

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DÜŞÜK FERTİLİZASYONA NEDEN OLAN SPERM
ÖRNEKLERİNDE FOSFOLİPAZ C ZETA'NIN
İMMUNFLORESAN GÖSTERİMİ VE PLC ζ GEN
MUTASYONLARININ TAYİNİ**

Biyolog Ayşegül İLKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2014

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DÜŞÜK FERTİLİZASYONA NEDEN OLAN SPERM
ÖRNEKLERİNDE FOSFOLİPAZ C ZETA'NIN
İMMUNFLORESAN GÖSTERİMİ VE PLC ζ GEN
MUTASYONLARININ TAYİNİ**

Biyolog Ayşegül İLKAN

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Evrim ÜNSAL**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2014

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Ayşegül İLKAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEM	4
4.1.1. Testis Histolojisi	5
4.1.1.1. Seminifer Tubüller.....	6
4.1.1.2. Spermatogenez.....	7
4.1.1.2.1. Spermatogoniyal Evre	8
4.1.1.2.2. Mayoz Bölünme Evresi	9
4.1.1.2.3. Spermiyogenez Evresi	11
4.1.2. Semen.....	13
4.1.2.1. Sperm Hücresinin Yapısı.....	13
4.1.2.2. Semen Analizinde Sperm Hücrelerinin Mikroskopik İncelenmesi	15
4.2. FERTİLİZASYON	17
4.2.1. Fertilizasyon Sürecinde Sperm Hücrelerinin Kazandığı Özellikler.....	18
4.2.2. Oositte Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler Ve Oosit Aktivasyonu	20
4.2.3. Fertilizasyon Anomalileri	22
4.3. FOSFOLİPAZ C ZETA (PLCÇ).....	24
4.3.1. PLCÇ Gen Mutasyonları	28

4.4. ERKEK İNFERTİLİTESİ VE PLCÇ İLE İLİŞKİSİ.....	29
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
5.1. HASTA GRUPLARI.....	31
5.2. SEMEN TOPLANMASI.....	31
5.3. SPERM HÜCRELERİNİ BOYAMA VE MORFOLOJİ İNCELEME.....	32
5.4. KANDAN DNA İZOLASYONU.....	32
5.5. PLCÇ GENİNE AİT EKZONLARA ÖZGÜ PRİMER TASARIMI.....	33
5.6. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR).....	35
5.7. PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE ANALİZİ.....	35
5.8. PCR ÜRÜNLERİNİN PURİFİKASYONU.....	36
5.9. SEKANS PCR (BigDye) PROTOKOLÜ.....	36
5.10. SODYUM ASETAT PURİFİKASYONU.....	36
5.11. İMMUNFLORESAN TAKİBİ.....	37
6. BULGULAR.....	38
6.1. PCR VE SEKANS ANALİZİ BULGULARI.....	38
6.1.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Analizi Bulguları.....	38
6.1.2. Sekans Analizi Bulguları.....	38
6.1.2.1. PLCÇ Geninin 15 Ekzonunun Sekans Analizi Bulguları.....	38
6.1.2.2. PLCÇ Genindeki Polimorfizm Tarama Görüntüleri.....	50
6.2. İMMUNFLORESAN TAKİBİ BULGULARI.....	73
6.2.1. Normospermi Grubunun İmmunfloresan Bulguları.....	73
6.2.2. Düşük Fertilizasyona Neden Olan Sperm Gruplarının İmmunfloresan Bulguları.....	76

7. TARTIŞMA.....	85
8. SONUÇ.....	91
9. TEŞEKKÜR.....	92
10. KAYNAKLAR.....	93



SİMGE VE KISALTMALAR

ADAM	Bir Disintegrin ve Bir Metalloproteinaz
AMH	Anti-Mülleryen Hormon
BSA	Bovin Serum Albumin
Ca⁺²	Kalsiyum
CD9	Farklılaşma Kümesi 9 (Cluster of Differentiation 9)
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DAG	Diaçilgliserol
DAPI	4, 6 - Diamidino - 2 - Fenilindol
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EF	Uzama Faktörü
EtBr	Etidyum Bromür
EtOH	Etanol
H - E	Hematoksilen - Eozin
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IP₃	İnositol 1, 4, 5 Trifosfat
IP₃Rs	İnositol 1, 4, 5 Trifosfat Reseptörü
IVF	<i>in vitro</i> Fertilizasyon
kDa	Kilodalton
M	Molar
MgCl	Magnezyum Klorür
MIF	Mülleryen İnhibe Edici Faktör
MII	Metafaz II
ml	Mililitre
mRNA	Haberci RNA
µg	Mikro Gram
µl	Mikro Litre
µm	Mikro Metre

μM	Mikro Molar
NaOAc	Sodyum Asetat
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri
OAD	Oosit Aktivasyon Bozukluğu
OAF	Oosit Aktivasyon Faktörü
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PH	Plekstrin Homoloji
PIP₂	Fosfatidilinositol 4, 5 Bifosfat
PKC	Protein Kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
PLCβ	Fosfolipaz C Beta
PLCγ	Fosfolipaz C Gama
PLCδ	Fosfolipaz C Delta
PLCϵ	Fosfolipaz C Epsilon
PLCζ	Fosfolipaz C Zeta
PLCη	Fosfolipaz C Eta
pmol	Pikomol
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
rs	Referans SNP, Referans Tek Nükleotit Polimorfizmi
SH	Src Homoloji
TBE	Tris Borik Asit-EDTA
TBS	Tris Tampon Solüsyonu
TFF	Total Fertilizasyon Başarısızlığı
Trt X	Triton X
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
YÜT	Yardımla Üreme Teknikleri
ZP	Zona Pellusida

T.C Sağlık Bakanlığı, Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu, İstanbul İli Beyoğlu Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği, ŐiŐli Etfal Eğitim ve AraŐtırma Hastanesi, Klinik AraŐtırmalar Etik Kurulu tarafından 08/01/2013 tarih ve 2013/134 numaralı karar ile onaylanmıŐtır.

AraŐtırma Projesi No: HE/1132012



1. ÖZET

Erkek infertilitesi ve sebebi bilinmeyen infertilite, infertilite olguları arasında en sık görülenleridir.

Mikroenjeksiyon yöntemi ile erkek infertilitesinin çözümünde çok önemli bir yol katedilmiş olsa da mikroenjeksiyon sonrası görülen fertilizasyon problemleri üzerinde hala yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyonun olmayışı büyük ölçüde sperm hücresinin oosit aktivasyonunu sağlayamamasına bağlanmaktadır. Fosfolipaz C Zeta (PLC ζ); ayırt edici özellikleriyle sperm hücresi kaynaklı bir fosfolipaz olan çözümler 'sperm hücresi faktörü'dür ve oosit aktivasyonunu sağlayan en önemli faktörlerdendir.

Fertilizasyon esnasında; sperm hücresi, oosit aktivasyonu için gerekli olan sürekli ve tekrarlayan intrasellüler serbest kalsiyum (Ca⁺²) salınımını tetikler. Sperm hücresi ekstraktlarındaki Fosfolipaz C Zeta eksikliği ise kalsiyum salınım yeteneğini inhibe eder. Oosit aktivasyon bozuklukları (OAD), Fosfolipaz C Zeta'nın anormal ekspresyonu, lokalizasyonu ve protein yapısına bağlanmıştır.

Çalışmamızda; düşük fertilizasyona neden olan sperm örneklerini (globozoospermik, total fertilizasyon başarısızlığı (TFF), nükleer anomali, total immotil) normospermik örneklerle karşılaştırarak, Fosfolipaz C Zeta molekülünün lokalizasyonunu immunfloresan yöntemiyle belirlemeyi ve bu olgularda deoksiribonükleik asit (DNA) dizi analizi yöntemiyle bilinen mutasyonların Fosfolipaz C Zeta'nın 15 ekzonunda taranmasını ve yeni mutasyon ve polimorfizmlerin belirlenmesini amaçladık.

Bu çalışma sonucunda düşük fertilizasyon gösteren sperm örneklerinde Fosfolipaz C Zeta lokalizasyonu normospermi grubuna göre baş ve post-akrozomal bölgelerde azaldığı ya da hiç olmadığı belirlendi. DNA dizi analizi ile düşük fertilizasyona neden olan sperm örneklerinde pek çok değişim saptandı. Literatürde hiç yer almamış ve protein farklılaşmasına neden olan bazı değişikliklerin yanı sıra stop kodonuna dönüşen bir nükleotid değişimi de saptandı.

Sonuç olarak, Fosfolipaz C Zeta molekülünün düşük fertilizasyon gösteren bireylerdeki fertilizasyonda oosit aktivasyonunda etkili rolünün olduğu ortaya koyulmaktadır.

2. SUMMARY

Immunofluorescence Determination and Mutation Analysis of Phospholipase C Zeta In The Sperm Specimen Give Rise to Low Fertilization

Male and unexplained infertility are the frequent cases among the infertile patients. Although the solution of male infertility have been solved by microinjection, extensive studies about fertility problems after microinjection are still performing. Fertilization failure after microinjection is highly related with sperm cells which unable to provide oocyte activation. Phospholipase C Zeta (PLC ζ) is a soluble sperm factor with its unique features and one of the most important oocyte activating factor.

Upon fertilization, the sperm triggers repetitive and persistent changes in the intracellular concentration of free calcium, also referred to as oscillations, that are required for egg activation. PLC ζ deficiency in the sperm extracts inhibits the ability of calcium oscillation. Oocyte activation deficiencies was interested with abnormal protein structure, expression, and localization of the PLC ζ .

In our study we aimed the determination of immunofluorescence PLC ζ in the sperm specimens that give rise to low fertility rate (globozoospermia, total fertilization failure, nuclear anomaly, total immotile) by comparing with normospermic specimens and determination of the novel mutations and polymorphisms and also screening of the known mutations at 15 exons via DNA sequencing.

As a result of this study, the localization of PLC ζ in the sperm specimens that give rise to low fertility rate compared with normospermic specimens was determined decrease or absence in the head and post-acrosomal region. Many variations were detected in sperm specimens that give rise to fertility with the analysis of deoxyribonucleic acid (DNA) sequencing. As well as some variations which didn't never take place in literature, and caused protein differentiation, a nucleotide variation, which turned into the stop codon, was determined.

In conclusion, it was proved that PLC ζ has a significant role of oocyte activation in whom has shown low fertility individuals.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya üzerinde her 7 çiftten birinin infertilite sorunu çektiği bilinmektedir (1). Mikroenjeksiyon tedavisi bu olguların %35-40'ına çözüm getirmektedir. Ancak mikroenjeksiyon sikluslarının total ya da kısmi fertilizasyon başarısızlığı oranı da %1-5 olarak rapor edilmektedir (2).

Çiftlerde, infertilitenin %35-40'ı erkek faktörü kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (3, 4, 5). Erkek faktörlü infertilite çeşitli sebeplerle ortaya çıkmakla birlikte büyük ölçüde genetik nedenlere bağlı olduğu kabul edilmektedir (1, 5, 6, 7, 8).

Erkek infertilitesi durumlarının en bilineni mikroenjeksiyon işlemi sonrasında oosit aktivasyon bozukluklarıdır (9, 10). Oosit aktivasyonu; kortikal granül ekzositozu, polispermimin önlenmesi ve oositin mayotik duraksamadan kurtulmasını içeren fertilizasyon olayının en temel basamağıdır (11). İnsanlarda 12 numaralı kromozomda bulunan sperm-spesifik faktör PLC ζ oosit aktivasyonunu sağlayan Ca⁺² salınımını sağlamaktadır (12). PLC ζ 'nin oosit aktivasyonunu indüklediği 2002 yılında yayınlanan bir çalışmada gösterilmiştir (13). Oosit aktivasyonunun olmadığı bazı erkek faktörü infertiliterinde, PLC ζ anormal ekspresyon ya da fonksiyon bozukluğu gösterebilmektedir (14, 15). PLC ζ ile ilgili çalışmalar daha çok ekspresyon düzeyinde olup mutasyon taraması yapan çok az çalışma bulunmaktadır. İnsan genom veritabanında PLC ζ 'nin mutasyonlarına baktığımızda henüz "public" versiyonuna giriş yapılmamış olup bu alanda çok az çalışma bulunmaktadır. Düşük fertilizasyonun görüldüğü ya da hiç fertilizasyonun görülmediği olgularda (globozoospermik, TFF, nükleer anomali, total immotil) yapılacak mutasyon taraması anlamlıdır.

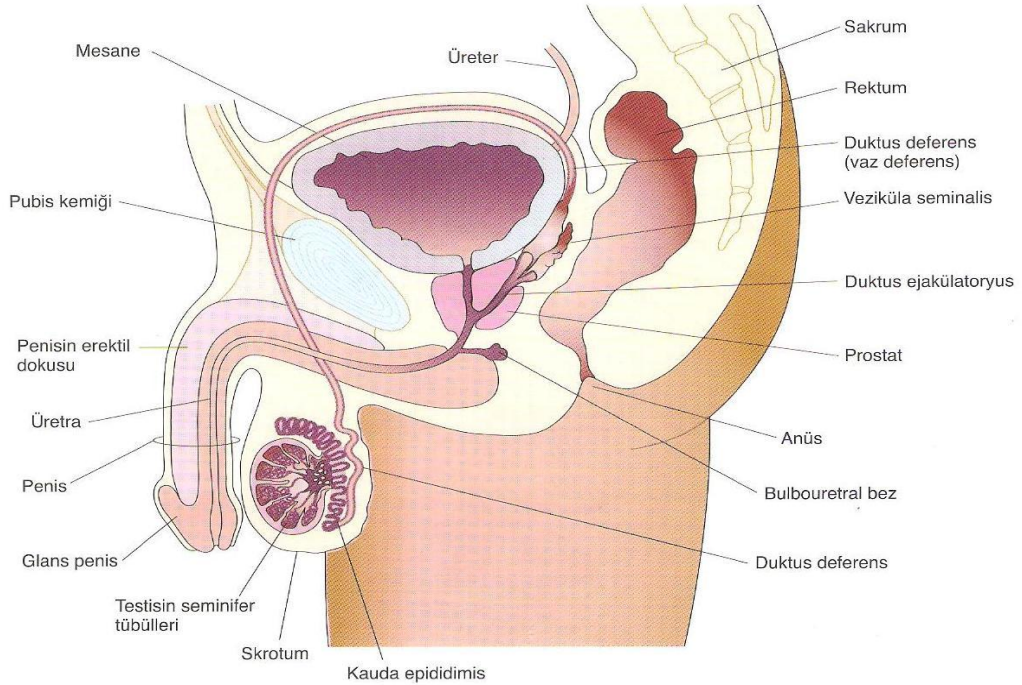
Yapmış olduğumuz bu çalışmada; sperm-spesifik faktör olan PLC ζ 'nin fertilizasyon üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla düşük fertilizasyon gösteren erkeklerde daha önceden belirlenmiş olan H398P ve H233L mutasyonlarına baktık ve PLC ζ geninin sekans analizini yaparak mutasyon ve polimorfizm taramasını gerçekleştirdik. Ayrıca bu olguların değerlendirilmesinde faydalı olması açısından, bu olguların sperm hücrelerinde PLC ζ 'nin immunfloresan olarak gösterimini gerçekleştirip, normospermik örneklerle kıyaslama yapabilmeyi amaç edindik.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi; haploid erkek gametin (sperm hücresi) devamlı üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanması ile erkek seks hormonlarının sentezi ve sekresyonundan sorumludur. Erkek üreme sistemi;

- ❖ Sperm hücresi üreten ve sentezleyen ve androjenleri salgılayan testisler
- ❖ Dışarıya sperm hücrelerinin taşınmasından sorumlu olan dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, vaz deferens, ejakülatuar kanal ve erkek üretrasının bir parçası,
- ❖ Salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle sperm hücrelerine besinler sağlayan aksesuar bezler; seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretal bezler,
- ❖ Erektile dokudan oluşan çiftleşme organı penis olmak üzere 4 birimden oluşur (Şekil 1) (16).



Şekil 1. Erkek genital sisteminin bileşenleri (17).

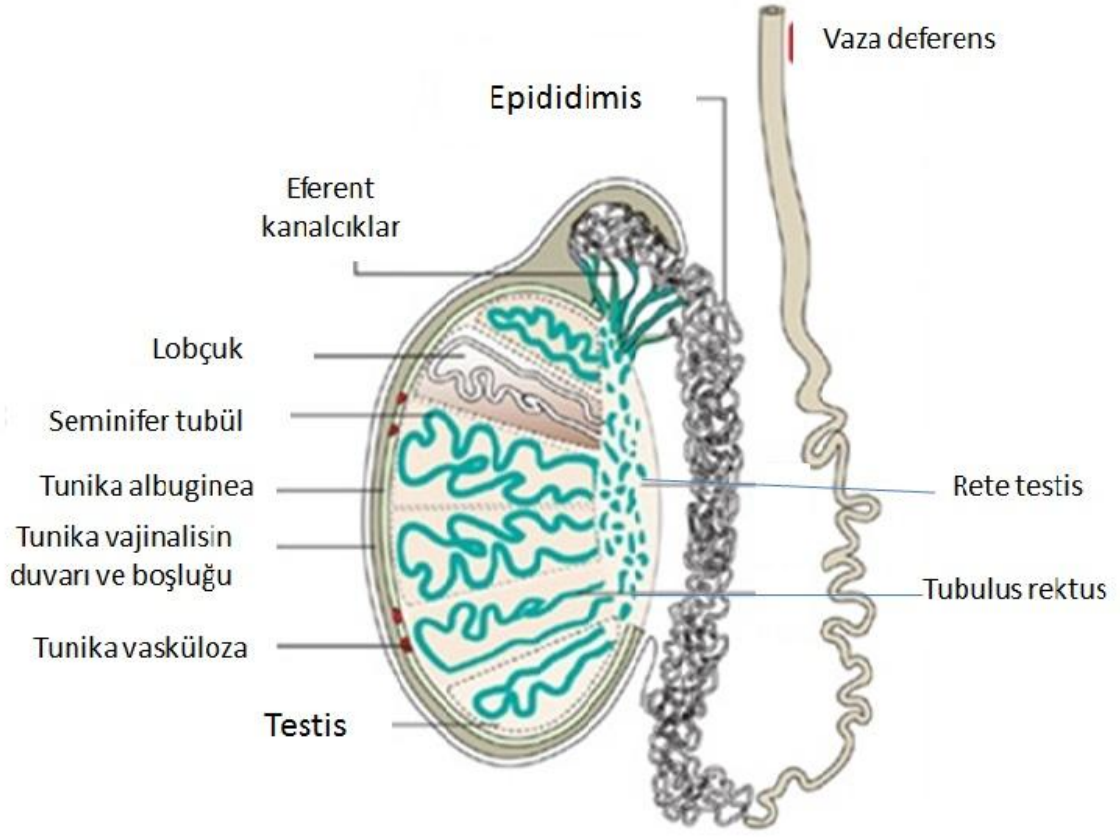
4.1.1. Testis Histolojisi

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum içinde yer alan çift organlardır. Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2-3°C düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34°C ila 35°C gereklidir (17).

Testisler, tunika albuginea adlı sıkı bağ dokusundan oluşan bir kapsülle çevrilidir. Tunika albuginea, arka yüzde kalınlaşarak mediastinum testis denilen, testis kan damarı ve sinirlerin giriş ve çıkış bölgesini oluşturur. Mediastinumdan testiküler kitleye doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250 ila 300 lopçuğa böler. Her bir lopçuk 1-4 seminifer tubül içerir. Sperm hücreleri seminifer tubüller içerisinde üretilirler. Tubüller arasında yer alan bağ dokusu içerisinde kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) yer alır. Bu hücreler de testiküler androjenleri salgılar (16).

Testisler, embriyolojik gelişim sırasında karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler ve fetüs gelişimi sırasında göç edip, skrotum içinde spermatik kordların ucunda asılı olarak bulunurlar. Skrotum içine doğru gerçekleştirdikleri göç sebebiyle her bir testis kendisiyle birlikte peritonu, tunika vaginalis denilen seröz bir zar şeklinde sürükler. Tunika vaginalis ise tunika albugineayı ön ve yan kısımlarından örter (Şekil 2) (18).

Testisler, ekzokrin ve endokrin fonksiyonu olan, bileşik tubüler yapıda bir çift bezdir. Ekzokrin salgısı, canlı sperm hücreleridir. Salgılama biçimi aktif holokrindir. Endokrin salgısı, Leydig hücreleri tarafından yapılan testosteron hormonu, intrauterin hayatta Sertoli hücreleri tarafından salgılanan anti-Mülleryen hormon (AMH=MIF) ve yine Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibindir (19).



Şekil 2. Testis ve testis kanalları (20).

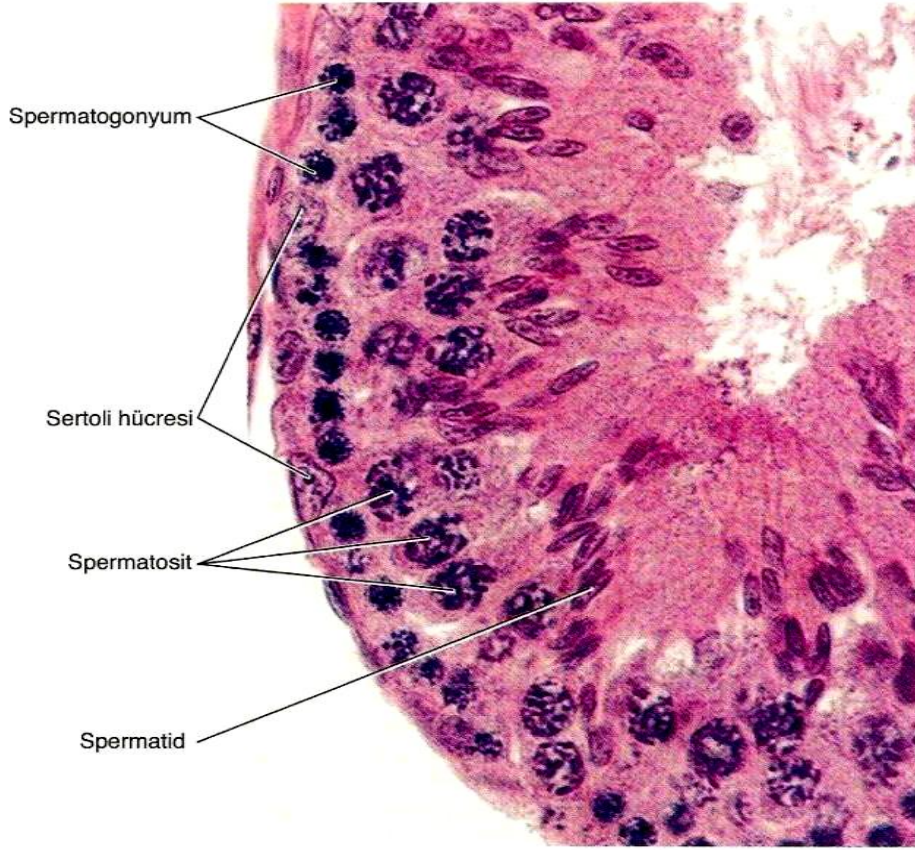
4.1.1.1. Seminifer Tubüller

Her bir seminifer tubül yaklaşık olarak 150 μm çapta ve 80 cm uzunluktadır. İki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir (16).

Seminifer tubüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve germinal ya da seminifer epitelden oluşur (18). Seminifer epitel bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrilidir (16).

Seminifer epitelde bazal lamina üzerine oturan iki grup hücre vardır:

1. Spermatogenik hücreler
2. Sertoli hücreleri (Şekil 3) (16, 18).



Şekil 3. Seminifer tubül epitelinin hücreleri. H-E boyası (18).

4.1.1.2. Spermatogenez

Spermatogenezis; erkek germ hücrelerinin oluşmasını, sayılarının artmasını ve olgun sperm hücrelerine dönüşmesini sağlayan bir süreçtir. Bu süreç, tek sıra Sertoli hücreleri ve spermatogenik seriye ait hücrelerle çevrili, uzun, tubüler bir yapı olan seminifer tubüllerde gerçekleşir.

Spermatogenezis sürecinde, nispeten farklılaşmamış spermatogoniyalar oldukça özelleşmiş testiküler sperm hücrelerine evrimleşirler. Seminifer epitelde bir çok hücre jenerasyonunu aynı anda görmek olasıdır. Bu nedenle farklılaşmaya başlamış spermatogoniyalardan en genç hücreler tubülün periferinde bulunurken, spermatozoidlerin oluşturduğu en yaşlı jenerasyon lümeninde yer alır. Spermatogenezis sırasında hücresel olgunlaşma evrelerinin sayısı ve sınırları türden türe değişir ve ardışık gelişme

özelliğindeki tüm safhalar birlikte değerlendirildiğinde, seminifer epitel siklusunu oluşturur.

Spermatogenezis süreci üç bölüme ayrılır.

1) Spermatogoniyal evre

- Farklılaşmamış spermatogoniya yenilenmesi ve üretim
- Spermatogoniya farklılaşması

2) Mayoz bölünme evresi

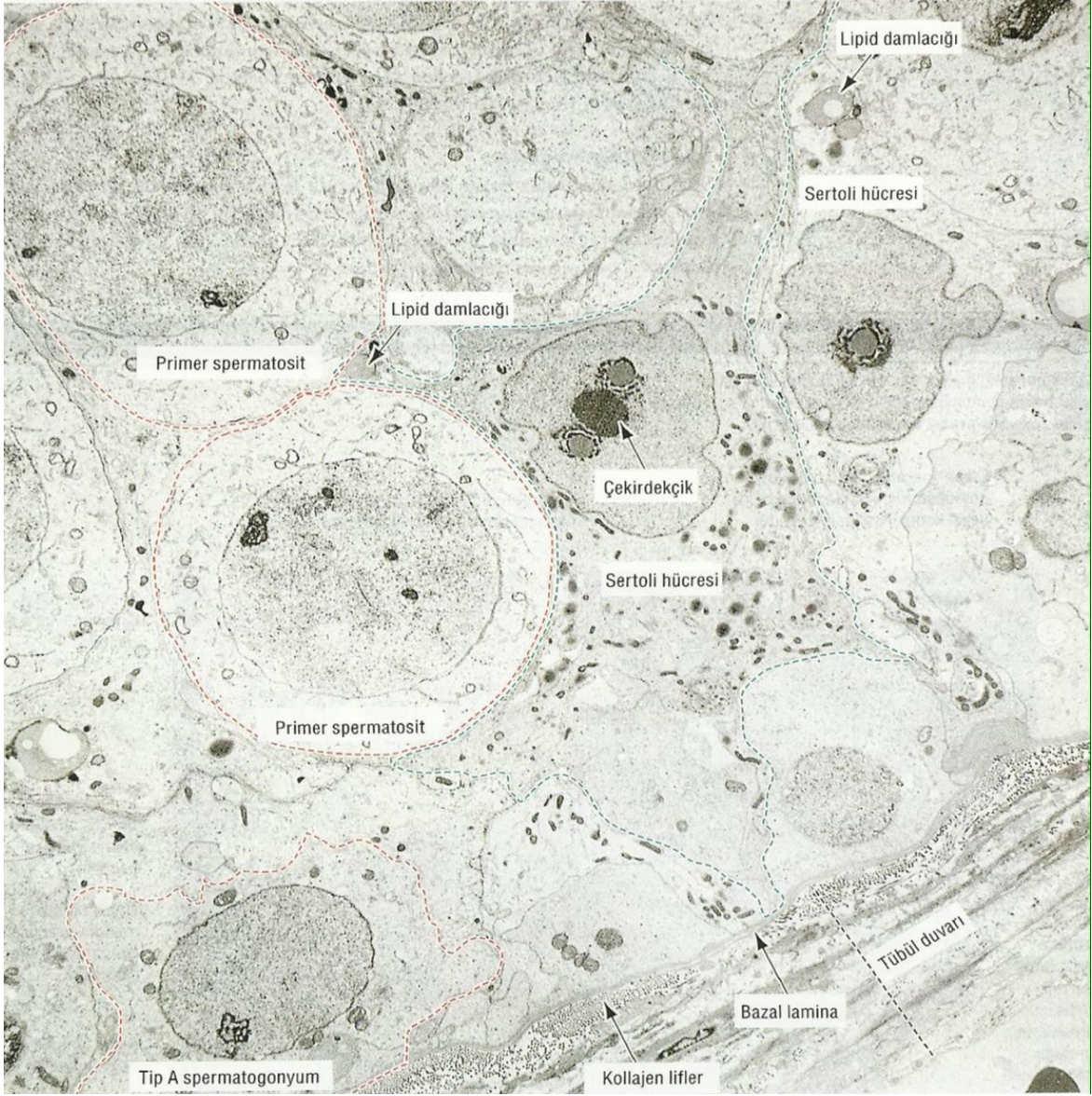
3) Spermiyogenezis evresi (21)

4.1.1.2.1. Spermatogoniyal Evre

Spermatogonyumlar bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasında tıkaçıcı bağlantıların altında yer alırlar. Bu nedenle de kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar.

Spermatogonyumlar spermatogoniyal kök hücrelerden köken alırlar ve pubertede başlayan başarılı mitotik hücre bölünmeleri geçirirler (16).

İnsan testisinde tanımlanan hücre tipleri: A koyu ve A açık spermatogonyumlar ile B spermatogonyumlarıdır (Şekil 4). Tüm A tipi spermatogonyumlar kök hücre işlevine sahiptir ve sürmekte olan mitoz döngüleri boyunca farklılaşarak B tipi spermatogonyumları da oluştururlar. B tipi spermatogonyumlar farklılaşarak primer spermatositleri oluşturan öncül hücrelerdir (18).



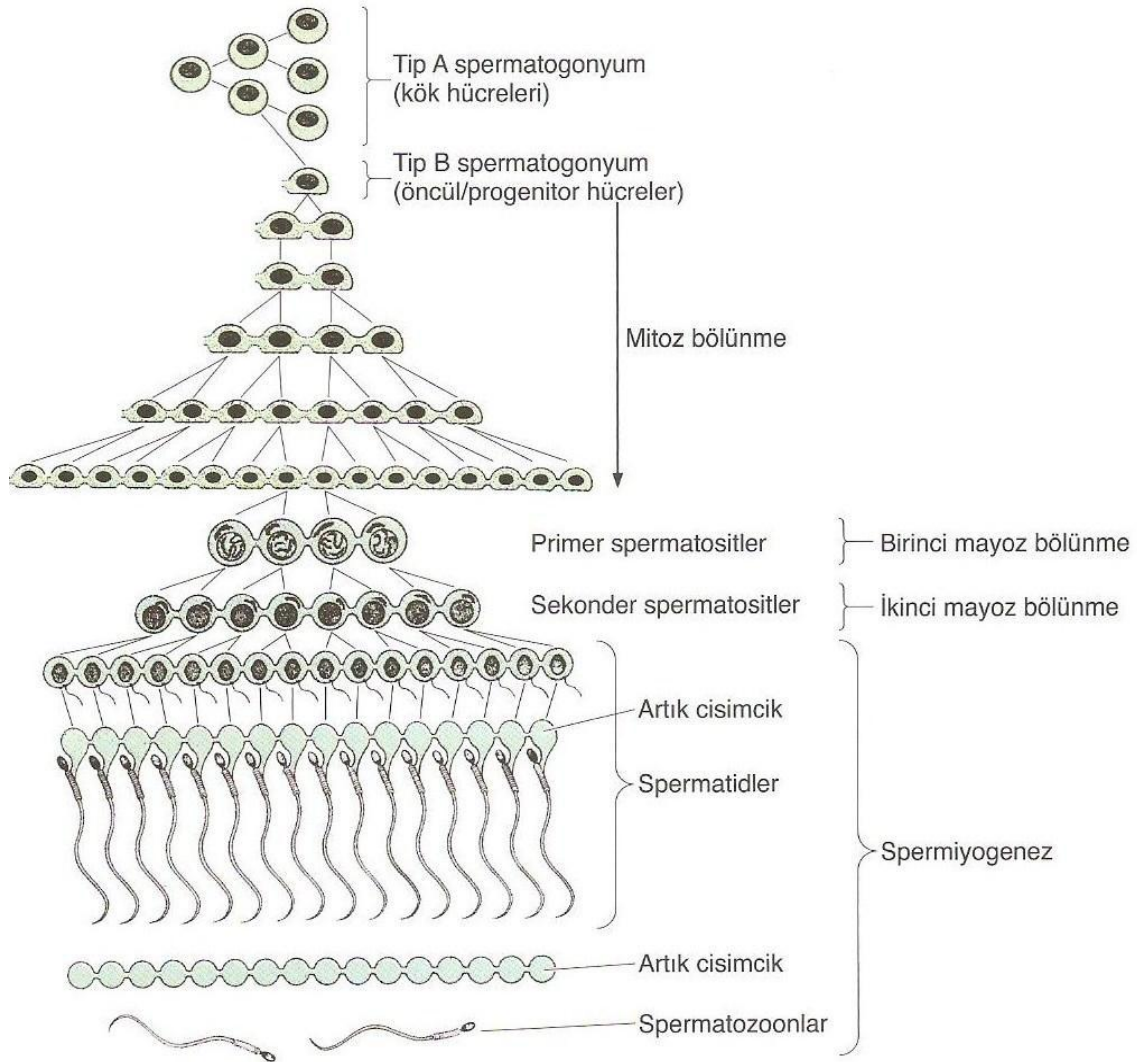
Şekil 4. İnsan seminifer epiteli (16).

