

Normospermi ve astenospermi olgularda phospholipase C zeta'nın fertilizasyondaki etkisi

The effect of fosfolipaz C zeta in fertilization of normospermia and astenospermia cases

Narin Oktay, Yasemin Ersoy Çanılıoğlu, Evrim Ünsal, Canan Hürdağ

İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada normospermi ve astenospermi gruplarında, immünohistokimyasal ve immünofloresan yöntemleri kullanılarak fosfolipaz C zeta (PLC ζ) proteininin lokalizasyonunun fertilizasyona olan etkileri araştırıldı.

Hastalar ve yöntemler: Bu çalışmaya yaşları 22-40 arasında değişen normospermi (sayı 20 milyon/mL ve üzeri, motilite %50 ve üzeri, n=20) ve astenospermi (sayı 20 milyon/mL ve üzeri, motilite %30 ve altı, n=20) olmak üzere iki grup semen örneği dahil edildi. Çalışmada, normospermi ve astenospermi grupları arasında PLC ζ 'nin lokalizasyonları immünohistokimya ve immünofloresan yöntemleri kullanılarak incelendi. Ek olarak, normospermi ve astenospermi grupları geçirirli elektron mikroskobu (TEM) takibi yapılarak incelendiğinde gruplar arasında ultrastrüktürel farklılıklar olduğu belirlendi.

Bulgular: Normospermi grubu immünohistokimyasal boyama sonuçlarında spermatozoonlarda, baş kısmının membranı boyunca, akrozom ve postakrozomal bölgelerde anlamlı PLC ζ reaksiyonu gözlemlendi. Astenospermi grubu spermatozoada PLC ζ reaksiyonunun bu bölgelerde azaldığı gözlemlendi. Uygulanan immünofloresan ve TEM yöntemlerinde de benzer destekleyici sonuçlar elde edildi.

Sonuç: Çalışmamızda PLC ζ proteini normospermi ve astenospermi gruplarında incelendi ve iki grup arasında belirgin yapısal farklar kaydedildi. Çalışma sonuçlarımız astenospermi grubu oosit aktivasyon yetersizliğinin, azalmış PLC ζ varlığı ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Astenospermi; immünofloresan; immünohistokimya; infertilite; oosit aktivasyonu; fosfolipaz C zeta; geçirirli elektron mikroskobu.

ABSTRACT

Objectives: This study aims to examine the effects of phospholipase C zeta (PLC ζ) protein localization in fertilization of normospermia and asthenospermia groups by using immunohistochemistry and immunofluorescence methods.

Patients and methods: We included two semen samples of normospermia (count: 20 million/mL and up, motility: 50% and higher, n=20) and asthenospermia (count: 20 million/mL and up, motility: 30% and lower, n=20) whose ages varied between 22-40, in this study. We analyzed the PLC ζ localization in the normospermia and asthenospermia groups by using immunohistochemistry and immunofluorescence methods. Additionally, when we examined the normospermia and asthenospermia groups with the transmission electron microscopy (TEM) follow-up, we found ultrastructural differences between the groups.

Results: In the immunohistochemical staining results of normospermia group, we observed significant PLC ζ reaction along the membrane of the sperm, and the acrosome and post-acrosome regions. We observed a decrease of PLC ζ reaction in asthenospermia group spermatozoa in these regions. We obtained similar supporting results from immunofluorescence and TEM examinations.

Conclusion: We examined the PLC ζ protein in normospermia and asthenospermia groups and observed significant structural differences between the two groups. Our results showed that insufficiency in oocyte activation in asthenospermia is associated with decreased PLC ζ presence.

Keywords: Asthenospermia; immunofluorescence; immunohistochemistry; infertility; oocyte activation; phospholipase C zeta; transmission electron microscopy.

İnfertilite dünya çapında her yedi çiftten birini etkilemektedir.^[1] Fertilizasyon sürecinin ana sorularından biri oositin nasıl aktive olduğudur. Başarılı bir fertilizasyon sırasında spermatozoon oositin zona pellusidasına bağlanır ve spermatozoonundan salınan proteazlar ile bu bariyer

aşılır.^[2] Spermatozoon, oosit plazma membranı ile kaynaşır ve spermatozoonundan salınan oosit aktivasyon faktörleri ile oosit aktivasyonu başlatılır.^[3] Başarısızlıkla sonuçlanan fertilizasyon çoğunlukla spermatozoonunun oositi aktive etmesindeki başarısızlıktan kaynaklanır.

Geliş tarihi: 11 Nisan 2016 **Kabul tarihi:** 14 Mayıs 2016

İletişim adresi: Dr. Canan Hürdağ, İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, 34394 Şişli, İstanbul, Türkiye.

Tel: 0212 - 273 26 90 / 151 e-posta: canan.hurdag@istanbulbilim.edu.tr

Spermatozoon fosfolipaz C zeta (PLC ζ), oosit aktivasyon faktörüdür. Fosfolipaz C zeta, başkın olarak spermatozonun ekvatoriyal bölgesinde bulunur ve inositol trifosfat (IP $_3$) yolu ile kalsiyum (Ca $^{+2}$) salınımını sağlayarak oosit aktivasyonu sağlar.^[1] Düşük miktarda PLC ζ proteinine sahip hastalar veya PLC ζ 'nin mutant formunun eksprese edildiği hastalarda spermatozoonun oosit aktivasyonu için gerekli Ca $^{+2}$ salınımını yapamadığı ve fertilizasyonun başarısızlığa uğradığı görülmüştür.^[4] Fare ve insan oositine "wild" tip insan PLC ζ proteini enjeksiyonu, Ca $^{+2}$ salınımını indükler; farede erken embriyo gelişimi ile blastosist aşamasına kadar başarılı bir şekilde gelişimin sürmesini sağlar.^[5]

