

DENEYSEL EPİDİDİMİT OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA ANTI-SPERM ANTİKORLARININ İFAT İLE GÖSTERİLMESİ VE ANTİBİYOTİK TEDAVİSİNİN ANTİKOR OLUŞUMUNA ETKİSİ

THE EFFECT OF INTIBIOTIC THERAPY ON THE FORMATION OF ANTISPERM ANTIBODIES (ASA) BY INDIRECT FLUROESCENT ANTIBODY TECHNIQUE (IFAT) IN RATS WITH EXPERIMENTAL EPİDİDYMITIS

DÖNMEZ, T*., KOÇOĞLU, T**., AKGÜN, Y**., BAYÇU, C***., ÖZYÜREK, Y*., KALE, M*.

* Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı

** Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

*** Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Sıçanlarda E. Coli ile deneysel epididimit oluşturuldu. Bir kısmına bakteri inokülasyonundan sonraki 1., 3. ve 8. günlerde antibiyotik başlandı. Deney ve kontrol gruplarından değişik günlerde kan alınarak IFAT ile anti-sperm antikor (ASA) arandı. Antibiyotik verilen ve verilmeyen gruplarla kontrol grubu arasında antikor varlığı ve titresi yönünden anlamlı bir fark bulunmadı.

SUMMARY

Epididymitis was induced experimentally in rats with E. Coli. To some of them were introduced antibiotic at first, third and eighth days after inoculation. Blood samples were taken from study and control groups at different days and ASAs were investigated by IFA technique. There was no significant difference between treated, untreated and control groups for presence and titer of antibody.

GİRİŞ

Serum seminal plazma veya servikal mukusda bulunan ASA'nın infertiliteye neden olabileceği genellikle kabul edilmektedir. ASA'ların serum ve reproduktif kanalda bulunması, spermlerin aglütinasyonuna veya komplemana bağlı immobilizasyonuna veya her ikisine birden neden olarak fertilizasyon kapasitesini azaltır^(1, 2).

Erkekler reproduktif olaylar sırasında konağa yabancı gametlerle yüzyüze gelmedikleri için erkek reproduktif sistemindeki immünolojik değişiklikler esasen otoimmün özelliktedir. Deneysel olarak spermatozoa ile oto ya da

alloimmünizasyon erkek veya kadında görelî bir infertiliteye neden olur. Sperme karşı doğal otoimmün reaksiyonlar nadirdir, fakat vazektomi sonrasında artan oranlarda görülmektedir. Son bulgular spermatozoaya potansiyel zararı olabilecek immün yanıtların seminal plazmadaki immünoregülatuar maddelerle inhibe edildiğini düşündürmektedir⁽³⁾.

Genital traktus infeksiyonlarının da sperme karşı otoimmünite gelişimine yol açabileceği düşünülmektedir⁽³⁾. Yapılan bazı çalışmalarda deneysel epididimitin⁽⁴⁾ ve deneysel *Brucella canis* infeksiyonunun⁽⁵⁾ anti-sperm antikor oluşumunu indüklediği gösterilmiştir.

Biz, bu çalışmada otoimmün özellikteki infertilite patogeneğinde genital sistem infeksiyonlarının rolünü ve ASA oluşumunun antibiyotik tedavisiyle önlenip önlenemeyeceğini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanları: Norveç cinsi erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Her biri 3-6 sıçandan oluşan 7 deney grubu ve 9 sıçandan oluşan kontrol grubu çalışmaya alındı. Deney grubunun epididimleri içine bir idrar kültüründen izole edilmiş ve ml'de 10^6 bakteri içeren E. Coli süspansiyonundan 0.1 ml. inoküle edildi. 1., 2., 3. ve 4. gruptaki sıçanlardan sırasıyla 1., 3., 8. ve 15. günlerde kan alındı. 5., 6. ve 7. gruptaki sıçanlara inokülden sırasıyla 1, 3 ve 8 gün sonra deneyde kullanılan suşun duyarlı olduğu amikacin başlandı. Yine sırasıyla bu sıçanlardan 8., 10. ve 15. günlerde kan alındı.

Serumlar: Çalışma gününe kadar -20°C 'de saklandı.