4.1.1.2.2. Mayoz Bölünme Evresi

Başarılı mitotik bölünmeler geçirdikten sonra, tip B spermatogonyumlar, son S fazını (DNA sentezi) tamamladıktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler. Spermatogonik hücrelerin yaşam süresindeki esas DNA sentez aktivitesinin bu son turu, mayozun profaz 1 aşamasına başlayan bir spermatozoidin spermatogonyuma göre iki kat DNA miktarına sahip olacağını belirler.

Spermatozitler iki başarılı mayotik hücre bölünmesi geçirirler. Sertoli hücreleri arasındaki tıkaçıcı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tubülün adlüminal kompartmanında yer alırlar.

Bir primer spermatozit iki adet sekonder spermatoziti oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye gider. Sekonder spermatozitler çok hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve belirgin bir DNA sentezi olmayan ikinci mayoz bölünmeye giderler. Her bir sekonder spermatozit artık herhangi bir hücre bölünmesi göstermeden sperm hücresi şeklinde olgunlaşan iki adet spermatid meydana getirir (Şekil 5) (16).



Şekil 5. Germ hücrelerinin klonal özelliğini gösteren çizim (18).

4.1.1.2.3. Spermiyogenez Evresi

Spermatidler seminifer tubülün adlüminal kompartmanında Sertoli hücre sitoplazma kriptaları içinde gömülüdür. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır ve spermatidlerin sperm hücrelerine olgunlaşma sürecidir.

Üç ana olay spermiyogenezi karakterize eder.

- 1) **Flagellumun (kuyruk) gelişmesi:** Distal sentriyolden gelişir. Keratin içeren yoğun dış lifler ve bir fibröz kılıf ile çevrili aksoneme sahiptir. Mitokondriyonlar kuyruğun proksimal bölümü çevresinde sarmalimsi bir kılıf oluşturur.
- 2) **Akrozom gelişmesi:** Fertilizasyon için gerekli olan hidrolitik enzimlerin depolanması ve sürekli sentezinin gerçekleştiği akrozomal keseyi içerir. Akrozomun gelişmesi dört ardışık evreden oluşur: Golgi fazı, kep fazı, akrozomal faz ve olgunlaşma fazı.
 - Golgi fazı: Hidrolitik enzimler Golgi aygıtından akrozomal veziküle aktarılır. Sentriyol çifti akrozomal vezikülün zıt kutbuna göç eder.
 - Kep fazı: Akrozom kesesi yassılaşır, nükleus zarına tutunmuş bir kep oluşturur ve nükleus çevresini sarmaya başlar. Sentriyol çifti akrozomal vezikülün zıt kutbuna ulaşmıştır. Spermatid, akrozomal bölge bazal kompartmana bakacak şekilde döner.
 - Akrozomal faz: Akrozom, nükleusun üst 1/3'lük kısmını örter ve sarmaya devam eder. Manşet gelişir. Distal sentriyol, 9+2 eş merkezli dizilmiş mikrotübül çiftlerinden oluşan aksonemi oluşturur. Mitokondriyonlar gelişen aksonem boyunca göç ederler.
 - Olgunlaşma fazı: Bir perinükleer halka ve tutunmuş mikrotübüllerden oluşan manşet, kaudale (kuyruğa) ilerler. Keratin içeren dış yoğun lifler gelişir ve aksonem boyunca dizilirler. Mitokondriyonlar, sadece orta parçada dış yoğun liflerin çevresinde dizilir.
- 3) **Nükleer Yoğunlaşma:** Somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizin-zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nükleer yoğunlaşma oluşur.

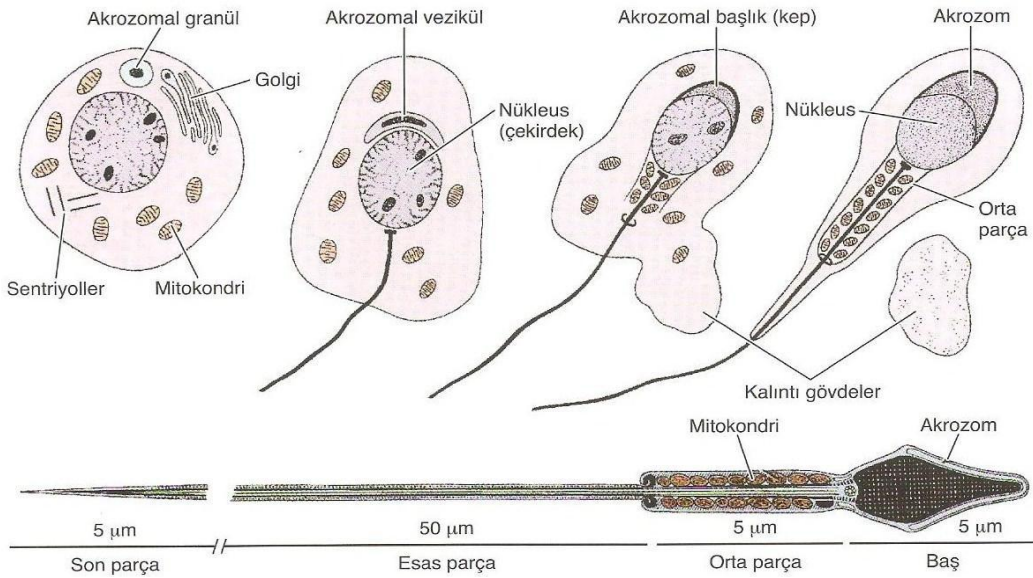
Bu somatik histonların protaminlere dönüşümünden sonra, nükleozomlar kaybolur ve nükleus materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilir.

Spermiyogenezin olgunlaşma aşamasından sonra belirgin bir RNA (Ribonükleik asit) sentezi yoktur.

Sonuncu spermatid olgunlaşma fazı sırasında mitokondriyonlar gelişen kamçı boyunca dizilimlerini tamamlar; kamçı keratin içeren dış yoğun liflerle sarılı bulunan merkezi bir aksonemden (9+2 mikrotübüller) oluşur. Nükleus uzar ve yoğunlaşır, manşet kaudal yönde göç eder. Olgunlaşma işlemi, nükleus son uzamış, yoğunlaşmış şeklini aldığı anda, manşet dağılmaya başladığında ve dış yoğun lifler tamamen organize olduğunda tamamlanır (Şekil 6). Kuyruk iki ana parçadan oluşur:

- mitokondriyonların bulunduğu orta parça,
- kuyruğun fibröz bir kılıfla sarılı olduğu esas parça.

Bir son halka (annulus), sperm hücresi kuyruğunun orta parça, ana parça geçişinin sınırlarını belirler. Olgun spermatidten bir sitoplazma artığı olan artık cisimcik, sperm hücresi meydana (seminifer tubül lümenine olgun spermatidlerin salınımı) gelirken, spermiyogenez sonunda Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Somatik histonların arjinin ve lizin zengin protaminlerle yer değiştirmesi olayı, nükleus yoğunlaşması, spermiyogenezin son basamağını tanımlar. Bu yer değişimi sperm hücresi genomik DNA'sını stabilize eder ve korur. Lümene verilen sperm hücresi henüz fertilizasyon yeteneğine sahip değildir ve hareket yeteneği yoktur (16).



Şekil 6. İnsanda spermiyogenezin şematik gösterimi (18).

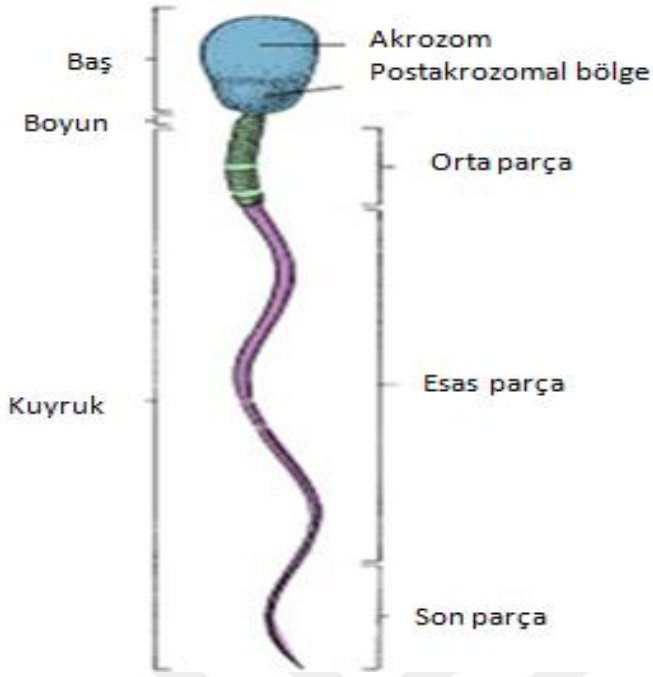
4.1.2. Semen

Semen, sperm hücrelerinin, testis ve epididimisin salgısının, ejakülasyon sırasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerin salgılarının birleşmesiyle oluşur. Sonuçta oluşan viskozitesi yüksek semen adını alan bir sıvıdır (22).

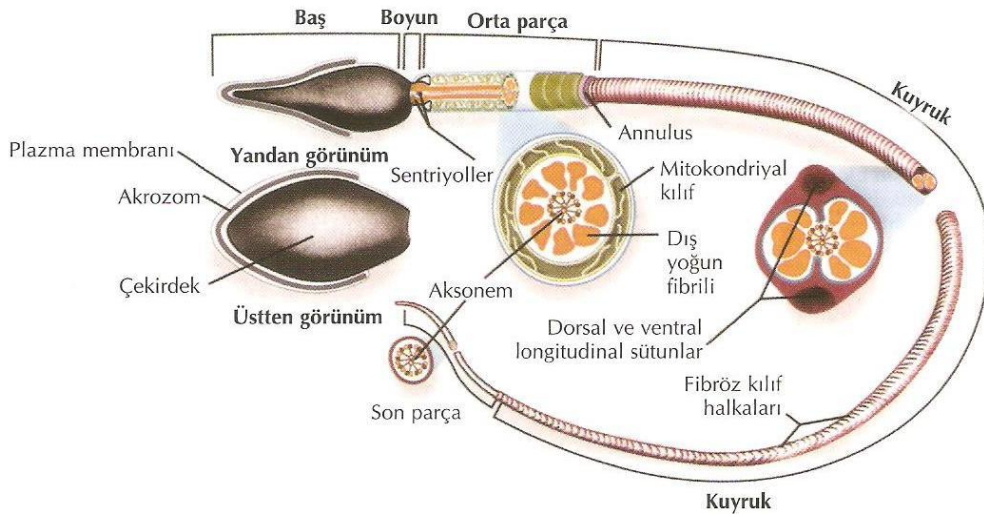
Sperm hücreleri, semenin %2-5'ini oluşturur. İnsanda ejakülat miktarı kişisel farklılık göstermekle birlikte 2-6 ml. kadardır. Semen pH'sı 7.2-8 arasında değişiklik gösterir ve yaklaşık 20 dakika içinde likefiye olur (22, 24).

4.1.2.1. Sperm Hücresinin Yapısı

Olgun bir sperm hücresi baş, kuyruk olmak üzere iki bölümden oluşur (Şekil 7.1, 7.2). Baş; 2-3 μm en ve 4-5 μm boyundadır, konturları düzgün ve ovaldir, akrozom başın %40-%70'ini kaplayacak şekildedir. Nükleus yassılaştırmış ve yoğundur. Boyun; 4-5 μm uzunluğundadır ve başın alt kısmına aksiller konumda bağlanır. Bir çift sentriyolün bulunduğu dar bir parçadır. Orta parçada da sperm hücresinin hareketi için gerekli enerjiyi sağlayan mitokondriler bulunur. Kuyruk 50-55 μm uzunlukta, düzgün kıvrımlı ve boyun kısmından daha incedir. Kuyruk kısmında sperm hücresine iskelet oluşturan fibröz bir kılıf ve hareketini sağlayan aksonem yapısı bulunur (Şekil 7.2) (16, 21).



Şekil 7.1. Olgun sperm hücresinin yapısı (19).



Şekil 7.2. Olgun sperm hücresinin yapısı (23).

4.1.2.2. Semen Analizinde Sperm Hücrelerinin Mikroskopik İncelenmesi

a) Konsantrasyon (Sperm Hücresi Sayımı)

Sperm hücresi sayımı için hemositometre, microcell, CellVU, Standard Count, Makler gibi çeşitli sayım kamaraları tanımlanmıştır. Günümüzde yaygın olarak Makler sayım kamarası kullanılmaktadır. Makler sayım kamarasında 100 karelik alan içinde en az 10 kare sayım yapılı ve sperm hücresi konsantrasyonu milyon/ml. olarak değerlendirilir. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) standartlarına göre 20 milyon/ml ve daha fazla olması normal kabul edilmektedir (22).

b) Sperm Hareketliliği

Sperm hücresi sayımı yapılırken hareketlilik; progresif hareketli sperm hücresi, hareketli sperm hücresi ve hareketsiz sperm hücresi olmak üzere 3 ana sınıfta değerlendirilir. WHO standartlarına göre sperm hücresi hareketliliği a, b, c, d olmak üzere 4 kategoride değerlendirilir. Buna göre; a) hızlı, progresif hareketlilik, b) yavaş ya da duraklayarak hareket eden sperm hücrelerini tanımlar, c) yerinde hareketlilik, d) hareketsiz sperm hücrelerini ifade eder (22).

c) Morfoloji Değerlendirmesi

Sperm hücresinin yapısal özelliklerinin incelenmesine dayanan morfolojik değerlendirme semen analizindeki en önemli kriterdir (21). Bir sperm hücresinin normal olarak kabul edilebilmesi için sperm hücresinin başı, boynu (orta parça) ve kuyruğu normal olmalıdır. Başın şekli düzgün ve oval olmalıdır. Başın boyu 4-5 µm ve genişliği 2.5-3.5 µm olmalıdır. Baş bölgesinin %40-%70'ini kapsayan iyi tanımlanmış bir akrozomal bölge olmalıdır ve vakuol içermemelidir. Orta kısım ince uzun ve genişliği 1 µm'den az, boyu baş uzunluğunun 1,5 katı ve başa aksiyal olarak bağlanmış olmalıdır. Kuyruk düz, düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve yaklaşık 45 µm uzunlukta olmalıdır (22). Sperm hücresi çeşitli yollarla değerlendirilebilir (Tablo 1).

	Kruger'in normal biçimler için tayin ettiği değerler	WHO'nun normal biçimler için tayin ettiği değerler
Baş	Düzgün, oval biçimli Uzunluk: 5-6 µm Çap: 2.5-3.5 µm Akrozom: Mutlaka sperm hücresi başının %40-70'i kadarını oluşturmali.	Oval, düzgün biçimli Yuvarlak, armut şeklinde, iğne, çift ve şekilsiz başlar daima anormal olarak değerlendirilir.
Orta parça	İnce ve güzel hatlı, 1 µm genişliğinde ve yaklaşık olarak baş uzunluğunun 1.5 katında olmalı ve hiçbir sitoplazmik artık bulundurmamalı.	Düz, kuyruktan hafifçe kalın olmalı.
Kuyruk	Tek, kıvrılmamış, düzgün, 45 µm uzunluğunda olmalı.	Tek, kıvrılmamış, düz, bükülmemiş olmalı.

Tablo 1: Sperm hücresi morfolojisinin Kruger ve WHO'a göre karşılaştırılması (25).

d) Semen Değişkenleri İçin Terminoloji

Sperm hücresi sayısı, motilitesi, morfolojisi ve miktarına bağlı değerlere göre yapılan sınıflandırmadır (22).

Normospermi: ml.'deki sperm hücresi sayısının 20 milyon/ml. ve üzeri olmasıdır.

Oligospermi: ml.'deki sperm hücresi sayısının 20 milyon/ml'den az olmasıdır.

Polispermi: ml.'deki sperm hücresi sayısının 20 milyon/ml.'den çok fazla olmasıdır.

Azospermi: Tüm ejakülatta hiç sperm hücresi bulunmamasıdır.

Aspermi: Seminal plazma üretiminin olmamasıdır.

Nekrospermi: Sperm hücrelerinin ölü olmasıdır.

Astenospermi: Motilitenin düşük (%30'dan daha az) olmasıdır.

Teratospermi: Morfolojik olarak anormal sperm hücrelerinin çoğunlukta olmasıdır.

Lökositospermi: Semende lökositlerin 1 milyon/ml'den daha fazla olmasıdır.

Hiperspermi: Semen hacminin 6 ml'den daha fazla olmasıdır.

Hipospermi: Semen hacminin 1 ml veya daha az olmasıdır.

Globozoospermi: Sperm hücresinde akrozom bulunmaz ve tüm spermler yuvarlak baş yapısı gösterirler.

Nükleer Anomali (pinhead): Sperm hücresinin başının olmayışıdır. Hücreler toplu iğne şeklinde bir görüntü verirler.

Total İmmotil: Semende hiç hareketli sperm hücresi olmamasıdır.

Total Fertilizasyon Başarısızlığı (TFF): Tekrarlayan IVF (*in vitro* fertilizasyon) denemelerinde hiç fertilizasyon olmamasıdır.

4.2. FERTİLİZASYON

Fertilizasyon, gametlerin (sperm hücresi ve oosit) birleşerek yeni bir varlık olan embriyoyu oluşturmak (26) üzere nükleus ve tüm sitoplazmik komponentlerin katılımıyla gerçekleşen bir olaylar zinciridir (21).

Fertilizasyon sürecinin tam olarak ne zaman başladığı açıkça ifade edilmemesine rağmen, sperm hücresi ve oositin birleşmesiyle oluşan zigotun ilk embriyonik mitotik bölünmeye girmeye hazır olması ile tamamlandığı kabul görmüştür (26).

İnsanda *in vivo* fertilizasyon uterus tüplerinin ovaryuma komşu olan ampulla bölgesinde gerçekleşir, burası uterus tüplerinin en geniş ve uzun parçasıdır (17). Fertilizasyon tamamlandığında yeni bireyin cinsiyeti belirlenir, ebeveynlerden gelen kromozomlar yeni bir kombinasyon oluşturur ve diploid kromozom reorganizasyonu sağlanır (21). Oositin fertilize olabilmesi için 1. mayoz bölünmeyi tamamlayarak 1. kutup cisimciğini atması, kısaca olgun bir oosit özelliklerini kazanması gerekir. Sperm hücreleri ise ancak kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu tamamlayarak hiperaktivasyon hareket yeteneğini kazandıklarında döleyebilme kapasitesine sahip olurlar (27, 28).

Fertilizasyon, birbirini izleyen üç ana başlıkta incelenebilir:

1. Sperm hücrelerinin oosite bağlanması,
2. Gametlerin füzyonu, oosit aktivasyonu ve
3. Sperm hücresi nükleusunun dekonpensasyonu ve pronükleusların oluşması (28).

4.2.1. Fertilizasyon Sürecinde Sperm Hücrelerinin Kazandığı Özellikler

Testisten salınan ve epididim kanalına giren sperm hücreleri sirküler harekete sahiptir. Sperm hücreleri epididimisi geçme ve epididimisin kuyruk veya kuyruğa yakın bölgesinde depolanmayı içeren 2 haftalık olgunlaşma sürecinden sonra fertilizasyon için gerekli olan ileri hareketini kazanır .

Sperm hücresi başı üç bölgeden oluşur:

- 1) Kondanse nükleus; bazik protaminlerle kaplı genomik DNA'yı içerir.
- 2) Akrozomal kese, üç ögeden oluşur.
 - a) Dış akrozomal membran
 - b) İç akrozomal membran
 - c) Hidrolitik enzimler
- 3) Plazma membranı (16).

❖ Kapasitasyon

Sperm hücreleri kapasitasyon sürecini dişi genital kanallarında, bu kanalların salgılarının etkisiyle tamamlarlar. Kapasitasyon, sperm hücrelerinde yapısal bir değişikliğe neden olmayan ve genellikle akrozom reaksiyonunun tamamlanması için gerekli bir olgunlaşma süreci olarak kabul edilir. Sperm hücrelerinin, vajinadan uterin tüplere ulaşması sırasında geçen sürece yayılan kapasitasyon sırasında sperm hücrelerinin plazma membranlarında bazı değişiklikler gözlenir;

- Akrozomal kep bölgesindeki plazma membranından seminal plazma proteinleri ve glikoprotein örtü uzaklaştırılır.
- Sperm hücresi plazma membranındaki intramembranöz partiküllerin yer değiştirdiği gözlenir.
- İntrasellüler kalsiyum ve sodyum seviyesi yükselir.

Kapasitasyon, sperm hücrelerinin oositle karşılaşmadan önce tamamlamış olmaları veya bu sırada tamamlamaları gereken bir süreçtir. Her ne kadar yapısal bir değişiklik gözlenmese de; kapasite olan sperm hücrelerinde intrasellüler iyonların yeniden düzenlenmesi gerçekleşir ve metabolik değişiklikler olur. Moleküler düzeyde ise adenilat siklaz/protein siklaz aktivitesi yeniden düzenlenir ve nükleus proteinlerinde değişiklikler meydana gelir (28, 29).

❖ Hiperaktivasyon

Kapasitasyon sürecini tamamlayan sperm hücrelerinin motilite kinetiği değişir ve hiperaktive olurlar. Hiperaktivasyon, sperm hücrelerinin kuyruk hareketlerindeki açılanmanın ve ileriye doğru olan hızının artması olarak tanımlanır (30).

❖ Akrozom reaksiyonu

Kapasitasyonun aksine sperm hücrelerinde yapısal değişikliğe neden olur (21). Bu reaksiyon sperm hücresinin zona pellusidaya (ZP) penetrasyonu için gereklidir (26).

Sperm hücresi oosite yaklaştığında ve Ca^{+2} varlığında sperm hücresi plazma membranı dış akrozomal membranla kaynaşır. Bu olay akrozom reaksiyonu olarak adlandırılır. Membran füzyonu ile oluşan küçük açıklıklar hidrolitik enzimlerin salınımını kolaylaştırır (16).

Akrozomal reaksiyonda işlevsel olan enzimler hyalüronidaz, asit proteinaz, ariminidaz, akrozin, esteraz, fosfataz, aril sülfataz, kollajenaz, fosfolpaz C, α -glukorinidaz ve nörominidazdır (21).

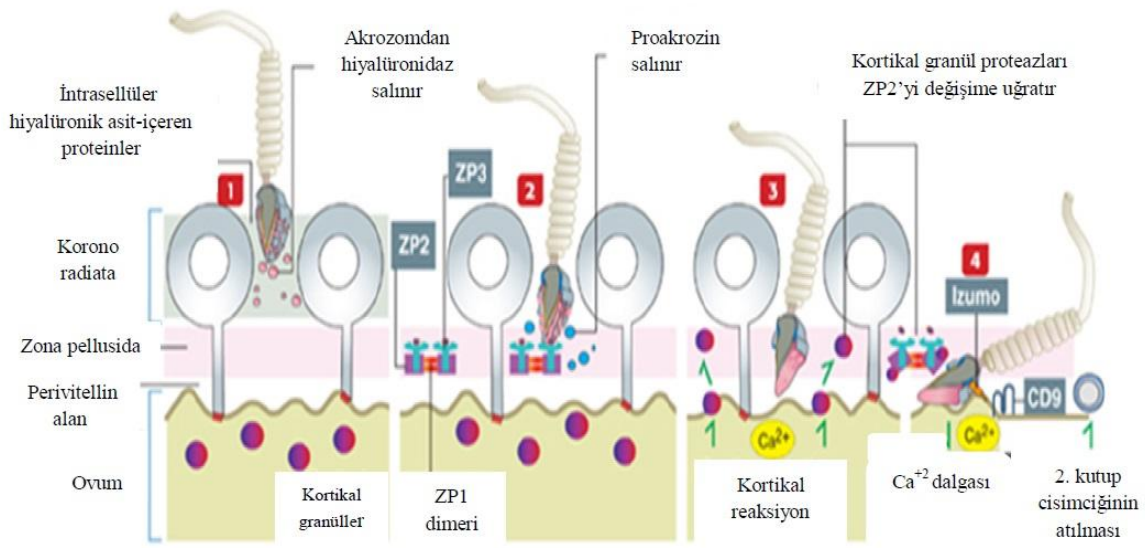
Akrozom reaksiyonunu tamamlamış sperm hücresi salgıladığı hiyalüronidaz, hiyalüronik asitten zengin olan kumulus hücreleri arasındaki matriksi eritirken; sperm hücresi yüzeyindeki akrozin ise zona pellusidanın aşılmasında rol oynar.

Tüm memeli oositlerinin plazma membranları, oosit tarafından üretilen ve 6-7 μ m kalınlığında olan zona pellusida tarafından sarılmıştır (16). Zona pellusida insanda 13-15 μ m kalınlığında ZP1, ZP2, ZP3 glikoproteinlerinden oluşan ve oositi çepeçevre saran bir kılıftır (21). ZP2 ve ZP3 düzenli aralıklarla ZP1 dimerleri tarafından birbirine bağlanarak uzun filament kompleksini oluştururlar. Yalnızca akrozomal reaksiyona girmiş sperm hücresi, ZP3'e bağlanabilir (16).

Sperm hücresi-oosit füzyonunda iki membran proteini gereklidir. Bu proteinler, sperm hücresinde Izumo ve oosite ise CD9'dur. Izumo, sperm hücresi-spesifik immunoglobulin süper ailesine ait membran proteindir. Akrozom reaksiyonu sonrası sperm hücresi plazma membranında yerleşim gösterir. CD9, tetraspanin süper ailesine ait transmembran proteindir. Izumo ve CD9 proteinleri, sperm hücresi-oosit füzyon reaksiyonu için gerekli plazma membran protein kompleksinin organizasyonu veya stabilizasyonu için gerekli olduğu düşünülmektedir (Şekil 8). Diğer proteinlerden, ADAM'lar gibi proteinlerinin de (disintegrin ve metalloproteaz) füzyon reaksiyonuna katıldığı düşünülmektedir. Sperm hücresi-oosit füzyonu, oosit plazma membranında hafif

şiddette depolarizasyona yol açmaktadır. Bunun sonucunda da oosit sitoplazması içinde 5-20 saniye Ca^{+2} dalgası oluşmaktadır. Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış, depolarizasyon sinyallerini artırır. Oositin hücre bölünmesine devam etmesi ile 2. mayoz bölünmeyi tamamlayarak 2. kutup cisimciğinin perivitellin aralığa atılmasını ve erken embriyogenezin başlamasını tetikler (20).

Membranların birleşmesi aşamasında, sperm hücresi başının ekvatoryal kısmı oosit plazma membranına bağlanır ve sperm hücresinin oosit içine girişi fagositoya benzer bir şekilde gerçekleşir (21, 26).



Şekil 8. Sperm hücresi-oosit füzyonunun şematik gösterimi (20).

4.2.2. Oositte Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler ve Oosit Aktivasyonu

Gametlerin birleşmesi ve sperm hücresinin oosit sitoplazmasına girmesinden hemen sonra oosit sitoplazmasının periferinde yerleşik olan kortikal granüller hücre yüzeyine salgılanarak polispermiye karşı blok oluştururlar. Kortikal granüllerin oosit yüzeyine salgılanmasına **kortikal reaksiyon** adı verilir. Ekzositoz yoluyla hücre yüzeyine salgılandıklarında kortikal granüller; zona pellusidanın yapısının değişip, sertleşmesine neden olurlar. Bu da **zona reaksiyonu** olarak bilinir.

Sperm hücresinin oosit sitoplazması içine girmesinden sonra oosit aktivasyonunu takiben oositin fertilize olduğunun göstergesi olarak **pronükleusların oluşması** beklenir (21). Sperm hücresi nükleusunun oosit sitoplazmasında depolandıktan sonra uğradığı ilk

moleküler değişiklik, protaminlerinden arınıp yerine oosit kökenli histonların konmasıdır (26). Bu adım, öncesinde sperm hücresinin nükleer zarının ortadan kaldırılmasını gerektirir. Yeni nükleer zar eş zamanlı olarak sperm hücresi kökenli ve oosit kökenli nükleer DNA'lar çevresinde sırasıyla erkek ve dişi pronükleusları ile oluşacak şekilde sonuçlanır. Her iki pronükleus oosit sitoplazmasında rotasyona benzeyen hareketler yaparak birbirlerine yaklaşır. Pronükleer değişim tamamlandığında hem dişi hemde erkek nükleer zarlar parçalanır ve nükleer materyalleri birleşip, bütünleşir. Bu aşamaya nükleer singami denir. Nükleer singamiden hemen sonra ilk embriyonik hücre bölünmesi başlar (26).

❖ Oosit Aktivasyonu

Gametlerin birleşmesi ve sperm hücresinin oosit sitoplazmasına girmesinden sonra, kortikal granüllerin ekzositozunu başlatan mekanizma, hücre içinde Ca^{+2} iyonlarının artışına bağlı olarak gelişen olaylardır (21).

Sperm hücresiyle birleşen oosit sitoplazmasında yapısal ve biyokimyasal birtakım değişiklikler meydana gelir. Bu birleşmenin doğrudan sonucu oosit aktivasyonudur (21, 31).

Memeli oositleri 1. kutup cisimciğinin atılması sonrasında, 2. mayoz bölünmenin metafazında (MII) duraksar (32, 33). “**Oosit aktivasyonu**” olarak adlandırılan ve gelişimin devam edebilmesi için bu duraksamanın salınması en önemli biyolojik süreçtir. Aktivasyon; mayotik duraksamadan kurtulma, kortikal granüllerin ekzositozu, hücre siklusunun ilerlemesi, pronükleer oluşum, maternal mRNA'nın göçü, embriyonik gen ekspresyonu ve sitozolik serbest Ca^{+2} 'un tekrarlayan salınımlarını içerir (34, 35, 36, 37, 38).

Tek bir Ca^{+2} salınımı oosit aktivasyonunu başlatır ama fertilizasyonun gerçekleşmesi, gen ekspresyonu ve metilasyon durumu için uzun süre Ca^{+2} salınımının gerçekleşmesi gerektiği bilinmektedir (12, 13, 48).

Fertilizasyon sürecinde birçok olayın başlayıp devam etmesinde esas olan intrasellüler Ca^{+2} artışı oosit aktivasyonunda da etkilidir (21). Memeli oositlerinde, sperm hücresi girişinden kısa süre sonra karakteristik bir Ca^{+2} sinyali meydana gelmektedir. Bu sinyaller ilk olarak farede tanımlanmıştır (39). Bu sinyaller periyodik olarak tekrar eden sitoplazmik serbest Ca^{+2} iyon konsantrasyonundaki keskin pikler şeklindedir ve Ca^{+2} salınımları olarak tanımlanmıştır. Bu sinyaller, ilk olarak sperm hücresinin kaynaştığı

bölgeden başlayan Ca^{+2} dalgaları biçimine dönüşür. Bu olay hem hücre dışı aralıktan, hem de başta endoplazmik retikulum olmak üzere hücre içinde Ca^{+2} depolayan organellerden sitoplazmaya doğru Ca^{+2} akışı ile düzenlenir (40). Ca^{+2} iyonlarının, hücre içinde Ca^{+2} depolayan farklı organeller ile sitoplazma arasındaki hareketini biri inositol 1, 4, 5 trifosfat (IP_3) diğeri de ryanodine bağlı olmak üzere reseptör tarafından yönetilen iki Ca^{+2} kanalı düzenler (41). Bu reseptörlerin Ca^{+2} ile indüklenerek Ca^{+2} salıvermesi, sperm hücresi kaynaklı bir faktör tarafından ayarlanarak oositin Ca^{+2} homeostazını sağlayan düzeneğin Ca^{+2} dalgalarını ve dalgalanmalarını oluşturmasını sağlar (42).

Memeli oositi içinde Ca^{+2} salınımının IP_3 molekülü aracılı olduğu bilinmesine rağmen, bu salınımın altında yatan mekanizma, 'Fosfolipaz C Zeta (PLC ζ)' adı verilen ve ayırt edici özellikleriyle sperm hücresi kaynaklı bir fosfolipaz olan çözünür 'sperm hücresi faktörü' keşfiyle anlaşılmıştır (12, 13, 31, 43, 44, 45, 46, 47, 48).