Yapılan çalışmalarda globozoospermik, düşük fertilizasyon veya tamamen fertilizasyon başarısızlığı gösteren hasta gruplarında PLC ζ proteini ekspresyonunun fertil veya yüksek oranda fertilizasyon gösteren gruplara göre oldukça düşük olduğu gösterilmiştir.^[6]

Yine yapılan çalışmalar, yüksek oranda anormal morfolojiye sahip semen örneklerinde oosit aktivasyonu gerçekleştirme potansiyelinin düştüğü gösterilmiştir.^[7]

Mikroenjeksiyon (ICSI) yöntemi, şiddetli erkek infertilitesi, *in vitro* fertilizasyon (IVF) tedavisini takiben fertilizasyon başarısızlığı ile sonuçlanan olguların tedavisinde devrim yaratan bir tekniktir. Aktivasyon başarı oranı %70'i aşmaktadır; ancak buna rağmen %1-5 ICSI siklusu halen başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Oosite bağlı faktörler (oosit maturasyonunu tamamlaması ve fosfoinositol sinyal yolu bozukluğu) ihmal edildiğinde ICSI başarısızlığının ana nedeni oosit aktivasyon başarısızlığıdır. Fosfolipaz C zeta, oosit aktivasyonu kabiliyeti ve erkek infertilitesinde tanısal bir belirteç olması mümkündür.^[1] Yaptığımız çalışmada normospermi ve astenospermi grupları arasında, PLC'nin hem immünohistokimya hem de immünofloresan düzeyinde belirlenmesi ve gruplar arasında bir karşılaştırma yapılabilmesi, bunun yanı sıra normospermi ve astenospermi gruplarından elde edilen spermatozoa örneklerinin ultrastrüktürel düzeyde incelenmesi amaçlandı.

Fosfolipaz C zeta üzerinde yapılacak ileri düzey çalışmalarla, PLC erkek infertilitesini açıklamada bir belirteç olarak kullanılabilir.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Bu çalışma İstanbul Hamidiye Şişli Etfal ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 08/01/2013 tarih ve 2013/132 numaralı karar ile onaylanmıştır. Hastalar yapılacak işlemler hakkında bilgilendirilmiş ve bilgilendirilmiş yazılı onamları alınmıştır. Çalışma Helsinki Deklarasyonu ilkeleri uyarınca gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada infertilite merkezine başvuran ve yaşları 24-40 arasında değişen hastalardan alınan semen örnekleri normospermi (sayı 20 milyon/mL üzeri, motilite %50 ve üzeri, n=20) ve astenospermi (sayı 20 milyon/mL ve üzeri, motilite %30 ve altı, n=20) olmak üzere iki grupta incelendi.

Spermatozoa konsantrasyonu, motilite ve morfolojisi için standart manuel teknikler uygulandı. Motilite ve konsantrasyon ışık mikroskopunda x20 büyütmede Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre en az 100 sperm sayılarak yapıldı. Makler sayma kamarasına (Makler chamber, Sefi Medikal Instruments Israel) 10 μ L semen koyularak ve x20 büyütme altında 10 kare sayılarak konsantrasyon ve motilite belirlendi. Morfolojik skorlama için lam üzerine yayılarak hazırlanan semen preparatları Spermac boyama yöntemi ile boyandı. Morfoloji, faz kontrast mikroskopta, x100 büyütmede Kruger kriterlerine göre değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal boyama

Viskoz bir yapıda olan semen örnekleri, parafin takibi alınabilmesi için "collection fluid" maddesi ile homojen bir şekilde muamele edildi. Santrifüj işlemi sonrası, dip kısmındaki (semen+collection fluid) pellet, kasetlere (Cytoblock Kit, Thermo Scientific, USA) hapsedildi. Yüzde dördürlük paraformaldehit fiksatifinde bir saat fikse edildikten sonra, yükselen alkol serilerinden geçirildi ve parafine gömme işlemi yapıldı.

Parafin bloklardan 4 μ m kalınlığında alınan kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Kesitler Decloaking chamber (Model DC2008INTL, USA) cihazında (20 dk 110 °C) sitrat tamponu (pH 6.0) (Lab Vision AP-9003-500) içerisinde işleme alındı. Kesitler oda sıcaklığında %0.3'lük hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$)'de 10 dk tutulduktan sonra, distile suyla çalkalandı ve fosfat tamponuna (PBS) (pH 7.2) alındı. Fosfat tamponunda 5 dk bekletildikten sonra bloklama solüsyonunda 5 dk süre ile bekletildi. Ardından kesitler

PLC ζ antikorida (Anti-PLCZ1 rabbit Sigma, R37067, 1: 50). +4 °C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün kesitler PBS'de iki kez yıkandıktan sonra, sekonder antikorda 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Streptavidin'de oda sıcaklığında 15 dk. İnkübasyonun ardından DAB (substrat 1 mL+1 damla kromojen) ile renklendirme işlemi 10 dk süre ile yapıldı. Hematoksilen eozin boyasında 1-2 dk tutuldu. Yükselen alkol serilerinden geçirilip ksilolde 5 dk bekletildi ve sonra entellan ile preparatlar kapatıldı. Spermatozoon hücreleri üzerindeki PLC ζ dağılımı, ışık mikroskobu (Olympus Bx53, Japan) ile incelendi ve X100 büyütmede fotoğrafları çekildi.

