmektedir. Fertilitate bozulduğunda humoral immünite dışında başka immünolojik olaylar da meydana gelebilir. Son zamanlarda sperme karşı sellüler immünite ve ovumun zona pellucida'sına karşı oluşan humoral immüniteye dikkat çeken yayımlar yapılmaktadır (10, 14).

Kadınlarda sperme karşı meydana gelen izoimmünizasyonla ilgili bilgiler erkeklerdekine göre çok azdır. Kadın üreme sistemi seksüel aktivite süresince immünolojik olarak yabancı sperm hücreleri ile tekrarlanan sayılarda karşılaşmakta ancak az sayıdaki kadınlarda sperme karşı antikorlar meydana gelmektedir. Birçok kadında sperme karşı immün cevabı inhibe eden bazı faktörlerin olduğu ve seminal sıvıda da birkaç immünsupressif faktörün bulunduğu bildirilmiştir. Bunlardan birinin in vitro lenfosit fonksiyonu üzerinde geniş spectrumlu immünsupressif etkiye sahip olduğu mitojen, antijen veya allojenik hücrelerce stimüle edilen T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği

saptanmış, ayrıca bunun B hücrelerinden in vitro şartlarda T hücrelerine bağımlı ya da bağımsız antikor yapımını da bloke ettiği gösterilmiştir. Seminal plasma çeşitli proteazlar ve proteaz inhibitörleri kapsar. Bu nedenle seminal plasma ile inkübe edilen serumda kompleman aktivitesi azalır. Seminal plazma bu etkileriyle spermi, kadın üretim yollarındaki immünolojik etkilerden korur. Cinsel ilişki (Coitus) sonunda kadın üretim yollarında büyük sayılarda kalan sperm hücrelerinin, makrofajlar tarafından fagosite edilmesi de kadını sperme karşı immünizasyondan korur.

Seminal plazma çeşitli antijenik maddeler özellikle enzimler, enzimatik proteinler ve nonprotein maddeler ihtiva eder. Serumdakinden daha düşük miktarlarda immünglobulin (Ig) ler kapsar. IgG (7-13 mg/dl) ve IgA (2-6 mg/dl) bulunurken IgM normalde bulunmaz. Vazektomi sonrasında ortaya çıkar. Seminal plazmada bulunan ve sperm aglütinasyonuna yol açan antikorlardan çoğu IgA iken, immobilizan antikorlar predominant olarak IgG sınıfındadır (9). IgA'nın servikal mukusta sperm penetrasyonu üzerinde en fazla inhibitör etkiye sahip antikor sınıfı olduğu bildirilmektedir (26). Sonuç olarak spermin servikal mukus içine girişi, sperme karşı oluşan otoantikörler nedeniyle bozulur. Hastanın infertil oluşunda antisperm antikörlerin rolünün olup olmadığı, spermle servikal mukus arasında meydana gelen reaksiyonu gözlemekle, klinik olarak anlaşılabilir (10, 29). Bu işleme sperm-cervical mucus contact (SCMC) testi denir. Kontrol olarak fertil donörlerin servikal mukus ve semeni kullanılırsa oto-yada izoimmünite nedenleri hakkında bilgi de sağlanabilir. SCMC testi, post-coital test (PCT) gibi sadece otoimmünite bakımından prognostik bilgi sağlamaz, meydana gelen reaksiyon şiddetine göre servikal mucus içindeki antikor titresini hakkında da bilgi verir (10, 17).

MATERYAL ve METOD

S.Ü.T.F. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD immünoloji laboratuvarına infertile nedeniyle başvuran 63 evli çiftten kan örnekleri alındı. Bu kanların santrifüje edilmesiyle elde edilen serumlar -23°C de saklandı. Antisperm antikör'leri tesbit için "ELISA anti-sperm antibody kit" i (Zer Science Based Industries Ltd. Jerusalem, Israel) kullanıldı. Bir kit içinde 96 kuyucuk bulunması nedeniyle hastalar iki ayrı gruba ayrılıp, pozitif optik dansite değerleri farklı (birinci kitte 0.4, ikinci kitte 0.2) iki kitle çalışıldı. Dört kez dilüe edilen serum örneklerinden 50 µl alınarak, sperm antijenleri ile kaplanmış olan kuyucuklara eklendi. Inkübasyon ve yıkama etaplarından sonra bağlanan antikor (IgG) miktarı, kovalent olarak alkali fosfataz enzimine bağlanmış antihuman antikörler (IgG) ihtiva eden konsantre enzim solusyonuyla ölçüldü. Yıkama işlemlerinden sonra substrat (p-nitrophenyl phosphate) eklenip inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucunda stop solusyonu (3 N NaOH den her kuyucuğa 50 µl) kondu. Meydana gelen renk yoğunluğundaki değişim, bir mikro ELISA okuyucusu (Microplate reader Model EL308, Bio-Tek instruments inc. Winooski, Vermont) ile 405 nm de okundu.