4.2.3. Fertilizasyon Anomalileri

Fertilizasyon anomalileri genellikle sperm hücresi kökenli oosit aktivasyon faktörlerinin eksikliklerinden dolayı oositin sitoplazmik sistemlerinin sperm hücresi faktörüne yeterli cevap verememesinden kaynaklanır (26).

➤ **Total Fertilizasyon Başarısızlığı (TFF)**

Oositlerin sitoplazmasında merkezi yerleşim gösteren iki pronükleus (bazen sitoplazmanın periferinde de gözlenebilir) ve perivitellin aralıktaki iki kutup cisimciği fertilizasyonun gerçekleştiğinin göstergesidir. IVF uygulamalarında kimi zaman pronükleuslar görülmeyebilir, tek pronükleus veya çok sayıda pronükleus görülebilir veya oositlerin hiç birinde fertilizasyon belirtileri saptanamaz. Oositlerin hiç birinin fertilize olmaması TFF olarak bilinir. Klasik IVF ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda (ICSI) bu duruma neden olan faktörler ayrı ayrı değerlendirilmelidir.

Düşük Fertilizasyona Neden Olan Durumlar:

✓ **Total İmmotil:** Yıkayıp hazırlanmış semen örneğinde oosit başına tek bir motil sperm hücresi bulunması; ICSI uygulamaları için yeterli kabul edilmektedir. ICSI'de fertilizasyon ve gebelik oranlarının ciddi düzeyde olumsuz etkilendiği tek durum; örnekte yıkama işleminden sonra hiç motil sperm hücresinin gözlenmediği 'total immotil sperm' olgularıdır. Sperm hücresinde hiç hareket izlenmiyorsa, sperm hücresinin canlılığı da

şüphelidir. ICSI’de immotil sperm hücreleriyle çalışıldığında seçilen sperm hücresi ölü olabilir. Ölü sperm hücrelerinde fertilizasyonun gerçekleşmemesi, ölü sperm hücrelerinde DNA’nın hasarlı olmasından kaynaklanabilir ve zarar gören DNA nedeniyle sperm hücresi nükleusunun dekontansasyonu gerçekleşmez (21).

✓ **Nükleer Anomali:** Fertilizasyon ve gebelik oranlarının düşük olmasına sebep olan bir diğer sperm hücresi anomalisidir. Morfolojik değerlendirme yapılırken boyanan sperm hücrelerinde, sperm hücresi başının toplu iğne şeklinde gözleendiği olgulardır. Pinhead ya da mikro baş olarak adlandırılır. Bu sperm hücresi anomalisinde başsız kuyruklar gözlenir veya sperm hücresinin mikro başında DNA bulunmamaktadır (49, 50).

✓ **Globozoospermi:** ICSI’de fertilizasyonun gerçekleşmemesinin bir diğer nedeni de globozoospermidir (21). Globozoospermik erkeklerin sperm hücreleri morfolojik anomali sergiler. Bu sperm hücreleri akrozom yokluğu ve yuvarlak nükleus sebebiyle tipik yuvarlak baş şekline sahiptir (51, 52) ve bu sperm hücreleri çoğu zaman kıvrılmış kuyruk, nükleer membranda ayrılma ve post-akrozomal kılıfın bulunmaması gibi hücre iskeletini de kapsayan çoklu defektlere sahip olma eğilimindedir (15).

➤ **Fertilizasyonun Gecikmesi**

Fertilizasyon; ICSI veya klasik IVF’te inseminasyondan 48 sonra gözlenebilir ve bu durum gecikmiş fertilizasyon olarak değerlendirilir.

➤ **Polispermik Fertilizasyon**

Genellikle oosit olgunlaşmasıyla ilişkilendirilir, immatür ve postmatür oositlerde kortikal reaksiyonun erken ya da geç olması polispermik fertilizasyona neden olmaktadır (21).

4.3. FOSFOLİPAZ C ZETA (PLC ζ)

Fosfolipaz C (PLC) ilk olarak 1981'de saflaştırılmıştır ve moleküler ağırlığının 68 kDa olduğu bildirilmiştir (53). Fosfoinositidil-spesifik PLC, fosfatidilinositol 4, 5 bifosfatı (PIP₂) hidrolize ederek ikincil mesajcılar olan, diaçilgliserol (DAG) ve IP₃ molekülünü üretir. DAG ve IP₃, protein kinaz ve intrasellüler Ca⁺² salınımını aktive ederek ileri sinyal transdüksiyon yolunu başlatır (54, 55, 56).

Memelilerde 13 PLC izomeri tanımlanmış ve 6 alt tipe ayrılmıştır. Bunlar; PLC beta (β 1, 4), PLC gama (γ 1, 2), PLC delta (δ 1, 3, 4), PLC epsilon (ϵ), PLC zeta (ζ) ve PLC eta (η 1, 2)'dir. PLC izomerlerinin asıl fonksiyonu ana sinyal proteini olmalarıdır (57).

PLC izomerleri yüksek korunmuş katalitik X ve Y bölgelerinin yanı sıra çeşitli regülatör bölgelerde içerir; bunlar C2 bölgesi, EF (uzama faktörü) bölgesi, Src homoloji (SH) bölgesi ve plekstrin homoloji (PH) bölgeleridir. Her PLC izomeri özgün bir bölgeye sahiptir ve PLC izomerleri farklı dokularda farklı şekilde eksprese olurlar. Bu faktörler, spesifik düzenleyici mekanizmaya katkı sağlar ve PLC izomerlerine fonksiyonel çeşitlilik katar (56).

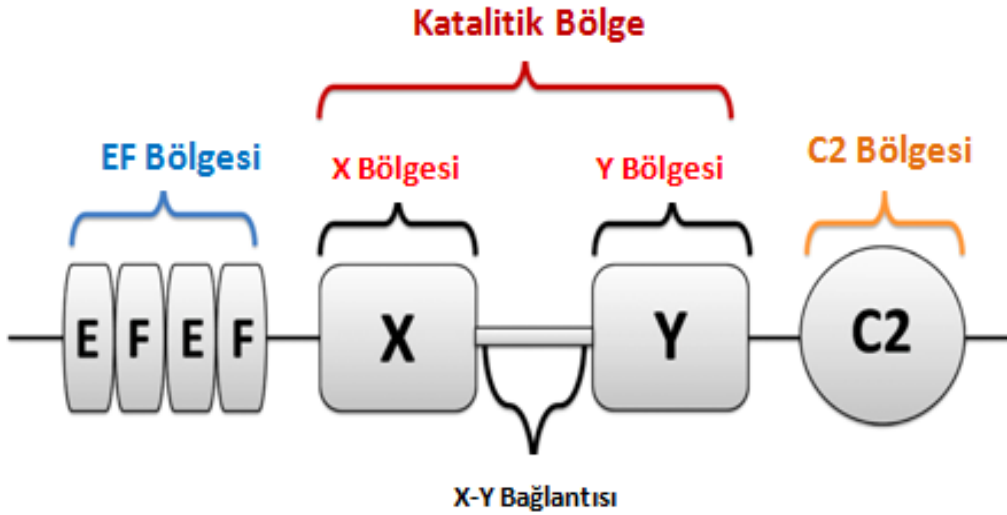
Oosit aktivasyonu; kortikal granüllerin ekzositozu ile polispermiye engel olma, oositin mayotik duraksamadan kurtulması ve IP₃ molekülü aracılı hücre sinyaline cevap olarak, intrasellüler Ca⁺²'un artması olaylarını içeren fertilizasyon sürecinin esas basamağıdır (11, 58, 59). İnsanda 12. kromozomda lokalize olan sperm hücresi-spesifik PLC ζ , oosit aktivasyonunda Ca⁺² salınımindan sorumludur (12, 13, 48).

Çeşitli çalışmalar PLC ζ 'nın, oosit aktivasyonu için fizyolojik ajan olduğunu kanıtlar niteliktedir (31, 43, 44, 45, 46, 47). Rekombinant PLC ζ veya proteinin her ikisinde fare oositine enjeksiyonu sonucu Ca⁺² salınımları başladığı ve fertilizasyonun gerçekleştiği ve blastosist aşamasına kadar olan embriyo gelişiminin de devam ettiği gözlenmiştir (12, 13, 48). Sperm hücresi ekstraktlarındaki PLC ζ eksikliği Ca⁺² salınım yeteneğini bastırır (12, 13, 48).

PLC'nin bilinen alt birimleri olan γ , β , δ , ϵ ve η 'nin Ca⁺² salınımı ile ilişkisi saptanamamıştır (60, 61). Yeni bir alt birim olarak PLC ζ tanımlanmış ve bu proteinin anahtar işlevinin oosit aktivasyonu olduğunu belirtilmiştir (36). PLC ζ , tipik PLC yapısı sergiler (12, 13, 48) ve PLC izoformları ile homoloji gösterir (62, 63). En yakın homolojiyi (%33) PLC δ ile en düşük homolojiyi (%9) ise PLC ϵ ile gösterir (13).

PLC ζ , tüm PLC'lerde ortak aktif bölüm olan X ve Y katalitik bölgelerine (63, 64), tek C2 bölgesine ve 4 ardarda dizili EF bölgesine sahiptir. PLC ζ 'nın diğer memeli PLC'lerinden en büyük farkı PH ve SH bölgelerinin (13) bulunmamasıdır (Şekil 9). Bu durum PLC ζ 'yı memeli PLC'lerinin en küçüğü yapar (12, 13, 48, 63). İnsanda yaklaşık 70 kDa (12, 13, 48, 64), farede yaklaşık 74 kDa ağırlıktadır (12, 13, 48). İnsanda PLC ζ 'nın; aminoasit numarası 608, izoelektrik noktası 9.14, GenBank Uluslararası Nükleotid Sekans Veritabanı aksesyon numarası AF532185 olarak belirtilmiş ve 15 ekzonu olduğu bildirilmiştir (12).

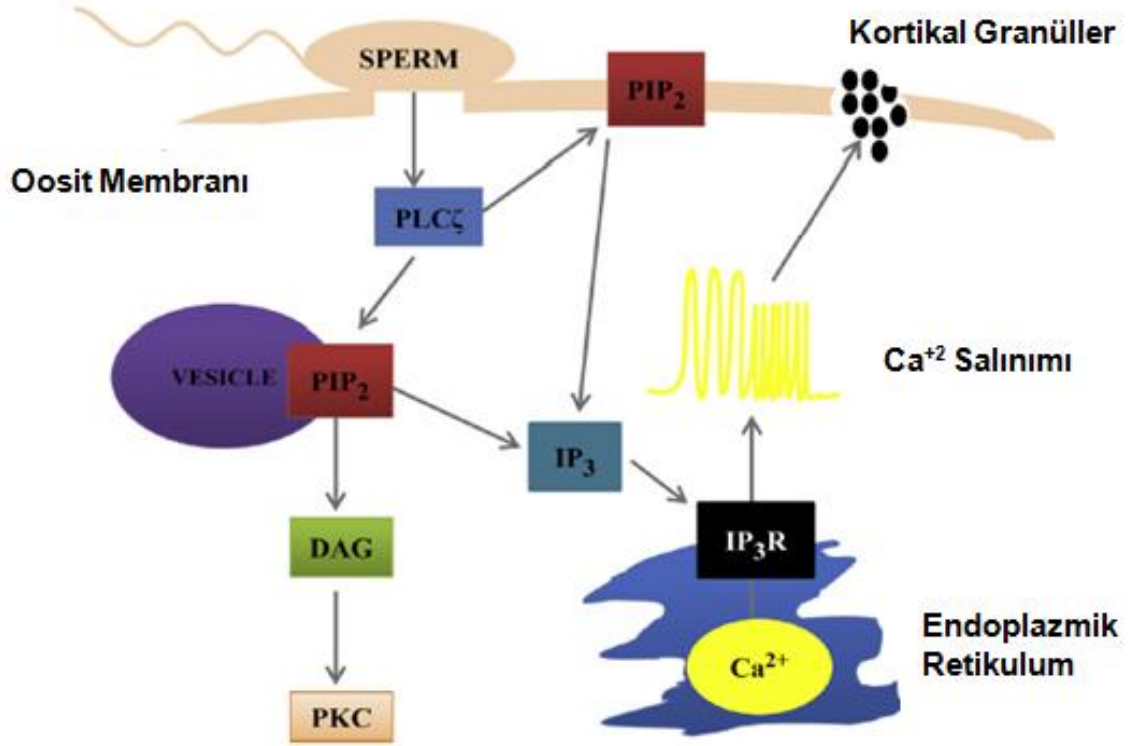
EF bölgesi iki çift lob şeklinde düzenlenmiştir ve PLC ζ 'nın enzimatik aktivitesinde önemli role sahiptir. Kalmodulin ve troponine benzer şekilde Ca^{+2} 'u bağlarlar (48). PLC ζ 'nın diğer memeli PLC'lerinden bir diğer farkı ise Ca^{+2} 'a yüksek duyarlılık göstermesidir (64, 66). PLC ζ 'nın PH bölgesi olmadan membrana bağlı substrat olan PIP $_2$ 'yi nasıl hedef aldığı belirsizliğini korumaktadır ve C2 bölgesinin PIP $_2$ 'ye bağlanmada etkili olabileceği düşünülmektedir (63, 64). X ve Y katalitik bölgeler arasındaki X-Y bağlantı bölgesinin de PIP $_2$ 'ye yüksek afinitesi olduğu gösterilmiştir (38, 66). X-Y bağlantı bölgesi türler arasında büyük farklılık gösterir ve insanda en kısa boydadır (64).



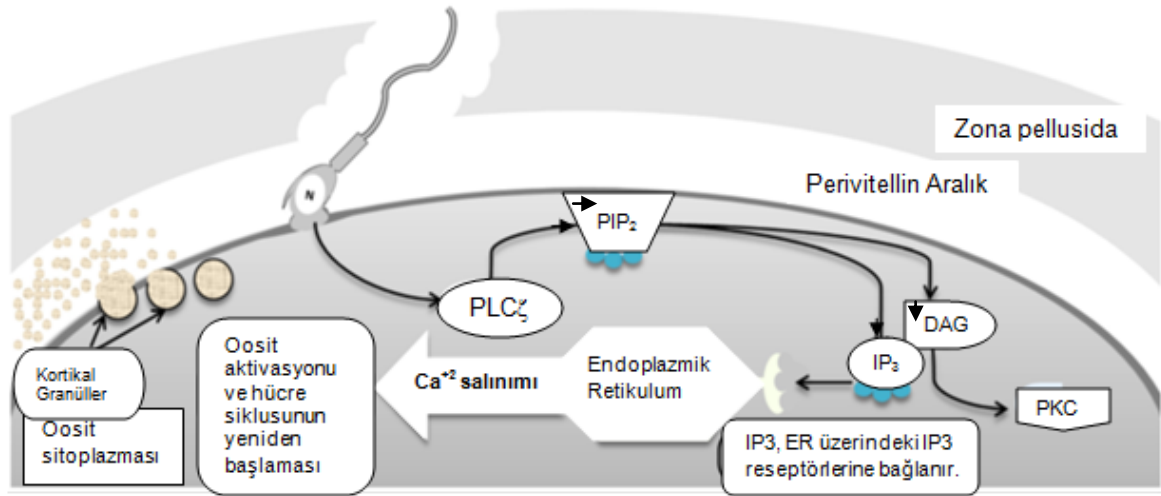
Şekil 9. PLC ζ molekülünün şematik gösterimi (67).

PLC ζ 'nın her bölgesi farklı karakteristik biyokimyasal özellikleri göstermede önemli role sahiptir. PLC ζ , oosit membranındaki PIP $_2$ molekülünü IP $_3$ ve DAG'a hidroliz ederek protein kinaz C (PKC) sinyal yolunun aktive edilmesini sağlar (12, 13, 38, 48, 68). IP $_3$,

endoplazmik retikulum üzerindeki inositol 1, 4, 5 trifosfat reseptörüne (IP₃Rs) bağlanır. İntrasellüler Ca²⁺ depolarından Ca²⁺ salınımını tetikler ve oosit aktivasyonunu indükler (Şekil 10, 11) (69, 70, 71).



Şekil 10. PLC ζ molekülünün hareket mekanizması (72).



Şekil 11. PLC ζ molekülü işleyiş mekanizmasının şematik gösterimi (67).

Fertilizasyonu takiben oositte Ca^{+2} salınımı pronükleus oluşumu sırasında kesilir (73). Bu kesilme PLC ζ 'nin interfaz aşamasında pronükleuslarda yerleşmiş olmasından kaynaklanır. Bu lokalizasyonun sebebi nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS)'dir. Pronükleer zarların parçalanıp oosit içinde mitozun yeniden başlamasına kadar Ca^{+2} salınımı sürdürülmez (64, 65). Bu nükleer lokalizasyon ile PLC ζ 'nin özelliğinin korunduğu önerilmiştir (64).

PLC ζ , Ca^{+2} 'a yüksek duyarlılık gösterdiği için oosit içindeki Ca^{+2} seviyesini ve IP $_3$ molekülü üretimini artırır. Olgun bir sperm hücresi de oositteki gibi durgun Ca^{+2} konsantrasyonuna sahiptir. PLC ζ 'nin sperm hücresi içinde Ca^{+2} seviyesini artırmaması perinükleer matriksteki lokalizasyonu sayesinde sağlanır. PLC ζ 'nin perinükleer matrikste tutunmuş olması sperm hücresi plazma membranındaki PIP $_2$ 'den uzak tutulmasını sağlar (64).

Kapasite olmamış insan sperm hücresinde PLC ζ , baskın olarak ekvatoryal alanda, daha düşük oranda ise akrozomal ve post-akrozomal alanda saptanmıştır (74). Kapasitasyondan sonra post-akrozomal ve ekvatoryal bölgelerde bu proteinin dağılımı gözlenmiştir. Ekvatoryal ve post-akrozomal populasyon gametlerin füzyonunu takiben oosit sitoplazmasına hızlı geçişi sağladığını düşündürmektedir (65).

4.3.1. PLCζ Gen Mutasyonları

PLCζ eksikliğinin ilk genetik bağlantısı oosit aktivasyon bozukluğu (OAD) görölen infertil erkeklerde yer değiştirme mutasyonu (H398P) belirlenerek ortaya konmuştur (15). Bu mutasyon PLCζ açık okuma çerçevesinin (ORF) 398 pozisyonunda, aktif Y bölgesinde, histidin aminoasitinin prolin aminoasitine değişimi ile meydana gelmiştir. Bir diğer nokta mutasyonu (H233L) ise katalitik X bölgesinde, aminoasit dizisinin 233 pozisyonunda histidin aminoasitinin lösin aminoasitine değişimi ile meydana gelmiştir (15, 80).

Mutasyon: Genlerin nükleotid dizisinde herhangi bir nedenle meydana gelen ve kalıtsal olan değişikliklere denir. Canlılarda, gen rekombinasyonu dışındaki nedenlerle meydana gelen kalıtsal değişiklerdir.

Mutasyonlar kromozom ve gen mutasyonları olarak ayrılır. Gen mutasyonları ise fenotipe ve genetik materyale etkisine göre sınıflandırılır. Gen mutasyonu; tek bir gen içinde olduğu ve bir kromozom bölgesine ait olduğu için gen mutasyonu veya nokta mutasyonu olarak isimlendirilir. Genetik materyale etkisine göre gen mutasyonları;

- ✓ Yanlış anlamlı (missense) mutasyon; gendeki bir baz değişikliğinin bir kodonun anlamını bir aminoasitten başka bir aminoasite değiştirmesidir.
- ✓ Anlamsız (nonsense) mutasyonda ise; anlamlı bir kodon stop kodonuna dönüşür. Bu durumda protein sentezi durur ve oluşan protein fonksiyonel değildir.
- ✓ Sessiz (silent) mutasyonda; bir aminoasiti kodlayan kodon, yine aynı aminoasiti kodlayan başka bir kodona dönüşür.
- ✓ Nötr mutasyonda; bir aminoasiti kodlayan kodon farklı bir kodona dönüşür fakat fonksiyonel olarak başlangıçtaki aminoasite benzer yani fonksiyonları aynı yapıları farklı olan aminoasitler oluşur. Sonuçta oluşan protein fonksiyonel olabilir (75).

4.4. ERKEK İNFERTİLİTESİ VE PLCÇ İLE İLİŞKİSİ

WHO infertilite tanımlamasını “en az bir yıl süreyle çiftlerin korunmasız olarak ilişkide bulunmalarına karşın çocuk sahibi olamamaları” olarak yapmaktadır (22). Dünya üzerinde yedi çiftten birinin infertilite sorunu çektiği bilinmektedir (1).

Erkek infertilitesinin altında yatan nedenlerin sayısı çok olsa da geleneksel olarak **pretestiküler, testiküler ve posttestiküler** etkenler şeklinde gruplandırılır.

- ✓ Pretestiküler nedenler, daha çok hormonal kaynaklıdır.
- ✓ Testiküler nedenler, testis düzeyinde etki göstererek infertiliteye neden olan durumları kapsar.
- ✓ Posttestiküler infertilite nedeni ise sperm fonksiyon veya hareketliliğini ilgilendiren anormalliklerdir (76).

Açıklanamayan erkek faktörlü infertilitede yada ICSI takibinden sonra sperm hücreninin oositi aktive etmeye gücünün yetmediği durumlarda erkek infertilitesi göze çarpmaktadır ve büyük kaygı uyandırmaktadır (77, 78). Erkek infertilitesi durumlarının en bilineni ICSI takibi sonrasında OAD durumudur (10, 79).

Oosit aktivasyonunun olmadığı bazı erkek faktörlü infertiliterde, PLCÇ anormal ekspresyon ya da fonksiyon bozukluğu gösterebilmektedir. ICSI tedavisi bu olguların %35-40'ına çözüm getirmektedir. ICSI uygulamalarında ortalama %70 vakada normal fertilizasyon gerçekleştiği bildirilmiştir (78). Ancak ICSI sikluslarının total ya da kısmi fertilizasyon başarısızlığı oranı da %1-5 olarak rapor edilmektedir (2). OAD ile PLCÇ arasındaki bağlantı ilk olarak Yoon ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir ve tekrarlayan TFF görülen olgularda Ca^{+2} salınımının olmadığını göstermiş ve bunun sperm hücresinde bulunan PLCÇ'nin anormal ekspresyonuna bağlı olduğunu bildirmiştir (14). Sperm hücresi ekstraktlarında PLCÇ eksikliğinin Ca^{+2} salınım yeteneğini inhibe ettiği bildirilmiştir (12, 13, 48).

İdiyopatik erkek infertilitesi, testiküler gen ekspresyonu ve spermatogenezi bozan birçok genetik defektlerin sonucunda olabilir. ICSI gibi yardımla üreme teknikleri (YÜT) müdahaleleri ile paternal fertilizasyon problemlerinin babadan oğula transfer edildiği gösterilmiştir (65).

Globozoospermide, sperm hücrenin morfolojik deformasyonu, oosit aktivasyonu ve akrozom formasyonunda anormalliğe neden olur. Ancak, morfolojik olarak normal sperm

hücresi de oosit aktivasyonunda başarısız olabilir. Son çalışmalar ile globozoospermi ve OAD olan diğer durumlarda aktivasyon başarısızlığı; PLC ζ 'nin anormal ekspresyonu, lokalizasyonu ve protein yapısına bağlanmıştır (14, 15).

Düşük miktarda PLC ζ proteinine sahip hastalarda veya PLC ζ 'nin mutant formunun enjekte edildiği hastalarda sperm hücresinin oosit aktivasyonu için gerekli Ca⁺² salınımını yapamadığı ve fertilizasyonun başarısızlığa uğradığı görülmüştür (14, 15, 80, 81). 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 (82).



5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1. HASTA GRUPLARI

Bu çalışmaya infertilite merkezine başvurmuş olan yaşları 24-42 arasında değişen, normospermik 20 olgu ve fertilizasyon başarısızlığına ya da düşük fertilizasyona neden olan globozoospermik, total immotil, nükleer anomali gösteren semen örnekleri ile TFF görülen 18 olgu dahil edildi.

5.2. SEMEN TOPLANMASI

Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle kliniğe gelen hastalardan, hastanın adının, soyadının yazılı olduğu steril kaplara, masturbasyon yöntemi ile alındı. Mililitredeki sperm hücresi sayısını belirlemek üzere, Makler sayma kamarasına (Counting Chamber Makler, Sefi Medikal Instruments, İsrail) 0,5 ml semen örneği konuldu. Toplam sperm hücresi sayısı, motilite ve morfoloji değerlendirmesi X20 büyütme altında yapıldı. Morfolojisi, faz kontrast mikroskopta, X100 büyütmede Kruger kriterlerine göre değerlendirildi.

PLCζ'nın sperm hücrelerindeki immunfloresan gösterimi için bu hastaların semen örnekleri kullanıldı. Semen örneği lama damlatılıp yayıldı. Havada kurutulduktan sonra soğuk paraformaldehit ile 10 dakika fikse edildi (%4, pH: 7,4).

5.3. SPERM HÜCRELERİNİ BOYAMA VE MORFOLOJİ İNCELEME

Morfolojik değerlendirme için bir lama bir damla semen örneğinden damlatıldı. Damlatılan semenin miktarı, sperm hücresi sayısına bağlı olarak ayarlandı. İkinci bir lam aracılığı ile bu damla lam üzerine yayılıp hava ile kurutuldu ve Spermac boyama (Ferti Pro NV, Industriepark Noord, Belçika) yöntemi ile boyandı.

Lam üzerine yayılıp kurutulan preparatlar, fiksatif solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Fiksatif su ile arıtıldıktan sonra suyu süzülerek A, B, C (Ferti Pro NV, Industriepark Noord, Belçika) solüsyonlarından 1,5 dakika olacak şekilde sırayla boyama işlemi yapıldı. Kuruması için beklendi. İmmersiyon yağı kullanılarak X100 büyütmede incelendi. Morfoloji değerlendirmesi yaparken 100 sperm hücresi dikkate alındı. Her anomali ayrı ayrı not edildi.

5.4. KANDAN DNA İZOLASYONU

PLC ζ gen mutasyonlarını belirlemeyi amaçladığımız çalışmamızda bu infertil olguların erkek eşlerinden DNA izolasyonu amacıyla etilen diamin tetraasetik asitli (EDTA) tüplere kan alındı. Kan örneklerinden DNA izole edildi. DNA izolasyonu Fermentas-Genomic DNA Isolation Kit K0512 DNA izolasyon kiti kullanılarak yapıldı.

Aşamalar sırası ile aşağıdaki şekilde yapıldı;

1. Eppendorf tüpler içerisine 20 μ l Proteinaz K konuldu.
2. Proteinaz K üzerine 400 μ l Lysis solution eklendi.
3. EDTA'lı kan tüpleri ters yüz edilerek 200 μ l kan örneği alındı ve bu karışım üzerine pipetaj yapılarak eklendi.
4. Tüpler 56°C de, 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyondan sonra eppendorf tüpler içerisine %95'lik Etanol (EtOH) konulup iyice karıştırıldı ve karışım filtreli kolon tüplere aktarıldı.
6. Filtreli kolon tüpler 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve kolon tüplerdeki sıvı uzaklaştırıldı.
7. Filtreli tüpler yeni kolon tüplere yerleştirilip üzerine 500 μ l Wash Buffer I ilave edilerek 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

8. Santrifüj sonunda kolon tüpteki sıvı uzaklaştırılıp filtreli kısım kolon tüpe yerleştirildi ve üzerine 500 µl Wash Buffer II ilave edilerek 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Kolon tüpteki sıvı tekrar uzaklaştırıldı ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Filtreli tüpler temiz bir eppendorf tüp içerisine yerleştirilerek üzerine 100 µl Elution Buffer eklendi.
10. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi ve sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. İzole edilen DNA'lar -20°C'de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapılincaya kadar saklandı.

5.5. PLCÇ GENİNE AİT EKZONLARA ÖZGÜ PRİMER TASARIMI

PLCÇ geninin 15 ekzonu olup bu bölgeleri içine alan ileri ve geri primerler tasarlandı ve tüm primerler blast edildi. Primer tasarımında PrimerPlex 2, Premier Biosoft International programı kullanıldı. Ayrıca primer tasarımında daha önceden tanımlanmış olan H398P ve H233L mutasyonlarının da taranması sağlandı.

Liyofilize halde hazır gelen primerler (Metabion International AG) konsantrasyon miktarlarına göre sulandırılarak, her primerden 100 pmol (pikomol) stok primer elde edildi. PCR koşullarına göre bu stok primerlerden 10 pmol olacak şekilde primerler ayrıldı ve -20°C'de PCR yapılincaya kadar saklandı.

Ekzon Numarası	İleri Primer	Geri Primer
PLC ζ - EKZON1	CATTCCATGAGCCACCTT	AACTGCCATTGTATCTCCTT
PLC ζ - EKZON2	GTTTCAAGGGCAGGGTAG	ATGACTTAATCCAGCAAAGCT
PLC ζ - EKZON3	CAATGACTTTCTGTGAGAATTTCC	TGTCTCCACTTTCATTTCTGATTT
PLC ζ - EKZON4	GTGAGCCCACCAGTCATTTT	GACCCATCCAAAAACGGTAA
PLC ζ - EKZON5	TGCTCTACTACTGAGTAAGT	TGGATAACATGGAGAGTCTT
PLC ζ - EKZON6	GACTAGCGAGAAAGACACA	TTCACTGCCTACTAATGGAT
PLC ζ - EKZON7	TGCTTCAGTTGTTCCCTATTC	ACAGGCCAATATAACAGTGA
PLC ζ - EKZON8-9	TTCAGTGACTGTTACAATGCA	CGTGCTCAGCCTAGAGAA
PLC ζ - EKZON10	CAAATGGTGTTTGAGGAGAT	CCACATCGGACATTCTCA
PLC ζ - EKZON11	TCCTTGAATGATCAGTGTAC	AACCCAGATAGGAATGACTT
PLC ζ - EKZON12	ATATAGACATGGCAGGAGAA	TAGAAGGATGCTGGAATACT
PLC ζ - EKZON13	GTGGACATTGTGGATTTCA	GCTTTCCAACAAGAAGTCTA
PLC ζ - EKZON14	GTCTGGTTATTATTCCTCTCAC	CACCTTCCACATGAGAACA
PLC ζ - EKZON15	GGCAGTTAGGAAGTCAGAAT	GCAGGAGAAATCAGCAAAC

Tablo 2: PLC ζ ekzonlarını kapsayan primerlerin sekans bilgileri.

5.6. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Kan örneklerinden DNA izolasyonu ile elde edilen DNA'lar kullanılarak PCR karışımı hazırlandı. PCR için Nanohelix, HelixAmp™ T5000N Kiti kullanıldı. Bu amaçla her örneğin her ekzonu için; 13,7 µl H₂O, 5 µl Helix Reaction Buffer, 5 µl 5X Tune Up, 1 µl dNTP mix, 0,3 µl Helix Amp Taq Polimeraz, her bir primerden 1µl ve örneklerden elde edilen 3 µl DNA eklendi.

DNA'ların amplifikasyonları PCR cihazı (Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700, Amerika) kullanılarak 95°C'de 2 dakika ve 35 döngü 95°C'de 20 saniye – 55°C'de 40 saniye – 72°C'de 1 dakika ve 72°C'de 5 dakika olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi.

PCR ürünlerinin kontrolü %2'lik agaroz içeren agaroz jel elektroforezinde yapıldı. DNA bantları ultraviyole (UV) ışığı altında etidyum bromür (EtBr) varlığında gözlemlendi. İlluminator (Loccus Biotechnologia, Brezilya) üzerinde görüntülenip kaydedildi. PCR işleminin tüm aşamalarında her örneğin her ekzonu için bir pozitif ve bir negatif kontrol kullanıldı.

5.7. PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE ANALİZİ

PCR ürünleri EtBr varlığında agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Jel hazırlamak için %2'lik agaroz (Prona Biomax Agarose) 1X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) (10X Thermo Scientific Electroforesis Buffer) ile karıştırıldıktan sonra ısıtılarak eritildi. 50-60°C'ye kadar soğutuldu ve 10 µl EtBr eklenerek karıştırıldı. Karışım jel tankına (Thermo EC Midicell PRİMO EC330, Amerika) döküldü. Örneklerin incelenebilmesi için kuyucuklar açılması amacıyla tarak yerleştirildi. Jelin katılaşması için 30 dakika bekletildikten sonra tarak çıkarıldı ve tank elektroforez tampon solüsyonu (1X TBE) ile dolduruldu. PCR ürünü, yükleme boyası ile karıştırılarak otomatik pipetle kuyucuklara yüklendi. Aynı zamanda markerda üç farklı kuyucuğa yüklendi. Elektroforez tampon içinde 150 volt akımla 15 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Jel UV ışık kaynağı (Vilber Lourmat, Fransa) altında incelenerek DNA bantları olup olmadığı incelendi.