IFA (İndirekt Floresan Antikor) deneyi: Sıçan epididiminden alınan spermlar PBS tamponuyla yıkayıp süspansiyon haline getirildikten sonra özel olarak bölmelenmiş lamlara tek tabaka sperm düşecek şekilde damlatıldı. Havada kurutulduktan sonra metanolle tespit edildi. Her bir bölmeye serumların PBS'de 1/10 ve 1/40 sulandırılmaları yapıldı. İnkübasyon ve yıkamadan sonra üzerlerine PBS ile 1/32 oranında sulandırılmış anti-rat IgG FITC conjugate (Sigma) damlatıldı. İnkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra preparatların üzerine PBS-gliserol karışımı damlatılıp lamel kapatılarak floresan mikroskopunda 10X ve 40X büyütme ile incelendi⁽⁶⁾.

Histolojik inceleme: İnfekte edilen gruplarla kontrol grubunun epididimleri çıkarılıp Bouin's solusyonuna konuldu. Spesmenler HXE ile boyanarak mikroskopik incelemeye alındı.

BULGULAR

Deney hayvanlarına antibiyotik başlanma ve kan alınma günleri Tablo I'de, IFA sonuçları Tablo II'de gösterilmiştir. Tablo II'ye göre, 1.

gün kan alınan 1. grup ile 1. gün tedaviye başlanıp 8. gün kan alınan 5. gruptaki sıçanlarda anti-sperm antikor varlığı gösterilememiştir. Kontrol grubundaki 9 sıçandan birinde 1/80 titrede antikor saptanmıştır. Antibiyotik verilmeyen ve 3. günde kan alınan 2. gruptaki 6 sıçandan 2'sinde 1/10 ve 2'sinde 1/40 titrede antikor bulunmuştur. Yine antibiyotik verilmeyen ve 8. günde kan alınan 3. gruptaki 4 sıçandan birinde 1/10 ve birinde de 1/40 titrede antikor bulunmuştur. Antibiyotik verilmeyip, 15. gün kan alınan 4. gruptaki 7 sıçanın 4 tanesinde 1/10, bir tanesinde 1/40 ve bir tanesinde de 1/80 titrede antikor saptanmıştır. 3. günde antibiyotik başlanan ve 10. gün kan alınan 6. gruptaki 3 hayvandan ikisinde 1/40 ve birinde 1/10 titrede antikor bulunurken, 8. gün antibiyotik başlanıp 15. gün kan alınan 7. gruptaki 4 sıçandan ikisinde 1/10 ve birinde de 1/320 titrede antikor saptanmıştır. IFA incelemelerinde boyanmanın baş ve boyun kısımlarında ve lineer biçimde olduğu gözlenmiştir.

Histolojik bulgular: Kontrol grubu epididimlerinde normal stroma ve içlerinde olgun spermatidler bulunan tubuluslar gözlenmiştir. İnfekte

Gruplar	Sıçan Sayısı (n)	I	Günler				
			1	3	8	10	15
1	4	+					
2	6	+		□			
3	4	+			□		
4	7	+					□
5	5	+	★		□		
6	3	+		★		□	
7	4	+			★		□
K	9	-					□

□ Kan alma günleri

★ Antibiyotik (Mikacin intraperitoneal)

I E.coli (10⁶/ml, 0.1ml.ic)

Tablo I: Deney ve kontrol gruplarında kan alma ve antibiyotik başlama günleri.

Tablo 2: Deney ve kontrol gruplarında İFA ile gösterilen anti-sperm antikor titreleri.

BULGULAR						
Grup *	n	ASA titrasyonları				
		1/10	1/40	1/80	1/160	1/320
1	1	-				
	2	-				
	3	-				
	4	-				
2	5	-				
	6	+				
	7	-				
	8	+				
3	9	+	+			
	10	+	+			
	11	+				
4	12	-				
	13	+	+			
	14	-				
5	15	-				
	16	+	+			
	17	+				
	18	+				
	19	+	+	+		
	20	+				
6	21	+				
	22	-				
	23	-				
	24	-				
	25	-				
7	26	-				
	27	+				
	28	+	+			
	29	+	+			
K	30	+	+	+	+	+
	31	-				
	32	+				
	33	+				
K	34	-				
	35	-				
	36	-				
	37	-				
	38	+	+	+		
	39	-				
	40	-				
	41	-				
	42	-				

grupların antibiyotik alan ve almayanlarında stroma ve tubulus lümenlerinde değişik derecelerde polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, lümen epitelinde kalınlaşma, devamlılığında bozulma ve stromada ödem saptanmıştır. Antibiyotik alan ve almayan gruplar arasında histolojik olarak önemli bir farklılık görülmemiştir.