BULGULAR

İnfertil çiftlerin herbirinden alınan toplam 116 (58 çift) serum örneği, S.Ü.T.F. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji immünoloji laboratuvarında ELISA metodu ile değerlendirildi. ELISA testinde 405 nm de okunan absorbans değerlerinden, kit prospectus'ünde (8) bildirilen optik dansite değerden daha büyük olanları pozitif kabul edildi. bu şekilde çalışılan serumlardan 15'inde (%12.9), test pozitif sonuç verdi.

TARTIŞMA

Antisperm antikörleri tesbit için yaygın olarak kullanılabilir nitelikte bir test

henüz yoktur. Taramalarda Mikst aglütinasyon reaksiyonu yada Tray aglütinasyon testi kullanılabilirse de en uygun test, Immunobead binding tests-IBT yöntemidir (10, 15, 18). Biyopside testis histolojisi normal bulunan infertil erkeklerin serumlarında IBT ile yüksek titrelerde ASA tesbit edilmiştir. (27). Mikst aglütinasyon reaksiyonu, spermatozoa'lar yüzeyindeki Ig'leri tesbit edebilir. Serum veya seminal plazmadaki antikor miktarları ise tray aglütinasyon testi ile saptanmaktadır. Antikorların normal üreme süreci üzerindeki etkileri SCMC testi ile değerlendirilebilmektedir (26, 29). Aglütinasyon metodları nonspesifiktir, güvenilir değildir ve kapsadıkları Ig izotiplerini tanımlamaz. Tray aglütinasyon testi dışındaki aglütinasyon testlerinden hiçbiri, spermın hangi bölümüne antikorun bağlandığını göstermez. IBT, oldukça spesifik bir testtir. Burada kullanılan immün boncuklar (immunobead); insan IgA, IgG ve IgM'sinin sırasıyla α , β ve μ zincirlerine kovalent olarak bağlanmış tavşan antikorlarından ibaret 5-10 μ m lik poliakrilamid kürelerdir. Sperm immünglobulin kaplı bu boncuklarla inkübe edilir, ve daha sonra hareketli spermaların boncuklar üzerindeki spesifik bölümlere yapışmaları izlenir.

Sperm immobilizasyon testi ve spermositotoksik antikor mikrosayımları, komplemana bağımlı immobilizan ve sitotoksikite'yi tesbit eden spesifik metodlardır. Kompleman fiksasyonu yapmayan IgA izotiplerine karşı sperm immobilizasyon testinin duyarsız olduğu ve sperm başına bağlanan antikorların sperm immobilizasyonuna sebep olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle antisperm antikor aktivitesinin tesbiti için güvenle kullanılabilirse de bazı antisperm antikorlara duyarsızlıkları ve sperme bağlanan antikor bölümünü belirleyememeleri sonucu kısıtlı kullanılmaktadır.

Immünfluoresan metodu; sperme bağlanan antikor bölümünü belirlemekte ve internal sperm antijenleri ile de aglütinasyon vermesi sonucu, yüksek sayıda yanlış pozitif sonuç vermekte ve fertilitate durumu ile zayıf korelasyon göstermektedir. Sperm destrüksiyonu sonucu oluşan internal antijenlerin, infertiliteyle ilgileri yoktur. Sonuç olarak rutin klinik taramalar için yararlı bir metod değildir.

İlk kez Engvall ve Perlman tarafından tanımlanan ELISA testi, kısa süre içinde yaygın halde kullanılmaya başlanmış ve antisperm antikorlar dahil çeşitli amaçlara adapte edilmiştir. ELISA'nın, antisperm antikorları tesbitte kullanılan diğer testlere üstünlükleri; daha duyarlı oluşu, hem zaman hemde kullanılan reagenler yönünden daha ekonomik oluşudur. Böylece çeşitli sayıdaki test materyalleri hızlı ve etkili bir şekilde incelenebilmektedir. bu arzulanan özellikleri yanında, ELISA'nın önemli bir dezavantajı diğer anti-sperm antikor testleri sonuçları ile korelasyon göstermemesidir. ELISA metoduna ait sonuçlar, birçok araştırmacı tarafından çeşitli metodlarla karşılaştırılmış ELISA ile farklı yapıdaki antikorların ölçüldüğünü ve bu yüzden diğer testlerle korelasyon göstermediği sonucuna varılmıştır (4, 5, 6, 7, 9, 21, 27).