5.8. PCR ÜRÜNLERİNİN PURİFİKASYONU

PCR ürünlerinin purifikasyonu için ExoSAP-IT PCR Clean Up (USB Products Affymetrix, P/N: 78200) protokolü uygulandı. Purifikasyon amacıyla; 5 µl PCR ürünü 2 µl ExoSAP-IT ile karıştırıldı. Karışım 37°C'de 15 dakika ve 80°C'de 15 dakika olmak üzere PCR cihazında inkübe edildi.

5.9. SEKANS PCR (BigDye) PROTOKOLÜ

Sekans PCR işleminde Sanger-Coulson Zincir Sonlama Yöntemi uygulandı ve işlemde Applied Biosystem-BigDye® Terminator v3.1Cycle Sequencing Kit'i kullanıldı. Her hasta için sırasıyla 8,5 µl H₂O, 6 µl 5X buffer, 2 µl sequencing mix, 0,75 µl ileri primer ve 2,75 µl purifiye edilen PCR ürününden konuldu. PCR cihazında 96°C'de 1 dakika, 25 döngü 96°C'de 10 saniye – 50°C'de 5 saniye – 60°C'de 4 dakika ve +4°C'de birkaç dakika inkübe edildi. Sodyum asetat (NaOAc) purifikasyonuna kadar da +4°C'de inkübe edildi.

5.10. SODYUM ASETAT PURİFİKASYONU

Sekans PCR uygulaması sonucunda NaOAc purifikasyonu aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Sekans PCR ürünü üzerine 2 µl (3 mM, pH: 4,6) NaOAc eklendi.
2. Bu karışım üzerine 50 µl %95'lik EtOH eklenerek 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı ve elle hafifçe vurularak karıştırıldı.
3. Buz üzerinde 15 dakika inkübe edildi ve süre sonunda hiç bekletmeden 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant çekilerek atıldı ve üzerine 250 µl %70'lik EtOH eklendi ve elle hafifçe vurularak karışması sağlandı.
5. 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
6. Liyofilize hale gelen DNA'lar üzerine 20 µl formamid (Amresco, Formamide, Deionized) eklendi ve 3 saniye vortekslendi.

7. 95°C’de 5 dakika denatüre edildi. Hemen buz üzerine alınıp 2 dakika bekletildikten sonra sekans cihazına yüklemeye hazır hale geldi.

Ürünler sekans cihazına (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Amerika) 20 µl üzerine 5 µl H₂O eklenerek cihaza yüklendi. Sekans cihazı ile hedef bölgeler okunarak dizi üzerindeki değişiklikler değerlendirildi. H398P ve H233L mutasyonları da bu yolla belirlendi.

5.11. İMMUNFLORESAN TAKİBİ

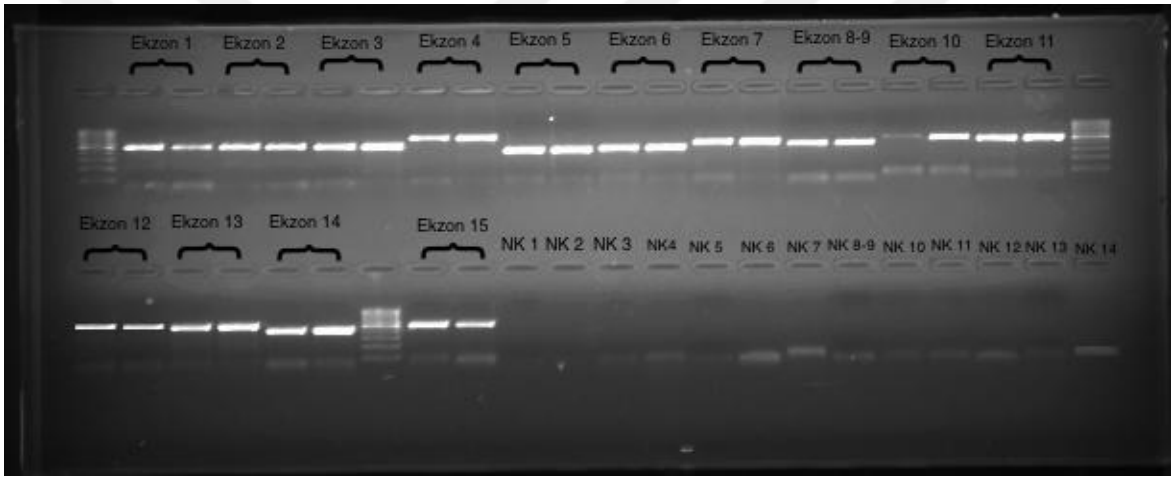
Sperm hücreleri soğuk paraformaldehit ile 10 dakika fikse edildi (%4 - pH: 7,4). Ardından 1XPBS ile 3x10 dakika yıkanarak fiksatiften arındırıldı. Permeabilizasyon için, hücreler 0.25 % Trt X-100/1X PBS solüsyonu ile 10 dakika inkübe edildi. Ardından bloke solüsyonu (%1 – 0,25 BSA/1X PBS) ile 30 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. Hücreler; 1:50 oranında PBS ile sulandırılan PLCζ antikoru (PLCZ1 Antibody, Alexa Fluor 488, Katalog No: ABIN911374) ile +4°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. 3x10 dakika PBS ile yıkandı. 0.02 µg/ml (20 µM) DAPI 1X TBS ile muamele edildi ve hemen lamelle kapatıldı. Floresan mikroskobunda (Olympus BX51, Japonya) görüntü alındı.

6. BULGULAR

6.1. PCR VE SEKANS ANALİZİ BULGULARI

6.1.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Analizi Bulguları

PLC ζ geninin 15 ekzonuna ait PCR ürünlerinin 100 baz çiftlik ladder kullanılarak alınan agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 12'deki gibidir.



Şekil 12. PLC ζ geninin 15 ekzonuna ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

6.1.2. Sekans Analizi Bulguları

6.1.2.1. PLC ζ Geninin 15 Ekzonunun Sekans Analizi Bulguları

Sekans cihazı (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Amerika) ile yapılan analiz sonucu, hastalarda değişim olan ekzonlar ve bu ekzonlarda meydana gelen değişimler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda meydana gelen değişimler ve bu değişimlerin gruplar arası karşılaştırılması ise Tablo 4'te gösterilmiştir.

Değişim Olan Bölge	Meydana gelen değişim/değişimler	Rs	Kromozom pozisyonu	Referans Alel %	Alternatif Alel %
	<i>Hasta 1, globozoospermik</i>				
İntron 5	c.18594 C>G Homozigot Değişimi	10841078	chr12: 18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 8	c.36370_36378delGGAGGAGGA Homozigot DeğişimiTCCTCCTCC	11279217	chr12: 18854541	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron11	c.41659_41662delTATATATA Homozigot Değişimi	149450833	chr12: 18849257	Bildirim yok	Bildirim yok
	c.41696 A>G Heterozigot Değişimi	-	chr12: 18849223	Bildirim yok	Bildirim yok
	c.41825 T>G Heterozigot Değişimi	-	chr12: 18849094	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 12	c.43191 T>G Homozigot Değişimi	12826151	chr12: 18847728	T: 60.63	G: 39.37
	<i>Hasta 2, globozoospermik</i>				
İntron 5	c.18594 C>G Heterozigot Değişimi	10841078	chr12: 18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 7	c.32547 G>C Homozigot Değişimi	1542681	chr12: 18858372	G: 90.88	C: 9.12
İntron 8	c.36370_36378delGGAGGAGGA Heterozigot Değişimi	11279217	chr12: 18854541	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron12	c.42788 A>G Homozigot Değişimi	1487070	chr12: 18848131	A: 50.76	G: 49.24
	c.43191 T>G Heterozigot Değişimi	12826151	chr12: 18847728	T: 60.63	G: 39.37
	<i>Hasta 3, TFF</i>				
İntron 6	c.24970 A>G Heterozigot Değişimi	-	chr12:18865949	Bildirim yok	Bildirim yok

Tablo 3: Hastalarda değişim olan ekzonlar ve bu ekzonlarda meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonuçları.

Değişim Olan Bölge	Meydana gelen değişim/değişimler	Rs	Kromozom pozisyonu	Referans Alel %	Alternatif Alel %
	<i>Hasta 4, %89 nükleer anomali</i>				
Ekzon 6	c.25019 G>A Heterozigot Değişimi p.R197H CSM1220993	-	chr12:18865900	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 7	c.32547 G>C Homozigot Değişimi	1542681	chr12:18858372	G: 90.88	C: 9.12
İntron 12	c.42788 A>G Homozigot Değişimi	1487070	chr12:18848131	A: 50.76	G: 49.24
	<i>Hasta 5, total immotil</i>				
İntron 5	c.18594 C>G Homozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 8	c.36370_36378delGGAGGAGGA Homozigot Değişimi	11279217	chr12:18854541	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 12	c.43191 T>G Homozigot Değişimi	12826151	chr12:18847728	T: 60.63	G: 39.37
	<i>Hasta 6, total immotil</i>				
İntron 5	c.18594 C>G Heterozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 8	c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Heterozigot Değişimi	-	chr12:18854541- chr12:18854552	Bildirim yok	Bildirim yok

Tablo 3: Hastalarda değişim olan ekzonlar ve bu ekzonlarda meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonuçları (devamı).

Değişim Olan Bölge	Meydana gelen değişim/değişimler	Rs	Kromozom pozisyonu	Referans Alel %	Alternatif Alel %
	<i>Hasta 7, %54 nükleer anomali</i>				
Ekzon3-İntron3 bağlantısında	c.1766 T>A Homozigot Değişimi	-	chr12:18889153	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 3	c.1793 C>T Heterozigot Değişimi	71463003	chr12:18889126	C: 99.23	T: 0.77
İntron 3	c.1841 T>G Heterozigot Değişimi	-	chr12:18889078	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 3	c.1892 A>G Heterozigot Değişimi	-	chr12:18889027	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 7	c.32529 A>G Heterozigot Değişimi	-	chr12:18858390	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 8	c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Homozigot Değişimi	-	chr12:18854541- chr12:18854552	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 10	c.37978_37979del AA Homozigot Değişimi	-	chr12:18852940	Bildirim yok	Bildirim yok
Ekzon 12	c.42933 T>G Heterozigot Değişimi p.L440R	-	chr12:18847986	Bildirim yok	Bildirim yok
Ekzon 13	c.49804 C>T Heterozigot Değişimi p.S500L	10505830	chr12:18841115	C: 96.85	T: 3.15
	<i>Hasta 8, TFF</i>				
İntron 8	c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Heterozigot Değişimi	-	chr12:18854541- chr12:18854552	Bildirim yok	Bildirim yok
Ekzon 12	c.42933T>G Heterozigot Değişimi p.L440R	-	chr12:18847986	Bildirim yok	Bildirim yok

Tablo 3: Hastalarda değişim olan ekzonlar ve bu ekzonlarda meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonuçları (devamı).

Değişim Olan Bölge	Meydana gelen değişim/değişimler	Rs	Kromozom pozisyonu	Referans Alel %	Alternatif Alel %
	<i>Hasta 9, globozoospermik</i>				
İntron 5	c.18594 C>G Homozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 8	c.36370_36378delGGAGGAGGA Homozigot Değişimi	11279217	chr12:18854541	Bildirim yok	Bildirim yok
Ekzon 12	c.42933 T>G Heterozigot Değişimi p.L440R	-	chr12:18847986	Bildirim yok	Bildirim yok
	<i>Hasta 10, TFF</i>				
İntron 5	c.18594 C>G Heterozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 8	c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Heterozigot Değişimi	-	chr12:18854541- chr12:18854552	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 10	c.37978_37979del AA Heterozigot Değişimi	-	chr12:18852940	Bildirim yok	Bildirim yok
Ekzon 10	c.38052 T>G Heterozigot Değişimi p.I345I	-	chr12:18852867	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 10	c.38352 A>G Heterozigot Değişimi	-	chr12:18852567	Bildirim yok	Bildirim yok

Tablo 3: Hastalarda değişim olan ekzonlar ve bu ekzonlarda meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonuçları (devamı).

Değişim Olan Bölge	Meydana gelen değişim/değişimler	Rs	Kromozom pozisyonu	Referans Alel %	Alternatif Alel %
	<i>Hasta 11, globozoospermik</i>				
İntron 5	c.18594C>G Heterozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 7	c.32547G>C Homozigot Değişimi	1542681	chr12:18858372	G: 90.88	C: 9.12
İntron 8	c.36370_36378delGGAGGAGGA Homozigot Değişimi	11279217	chr12:18854541	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 10	c.37978_37979del AA Homozigot Değişimi	-	chr12:18852940	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 12	c.43191T>G Heterozigot Değişimi	12826151	chr12:18847728	T: 60.63	G: 39.37
	<i>Hasta 12, globozoospermik</i>				
İntron 3	c.1770A>G Heterozigot Değişimi	12300257	chr12:18889149	A: 72.89	G: 27.11
	c.2236A>G Heterozigot Değişimi	11044275	chr12:18888683	A: 65.13	G: 34.87
İntron 5	c.18594C>G Heterozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 7	c.32547G>C Homozigot Değişimi	1542681	chr12:18858372	G: 90.88	C: 9.12
İntron 8	c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Heterozigot Değişimi	-	chr12:18854541- chr12:18854552	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 11	c.41659_41666delTATATA Heterozigot Değişimi	149450833	chr12:18849257- 18849264	Bildirim yok	Bildirim yok

Tablo 3: Hastalarda değişim olan ekzonlar ve bu ekzonlarda meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonuçları (devamı).

Değişim Olan Bölge	Meydana gelen değişim/değişimler	Rs	Kromozom pozisyonu	Referans Alel %	Alternatif Alel %
	<i>Hasta 13, TFF</i>				
Ekzon 5	c.18415C>T Heterozigot Değişimi p.L144L	140550681	chr12:18872504	C: 99.97	T: 0.03
İntron 8	c.36334_36335ins AG Heterozigot Değişimi	-	chr12:18854507	Bildirim yok	Bildirim yok
Ekzon 13	c.49804C>T Heterozigot Değişimi p.S500L	10505830	chr12:18841115	C: 96.85	T: 3.15
	<i>Hasta 14, globozoospermik</i>				
İntron 3	c.1770A>G Heterozigot Değişimi	12300257	chr12:18889149	A: 72.89	G: 27.11
	c.2211A>T Homozigot Değişimi	191790993	chr12:18888708	A: 99.95	T: 0.05
	c.2236A>G Heterozigot Değişimi	11044275	chr12:18888683	A: 65.13	G: 34.87
İntron 5	c.18594C>G Heterozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 7	c.32547G>C Homozigot Değişimi	1542681	chr12:18858372	G: 90.88	C: 9.12
İntron 8	c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Heterozigot Değişimi	-	chr12:18854541- chr12:18854552	Bildirim yok	Bildirim yok

Tablo 3: Hastalarda değişim olan ekzonlar ve bu ekzonlarda meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonuçları (devamı).

Değişim Olan Bölge	Meydana gelen değişim/değişimler	Rs	Kromozom pozisyonu	Referans Alel %	Alternatif Alel %
	<i>Hasta 15, TFF</i>				
İntron 3	c.1719delA Homozigot Değişimi c.1770A>G Heterozigot Değişimi c.1793C>T Heterozigot Değişimi c.2236A>G Homozigot Değişimi	- 12300257 71463003 11044275	chr12:18889200 chr12:18889149 chr12:18889126 chr12:18888683	Bildirim yok A: 72.89 C: 99.23 A: 65.13	Bildirim yok G: 27.11 T: 0.77 G: 34.87
Ekzon 4	c.14587C>T Heterozigot Değişimi p.Q94X	138801851	chr12:18876332	C: 99.98	T: 0.02
İntron 7	c.32547G>C Homozigot Değişimi	1542681	chr12:18858372	G: 90.88	C: 9.12
İntron 8	c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Homozigot Değişimi	-	chr12:18854541 chr12:18854552	Bildirim yok	Bildirim yok
Ekzon 13	c.49804C>T Heterozigot Değişimi p.S500 L	10505830	chr12:18841115	C: 96.85	T: 3.15
	<i>Hasta 16, globozoospermik</i>				
İntron 5	c.18594 C>G Homozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 7	c.32547G>C Homozigot Değişimi	1542681	chr12:18858372	G: 90.88	C: 9.12
İntron 8	c.36370_36378delGGAGGAGGAGGA Homozigot Değişimi	11279217	chr12:18854541	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 10	c.37978_37979del AA Homozigot Değişimi	-	chr12:18852940	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 11	c.41655_41662delTATATA Homozigot Değişimi	149450833	chr12:18849257	Bildirim yok	Bildirim yok
Ekzon 12	c.42933T>G Heterozigot Değişimi p.L440R	-	chr12:18847986	Bildirim yok	Bildirim yok

Tablo 3: Hastalarda değişim olan ekzonlar ve bu ekzonlarda meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonuçları (devamı).

Değişim Olan Bölge	Meydana gelen değişim/değişimler	Rs	Kromozom pozisyonu	Referans Alel %	Alternatif Alel %
	<i>Hasta 17, %95 immotil</i>				
İntron 2	c.408_409delTA Homozigot Değişimi	-	chr12:18890441	Bildirim yok	Bildirim yok
	c.439_442delAAAA Homozigot Değişimi	-	chr12:18890410	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 4	c.14483A>G Homozigot Değişimi	-	chr12:18876796	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 5	c.18594C>G Homozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 7	c.32547G>C Homozigot Değişimi	1542681	chr12:18858372	G: 90.88	C: 9.12
İntron8	c.36370_36378delGGAGGAGGA Homozigot Değişimi	11279217	chr12:18854541	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 12	c.43191T>G Homozigot Değişimi	12826151	chr12:18847728	T: 60.63	G: 39.37
	<i>Hasta 18, TFF</i>				
İntron 5	c.18594C>G Heterozigot Değişimi	10841078	chr12:18872325	C: 57.58	G: 42.42
İntron 6	c.24821C>T Homozigot Değişimi	-	chr12:18866098	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 7	c.32547G>C Heterozigot Değişimi	1542681	chr12:18858372	G: 90.88	C: 9.12
Ekzon 8	c.36251A>G Heterozigot Değişimi p.T303A	-	-	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 11	c.41655_41662delTATATA Homozigot Değişimi	149450833	chr12:18849257	Bildirim yok	Bildirim yok
İntron 12	c.43191T>G Heterozigot Değişimi	12826151	chr12:18847728	T: 60.63	G: 39.37

Tablo 3: Hastalarda değişim olan ekzonlar ve bu ekzonlarda meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonuçları (devamı).

Kromozom pozisyonu	RS	Türü	Meydana gelen değişim/değişimler	TFF (6)	Globozoospermik (7)	Nükleer anomali (2)	İmmotil (3)
chr12:18872325	10841078	İntron	c.18594 C>G Homozigot Değişimi	2	7	-	3
chr12:18854541	11279217	İntron	c.36370_36378delGGAGGAGGA Homozigot Değişimi	-	5	-	3
chr12:18849257	149450833	İntron	c.41659_41662delTATATATA Homozigot Değişimi	-	1	-	-
chr12:18849223	-	İntron	c.41696 A>G Heterozigot Değişimi (intronik 42369)	-	1	-	-
chr12:18849094	-	İntron	c.41825 T>G Heterozigot Değişimi	-	1	-	-
chr12:18847728	12826151	İntron	c.43191 T>G Homozigot Değişimi	1	3	-	2
chr12:18858372	1542681	İntron	c.32547 G>C Homozigot Değişimi	2	5	1	1
chr12:18848131	1487070	İntron	c.42788 A>G Homozigot Değişimi	-	1	1	-
chr12:18865949	-	İntron	c.24970 A>G Heterozigot Değişimi	1	-	-	-
chr12:18865900	-	Ekzon	c.25019 G>A Heterozigot Değişimi p.R197H CSM1220993	-	-	1	-
chr12:18854541 chr12:18854552	-	İntron	c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Heterozigot Değişimi	3	1	-	1
chr12:18854541 chr12:18854552	-	İntron	c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Homozigot Değişimi	-	-	1	1

Tablo 4: Çalışmaya dahil edilen hasta gruplarında meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonucu ve karşılaştırılması.

Kromozom pozisyonu	RS	Türü	Meydana gelen değişim/değişimler	TFF (6)	Globozoospermik (7)	Nükleer anomali (2)	İmmotil (3)
chr12:18889153	-	Ekzon/ İntron	c.1766 T>A Homozigot Değişimi	-	-	1	-
chr12:18889126	71463003	İntron	c.1793 C>T Heterozigot Değişimi (TTAGTCT)	1	-	1	-
chr12:18889078	-	İntron	c.1841 T>G Heterozigot Değişimi	-	-	1	-
chr12:18889027	-	İntron	c.1892 A>G Heterozigot Değişimi	-	-	1	-
chr12:18858390	-	İntron	c.32529 A>G Heterozigot Değişimi	-	-	1	-
chr12:18852940	-	İntron	c.37978_37979del AA Homozigot Değişimi	1	2	1	-
chr12:18847986	-	Ekzon	c.42933 T>G Heterozigot Değişimi p.L440R	1	2	1	-
chr12:18841115	10505830	Ekzon	c.49804 C>T Heterozigot Değişimi p.S500L	2	-	1	-
chr12:18852867	-	Ekzon	c.38052 T>G Heterozigot Değişimi p.I345I	1	-	-	-
chr12:18852567	-	İntron	c.38352 A>G Heterozigot Değişimi	1	-	-	-
chr12:18889149	12300257	İntron	c.1770 A>G Heterozigot Değişimi	1	2	-	-
chr12:18888683	11044275	İntron	c.2236 A>G Heterozigot Değişimi	1	2	-	-

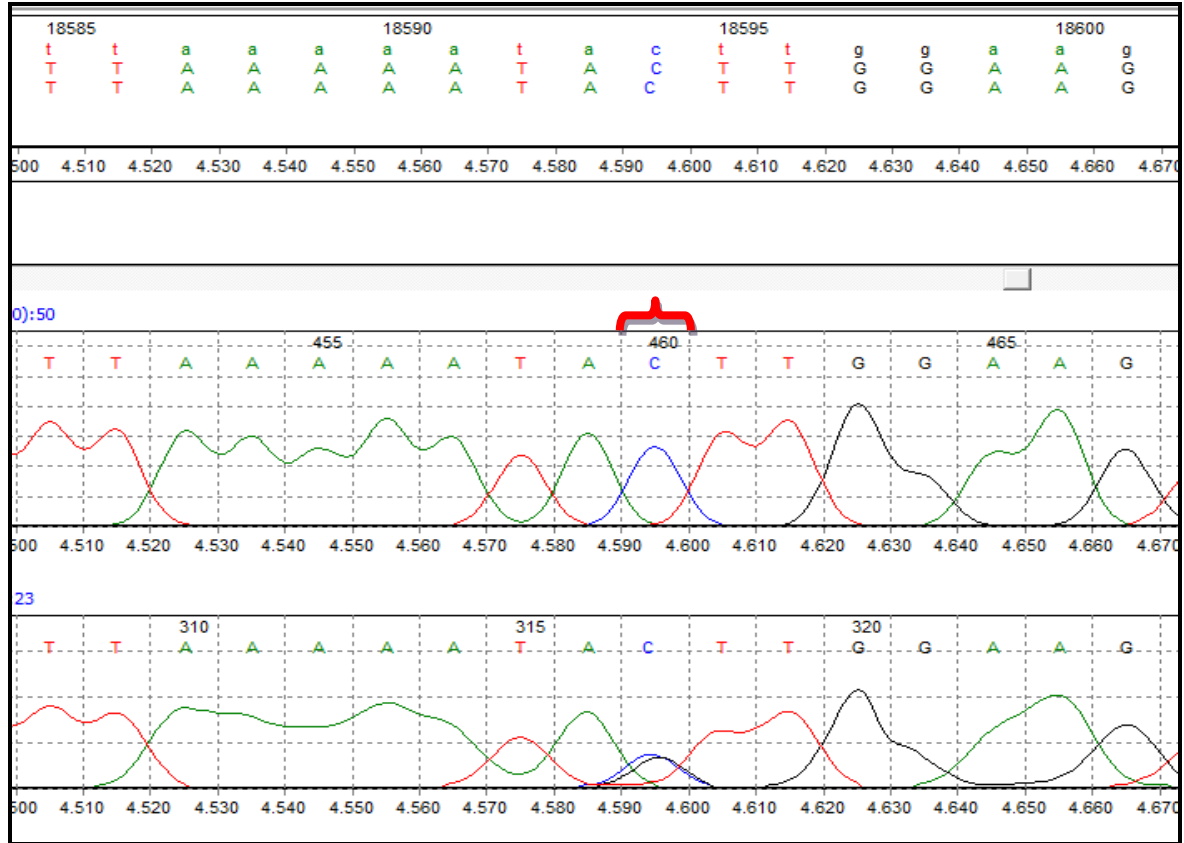
Tablo 4: Çalışmaya dahil edilen hasta gruplarında meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonucu ve karşılaştırılması (devamı).

Kromozom pozisyonu	RS	Türü	Meydana gelen değişim/değişimler	TFF (6)	Globozoospermik (7)	Nükleer anomali (2)	İmmotil (3)
chr12:18872504	140550681	Ekzon	c.18415 C>T Heterozigot Değişimi p.L144L	1	-	-	-
chr12:18854507	-	İntron	c.36334_36335insKAG het	1	-	-	-
chr12:18888708	191790993	İntron	c.2211 A>T Homozigot Değişimi	-	1	-	-
chr12:18889200	-	İntron	c.1719delA Homozigot Değişimi	1	-	-	-
chr12:18876332	138801851	Ekzon	c.14587 C>T Heterozigot Değişimi p.Q94X	1	-	-	-
chr12:18890441	-	İntron	c.408_409delTA Homozigot Değişimi	-	-	-	1
chr12:18890410	-	İntron	c.439_442delAAAA Homozigot Değişimi	-	-	-	1
chr12:18876796	-	İntron	c.14483 A>G Homozigot Değişimi	-	-	-	1
chr12:18866098	-	İntron	c.24821C>T Homozigot Değişimi	1	-	-	-
-	-	Ekzon	c.36251A>G Heterozigot Değişimi p.T303A	1	-	-	-

Tablo 4: Çalışmaya dahil edilen hasta gruplarında meydana gelen değişimlerin sekans analizi sonucu ve karşılaştırılması (devamı).

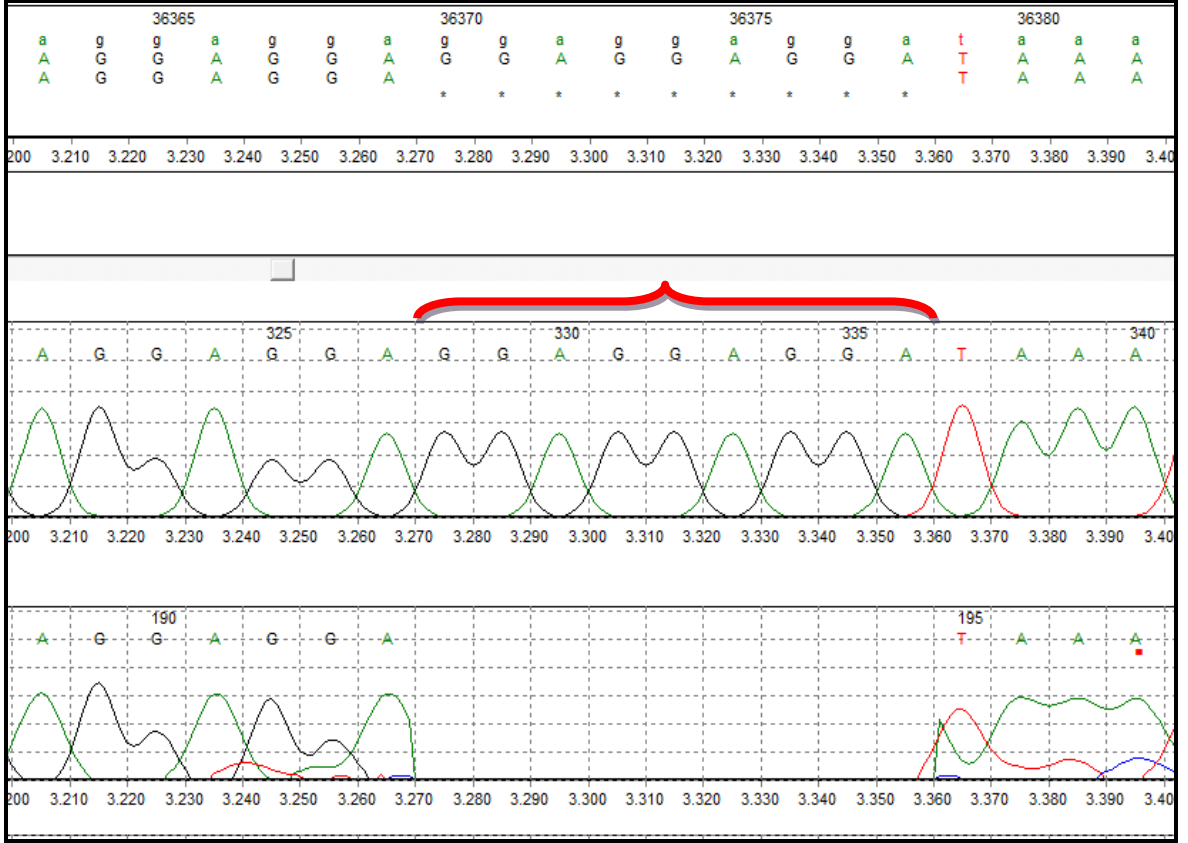
6.1.2.2. PLCÇ Genindeki Polimorfizm Tarama Görüntüleri

PLCÇ geninde bulunan 15 ekzonu içine alan ampikonlarda Mutation Surveyor DNA Varyant Analysis Software ile yapılan sekans okuma sonuçları ve görüntüleri aşağıdaki gibidir.



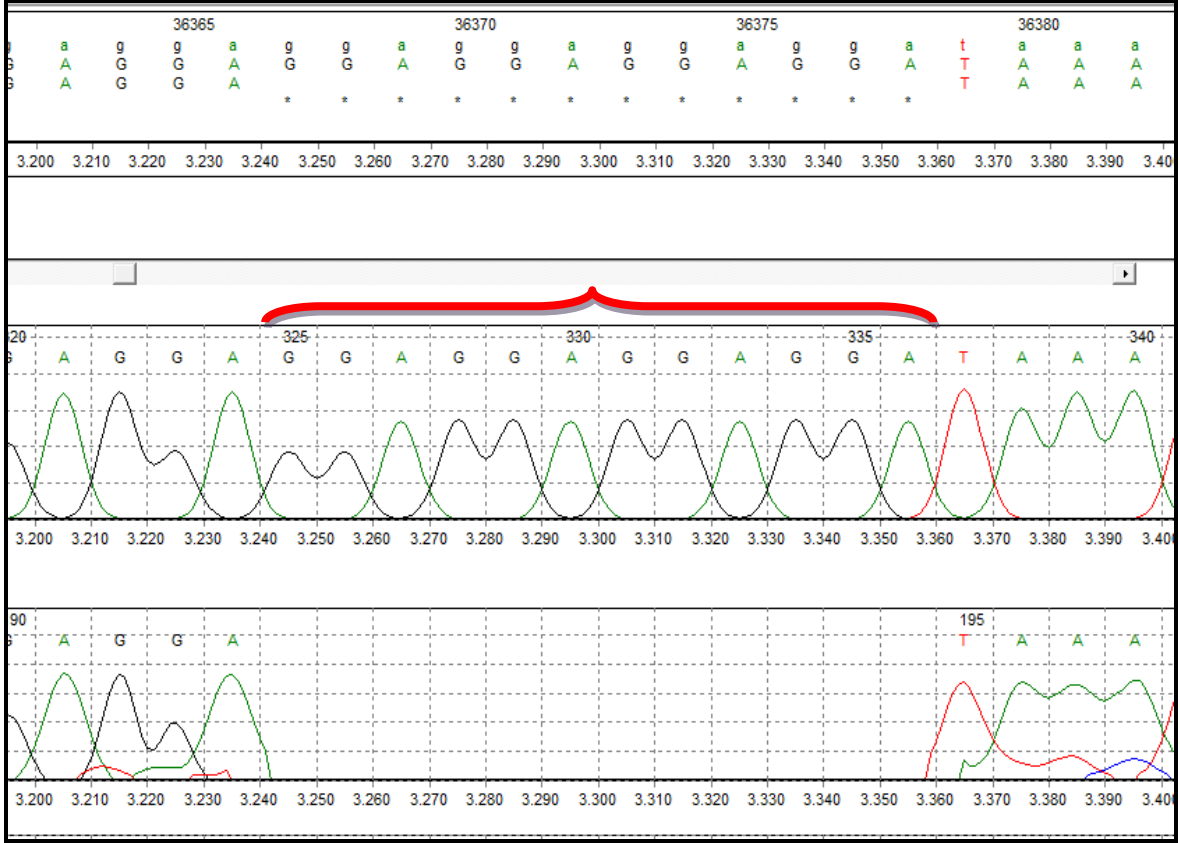
Şekil 13.1. 2., 6., 10., 11., 12., 14. ve 18. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü. c.18594C>G Heterozigot Değişikliği. İtron 5-6, IVS5-40, (rs 10841078).