İmmünofloresan boyama

Lam üzerinde spermatozoon örnekleri, immünofloresan boyama için tespit edildi. Kesitler 5 dk PBS'de bekletildi ve yıkama solüsyonu damlatılıp 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bloklama solüsyonu damlatılarak 30 dk. inkübe edildi. PLC ζ antikoru (PLZ1 (Alexa Flour 488) rabbit, ABIN911374, 1: 50) ile +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün karanlık bir ortamda 10 dk süre ile ve üç kez PBS ile yıkandı. Ardından DAPI solüsyonu damlatılarak lamel ile kapatıldı. Daha sonra örnekler floresan mikroskobunda (Olympus Bx51, Japonya) incelendi ve görüntülendi.

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) takibi

Spermatozoonlar, tespit işlemi için santrifüj edilerek üstteki sıvı alındı. Santrifüj tüpündeki çökelti üzerine fosfat tamponlu %2.5'lik glutaraldehit ilave edildi ve iki saat bekletildi. Üzerine yıkama işlemi için PBS (0,1M, pH: 7.4) ilave edilerek 2000 rpm'de 5 dk süre ile iki kez santrifüj işlemi edildi.

Post-fiksasyon için spermatozoonlar santrifüj edildi ve üzerine %1'lik osmium tetraoksit ilave edildi ve bir saat bekletildi. Blokları boyamak amacı ile uranil asetat 30 dk. bekletildi. Dehidratasyon işlemi yapıldı. Gömme işlemi için propilen oksit: epon (1:1) karışımında 20 dk. Etüvde 18-20 saat süre ile polimerize edildi. Ultramikrotomda alınan yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyandı. Yarı ince kesitlerde yer tayini yapıldıktan sonra 600-700 Å kalınlığında bakır grid üzerine alındı. Uranil asetat 30-40 dk kurşun sitrat 10-20 dk boyanarak kontrastla-

arak elektron mikroskobunda incelendi (JEOL-JEM 1011).

BULGULAR

İmmünohistokimyasal bulgular

Normospermi grubu bireylerden elde edilen kesitlerde, spermatozoonlarda PLC ζ reaksiyonu, baş kısmının membranı boyunca, akrozom ve post-akrozomal bölgelerde belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 1, 2). Normospermi grubunda yapılan işlemlerin kontrolü için PLC ζ negatif kontrolü uygulandı (Şekil 3).

Astenospermi grubu bireylerinden elde edilen kesitlerde; spermatozoonlarda PLC ζ reaksiyonu baş kısmında membran boyunca, akrozom ve post-akrozomal bölgelerde normospermi gruplarına göre reaksiyonun azaldığı gözlemlendi (Şekil 4, 5). Astenospermi grubunda; PLC ζ immünohistokimyası negatif kontrolüne de bakıldı (Şekil 6).

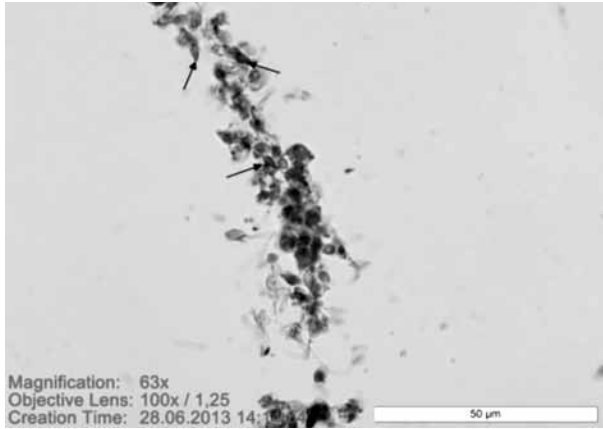
İmmünofloresan bulgular

Normospermi grubu bireylerinden elde edilen görüntülerde; PLC ζ immünofloresan reaksiyonu incelendiğinde, spermatozoa baş kısmı membranı boyunca (Şekil 7), ekvatoriyal bölgesinde (Şekil 8), post-akrozom bölgesinde (Şekil 7, 8, 10) yoğun bir reaksiyon gözlemlendi. Normospermi grubun negatif kontrolü yapıldı (Şekil 9).

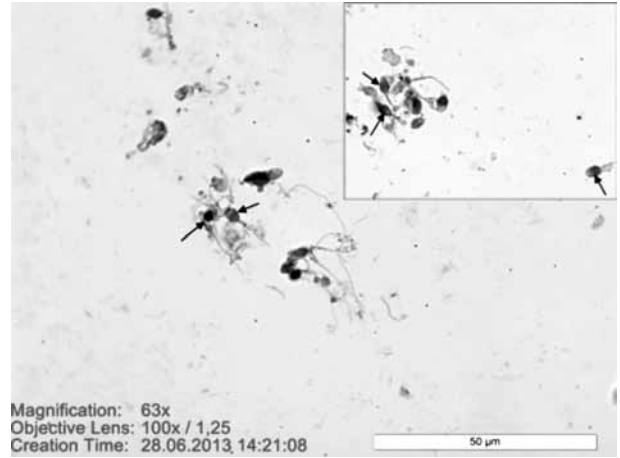
Astenospermi grubu bireylerinden elde edilen görüntülerde; PLC ζ immünofloresan reaksiyonu incelendiğinde, normospermi grubu ile kıyaslandığında spermatozoanın baş kısmı membranı boyunca, ekvatoriyal ve post-akrozom bölgesinde belirgin olarak reaksiyonun azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 10-12).