TARTIŞMA

Genital traktus infeksiyonlarının sperme karşı otoimmünite gelişimine yol açabileceği düşünülmektedir. Fakat bu nedenle otoimmünite gelişmiş olguların sperm-reaktif antikorların saptandığı popülasyonun az bir bölümünü oluşturabilirler⁽³⁾. Bir deneysel çalışmada E. Coli ile epididimit oluşturulmuş sıçanlarda sitotoksik ASA yapımının indüklendiği ve antikor oluşumunun antibiyotik tedavisiyle baskılanabileceği gösterilmiştir⁽⁴⁾. Bir başka deneysel çalışmada ise sistemik Brucella canis infeksiyonunun köpeklerde aglütinan ASA yapımını indüklediği gösterilmiştir⁽⁵⁾. Bu çalışmada aktivitesi infeksiyon nedeniyle artmış makrofajların spermleri fagosit ettiği ve spermle yüklü makrofajların tübül epitel hücreleri arasında lenfositlerle yüzyüze gelerek spermlere karşı hem hücresele hem de hü-möral immün yanıtı neden olduğu belirtilmiş ve bunun sperme karşı otoimmün yanıtın muhtemel mekanizması olabileceği ileri sürülmüştür.

Bizim çalışmamızda antibiyotik verilmeyen ve inokülasyondan sonra 1. gün kan alınan 1. grup ile tedavisine 1. gün başlanan ve 8. gün kan alınan 5. gruptaki sıçanlardan hiçbirinde antikor bulunamazken, tedavisiz sıçanların bir kısmında 1/40 ve üzerindeki titrelere antikor saptanmış olması infeksiyonun anti-sperm antikor yapımını indüklediği ve antibiyotik tedavisinin de bunu önleyebildiğini düşündürmektedir. Ancak tedavi verilmeyip 3. gün kan alınan 2. gruptaki iki sıçanda 1/40, kontrol grubunda 9 sıçandan birinde 1/80 titrede antikor saptanmış olması bu antikorların doğal antikor olma olasılığını akla getirmektedir. Çünkü insan dahil birçok türün serumlarında doğal ASA'ları bulunmaktadır. Puberte öncesinde her iki cinste IFA ile % 90 oranında ASA saptanmıştır. Bu oran puberteden sonra % 60'a düşerek hayat boyu devam etmek-

tedir. Yapılan bazı çalışmalarda çocuklarda ve kadın donörlerde IFA ile saptanan doğal ASA varlığı oranının yüksek olmakla birlikte titrelerinin düşük olduğu (pek azında 1/16 ve üzerinde) oysa infertil kadınların yaklaşık % 50'sinde 1/16 ve üzerinde olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra IFA ile saptanan antikorların daha çok intrasellüler antijenlere karşı olduğu ve sperm yüzeyine karşı olan ve spermleri aglütine eden antikorlardan farklı olduğu düşünülmektedir. Bu doğal antikorlar başka tekniklerle de düşük titrelere gösterilmiştir⁽³⁾.

Deneyde kullandığımız anti-rat antikorunun anti-IgG türünde olması da saptanmış olduğumuz antikorların doğal antikor olabileceğini düşündürmektedir ve tedavi edilmeyen fakat erken dönemde kan alınan 2. grup ile kontrol grubunda antikor bulunmasının nedenini açıklayabilir. Vücuda antijen verilmeden sonra birkaç gün içinde IgM ve 1-2 hafta içinde de IgG sentezi başlar⁽⁷⁾.

Spermlerin yüzeyine karşı oluşan antikorların rolü önemli olup, bu antikorların etkisiyle ortaya çıkan immobilizasyon deneyi spesifiktir. Aglütinan antikorlar da infertilite için duyarlı bir indeks olmakla birlikte özgüllüğü azdır. Ancak aralarında iyi bir korelasyon vardır⁽³⁾. İnfertil erkeklerde yapılan bir çalışmada bu iki testle IFA ve servikal mukusa sperm penetrasyonu arasında ilişki bulunamamıştır⁽⁸⁾. Ülkemizde yapılan bir çalışmada da IFA ve bu iki test arasında tam bir korelasyon bulunamamıştır⁽⁹⁾.