Alel frekansları: C: %42,418; G: %57,582. Alternatif alelin görülme oranı çalışılmış tüm toplumlarda %5'in üzerindedir. Bu durum bu değişikliğin nadir bir polimorfizm olmadığını göstermektedir. Bu durum bu değişikliğin fonksiyonel olma şansını azaltmaktadır.



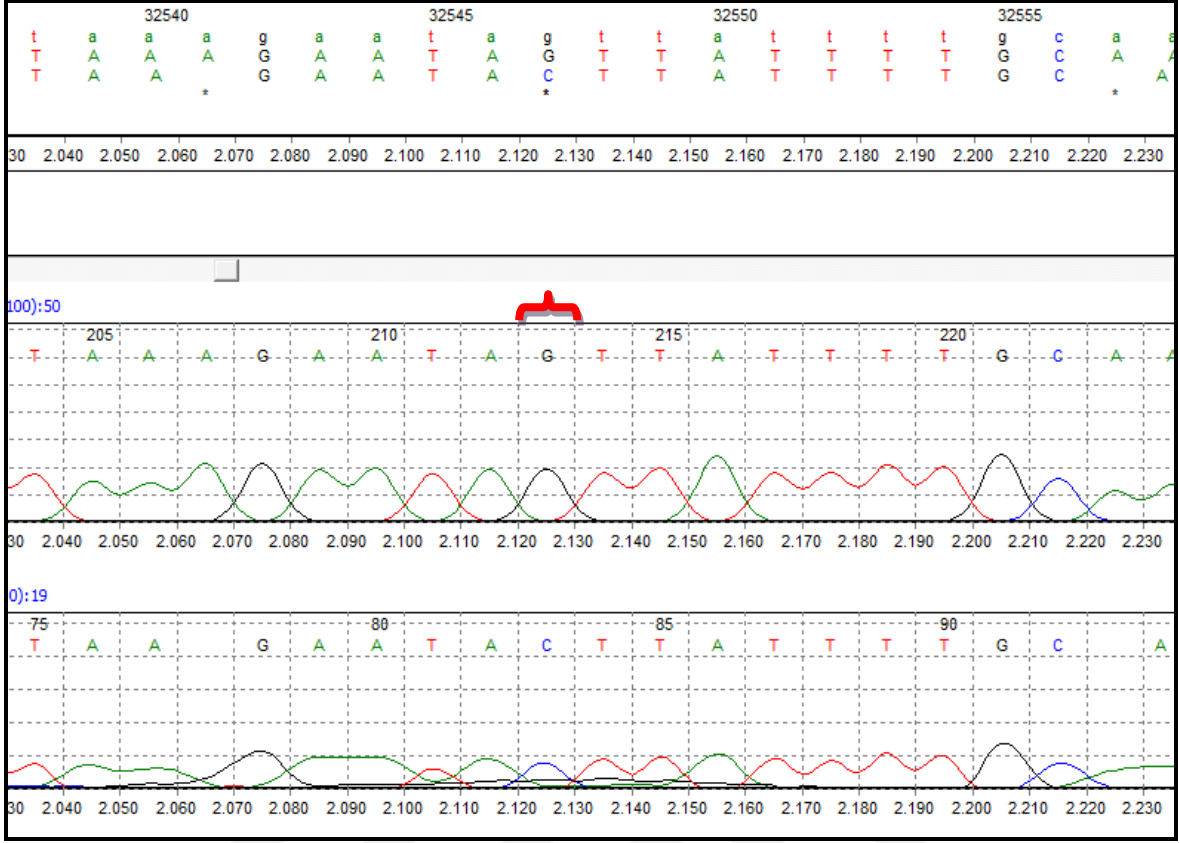
Şekil 13.2. 1.,5., 9., 11., 16. ve 17. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü. c.36370_36378delGGAGGAGGA Homozigot Değişikliği. İtron 8.

Alel frekansları: Bildirilmemiştir. Polimorfizmin introndaki 50 bazlık GGA tekrar bölgesindeki birçok polimorfizmden biri olması fonksiyonel bir etkisi olma olasılığını düşürmektedir.



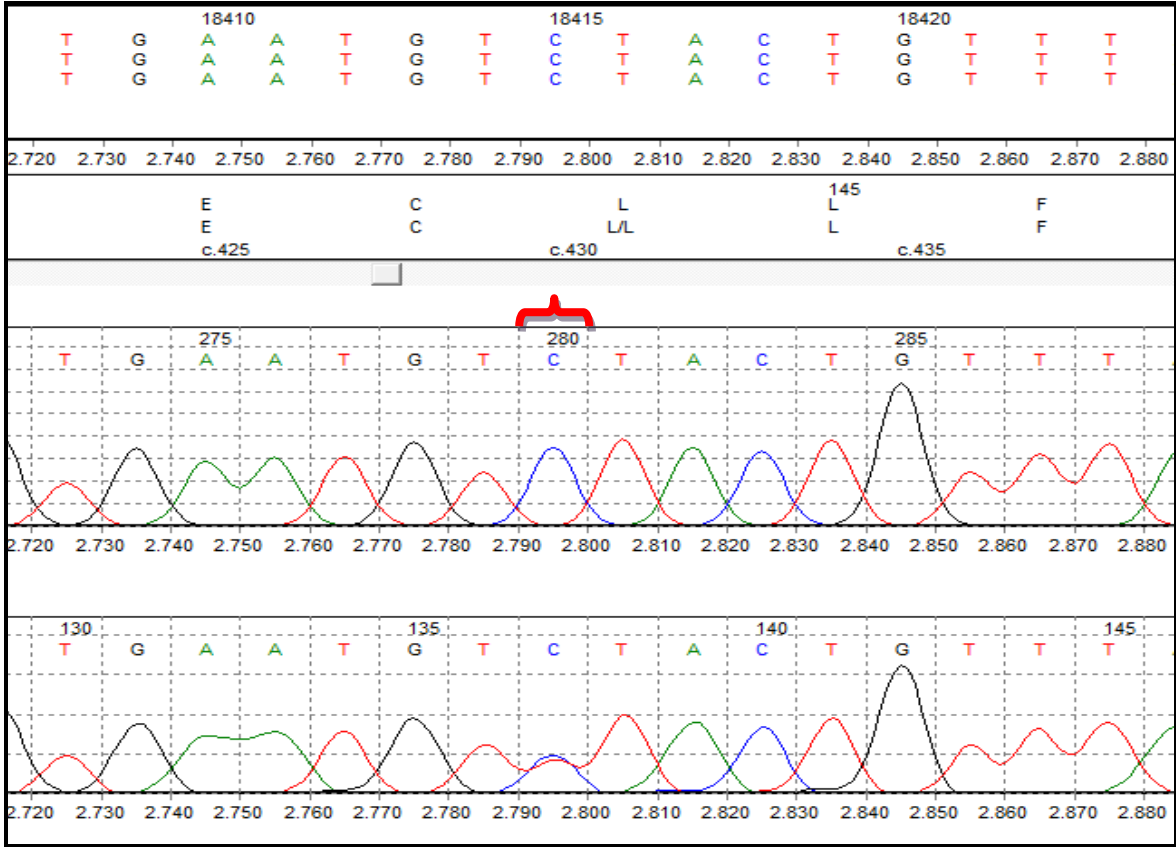
Şekil 13.3. 7. ve 15. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü. c.36367_36378delGGAGGAGGAGGA Homozigot Değişikliği. İtron 8-9.

Allel frekansları: Bildirilmemiştir. Şekil13.2'deki delesyon bölgesi ile aynı bölgede bulunmakta olup bu delesyonun farklı bir polimorfizm olmama ihtimali vardır.



Şekil 13.4. 2., 4., 11., 12.,14., 15., 16. ve 17. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü. c.32547G>C Homozigot Değişikliği. İntron 6-7, (rs1542681).

Allel frekansları: G: %90,878; C: %9,122. Alternatif alelin görülme oranı çalışılmış tüm toplumlarda %5'in üzerindedir. Homozigot CC değişim oranı literatürde bildirilmemiştir.



Şekil 13.5. a) 13. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.18415C>T Heterozigot Değişikliği, p.L144L. Ekzon 5, (rs140550681).

RMYRY

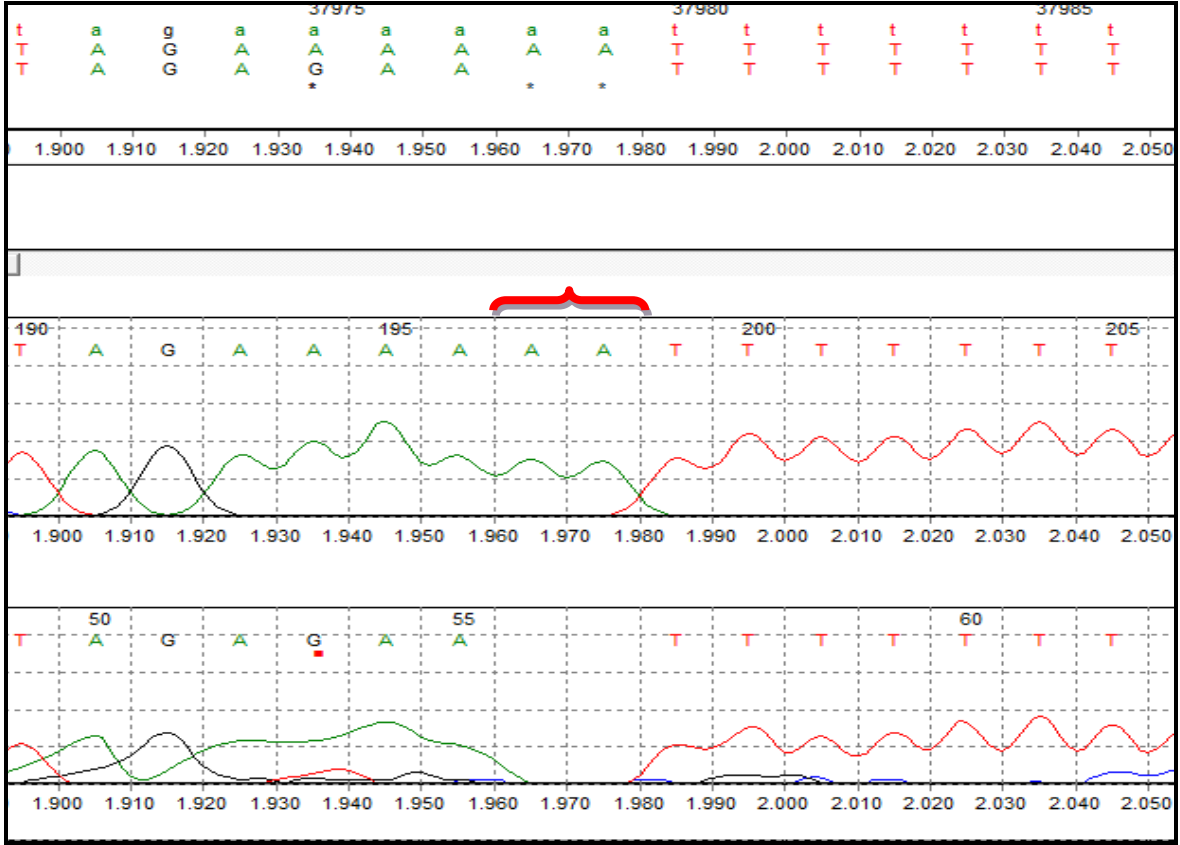
661 GGTTTTACAAGATACATGGATTCCACGTGAATGTCTACTGTTTAAAAATGAATGTAGAAAA

397 GGTTTTACAAGATACATGGATTCCACGTGAATGTCTACTGTTTAAAAATGAATGTAGAAAA

133 -G--F--T--R--Y--M--D--S--R--E--C--L--L--F--K--N--E--C--R--K-

Şekil 13.5. b) 13. hastadaki ekzon değişikliklerinin cDNA görüntüsü.

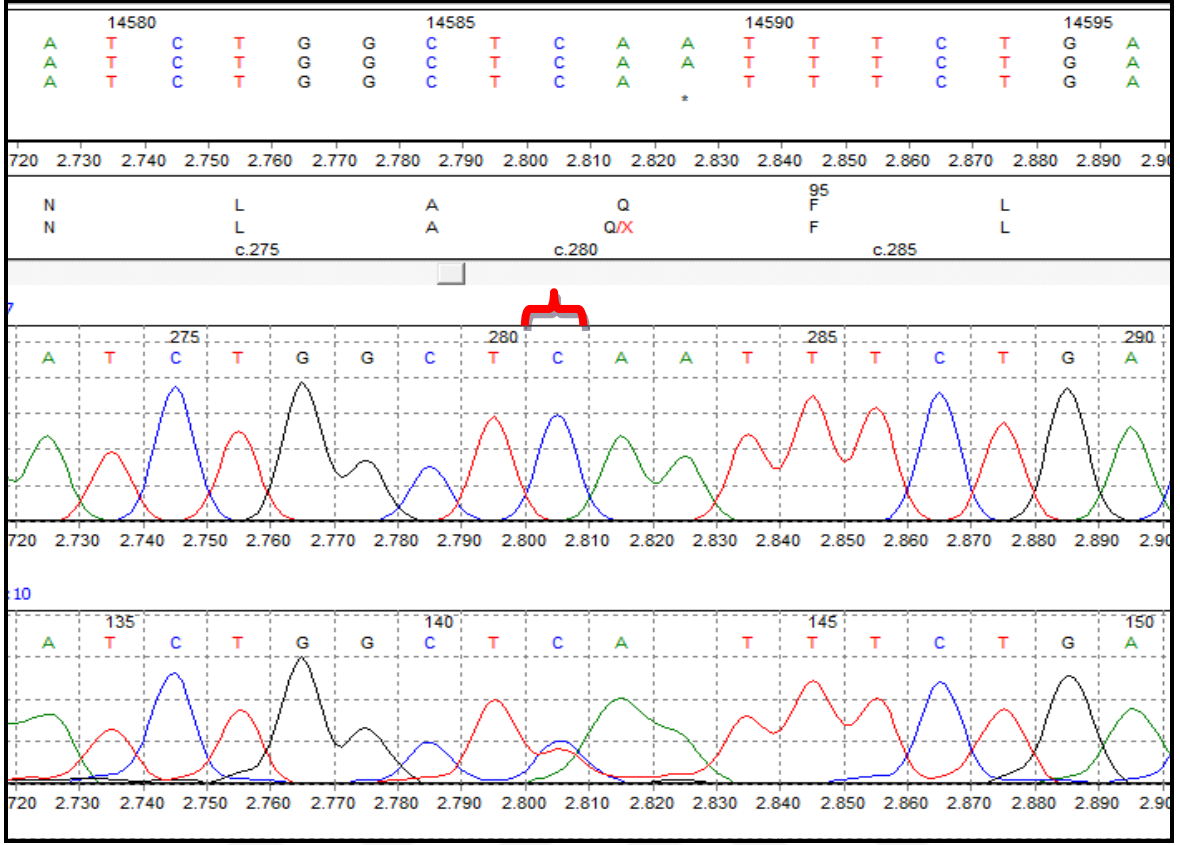
Alel frekansları: C: %99,97; T: %0,03. Saptanan ekzon bölgesindeki bu polimorfizm aminoasit değişikliğine neden olmamaktadır.



Şekil 13.6. 7., 11., ve 16. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.37978_37979del AA Homozigot Değişikliği. İtron 9.

Saptanan delesyon için literatürde bir bildirim bulunmamaktadır.



Şekil 13.7. a) 15. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.
c.14587C>T Heterozigot Değişikliği, p.Q94X. Ekzon 4, (rs138801851).

YKYK

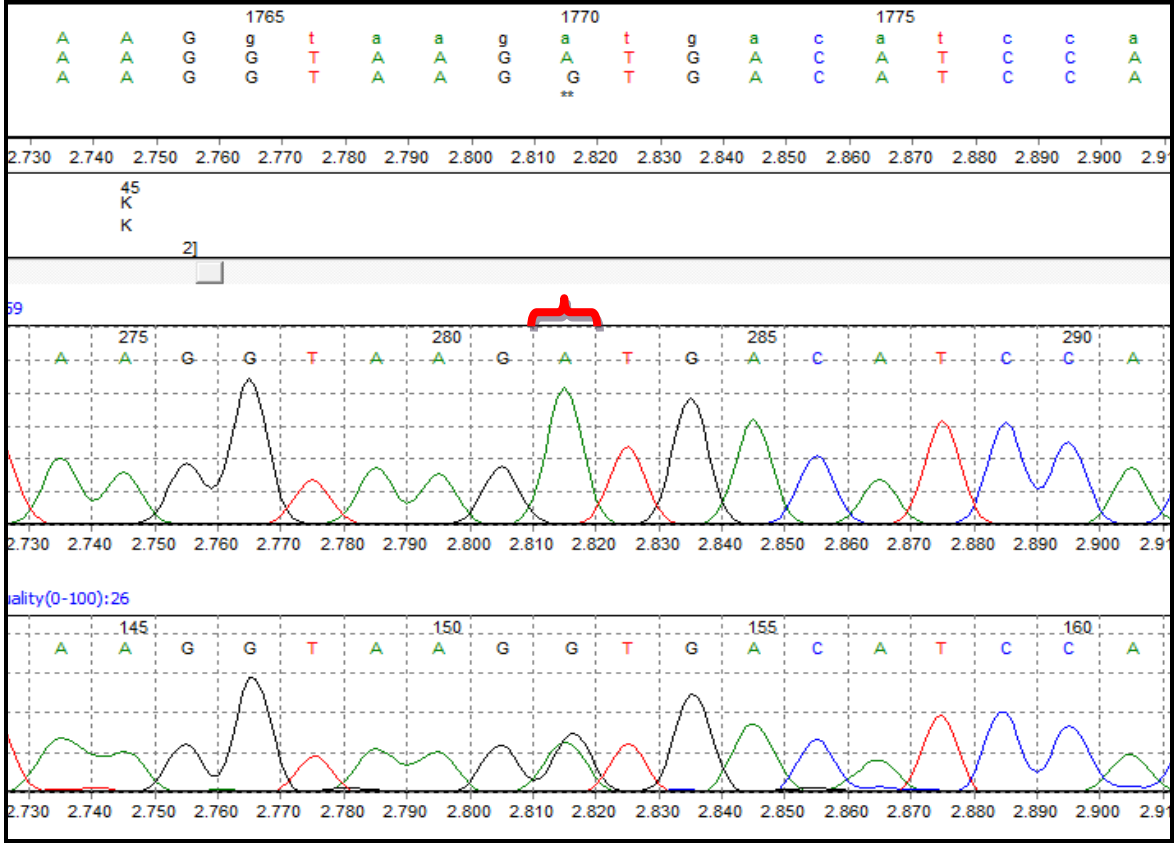
541 GCTCAAATTTCTGACACAAGAACAATATGCAGCTGAGATGAGTAAAGCTATTGCTTTGAG

277 GCTCAATTTCTGACACAAGAACAATATGCAGCTGAGATGAGTAAAGCTATTGCTTTGAG

93 -A--Q--F--L--T--Q--E--Q--Y--A--A--E--M--S--K--A--I--A--F--E-

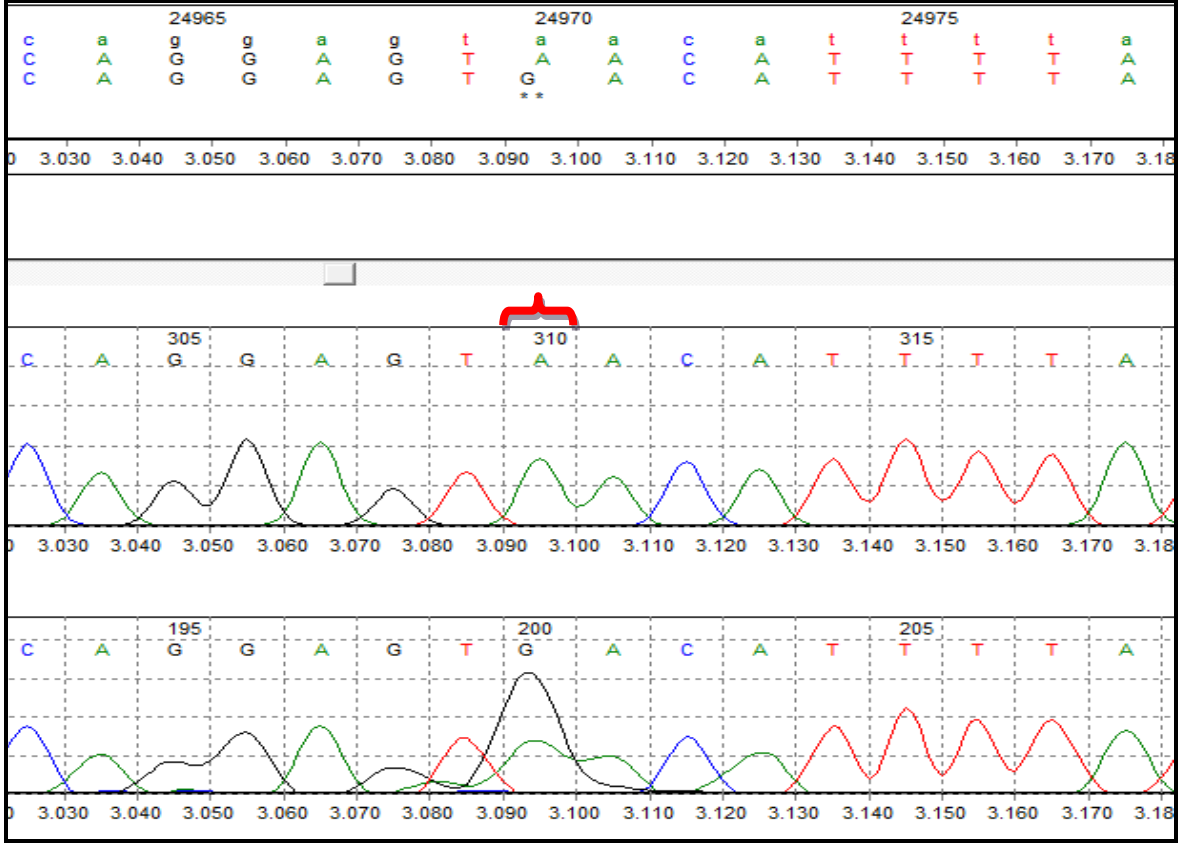
Şekil 13.7. b) 15. hastadaki ekzon değişikliklerinin cDNA görüntüsü.

Allel frekansları: C: %99,98; T: %0,02. Bu değişiklik anlamsız (nonsense) bir değişikliğe neden olmaktadır.



Şekil 13.8. 12., 14. ve 15. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.
c.1770A>G Heterozigot Değişikliği. İtron 3, IVS 3-6, (rs12300257).

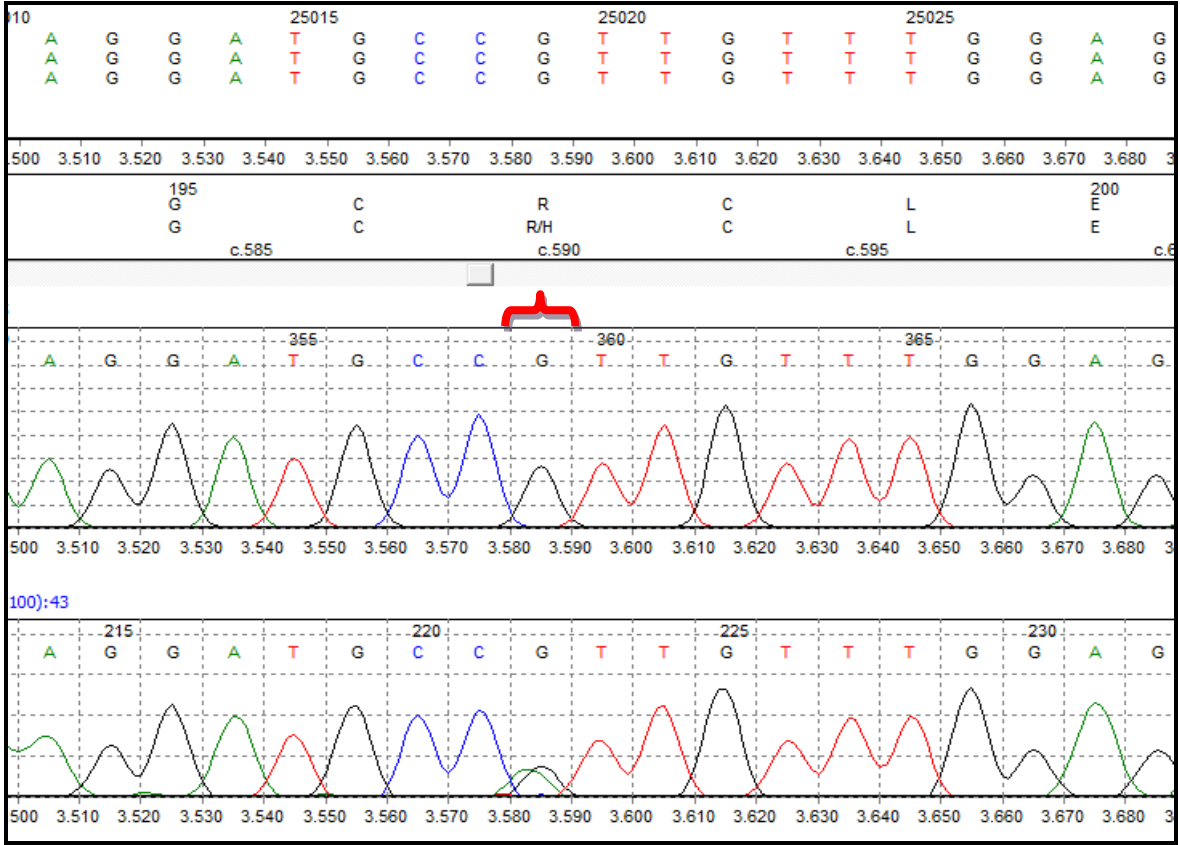
Alel frekansları: A: %72,89; G: %27,11. Alternatif alelin görülme oranı çalışılmış tüm toplumlarda %5'in üzerindedir. Bu durum bu değişikliğin nadir bir polimorfizm olmadığını göstermektedir.



Şekil 13.9. 3. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.24970A>G Heterozigot Değişikliği. İtron 5.

Bu değişiklik literatürde bulunmamaktadır.



Şekil 13.10. a) 4. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.25019G>A Heterozigot Değişikliği, p.R197H. Ekzon 6 (CSM1220993)

RWYWRYS

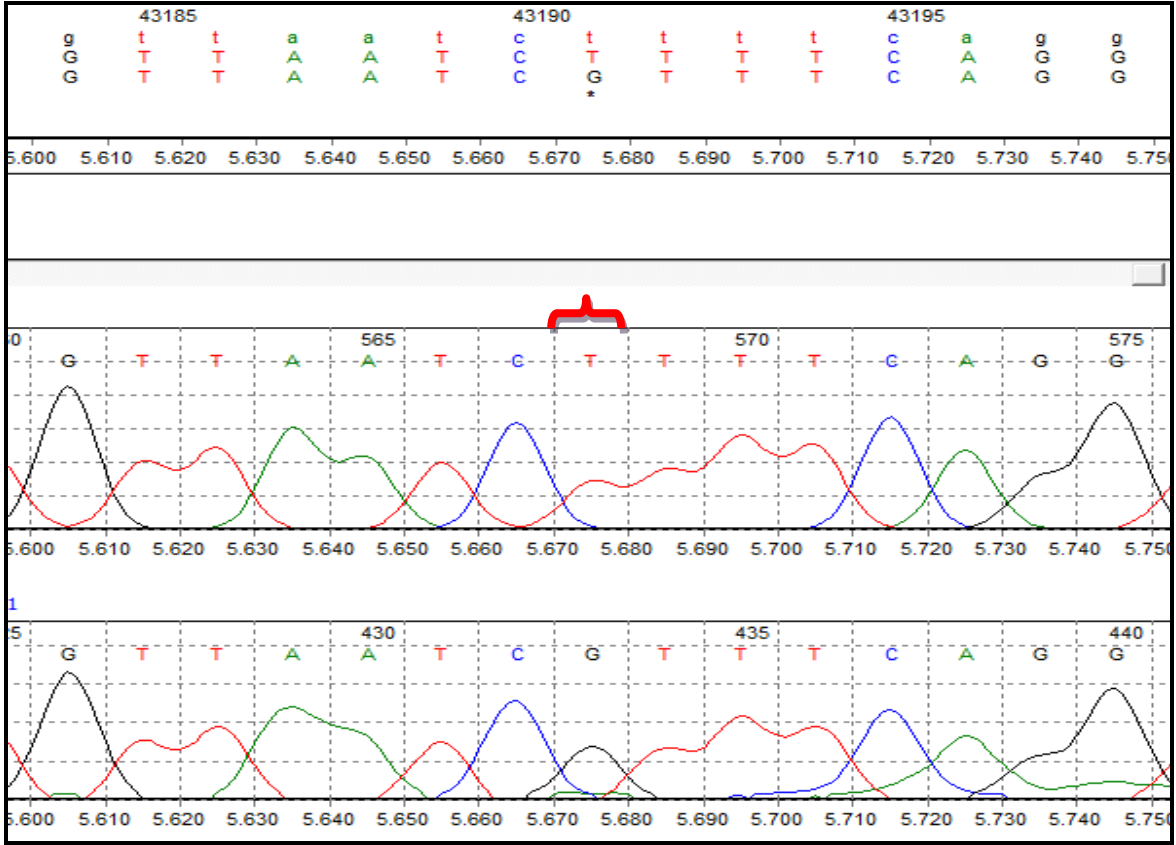
841 GTGAAAGGATGCCGTTGTTTGGAGATTGACTGCTGGGATGGAGCACAAAATGAACCTGTT

577 GTGAAAGGATGCCGTTGTTTGGAGATTGACTGCTGGGATGGAGCACAAAATGAACCTGTT

193 -V--K--G--C--R--C--L--E--I--D--C--W--D--G--A--Q--N--E--P--V-

Şekil 13.10. b) 4. hastadaki ekzon değişikliklerinin cDNA görüntüsü.

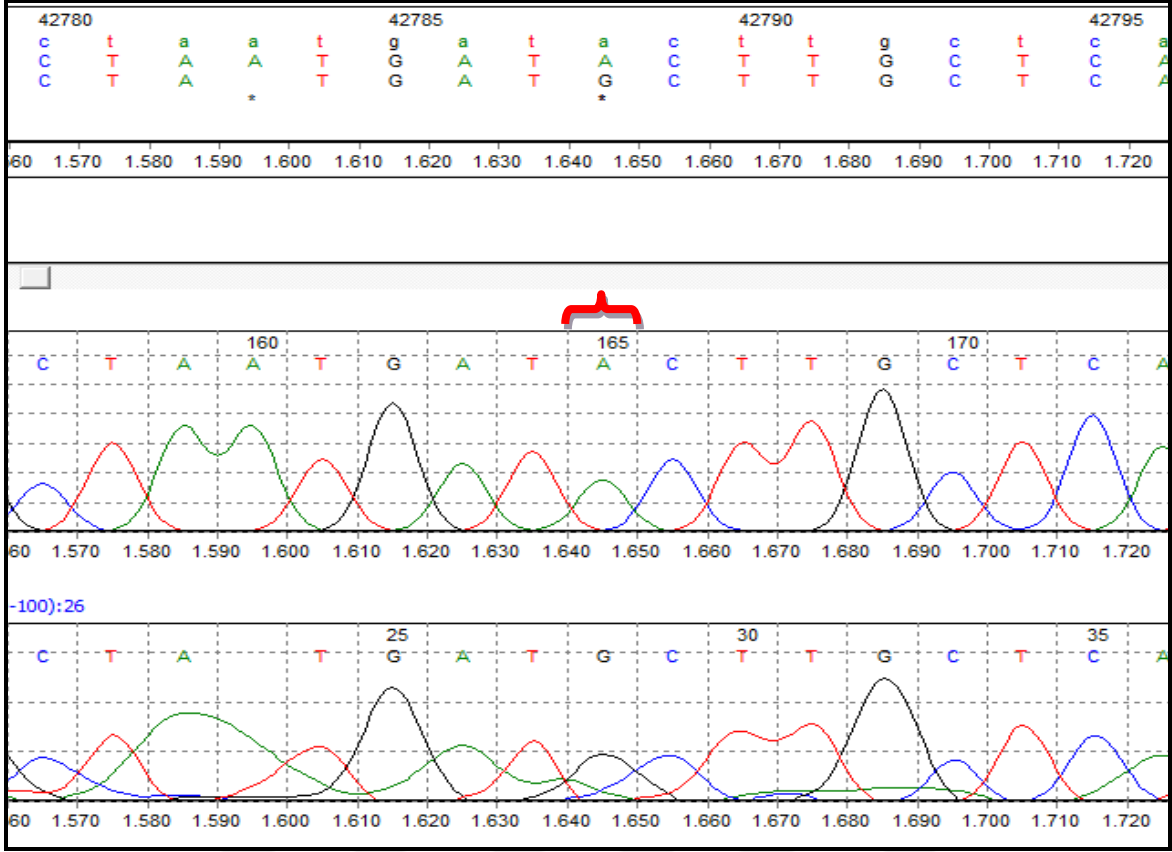
Bu değişikliğin literatürde bildirimi bulunmamaktadır. Aminoasit değişikliğine neden olmaktadır.