Geçirimli elektron mikroskobu takibi bulguları

Geçirimli elektron mikroskobu çalışmasında normospermi ve astenospermi grupları incelendi. Normospermi ve astenospermi örnekleri spermatozoonlarda baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımda değerlendirildi. Normospermi grubunda, spermatozoonların baş kısmındaki nükleusun ve plazma membranının korunmuş olduğu görüldü (Şekil 13). Normospermi grubundaki örneklerin kuyruk bölgesindeki mitokondriyum diziliminin düzgün olduğu, 9+2 aksonem ve fibröz örtü yapısının bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi (Şekil 18, 19).



Şekil 1. İmmünohistokimya reaksiyonu değerlendirilmesi. Normospermi grubunda; spermatozoanın post-akrozomal bölgesi ile baş kısmının membranı boyunca PLCζ immün reaksiyonu (→). Bar: 50 μm.



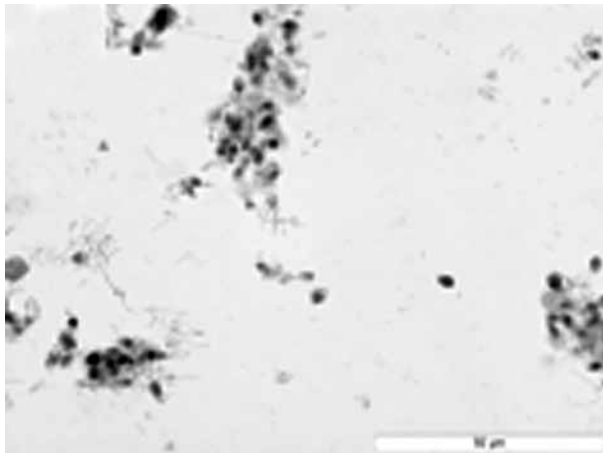
Şekil 2. Normospermi grubunda; spermatozoanın baş kısmı membranı boyunca PLCζ immün reaksiyonu (→). Bar: 50 μm, İnset Bar: 50 μm.

Astenospermi grubundaki spermatozoonların baş kısmının plazma membran yapısının bozulduğu (Şekil 21) vakuollü ve granüllü bir kromatin yapısına sahip olduğu (Şekil 14, 15) görüldü. Bunun yanı sıra bazı örneklerde atılmamış sitoplazmik artığın yer aldığı (Şekil 16, 17) ve elonge (uzamış) başlı spermatozoonların olduğu gözlemlendi (Şekil 16). Bu grup spermatozoonların kuyruk kısmının orta parçasında mitokondrium dağılımının düzensizliği, dağılmış bir fibröz örtüsünün bulunduğu (Şekil 18), motilitede önemli rol oynayan 9+2 aksonem yapısındaki merkezi çiftin yer almadığı ve dağılmış mikrotübüllerin olduğu görüldü (Şekil 18).

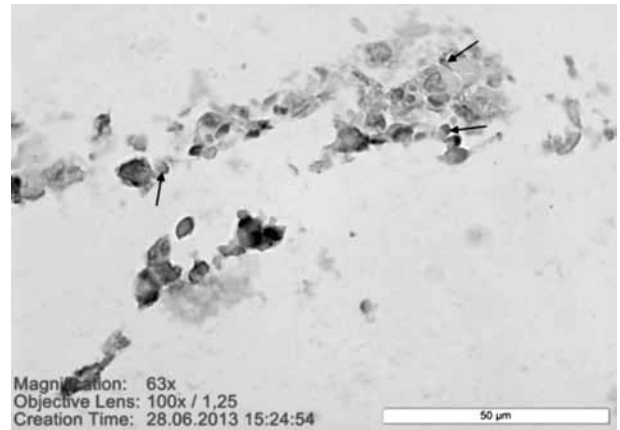
TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, spermde spesifik bir protein olan ve fertilizasyonu takiben oosit aktivasyonundan sorumlu oosit aktivatör faktör olan PLCζ fonksiyonundaki bozuklukların erkek infertilitesinde etkin olduğuna dair bilgiler ileri sürülmüştür.^[8]

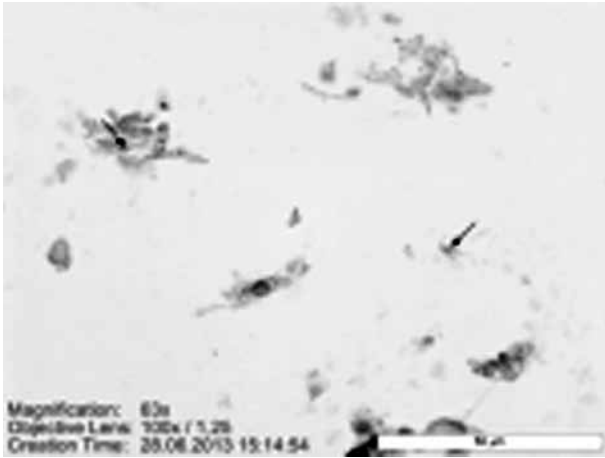
Biz de çalışmamızda bu bilgiler ışığında, potansiyel erkek infertilite biyoişareti olduğu iddia edilen ve spermatogenezis boyunca ekspresyonu olan PLCζ'nin histokimyasal olarak hem normospermik hem de astenospermik bireylerde yerleşimini inceledik. Normospermik bireylerin spermatozoonlarında PLCζ proteininin baş kısmında membran



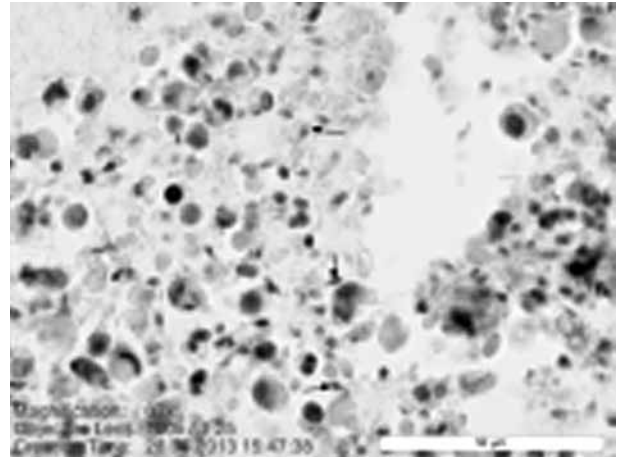
Şekil 3. Normospermi grubunda PLCζ immünohistokimyası negatif kontrolü. Bar: 50 μm.