ELISA metodunda, sperm yüzeyindeki human immünglobulinlere bağlanabilen enzimle işaretlenmiş bir antiglobulin kullanılır. Enzim mevcudiyeti tesbit edilebilir ya da enzim substrat eklenişinden sonra kalorimetrik olarak ölçülür. Hem sperm hem de sperm membran ekstreleri ile reaksiyon verir. Çeşitli antijenlere karşı reaksiyon sonucu yanlış pozitif ve negatif sonuç alınmakta infertilite ile klinik korelasyon göstermemektedir. Klinik olarak önemli antijenler tesbit ve izole edilinceye kadar, bu testin antijen tesbiti amacıyla klinik kullanımı sınırlıdır (4, 10). Fumutaka ve arkadaşları piyasada mevcut bir ELISA kiti (ELISA anti-sperm antibody kit, Zer Science Based Inc.) ni, Sperm immobilizasyon testi ile karşılaştırmışlar, 83 infertil kadın ve 29 kontrol bireyine ait

serumu kullanmışlar ve infertil hastaların %24 ünde ve kontrol grubuna ait kadınların %10 unda ELISA testi ile antisperm antikorları pozitif bulmuşlar buna karşın, sperm immobilizasyon testinde infertil kadınların ancak %15 inde pozitif sonuç almışlar fakat kontrol grubunda hiçbir pozitiflik saptayamamışlardır. Yine aynı çalışmada postkoital testte servikal mukusta saptanan hareketli spermelerin sayısı ile sperm immobilizasyon testi arasında ilgi bulunmuş fakat ELISA ile postkoital test arasında da bir korelasyon bulunamamıştır. Aynı serumlarla yaptıkları paralel çalışmalar sonucunda ELISA testi ile bir seri, farklı antikorların etkileştikleri ve bu nedenle antisperm antikor tesbitin de ELISA testine güvenilemeyeceğini vurgulamışlardır (4).

ELISA testi semen, serum veya diğer vucut sıvılarında bulunan sperm ekstreleri yada sperm yüzeyine karşı oluşmuş antikorları tesbit etme amacı dışında infertil kadınlarda dolaşan immun kompleksleri tesbit için de kullanılmaktadır. Semende direkt ve indirekt ELISA testleri ile kantitatif antisperm antikor tayinleri karşılaştırılmış fakat önemli bir fark bulunamamıştır (19).

İmmünolojik infertilite alanında henüz belirli bir tedavi şekli yoktur. Kadınlardaki antikor titresini düşürmek amacıyla kondom önerilmiştir (9, 10, 15, 22, 25). Kondom'un spermle karşılaşmayı azaltarak antikor titresini düşürdüğü, fakat etkinliğinin halen kanıtlanamadığı bildirilmiştir. Adrenal kortikosteroidlerle immünsupresyon önerilmiş, fakat çeşitli çalışmalarda değişik sonuçlar alınmıştır (23). W.F. Hendry ve ark. prednisolon alan erkeklerin partnerlerini izlediklerinde 9 ayda %31 oranında gebelik oranı elde etmişlerdir. Bu sonuç prednisolonun seminal plazmadaki antikor düzeyini düşürmesi ve buna bağlı olarak da sperm hareketliliğinin artışına bağlı olabilir. Sperm üzerindeki antikorların, spermi yıkamakla uzaklaştırılması ve yıkanmış spermelerin intrauterin verilmesi sonucu gebelik meydana getirilmiştir (20). Ancak yıkama işlemi ile antikorların spermde uzaklaştırılmaları zordur ve zaten antikora sahip bu kadınlarda servikal kanalda da antikorlar bulunmaktadır. Bu nedenle kadına ait infertilitede bu yöntemin de değeri sınırlıdır, erkek infertilitesinde yararlı olabilmektedir. Erkek ve kadın infertilitesinde sperm, oosit ve antikor arasındaki etkileşimden korunarak gebeliği sağlayan etkili bir yöntemin in vitro fertilizasyon yöntemi olduğu bildirilmektedir (11, 28).