Şekil 13.11. 1., 5. ve 17. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.43191T>G Homozigot Değişikliği. İtron 12, (rs12826151).

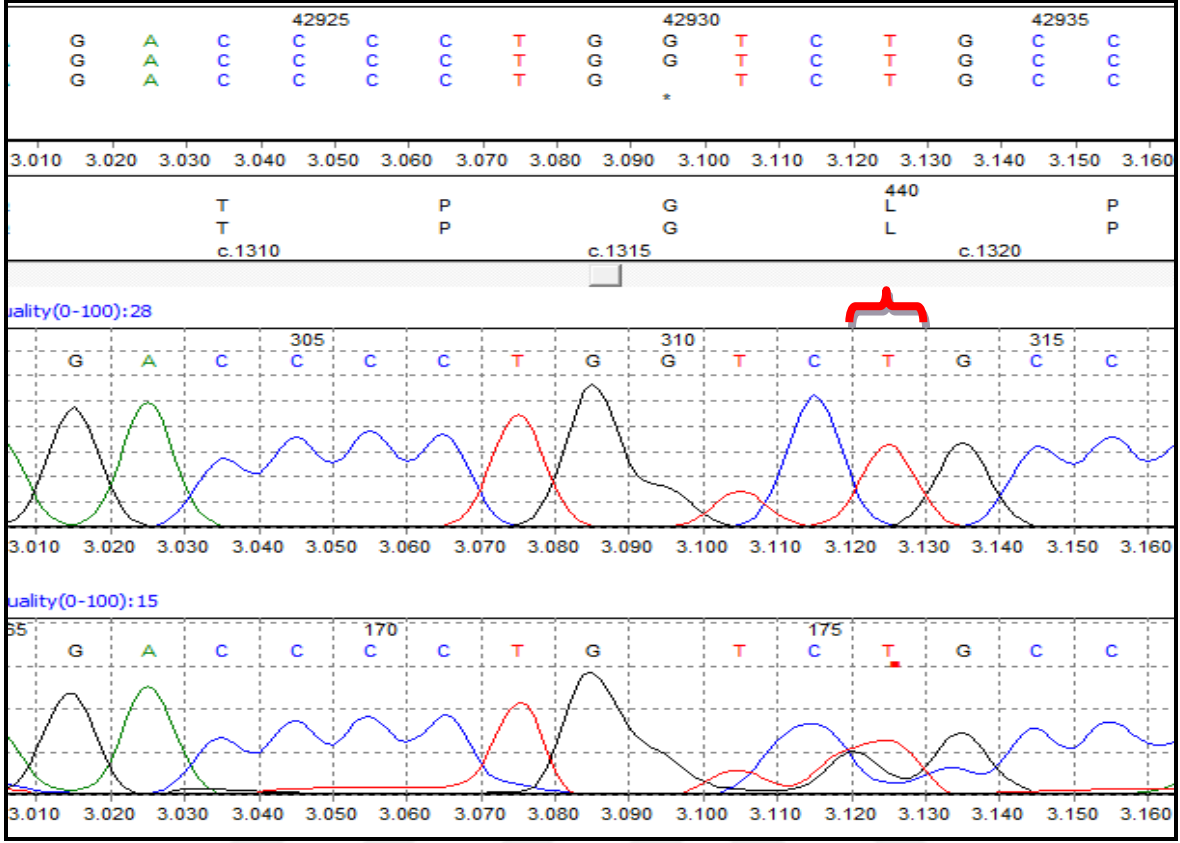
Alel frekansları: T: %60,63; G: %39,37. Alternatif alelin görülme oranı çalışılmış tüm toplumlarda %5'in üzerindedir. Bu durum bu değişikliğin nadir bir polimorfizm olmadığını göstermektedir.



Şekil 13.12. 2. ve 4. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.42788A>G Homozigot Değişikliği. İtron 11-12, (rs1487070).

Alel frekansları: A: %50,76; G: %49,24. Alternatif alelin görülme oranı çalışılmış tüm toplumlarda %5'in üzerindedir. Bu durum bu değişikliğin nadir bir polimorfizm olmadığını göstermektedir.



Şekil 13.13. a) 7., 8., 9.ve 16. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.
c.42933T>G Heterozigot Değişikliği, p.L440R. Ekzon 12.

S

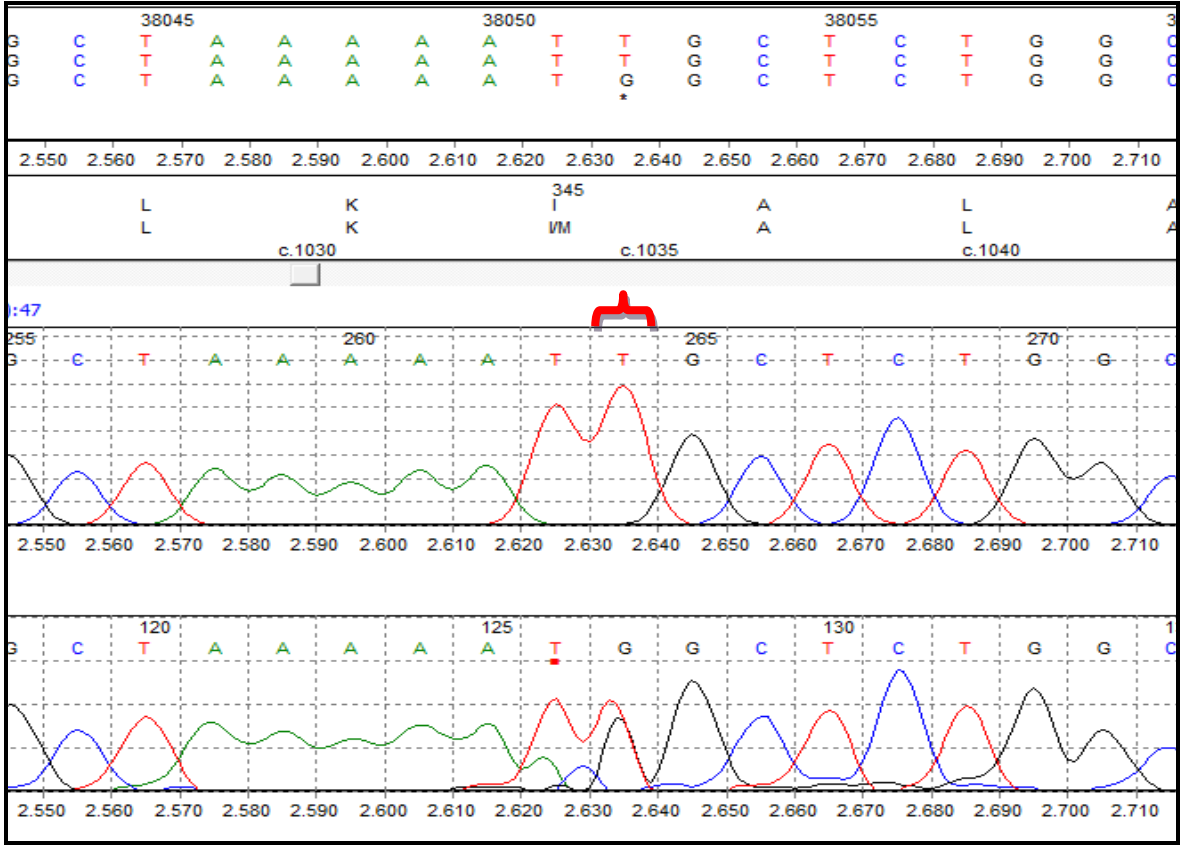
1561 TTAAATTTCCAGACCCTGGTCTGCCCATGGATCTGCAAATGGGAAATTTTTGGATAAT

1297 TTAAATTTCCAGACCCTGGTCTGCCCATGGATCTGCAAATGGGAAATTTTTGGATAAT

433 -L--N--F--Q--T--P--G--L--P--M--D--L---N--G--K--F--L--D--N--Q

Şekil 13.13. b) 7., 8., 9.ve 16. hastalardaki ekzon değişikliklerinin cDNA görüntüsü.

Literatürde bildirilmemiştir. Aminoasit değişikliğine neden olan bir değişiktir.



Şekil 13.14. a) 10. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.
c.38052T>G Heterozigot Değişikliği, p.I345I. Ekzon 10.

YMRRYR

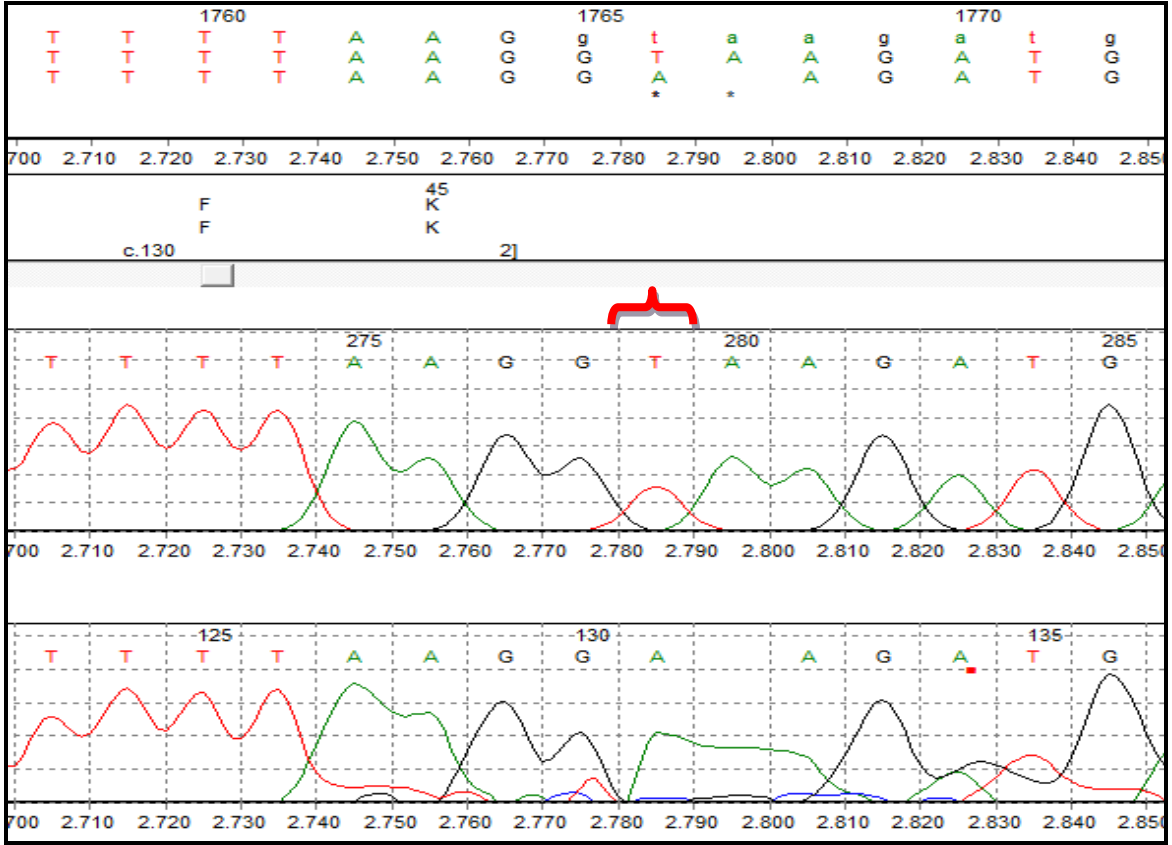
1261 ATGCTTTTC AAGAAAA GAAGACCAG AAGCTAAAAAT GCTCTGGCCTTATCTGATCTT

997 ATGCTTTTCAAGAAAAAGAAGACCAGGAAGCTAAAAATTGCTCTGGCCTTATCTGATCTT

333 -M--L--F--K--K--K--K--T--R--K--L--K--I--A--L--A--L--S--D--L-

Şekil 13.14. b) 10. hastadaki ekzon değişikliklerinin cDNA görüntüsü.

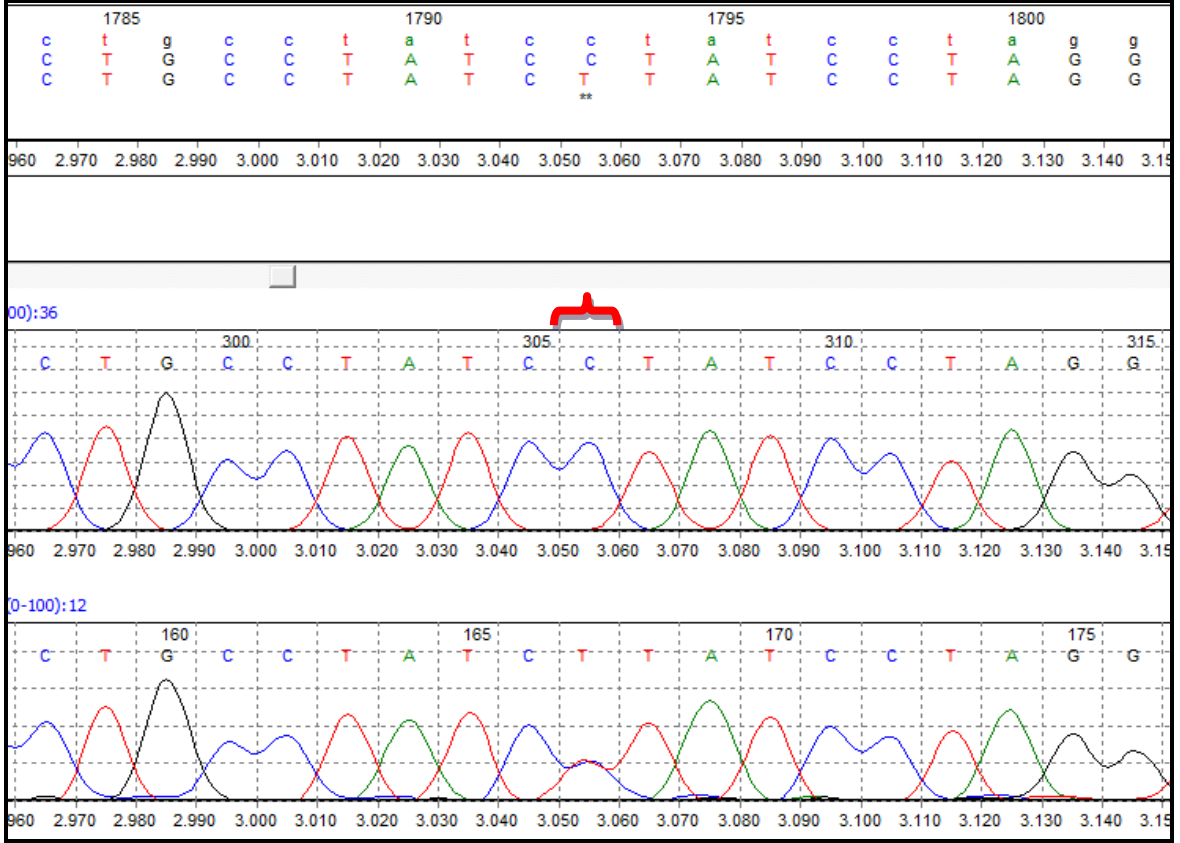
Literatürde bildirilmemiştir. Aminoasit değişikliğine neden olmayan sessiz bir polimorfizmdir.



Şekil 13.15. 7. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.1766T>A Homozigot Değişikliği. İtron3 (Ekzon-intron birleşme yerinde).

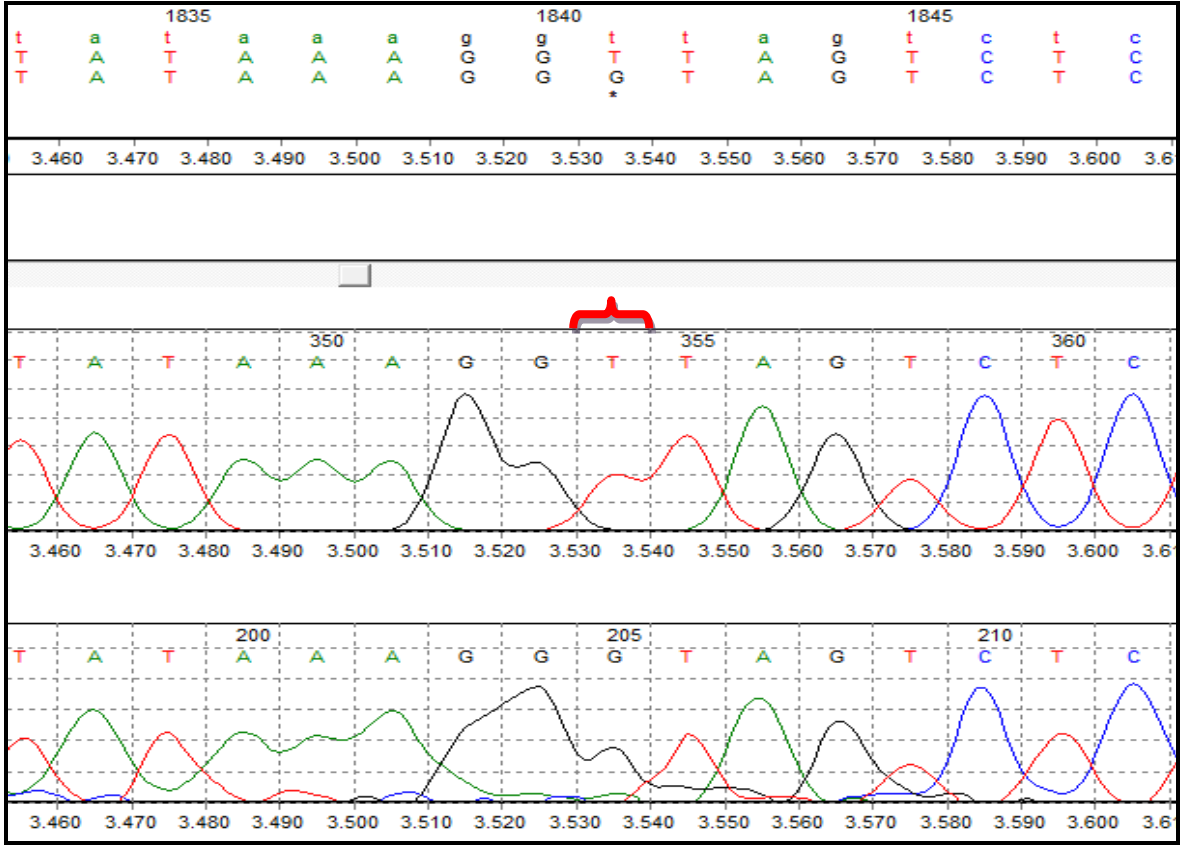
Literatürde yer almamakta olup değişiklik ekzon-intron birleşme yerine denk gelmektedir.



Şekil 13.16. 7. ve 15. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.1793C>T Heterozigot Değişikliği. İtron 3, (rs71463003).

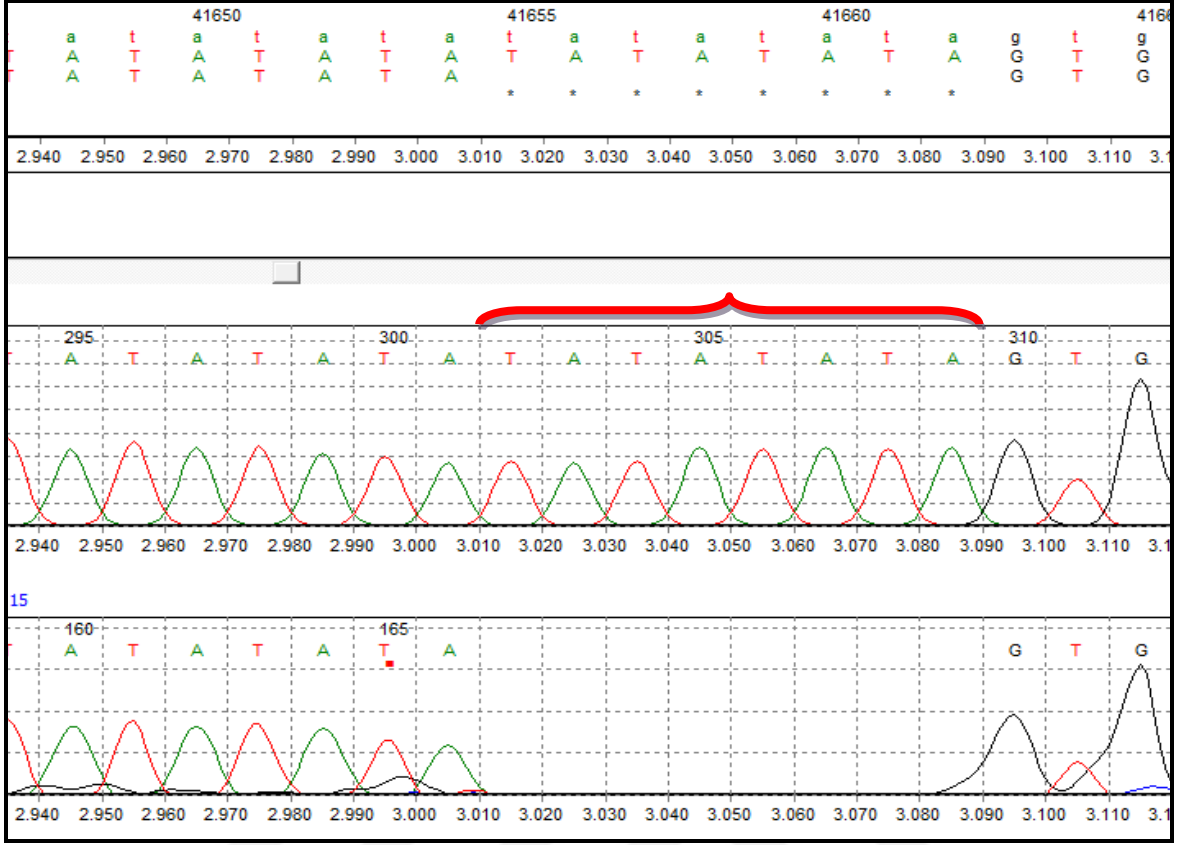
Alel frekansları: C: %99,23; T: % 0,77. Alternatif alelin görülme oranı çalışılmış tüm toplumlarda %5'in altındadır. Bu durum bu değişikliğin nadir bir polimorfizm olduğunu göstermektedir.



Şekil 13.17. 7. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.1841T>G Heterozigot Değişikliği. İtron 3.

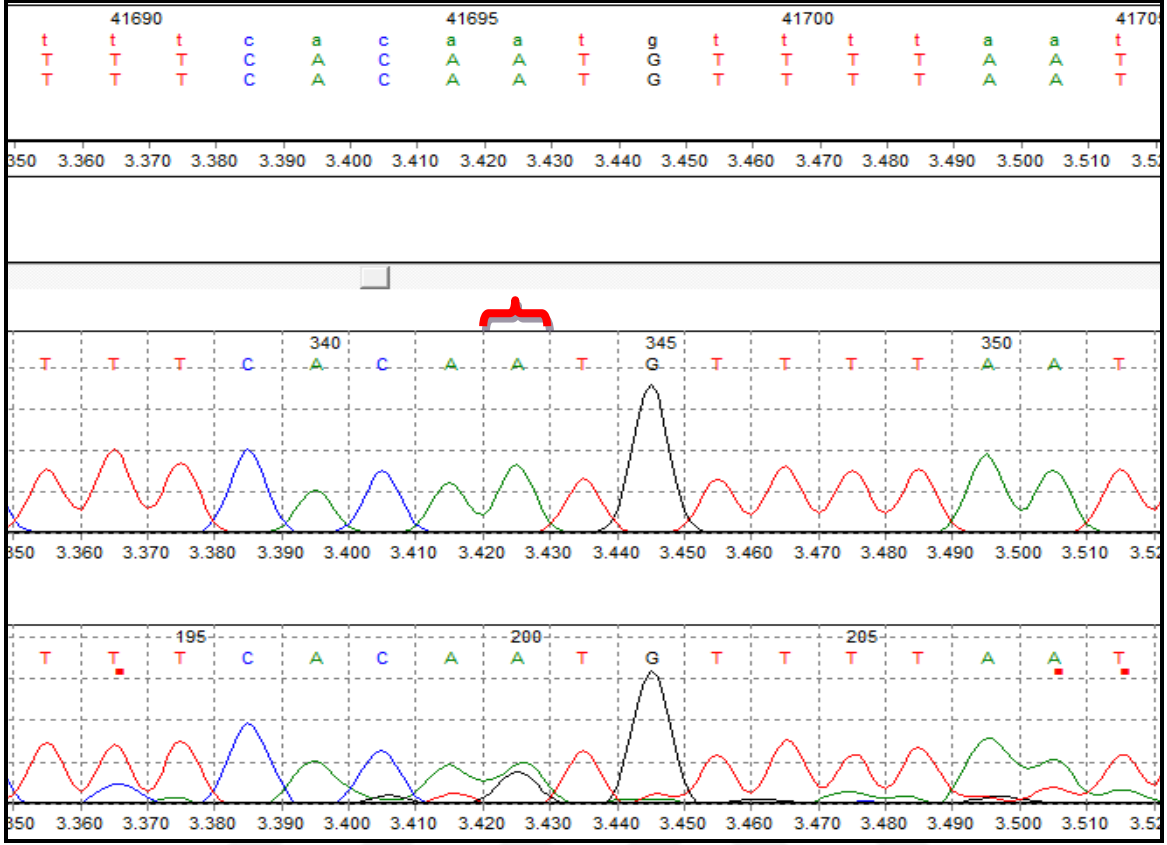
Literatürde bildirim bulunmamaktadır.



Şekil 13.18. 1. ve 2. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.41659_41662delTATATATA Homozigot Değişikliği. İtron 10-11, (rs149450833).

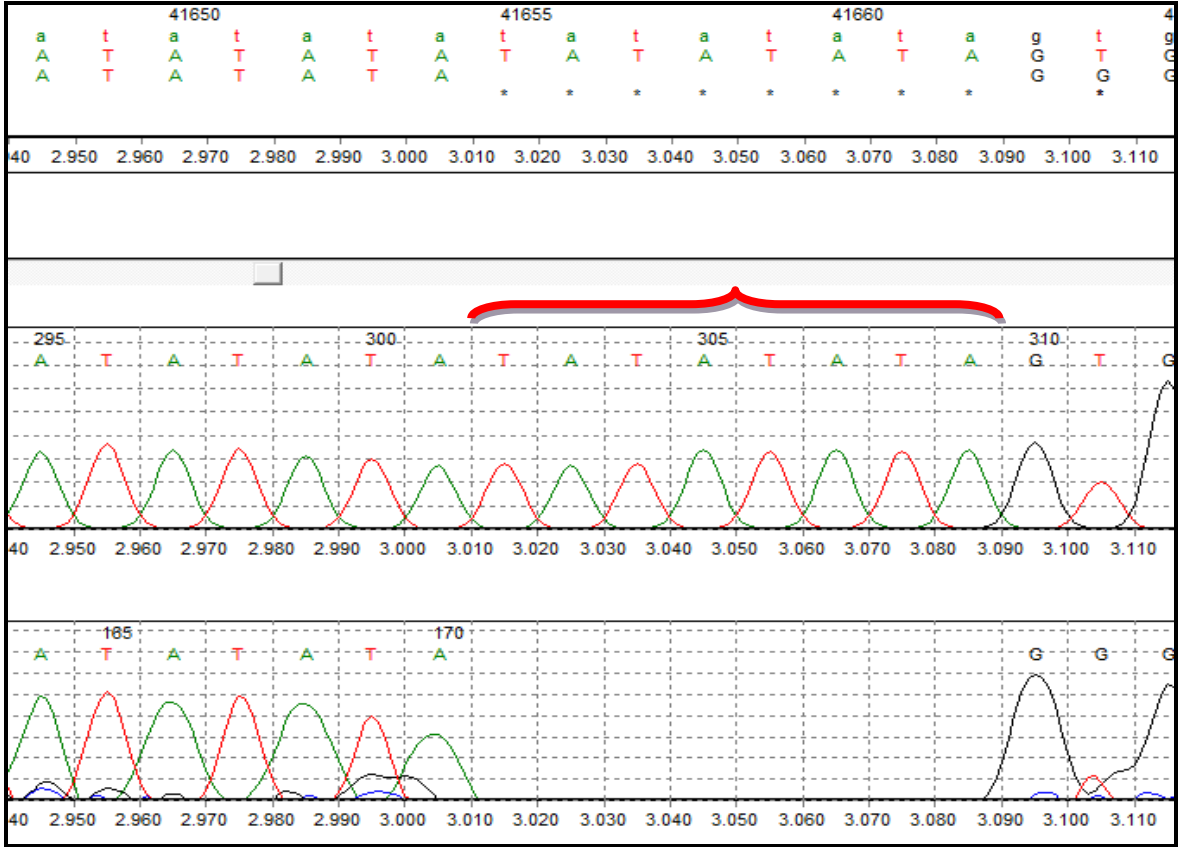
Literatürde bildirilmiş ancak alel frekansı belirtilmemiş bir tekrar polimorfizmidir.



Şekil 13.19. 1. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

c.41696A>G Heterozigot Değişikliği. İntron 10–11.

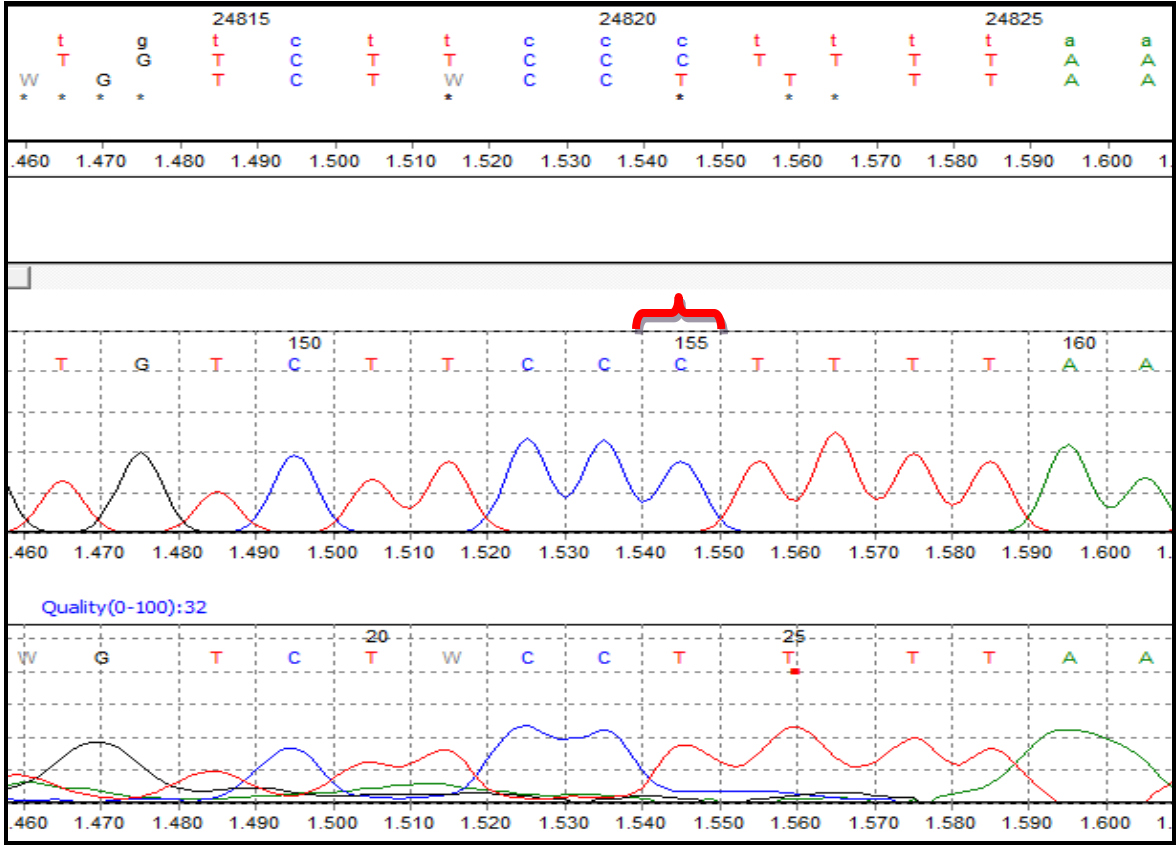
Literatürde bildirim olmayan intronik bir değişiklidir.