Şekil 4. Astenospermi grubunda; spermatozoanın baş kısmı membranı boyunca azalmış PLCζ reaksiyonu (→). Bar: 50 μm.



Şekil 5. Astenospermi grubunda; spermatozoanın baş kısmı membranı boyunca azalmış PLCζ reaksiyonu (→). (Bar: 50 µm).



Şekil 6. Astenospermi grubunda; PLCζ negatif kontrolünde immün reaksiyonu göstermemiş spermatozoa (→). (Bar: 50 µm).

boyunca, akrozom ve post-akrozomal bölgelerde belirgin olduğu görüldü. Aynı zamanda immüno- floresan görüntülemelerde de bu proteinin spermatozoonların benzer bölgelerinde dağılım gösterdiği tespit edildi.

Yapılan çalışmalarda PLCζ proteinin akrozomal bölgede yerleşim gösterdiği ortaya konmuştur.^[9]

Diğer çalışmalarda ise fare spermatozoonunda akrozomal ve post-akrozomal bölgelerde iki PLCζ yerleşimi gösterilmiştir.^[10] Biyokimyasal ve klinik kanıtlar başta PLCζ olmak üzere sit-

rat sentaz ve post-akrozomal örtü WW domain bağlayıcı protein (PAWP) gibi proteinlerin memelilerde oosit aktivasyonundan sorumlu baskın spermatozoon faktör adayları olduğunu desteklemektedir.^[11]

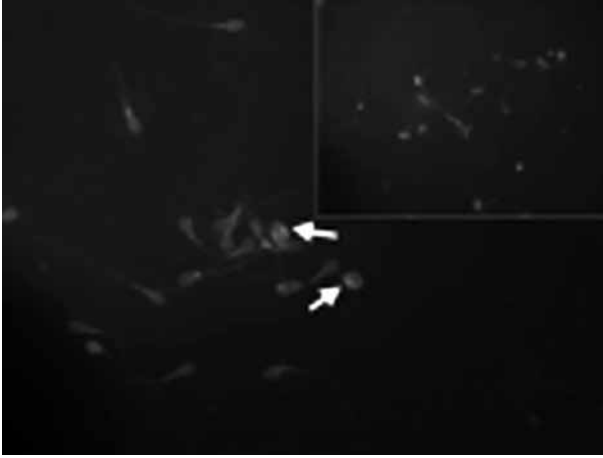
Aarabi ve ark.,^[11] PLCζ'nın sitosolik protein olmadığını bunun yerine fare/boğa spermatozoonlarında post-akrozomal bölge üzerinde yerleşim gösterdiğini ve insan spermatozoonlarında tüm baş boyunca yerleşim gösterdiğini iddia etmişlerdir. Bu bilgi, PLCζ'nın sitosolik spermatozoa proteini olduğu, kemirgen ve insan spermatozoasında akrozomal, ekvatoriyal ve post-akrozomal



Şekil 7. İmmüno floresan reaksiyonu değerlendirilmesi. Normospermi grubunda; spermatozoanın post-akrozom bölgelerinde PLCζ reaksiyonu (beyaz ok ucu). (Büyütme: x100).



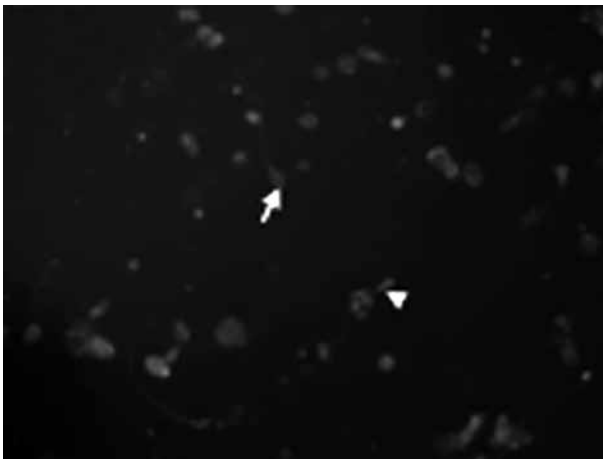
Şekil 8. Normospermi grubunda; PLCζ reaksiyonu, spermatozoanın baş kısmı membranında (beyaz ok) ve post-akrozom bölgesinde (beyaz ok ucu). (Büyütme: x100).



Şekil 9. Normospermi grubunda; spermatozoonların baş kısmı membranında PLCζ reaksiyonu (beyaz ok). (Büyütme: x100, İnsset büyütme: x100).

bölgelerde yerleşim gösterdiğini savunan pek çok diğer çalışma ile çelişmektedir.^[12] Aarabi ve ark.,^[11] çelişkili olarak epididimal hücrelerden salgılandığı yönünde ve fertilizasyonu takiben ooplazma içinde birleşme olmadığını göstermiştir. Bu verilere bu çalışmada örnek sayısının az olması ve antikoron spesifikliği gibi nedenlerden dolayı şüpheli bakılmaktadır.