KAYNAKLAR

1. Bronson R, Cooper C, Rosenfeld D. Sperm antibodies: Their role in infertility. Fertil Steril 1984; 42: 171.
2. Jones WR. Immunologic infertility: fact or fiction, Fertil Steril 1980; 33: 577.
3. Sogor L. Immune aspects of infertility. Gynecology and obstet 1986;5: 1-7.
4. Beck WW. Obstetrics and gynecology. Pennsylvania: Harwal Publishing 1989: 312.
5. Fjällabrant B. Studies on sera from men with sperm antibodies. Acta Obstet Gyneol Scand 1969; 48: 131.
6. Daniel PS, John DS, Wells JV. Basic clinical immunology. USA: Apleton Lange Medical. 1987; 625-631.
7. Stacey LM, Michael PD, Alan HD. The impact of antisperm antibodies on human infertility. J Urol 1987; 138:1-8.
8. Nancy CA, Carl MH, Wayne SM, Jane BR, Michael PD, Anne CW. Intrauterine insemination: a critical review Fertil Steril 1985; 44: 569-580.
9. Anafarta K. Erkek infertilitesi ve tedavideki son gelişmeler. Türkiye Klinikleri 1982; 2: 311-315.

10. Güngör S, Sağlım M, Sağlam R, Aşar G. İnfertil çiftlerde antisperm antikor sıklığı ve immünsupressif tedavi ile elde edilen gebelik oranları. Türk Üroloji Dergisi, 1985; 11:365-374.
11. Güngör S, Sağlam M, Gümrükçü E, Aşar G, Kerse M, Yılmaz E. İnfertilite nedeni açıklanamayan erkek ve kadınlarda antisperm antikor sıklığı. GATA Bülteni 1983; 25: 1201-1210.
12. Franklin RR, Duker CD. Antispermatozoal antibody and unexpected infertility. Amer J Obstet Gynecol 1964; 89: 6.
13. Griffin EJ, Wilson JD. Disorders of the testis. In: Brounwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, eds. Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill, 1987: 1807-1818.
14. Barlow DH. Antisperm antibodies in infertility. Br Med J 1988; 296: 310-311.
15. Güngör S, Gün H, Kocabeyoğlu Ö, Yılmaz E, Yenen Ş, Baydar İ. Hayat kadınlarında antisperm antikor sıklığı ve fertilite azalmasının değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Dergisi 1988; 45: 229-234.
16. Lynn MW, Nicholas LC, Michael FO, Frederick WH, James WO, R Jeffrey C. Detection of antisperm antibodies: Their localization to human sperm antigens that are transferred to the surface of zona-free hamster oocytes during the sperm penetration assay. Fertil Steril 1987; 48: 292-298.
17. Garcia CR, Manstroianni L, Amelar RD, Dubin LBC. Current therapy of infertility-3. Philadelphia: Decker Inc. 1988; 44-47.
18. Morgan H, Stedronska J, Hendry WF, Chamberlain GVP, Dewhurst CJ. Sperm/cervical mucus crossed hostility testing and antisperm antibodies in the husband. Lancet 1977;11: 1228-1230.
19. Franken DR, Grobler S, Pretorius E. The SCMC test: a reliable monitor for antispermatozoal antibodies. Hum Reprod 1988; 3: 607-609.
20. Zer, ELISA anti-sperm antibody test-Jerusalem: Zer Science Based industries . 1986: 1-7.
21. Fumitaka S, Kazutomo O, Takao N, Osamu T, Munehiro K. Clinical evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for antisperm antibodies. Fertil Steril 1988; 50: 644.
22. Dona ML, Stephane EH. Comparison of a direct and indirect ELISA for quantitating antisperm antibody in semen. J Androl 1987; 8: 215-220.
23. Hargrave TB. The investigation of male infertility. Turk J Pediat 1984; 26: 119-122.
24. Hargrave TB.:The medical management of male infertility. Turk J Pediat 1984; 26: 147-150.
25. Dona ML, Stephan EH. Comparison of a direct and indirect ELISA for quantitating antisperm antibody in semen. J Androl 1987; 8: 215-220.
26. Üstay K. İnfertilite, temel tedavi. Ankara: Fidan Kitabevi, 1983; 793-798.
27. Kern JFP. Improved conception rate after intrauterine insemination of washed spermatozoa from men with poor quality semen. Lancet 1984; 2: 533-4.
28. Anthony HP, Mortimer D. Prevalance of sperm surface antibodies in the male partners of infertile couples as determined by immunobead screening. Fertil Steril 1987; 48: 466-469.
29. Klopper A. İnfertilite. Med J 1985; 290:140-142.