Şekil 13.20. 16. ve 18. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.

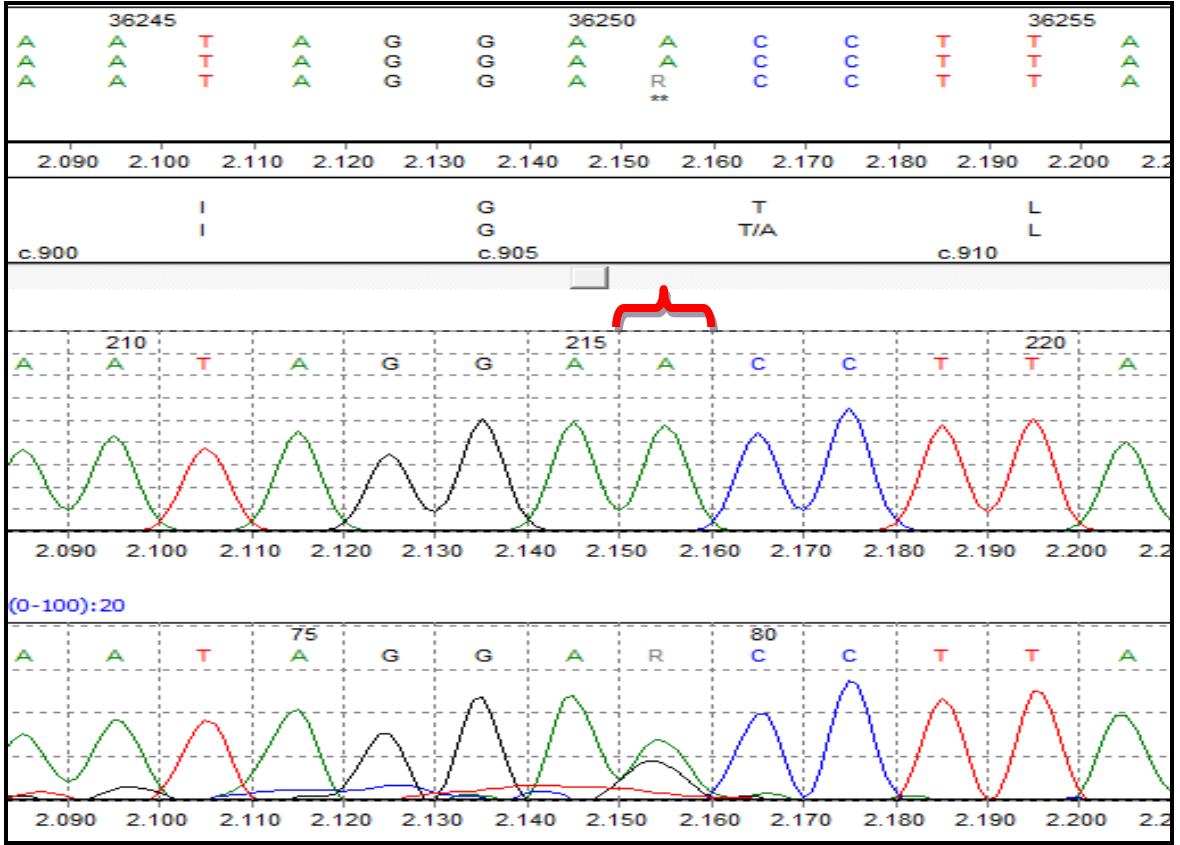
c.41655_41662delTATATA Homozigot Değişikliği. İntron 10-11.

Alel frekansları: Bildirilmemiştir. Şekil 13.18'deki delesyon bölgesi ile aynı bölgede bulunmakta olup bu delesyonun farklı bir polimorfizm olmama ihtimali vardır.

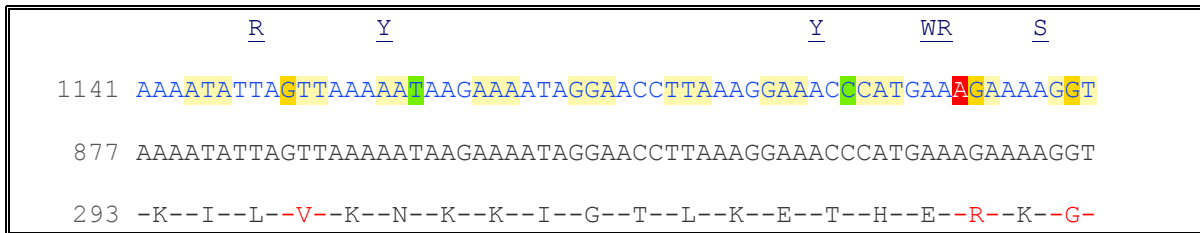


Şekil 13.21. 18. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.
c.24821C>T Homozigot Değişikliği. İtron 5.

Literatürde bildirim bulunmamaktadır.

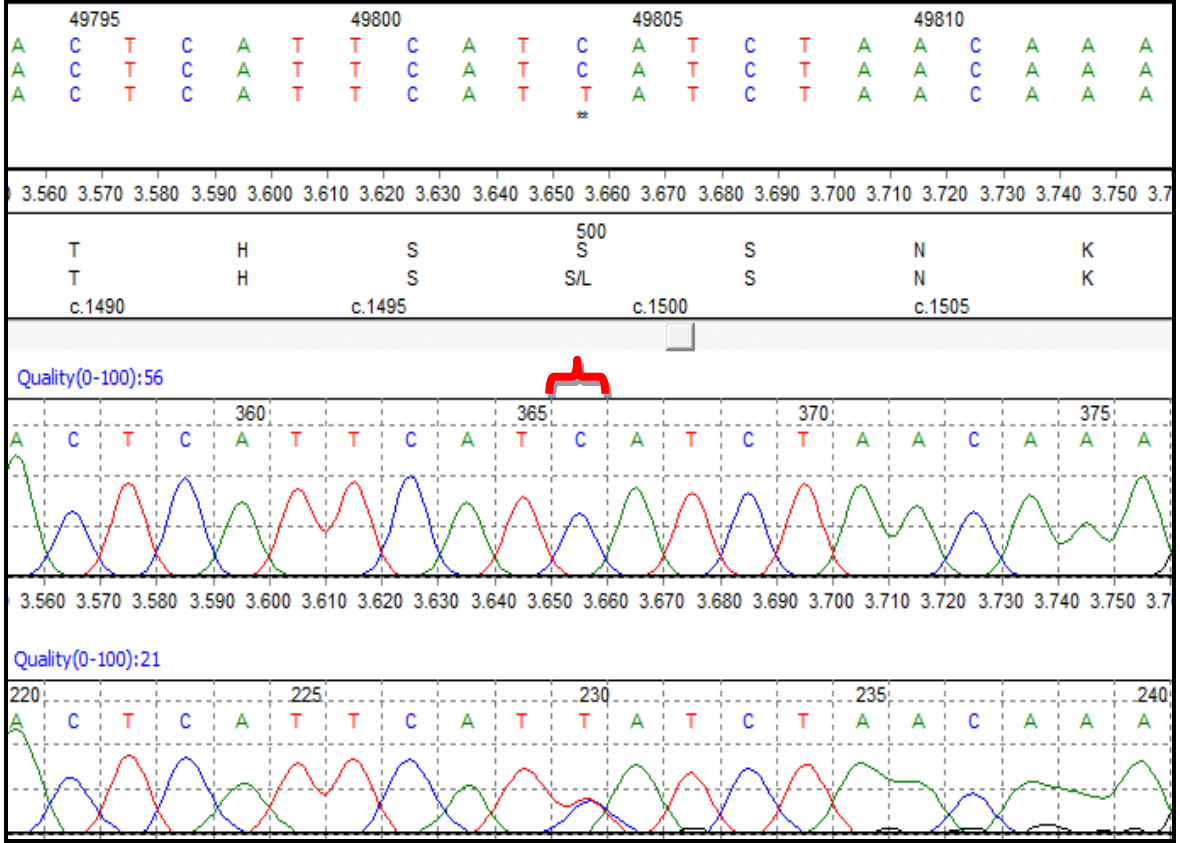


Şekil 13.22. a) 18. hastadaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü.
c.36251A>G Heterozigot Değişimi, p.T303A. Ekzon 8.

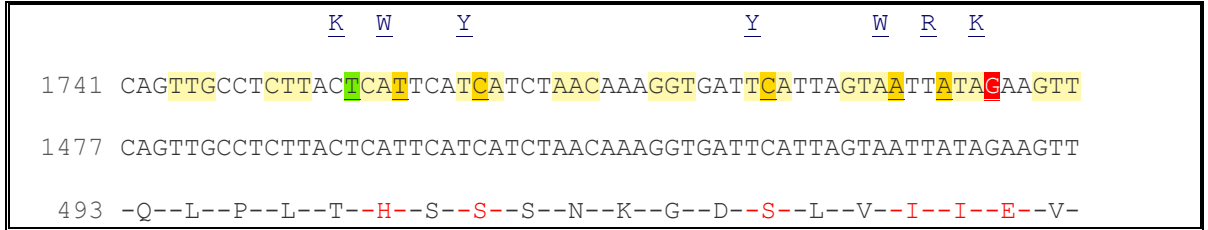


Şekil 13. 22. b) 18. hastadaki ekzon değişikliklerinin cDNA görüntüsü.

Literatürde bir bilgi bulunmamaktadır. Aminoasit değişikliğine neden olan ekzon bölgesi içindeki bir değişikliktir.



Şekil 13.23. a) 7., 13. ve 15. hastalardaki değişimlerin sekans analizi görüntüsü. c.1499C>T Heterozigot Değişimi, p.S500L. Ekzon 13, (rs10505830).



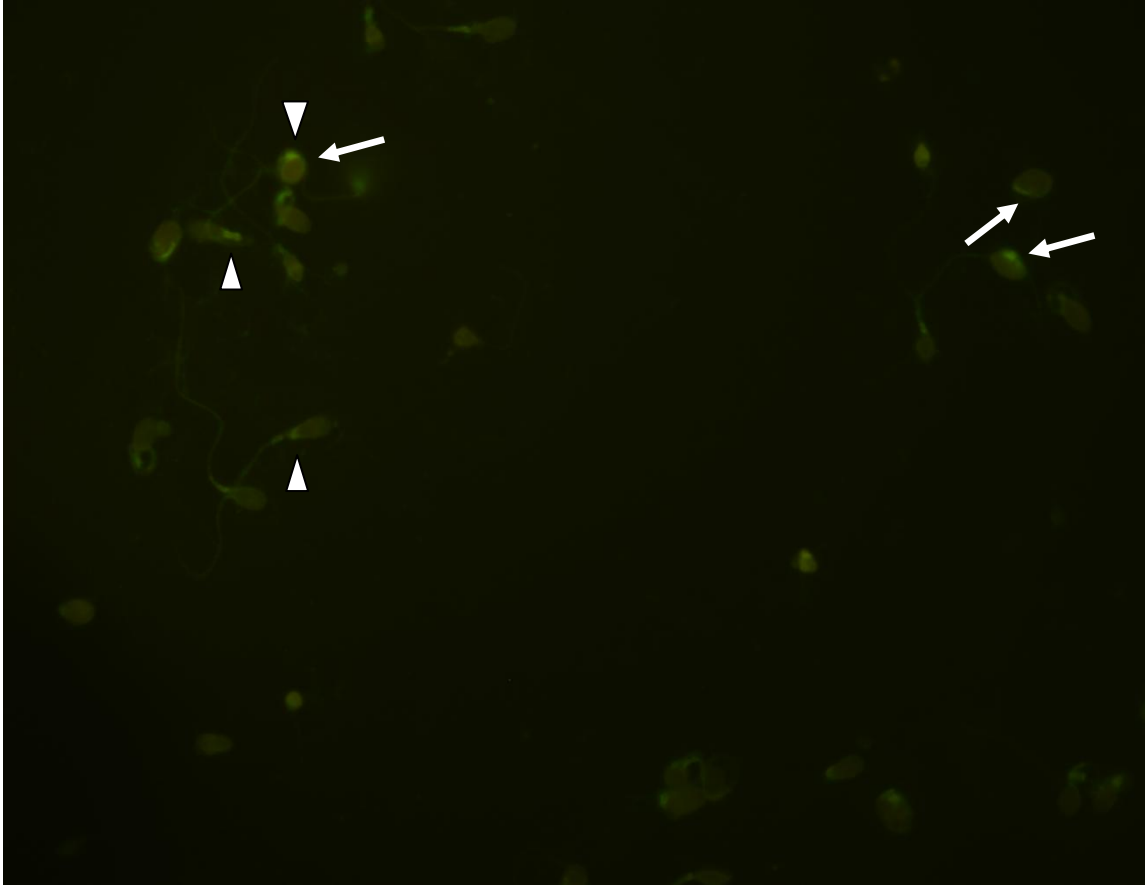
Şekil 13.23. b) 7., 13. ve 15. hastalardaki ekzon değişikliklerinin cDNA görüntüsü.

Allel frekansları: C: %96,85; T: %3,15. Aminoasit değişikliğine neden olan ekzon bölgesi içindeki bir değişikliktir.

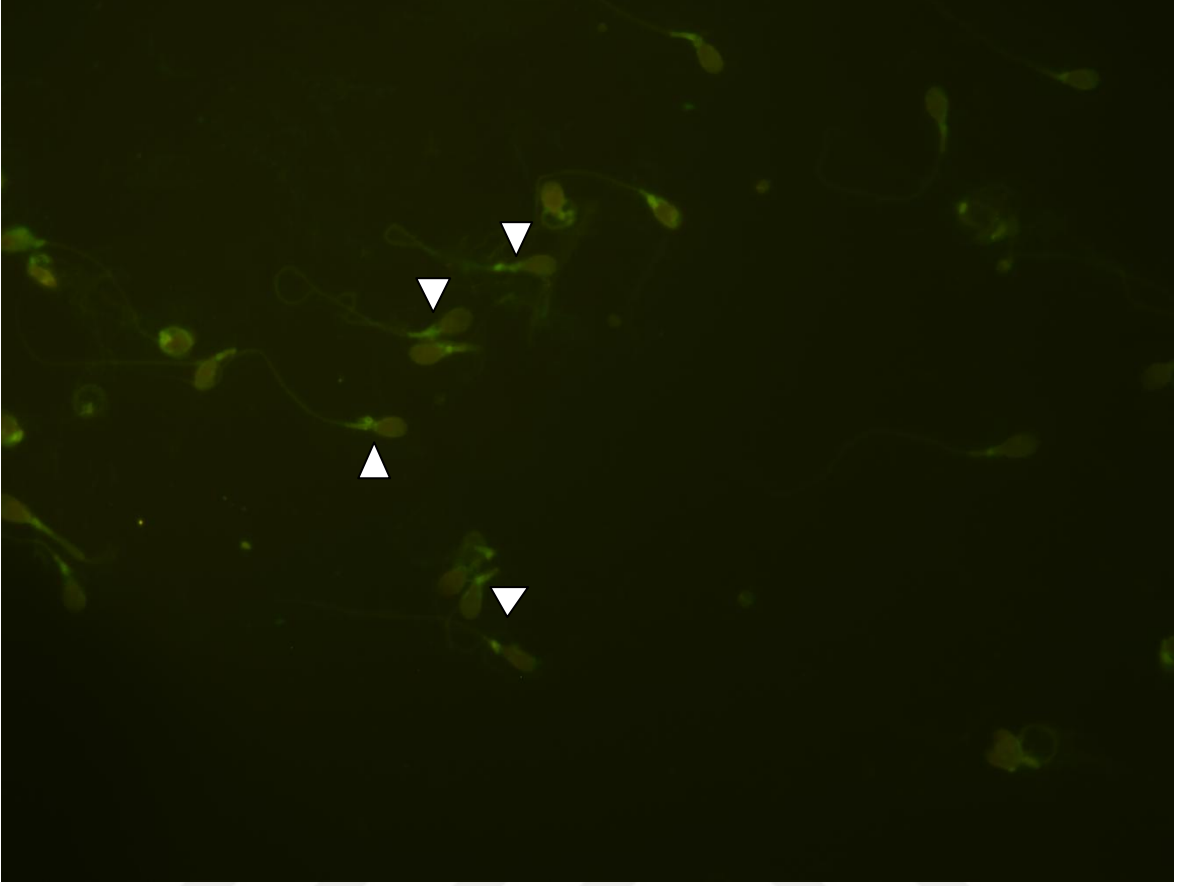
6.2. İMMUNFLORESAN TAKİBİ BULGULARI

6.2.1. Normospermi Grubunun İmmunfloresan Bulguları

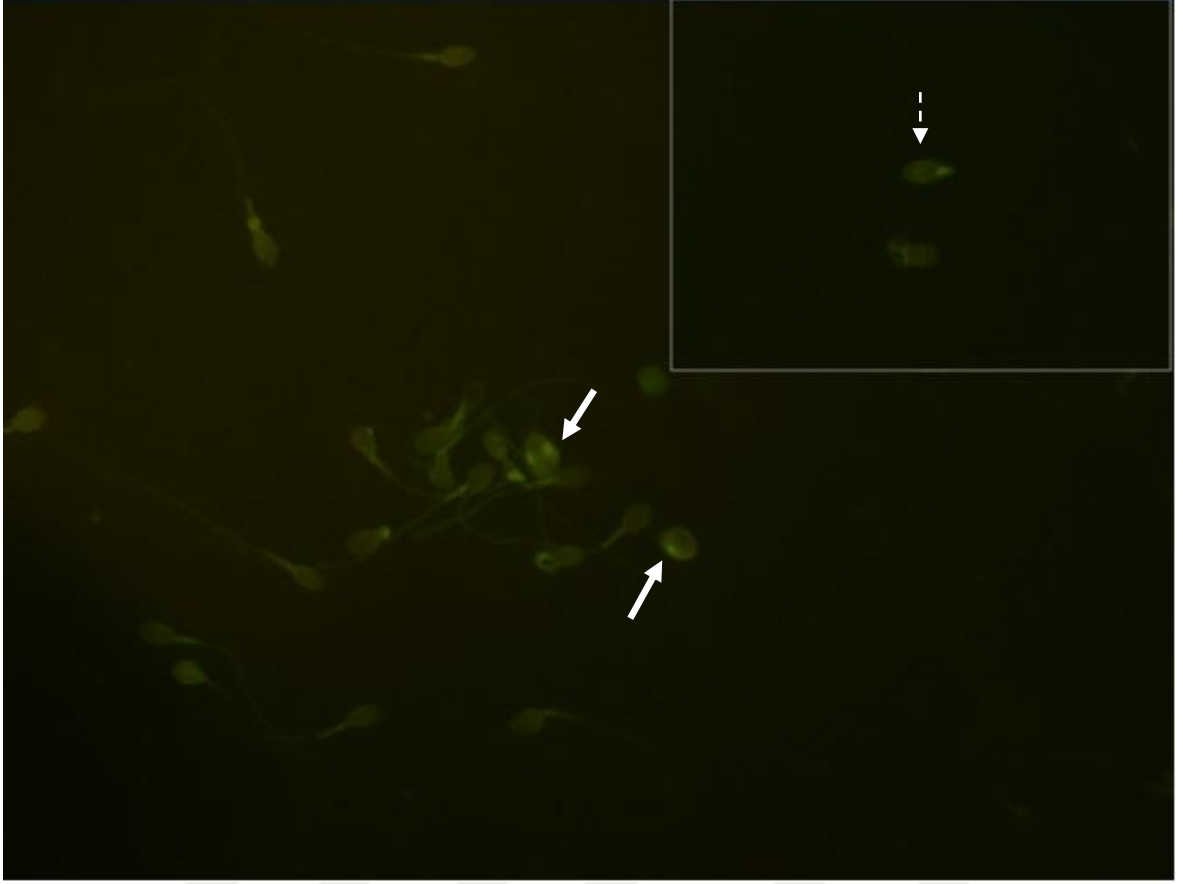
Normospermi grubu bireylerinden elde edilen bulgular PLC ζ immunfloresan reaksiyonu açısından incelendiğinde, sperm hücrelerinin baş bölgesi plazma membranı boyunca (Şekil 14.1, 14.2, 14.3), ekvatoryal bölgesinde (Şekil 14.3) ve post-akrozom bölgesinde (Şekil 14.1, 14.2) yoğun bir reaksiyon gözlemlendi.



Şekil 14.1. Normospermi grubunda; sperm hücrelerinin baş bölgesi plazma membranı boyunca (beyaz ok) ve post-akrozom bölgesinde (beyaz ok başı) PLC ζ immunfloresan reaksiyonu. Büyütme: X100.



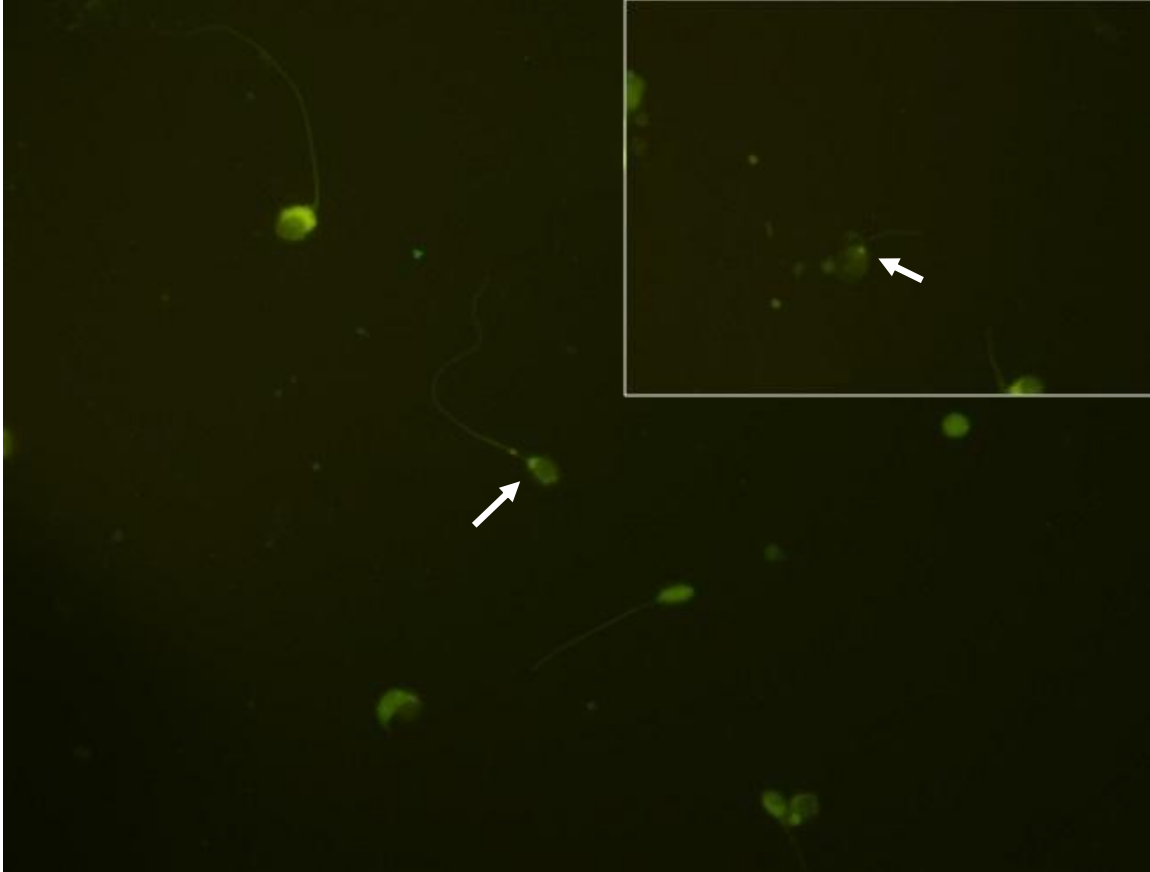
Şekil 14.2. Normospermi grubunda; sperm hücrelerinin post-akrozom bölgesinde PLC ζ immunfloresan reaksiyonu (beyaz ok başı). Büyütme: X100.



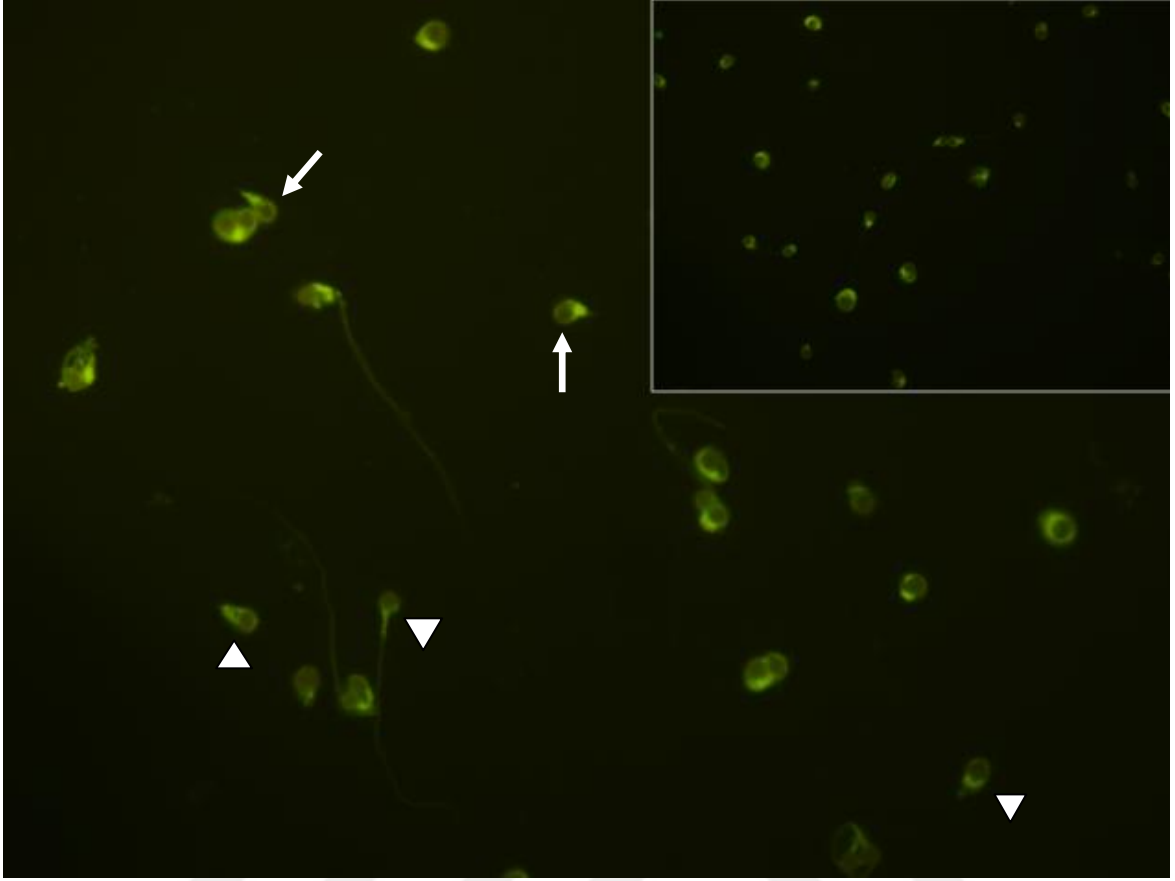
Şekil 14.3. Normospermi grubunda; sperm hücresinin baş bölgesi plazma membranında (beyaz ok) ve ekvatoryal bölgesinde (kesikli ok) PLC ζ immunfloresan reaksiyonu. Büyütme: X100, İncet büyütme: X100.

6.2.2. Düşük Fertilizasyona Neden olan Sperm Gruplarının İmmunfloresan Bulguları

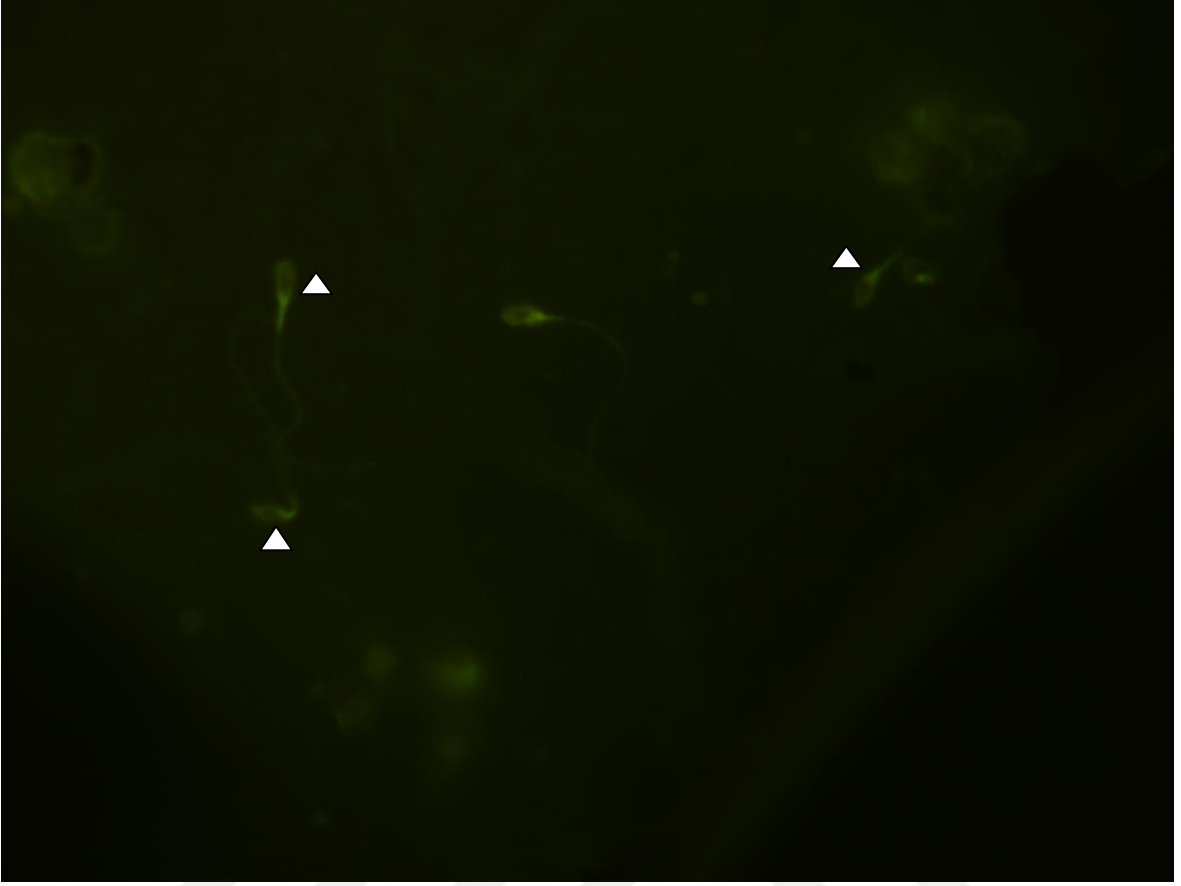
Düşük fertilizasyona neden olan sperm gruplarından (globozoospermi, total immotil, TFF, nükleer anomali) elde edilen bulgular, normospermi grubu ile kıyaslandığında; sperm hücrelerinin baş bölgesi plazma membranında (Şekil 15.2, 15.4, 15.7) ve ekvatoryal bölgesinde (Şekil 15.6) yer yer reaksiyon gerçekleştiği ya da hiç reaksiyon gerçekleşmediği (Şekil 15.8, 15.9), post-akrozomal bölgesinde (Şekil 15.1, 15.2, 15.3, 15.4, 15.5) ise reaksiyonun belirgin bir şekilde azalmış olduğu ya da hiç reaksiyon gerçekleşmediği (Şekil 15.8, 15.9) gözlemlendi.