Fosfolipaz C zeta ile erkek infertilitesi arasındaki ilk klinik ilişki, Yoon ve ark.^[8] tarafından rapor edilmiş, PLCζ proteininin azalmış seviyesi, total eksikliği veya anormal yerleşimi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Tekrarlayan ICSI başarısızlığı



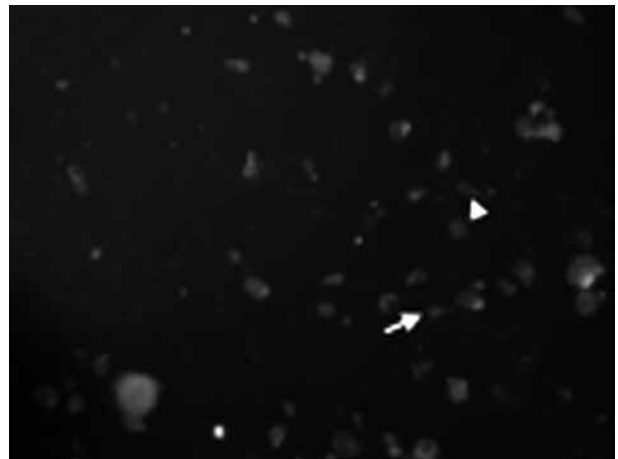
Şekil 11. Astenospermi grubunda; spermatozoonların baş kısmı membranı boyunca (beyaz ok) ve post-akrozom bölgesinde (beyaz ok ucu) azalmış PLCζ reaksiyonu. (Büyütme: x100).



Şekil 10. Astenospermi grubunda; spermatozoonların baş kısmı membranı boyunca (beyaz ok), ekvatoriyal bölgesinde (beyaz yıldız) ve post-akrozom bölgesinde azalmış PLCζ reaksiyonu (beyaz ok ucu). (Büyütme: x100).

olan olgulardan elde edilen spermatozoonlar, fare oositlerin içine enjekte edildiğinde Ca^{+2} salınımını uyaramadığı, fakat rastlantısal olarak PLCζ mRNA enjekte edildiğinde salınımı uyandırdığı gözlenmiştir.^[8]

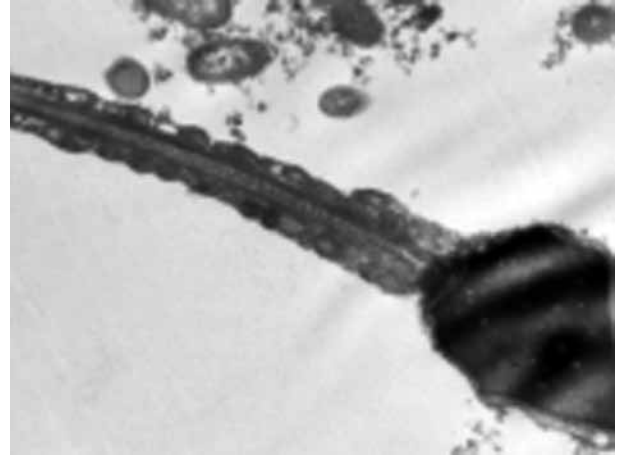
Normospermi grubundan elde ettiğimiz PLCζ verileri yukarıda bahsettiğimiz çalışmalarla paralellik göstermektedir. Bu proteinin infertilite ile olan ilişkisini anlamak amacıyla astenospermi grubu spermatozoonlarında PLCζ'nın dağılımı değerlendirildiğinde, spermatozoonların baş kısmında ve post-akrozom bölgesinde belirgin olarak reaksiyonun azalmış olduğu görüldü.



Şekil 12. Astenospermi grubunda; spermatozoonların baş kısmı membranı boyunca (beyaz ok) ve post-akrozom bölgesinde (beyaz ok ucu) azalmış PLCζ reaksiyonu. (Büyütme: x100).



Şekil 13. Geçirimli (transmisyon) elektron mikroskop bulguları. Normospermi grubunda; plazma membranı ve nükleus bütünlüğü korunmuş normal spermatozoon baş görüntüsü. (Büyütme: x30000).



Şekil 14. Normospermi grubunda; mitokondriyum dizilimi düzgün spermatozoon. (Büyütme: x15000).

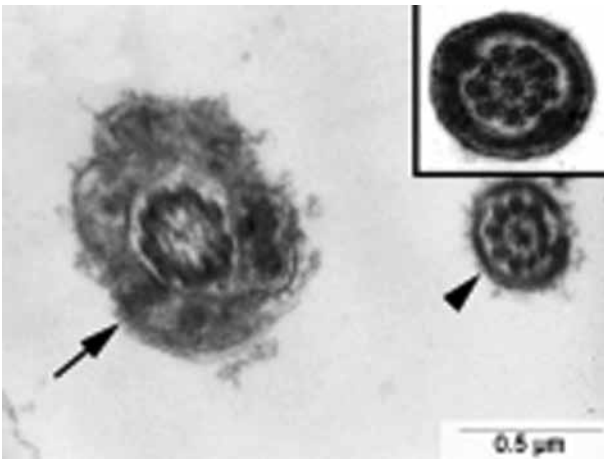
Fosfolipaz C zeta'nın infertilite ile bağlantısı araştırıldığında PLC ζ 'nin önemi anlaşılmıştır. Daha ileri düzeyde çalışmalar yapıldığında, PLC ζ 'nin infertilitede oosit aktivasyonunda önemli rolü olabileceği ile ilgili bilgiler edinilmiştir. Deneysel ve klinik veriler, globozoospermi ve oosit aktivasyon eksikliği (OAD) ile PLC ζ 'nin anormal ekspresyonu, yerleşimi ve protein yapısı arasında bağlantı olduğunu göstermiştir.^[13]