Yukarıdaki bilgilerden de anlaşılacağı üzere, tek bir serolojik yöntemle sonuca gitmek sağlıklı olmayabilir. Bizim çalışmamızda sıçanlardan insanda olduğu gibi bol ve hareketli sperm elde etme olanağının olmayışı nedeniyle immobilizasyon ve aglütinasyon deneyleri yapılamamıştır.

Son yıllarda sperm-reaktif antikorları araştırmaya yönelik daha duyarlı yöntemlerin arayışı hız kazanmıştır. Bunlar arasında ELISA, immunobead binding assay, sperm sitotoksisite deneyi, tray agglutination, gel agglutination, pasif hemaglütinasyon sayılabilir. Bu deneyler WHO referans bankasından alınan serumlar üzerinde çalışılmış ve deneyler arasında korelasyon bulunamamıştır. Bundan çıkarılan sonuç, bu testlerin eski testlerdekinden farklı antikorları sap-

tadığı şeklindedir^(3, 10). ELISA'da sperm antijenlerinin farklı yöntemlerle hazırlanması farklı sonuçlara neden olmaktadır⁽¹¹⁾. Dolayısıyla ASA'larının saptanmasında zahmetli olmalarına rağmen immobilizasyon, aglütinasyon, servikal mukusa penetrasyon gibi klasik yöntemlerin dışında yeni geliştirilen tekniklerin tam olarak güvenilir duruma gelmeleri zaman istemektedir. IFA tekniği ise diğer klasik ve özgül yöntemlerle iyi korelasyon göstermemekte ve doğal antikoları yansıtabilmektedir.

Klinik ve deneysel çalışmaların ışığında, erkek infertilitesinde önemli mesafeler alınmasına karşın yine de çözüm arayan sorunlar çoğunluktur.

KAYNAKLAR

1. **Shulman, S.:** Antigenicity and autoimmunity in sexual reproduction. *Clin. Exp. Immunol.*, 9: 267, 1971.
2. **Saji, F., Negoro, T., Wakao, T., Yagi, J., Nakamuro, K.:** Circulating autoantibodies against spermatozoa in the husbands of infertile couples. *Acta Obstet Gynecol. Jpn.*, 31: 508, 1979.
3. **Pavia, C.S., Stiles, D.P., Bronson, R.A.:** Reproductive Immunology. In *Basic and Clinical Immunology* (Eds: Stites, D.P., Stobo, J.D., Wells, J.V.) Sixth Edition, 1987, Lange Medical Book. pp. 619-633.
4. **Greskovich, F.J. et al.:** The effect of early antibiotic therapy on the formation of sperm antibodies in experimentally induced epididymitis. *The J. of Urology*, 137: (4, Part 2); 382 A, 1987.
5. **George, L., Carmicheal, L.:** Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 45, No 2, 274, 1984.
6. **Burek, C.L., Rose, N.R.:** Detection of autoantibodies. In: *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis* (Eds: Sonnenwirth, A.C., Jarett, L.) Eighth Edition, 1980, Mosby Company. pp. 1257-1278.
7. **Root, R.K., Ryan, J.L.:** Humoral Immunity and Complement, In: *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Eds: Madell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E.) 1985, A Wiley Medical Publication. pp. 31-57.
8. **Hendry, W.F., Morgan, H., Stendronska, J.:** The clinical significance of antisperm antibodies in male subfertility. *British Journal of Urology*, 49: 757, 1977.
9. **Kerse, İ., Özdemir, T., Harmankaya, Ç., Eryigit, M., Sağlam, R., Peker, A.F.:** Erkek infertilitesinde immünojenik araştırmanın tanı ve tedavideki yeri. *GATA Bülteni*, 28: 29, 1986.
10. **Saji, F., Negoro, T., Ohaski, K., Tanizawa, O., Kato, M.:** Clinical evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for antisperm antibodies. *Fertility and Sterility* Vol. 50, No 4, 644, 1988.
11. **Haas, G.G.:** This month in investigative urology: Antibody-mediated causes of male infertility. *The Journal of Urology* Vol. 140, 626, 1988.