Anormal PLC ζ yerleşime sahip spermatozoonların oositi aktive etmediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, immunoblot analiz sonuçları, globozoospermik örneklerde azalmış miktarda PLC ζ prote-

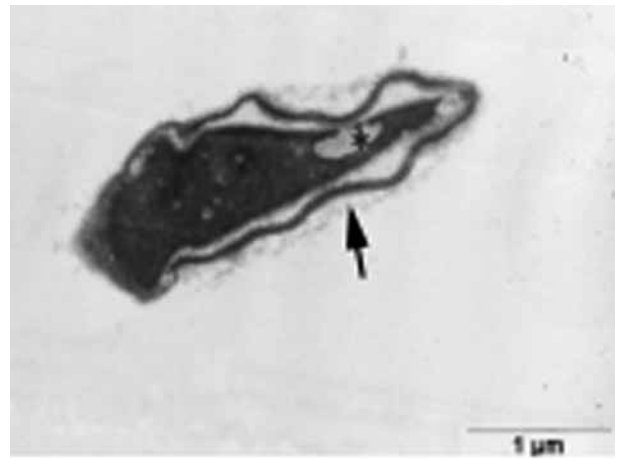
ini olduğunu kanıtlamıştır. Anormal yapıya sahip PLC ζ non-globozoospermik bir hastada tespit edilmiş ve benzer şekilde PLC ζ proteinin azalmış olduğu görülmüştür.^[14]

Heytens ve ark.^[14] tarafından yapılan çalışmada insan globozoospermik spermatozoonun fare oositlerine enjekte edildiğinde uzun devre Ca²⁺ salınımının oluşmadığı görülmüştür. İmmünohistokimyasal kanıtlar, globozoospermik spermatozoonlarda anormal PLC ζ yerleşimi ile birlikte immün reaksiyonun düşük seviyede bulunduğunu ortaya koymuştur.

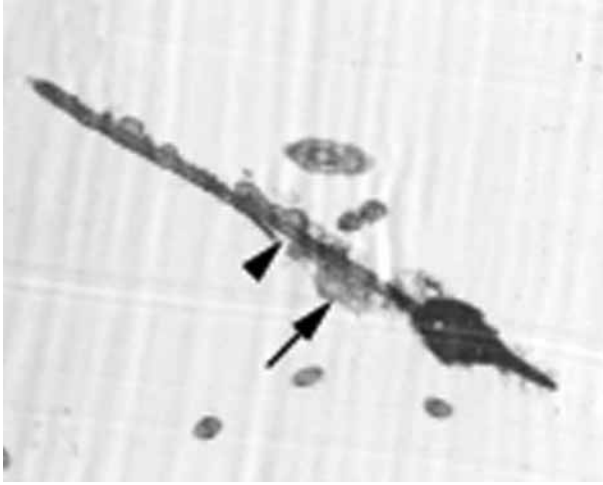
İnfertil erkeklerde, yetersiz spermatozoonun yanında, PLC ζ 'nin defektif ekspresyonu ve üç



Şekil 15. Normospermi grubunda; flagellanın esas parçasında normal fibröz örtü ve düzgün aksonem yapısı (→), flagellada düzgün aksonem yapısı (►). (Büyütme: x60000, İnsset büyütme: x75000).



Şekil 16. Astenospermi grubunda; spermatozoon başı kromatinde şiddetli vakuoler bozukluk (*), granüler kromatin, normalden farklı plazma membranı görüntüsü (→). (Büyütme: x30000).

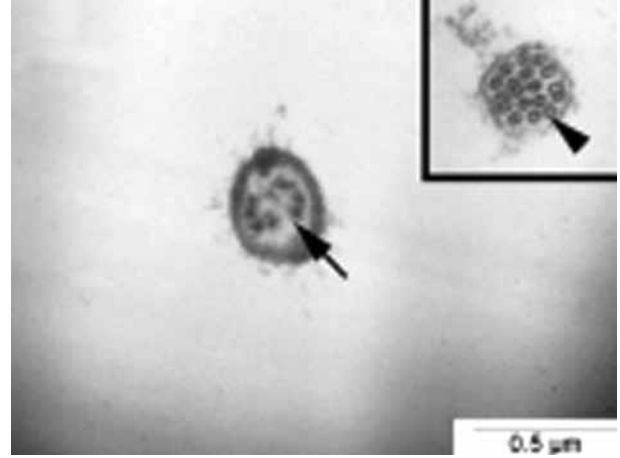


Şekil 17. Astenospermi grubunda; bütün bir spermatozonda dağılmış fibröz örtü (→) ve orta parçada mitokondriyon eksikliği (▴). (Büyütme: x10000).

boyutlu yapısındaki bozukluklara ve buna bağlı olarak PLC ζ gen mutasyonuna sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan alınan veriler, fertil erkekteki spermatozoonlarda PLC ζ 'nin dominant olarak ekvatoriyal ve post-akrozomal bölgelerde bulunduğu tespit edilmiştir.^[14]

Fosfolipaz C zeta'nın sperm kapasitasyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, kapasitasyonu tamamlamamış insan spermatozoonunda PLC ζ , dominant olarak ekvatoriyal bölgede yerleşim göstermiştir. Bu bölgedeki yerleşimin, kapasitasyonu izleyen süreçte korunduğu görülmüş ve iyonofor tedavisi olmuş kısaca akrozom reaksiyonu geçirmiş spermatozoa örneklerinde baskın PLC ζ yerleşimi ekvatoriyal bölgede bulunmuştur. Bazı olgularda PLC ζ 'ya, spermatozoon başında ve özellikle akrozomal ve post-akrozomal bölgelerde rastlanmıştır. Kapasitasyonu gerçekleşmemiş spermatozoonların %88'inde PLC ζ immünofloresan reaksiyonu ekvatoriyal bölgede, %35.3 akrozom bölgesinde, %21.9 post-akrozom bölgesinde ve %11.6 yalnızca post-akrozom bölgesinde olduğu gösterilmiştir. Kapasitasyondan sonra, spermatozoonun ekvatoriyal bölgesinde PLC ζ yerleşimi aynı kalmıştır. Post-akrozomal bölgesinde PLC ζ dağılımı, hasarın artmış olduğu, akrozomal PLC ζ gösteren hücre yüzdesinde de önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir.^[9]

İmmotil silya sendromu gösteren hastalarda çocukluk çağından itibaren kronik solunum hastalığı geçmişi vardır ve infertilite nedeni sperm



Şekil 18. Astenospermi grubunda; spermatozoon flagellasında bozulmuş 9+2 aksonem yapısı (→) ve dağılmış mikrotübüller (▴). (Büyütme: x60000, İnsset büyütme: x100000).

imotilitesidir. Solunum sistemi bronşiyal sil-yalar ve spermatozoon flagellası aksoneminde dynein kollarda eksiklik başlıca immotiliteden sorumludur. Daha sonraki yayınlarda immotil silya sendromuna neden olan pek çok aksonemal anomali tanımlanmıştır. Şiddetli astenozoospermi veya spermatozoon immotilitesi içeren beş hasta incelendiğinde, bu hastalardan üçü şiddetli solunum hastalığı, bir diğesinde de albinizm görülmüştür. Diğer bir hastada da Kartagener sendromu görülmüştür. Ultrastrüktürel çalışmalar dört hastada dynein kollarda eksiklik açığa çıkarmıştır. Beşinci hastada merkezi mikrotübül çiftinde eksiklik saptanmıştır.^[15]

Spermatozoada ultrastrüktürel çalışmalar astenozoospermide pek çok çeşitli flagellar değişim ile fertilizasyon potansiyellerini tanısal ve belirteç (prognostik) olarak değerlendirme imkanı sağlar.^[15] Bu doğrultuda biz de ultrastrüktürel düzeyde PLC ζ reaksiyonu azalmış astenospermik bireylerin spermatozoonlarını incelediğimizde, infertilitede motilitenin en belirgin özelliği olan kuyruk yapısında 9+2 aksonem yapısının bozulduğunu gözlemledik. Buna ek olarak, baş kısmında vakuolizasyon, elonge başlı spermatozoonlar, membran yapısının bütünlüğünde bozulma şeklinde bulgulara rastladık. Ayrıca boyun kısmında sitoplazmik artıklar ve yine motilitede etkili olan mitokondri dağılımının düzensizliğini gözlemledik. Elde ettiğimiz bu bulgular, PLC ζ bulguları ile karşılaştırdığımızda astenospermik

örneklerde PLC ζ reaksiyonlarının yapısal olarak farklılıkların görüldüğü baş ve boyun bölgelerinde azalmış olması, sperm fonksiyonunda özellikle oosit aktivasyonunda bu proteinin önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmanın, oosit aktivasyon sürecini araştırmada, ART (Assisted Reproductive Technologies) protokollerinin başarısını artırmada önemli potansiyele sahip olabileceğini ve erkek infertilitesi için yeni tanısal testlerin geliştirebilmesine ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, PLC ζ molekülünün motilite eksikliğine bağlı olarak infertilite gösteren bireylerde, fertilizasyon sırasında oosit aktivasyonunda rolünün olabileceğini ileri sürmekteyiz.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kashir J, Heindryckx B, Jones C, De Sutter P, Parrington J, Coward K. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum Reprod Updat* 2010;16:690-703.
2. Saling PM. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf Rev Reprod Biol* 1989;11:339-88.
3. Dozortsev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M. Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10:3012-7.
4. Kashir J, Konstantinidis M, Jones C, Lemmon B, Lee HC, Hamer R, et al. A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility. *Hum Reprod* 2012;27:222-31.
5. Ito J, Parrington J, Fissore RA. PLC ζ and its role as a trigger of development in vertebrates. *Mol Reprod Dev* 2011;78:846-53.
6. Aghajanjpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalae M, Moshtaghian J, et al. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. *Hum Reprod* 2011;26:2950-6.
7. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Javdan Z, Tavalae M. Artificial oocyte activation in severe teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008;90:2231-7.
8. Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, Lee HC, Yoo MS, Coward K, et al. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 2008;118:3671-81.
9. Grasa P, Coward K, Young C, Parrington J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase Czeta, in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Hum Reprod* 2008;23:2513-22.
10. Young C, Grasa P, Coward K, Davis LC, Parrington J. Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertil Steril* 2009;91:2230-42.
11. Aarabi M, Yu Y, Xu W, Tse MY, Pang SC, Yi YJ, et al. The testicular and epididymal expression profile of PLC ζ in mouse and human does not support its role as a sperm-borne oocyte activating factor. *PLoS One* 2012;7:33496.
12. Kashir J, Deguchi R, Jones C, Coward K, Stricker SA. Comparative biology of sperm factors and fertilization-induced calcium signals across the animal kingdom. *Mol Reprod Dev* 2013;80:787-815.
13. Amdani SN, Jones C, Coward K. Phospholipase C zeta (PLC ζ): oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Adv Biol Regul* 2013;53:292-308.
14. Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon SY, et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 2009;24:2417-28.
15. Chemes HE. Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men. *J Androl* 2000;21:799-808.