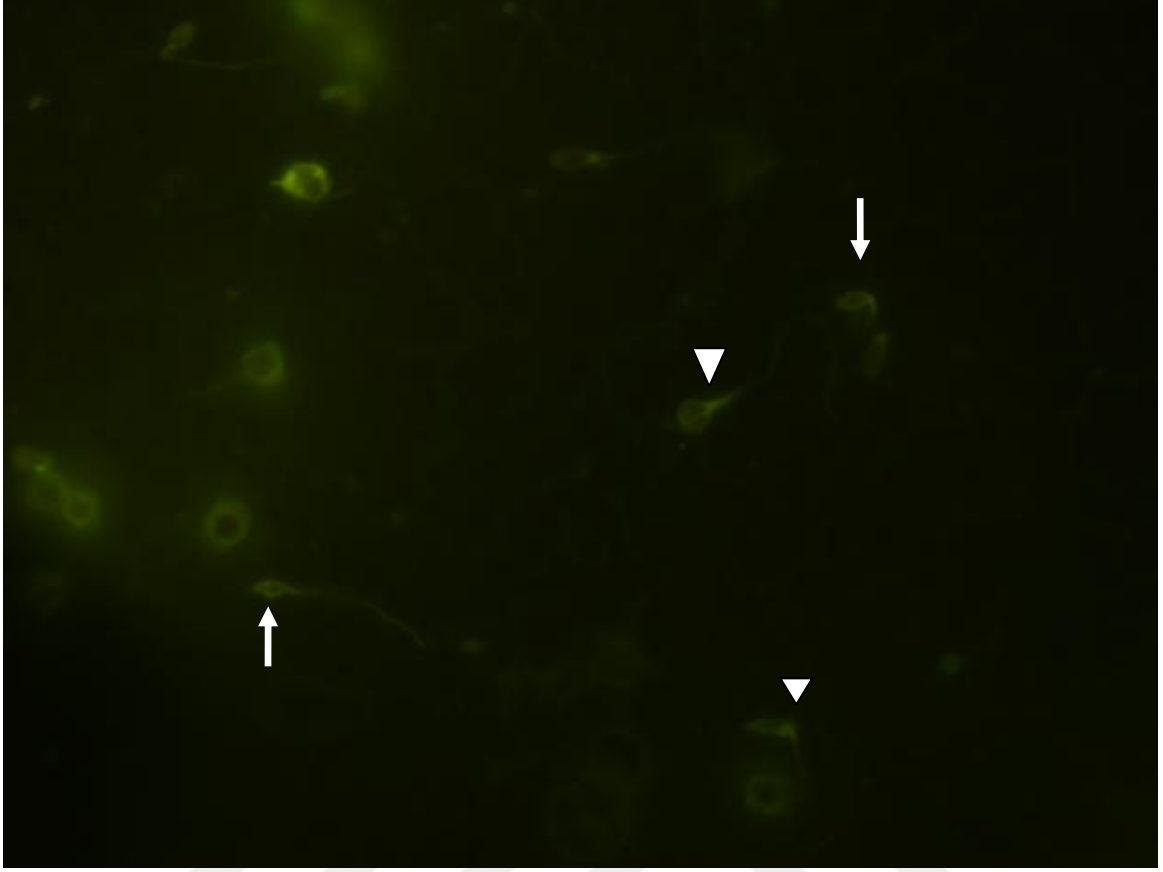
Şekil 15.1. Düşük fertilizasyona neden olan sperm grubunda (globozoospermi); sperm hücrelerinin post-akrozom bölgesinde azalmış PLC ζ immunfloresan reaksiyonu (beyaz ok). Büyütme: X100, İnsset büyütme: X100.



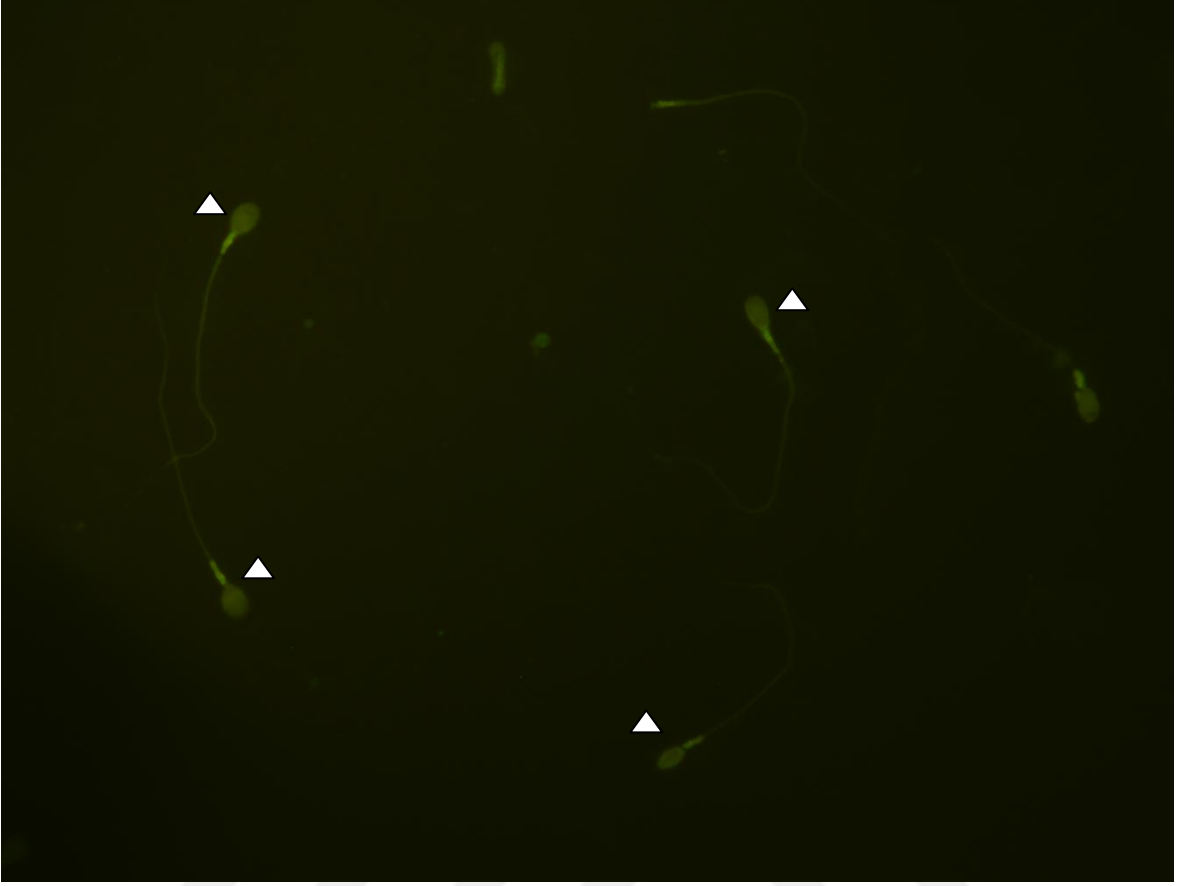
Şekil 15.2. Düşük fertilizasyona neden olan sperm grubunda (globozoospermi); sperm hücrelerinin post-akrozom bölgesinde azalmış PLC ζ immunfloresan reaksiyonu (beyaz ok başı) ve yer yer baş kısmı membranındaki PLC ζ immunfloresan reaksiyonu (beyaz ok). Büyütme: X100, İncet büyütme: X100.



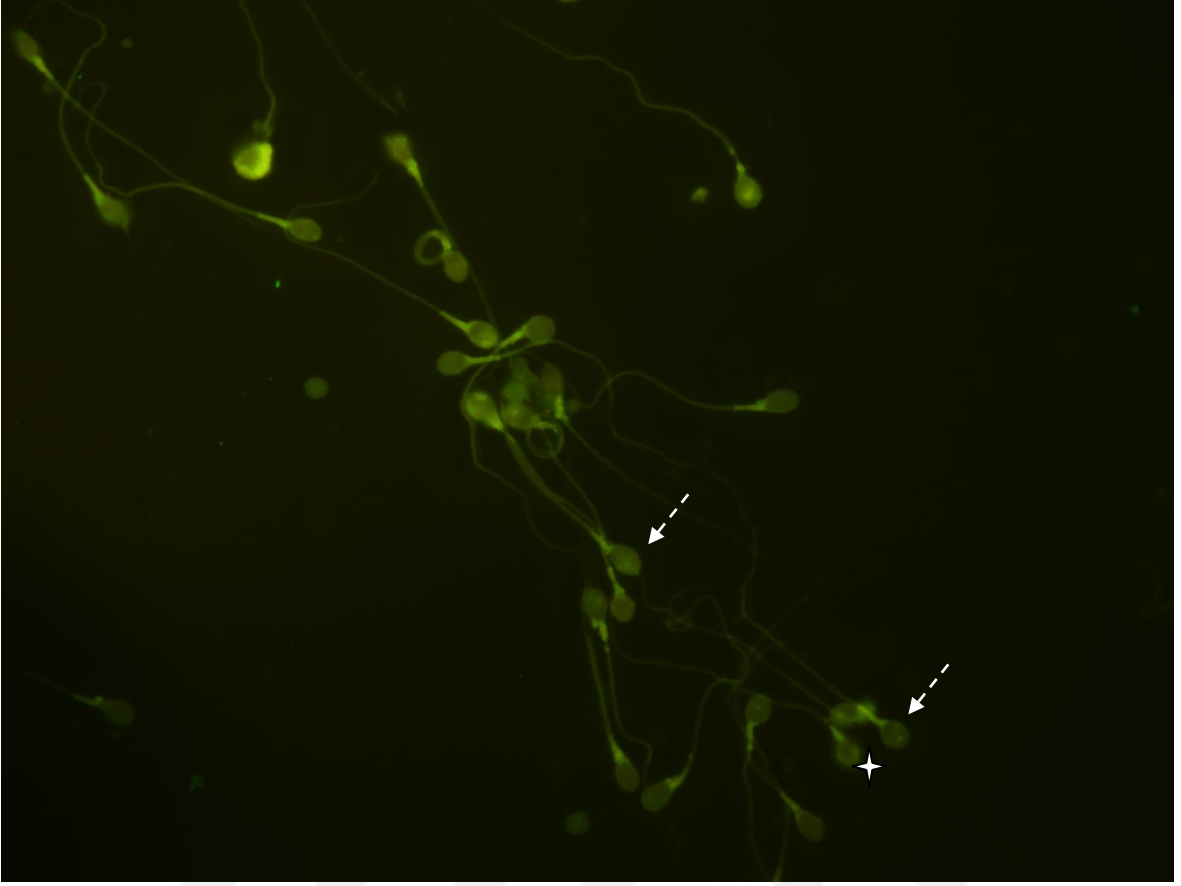
Şekil 15.3. Düşük fertilizasyona neden olan sperm grubunda (total immotil); sperm hücrelerinin post-akrozom bölgesinde azalmış PLC ζ immunfloresan reaksiyonu (beyaz ok başı). Büyütme: X100.



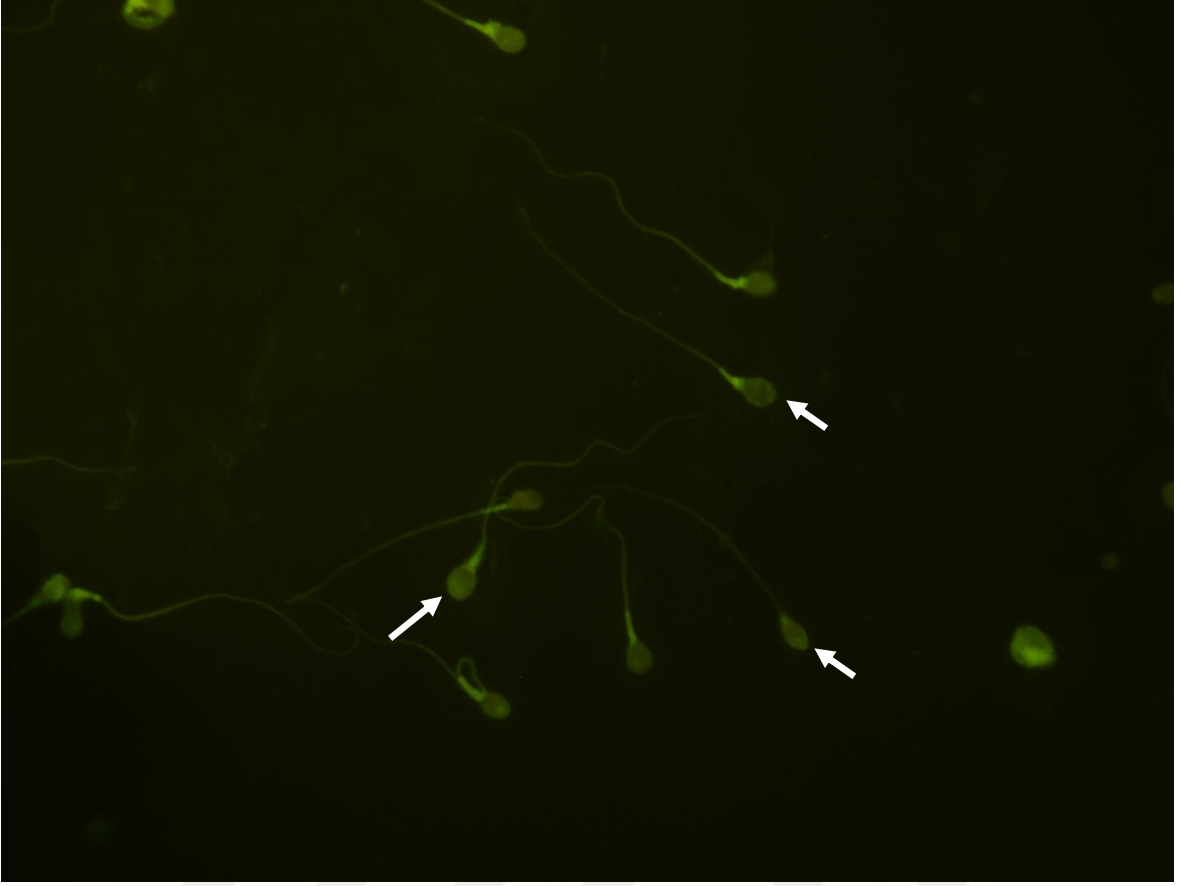
Şekil 15.4. Düşük fertilizasyona neden olan sperm grubunda (total immotil); sperm hücrelerinin post-akrozom bölgesinde azalmış PLC ζ immunfloresan reaksiyonu (beyaz ok başı) ve baş bölgesi plazma membranında PLC ζ immunfloresan reaksiyonu (beyaz ok). Büyütme: X100.



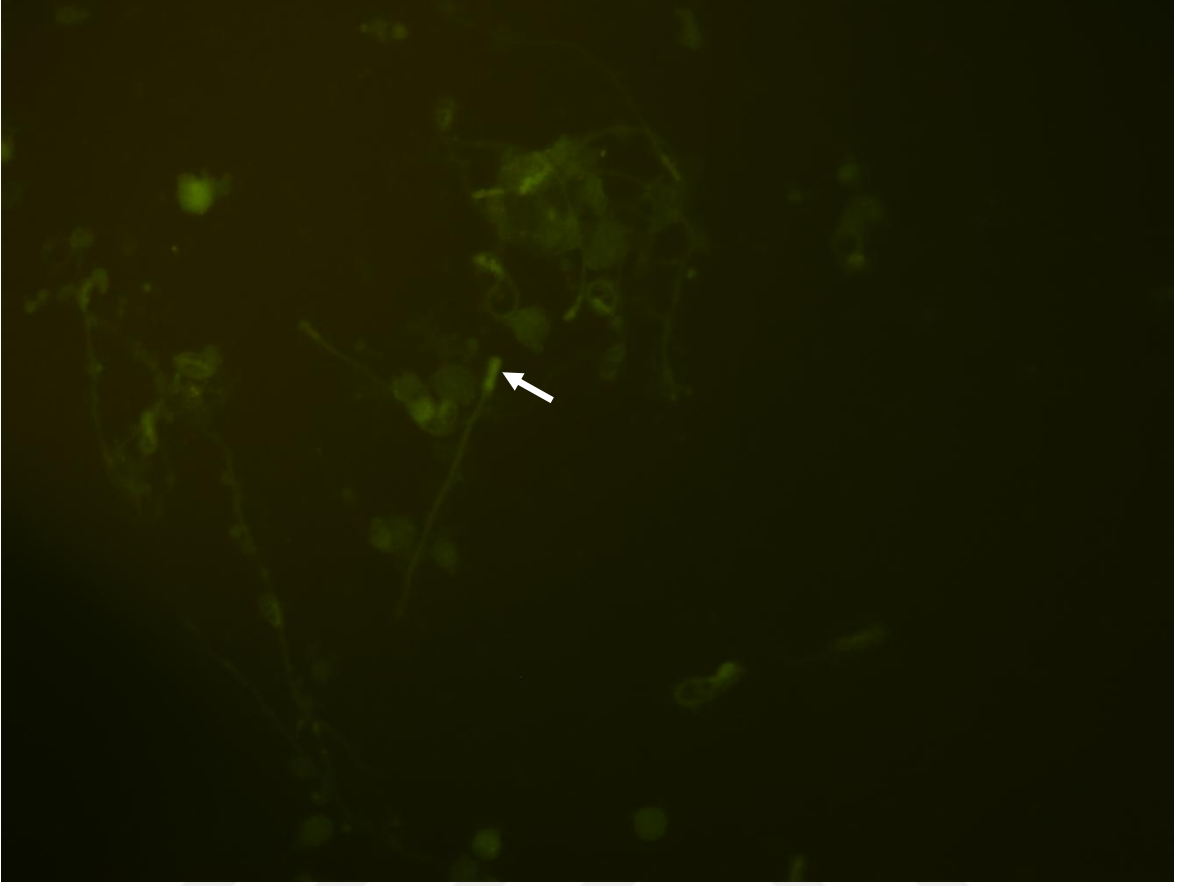
Şekil 15.5. Düşük fertilizasyona neden olan sperm grubunda (TFF); sperm hücrelerinin post-akrozom bölgesinde azalmış PLC ζ immunfloresan reaksiyonu (beyaz ok başı). Büyütme: X100.



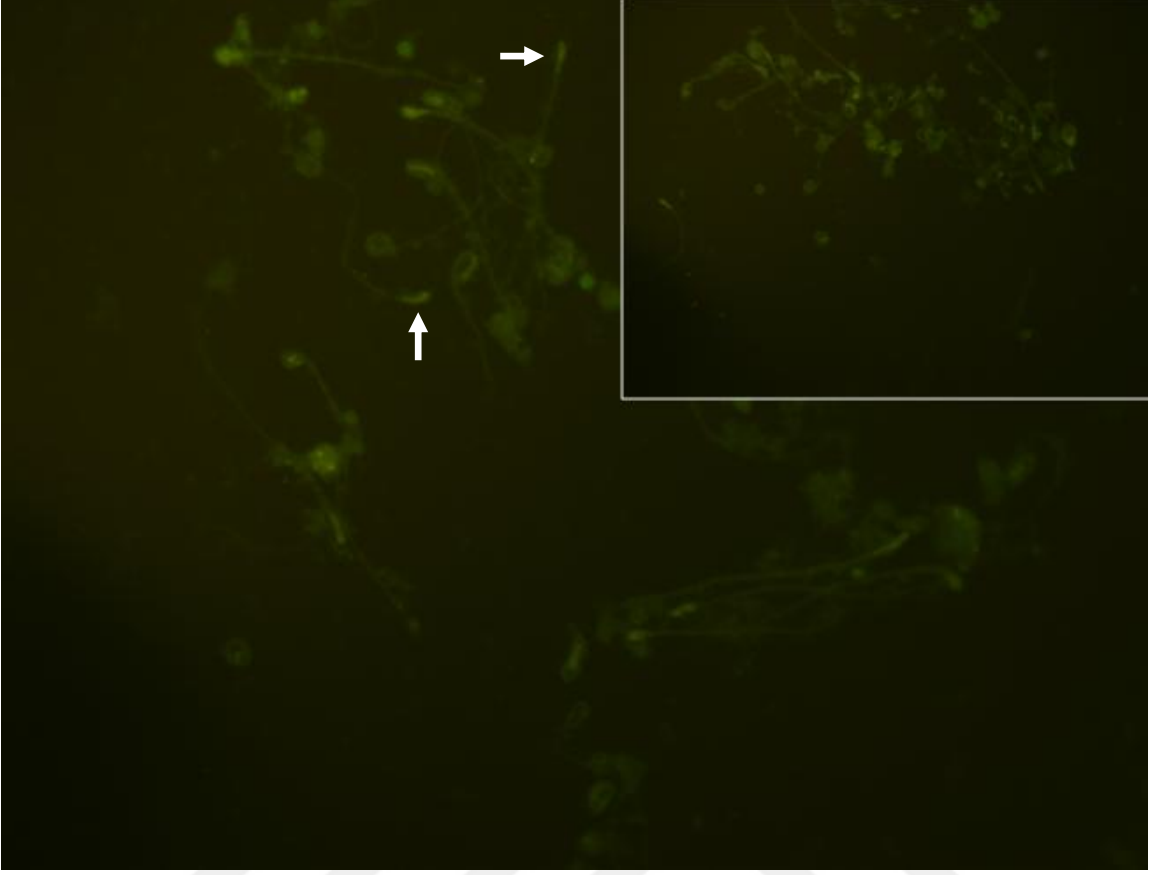
Şekil 15.6. Düşük fertilizasyona neden olan sperm grubunda (TFF); sperm hücrelerinin akrozomal bölgesinde (beyaz yıldız) ve ekvatoryal bölgesinde (kesikli ok) yer yer PLC ζ immunfloresan reaksiyonu. Büyütme: X100.



Şekil 15.7. Düşük fertilizasyona neden olan sperm grubunda (TFF); sperm hücrelerinin baş bölgesi plazma membranı boyunca yer yer PLC ζ immunfloresan reaksiyonu (beyaz ok). Büyütme: X100.



Şekil 15.8. Düşük fertilizasyona neden olan sperm grubunda (nükleer anomali); PLC ζ immunfloresan reaksiyonu göstermeyen sperm hücresi (beyaz ok). Büyütme: X100.



Şekil 15.9. Düşük fertilizasyona neden olan sperm grubunda (nükleer anomali); PLC ζ immunfloresan reaksiyonu göstermeyen sperm hücreleri (beyaz ok). Büyütme: X100, İncet büyütme: X100.

7. TARTIŞMA

İnfertilite dünya çapında her yedi çiftten birini etkilemektedir (1). YÜT, pek çok infertil çift için etkili tedavi yöntemleri sunmaktadır. ICSI yöntemi özellikle ağır erkek infertilitesinin tedavisinde önemli bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Klasik IVF başarısızlığı, sınırdaki ve şiddetli erkek infertilitesi ile açıklanamayan infertilite durumlarında kullanılan etkili bir tekniktir (78). IVF uygulamalarında ICSI sonrası görülen ortalama fertilizasyon oranı %70-85 civarındadır. Düşük fertilizasyon görülen ya da hiç fertilizasyon görülmeyen olgularda bugüne dek pek çok çalışma yapılmış ancak bu çalışmaların bir çoğu oosit aktivasyonu ve dolayısıyla Ca^{+2} salınımını sağlayan faktörler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu anlamda sperm çözülebilir faktörlerin sperm hücresinin oosit içine girişinin ardından fertilizasyonda rol aldığı belirlenmiş ve son dönemde de sperm hücre ekstraktlarında PLC enzim aktivitesinin biyokimyasal ölçümlerle çok yüksek olduğunun belirlenmesiyle (45, 83) PLC'nin fertilizasyondaki rolü mercek altına alınmıştır. PLC izoformlarının tümü ayrıntılı bir biçimde incelenmiş ancak PLC ζ izoformunun Ca^{+2} salınımını sağladığı ve dolayısıyla oosit aktivasyonunda rol aldığı belirlenmiştir (13). Çeşitli dokularda PLC ζ protein ekspresyon ve transkripsiyonu incelenmiş ve PLC ζ proteinin sperm hücresine özgü olduğunu kanıtlanmıştır (13). Fertilizasyondaki Ca^{+2} sinyalleri incelediğinde ise PLC ζ 'nin kısa aralıklarla karakteristik bir Ca^{+2} salınımı gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Katalitik bölgesinde mutasyon olan PLC ζ 'nin ise fonksiyonel olarak etkisiz olduğu ve oosit içinde Ca^{+2} hareketi için gerekli olan IP₃ molekülü üretimini (68, 84, 85) gerçekleştirmediği bildirilmiştir (13).

Bu bilgiler ışığında yola çıkarak, düşük fertilizasyona neden olan sperm örneklerinin oosit aktivasyonu ile olan ilişkisini anlama adına sperm çözümlerinde bulunan PLC ζ 'nin sperm hücresi başındaki dağılımını göstermeyi, PLC ζ gen mutasyonlarının taranmasını sağlamayı ve bunlarla ilişkili olarak rolünü anlayabilmeyi amaçlayarak bu çalışmayı gerçekleştirdik.

IVF uygulamalarında globozoospermik olgular, nükleer anomali görülen ve total immotil sperm olan erkeklerde düşük fertilizasyon görülmesi olağan bir durumdur. Tekrarlayan IVF denemelerinde her defasında fertilizasyon görülmeyen olgular ise TFF gösteren olgular olarak bilinmektedir ve bu olgulara uygulanacak tedavi planında oosit aktivasyonunu indükleyen elektrik stimülasyonu ya da kimyasal uyarı gibi bazı alternatif

metotlar bulunmaktadır (86, 87). IVF uygulamalarında ek metotlar gerektiren bu vakalarda oosit aktivasyonunu indükleyerek fertilizasyon oranlarının artırılması rutin tedavilere girmiş durumdadır. IVF uygulamalarının sınırlı kaldığı bu olgulara yönelik bir yol planının çıkarılması için olası problemlerin ortaya koyulması önemlidir.

Bazı erkek faktörlü infertilite durumuna, fonksiyonel olmayan PLC ζ proteininin sebep olduğu yönündeki bulgular artmış ve OAD durumunda PLC ζ 'nin tedaviye destek amaçlı kullanımıyla ilgili veriler çoğalmıştır (14, 15). İnsanda PLC ζ proteininin anormal ekspresyonuna bağlı OAD durumunda, Ca⁺² iyonoforun enjeksiyonu sonucu oosit aktivasyon oranı artırılmış ve sağlıklı bir doğumla sonuçlanmıştır (88). Bu çalışmalar, alternatif yapay aktivasyon ajanının güvenli ve endojen bir formu olan rekombinant PLC ζ aktif formunun klinikte uygulanmasının anlamlı olduğunu desteklemektedir (80).

PLC ζ ile erkek infertilitesi arasındaki ilk klinik ilişki, Yoon ve arkadaşları tarafından rapor edilmiş, PLC ζ proteininin azalmış seviyesi, total eksikliği veya anormal lokalizasyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür (14). Tekrarlayan ICSI başarısızlığı olan vakalardan elde edilen sperm hücreleri, fare oositlerin içine enjekte edildiğinde Ca⁺² salınımını uyaramadığı, fakat rastlantısal olarak PLC ζ -mRNA enjekte edildiğinde salınımı uyardığı gözlenmiştir. Bu bilgi fertilite ve Ca⁺² salınımını uyarma yeteneğindeki PLC ζ ilişkisini açık bir şekilde ortaya koymaktadır (14).

Yoda ve arkadaşları fare oositi içine PLC ζ -RNA enjekte ederek, fare oositinde Ca⁺² salınımının tetiklenmesini ve oosit aktivasyonunun başlamasını sağladıkları çalışmalarında; PLC ζ -RNA'yı sarı floresan protein olan 'Venüs' ile işaretleyerek oosit içinde PLC ζ 'nin konumsal olarak dağılımı ile ekspresyon seviyesini gerçek zamanlamaya uygun olarak inceleyerek floresan olarak görüntülemişlerdir. Aynı çalışmalarında Ca⁺² salınımının başlayıp sona ermesini de floresan olarak görüntülemişlerdir. Oosite enjekte işlemi sonrasında sitoplazmik dağılım gösteren PLC ζ -Venüs RNA pronükleus oluşumu sırasında pronükleer alanda, pronükleuslar oluşunca da pronükleuslar içinde biriktiği gözlenmiş ve bu birikimin başlamasıyla Ca⁺² salınımının durduğu belirlenmiştir. PLC ζ 'nin pronükleuslar içinde birikme yetisi, PLC ζ 'nin Ca⁺² salınımını sağlayan sperm hücresi faktörü olduğunun güçlü bir belirteçidir (89).

Aghajanpour ve arkadaşları, globozoospermik olguların yanı sıra önceki uygulamalarında düşük fertilizasyon görülen ya da TFF olgularında PLC ζ ekspresyon

düzeşini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada bu olgularda ekspresyonun anlamlı bir biçimde azaldığını göstermişlerdir (82).

Fertil erkek sperm hücrelerinde, PLC ζ ağırlıklı olarak ekvatoryal ve post-akrozomal bölgede lokalizedir. Grasa ve arkadaşları; akrozom reaksiyonu göstermiş, kapasite olmuş ya da olmamış fertil erkek sperm hücrelerinde de PLC ζ 'yı yine bu bölgelerde gözlemlemişlerdir (74). Oosit aktivasyon faktörü (OAF) için bu lokalizasyon modeli daha önceden de belirtilmiştir (90) ve memelilerde oosit aktivasyonunun endojen ajanı olan PLC ζ hipotezi ile uyumlu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, sperm hücrelerinde anormal lokalizasyonda olan PLC ζ 'nın oositi aktive edemediğı bildirilmiştir (15). Çalışmamızda normospermi gruplarda, PLC ζ reaksiyonunu membran bölgesi, post-akrozom ve ekvatoryal bölgede gözlemledik. Bu durum daha önceki çalışmalarda da belirtilen PLC ζ 'nın oosit aktivasyonunda etkin bir faktör olduğunu desteklemektedir.

Globozoospermi olgularında semendeki tüm sperm hücreleri akrozomsuz ve yuvarlak baş yapısında olup bu olgulara nadir rastlanmaktadır. Globozoospermik erkeklerin sperm hücrelerinin oosit aktivasyon kapasitesi; ICSI sonrası fertilizasyon başarısızlığında ve fare oositini aktive edememe durumunda da gösterildiğı üzere oldukça azalmıştır (15, 91). İmmunoblot analizlerle de globozoospermik bireylerde PLC ζ protein miktarının azalmış olduğu gösterilmiştir ve iki durumda da PLC ζ proteininin yetersiz olduğu bildirilmiştir. OAD gösterip globozoospermik olmayan hastada da aynı şekilde PLC ζ protein miktarının az olduğu ve anormal lokalizasyonda bulunduğu gözlenmiştir. Yoon ve arkadaşlarının son bulguları da bu doğrultudadır (14). Elde etmiş olduğumuz düşük fertilizasyona neden olan globozoospermik bireylerde, PLC ζ lokalizasyonun azalmış olduğunu gözlemledik. Daha önceki çalışmalar da bizim bu bulgumuzu desteklemektedir.

Kemirgenlerle yapılan önceki immunfloresan çalışmalarda, fare sperm hücresinde PLC ζ 'nın sperm hücresi başında perinükleer tekada lokalize olduğu (92), bununda OAF için beklenen lokalizasyon bölgesi olduğu ileri sürülmüştür (64, 90, 93, 94). Sonraki çalışmalarda ise PLC ζ 'nın, kapasite olmamış fare sperm hücresinde post-akrozomal bölgede ve kapasite olmamış boğa sperm hücresinde ise ekvatoryal bölgede lokalize olduğu gösterilmiştir (95). Bu bulguların tersine, fare ve hamster sperm hücrelerinde akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon sırasında yapılan bir PLC ζ lokalizasyon çalışmasında; PLC ζ 'nın, kapasite olmamış sperm hücrelerinde akrozomal bölgede, kapasitasyonu takiben de post-akrozomal bölgede öne çıktığı bildirilmiştir (96). PLC ζ 'nın akrozom reaksiyonu

gibi oosit aktivasyonundan başka rolleri olup olmadığı hala belirsizliğini korumaktadır. Kapasite olmamış insan sperm hücresinde, PLC ζ ağırlıklı olarak sperm hücresi başında, ekvatoryal bölgede lokalizedir (74), bu lokalizasyon modeli kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu sırasında da korunmuştur. Oosit aktivasyonunda PLC ζ 'nın rol oynadığı, OAD ve erkek infertilitesinin belirli tiplerinin sebebinin altında, PLC ζ 'nin anormal fonksiyonu ya da anormal formunun olabileceği önerilmiştir. Devamlı olarak IVF ve ICSI sonrası fertilizasyon başarısızlığı gösteren infertil sperm hücrelerinde yapılan bir çalışmada, bu sperm hücreleri fare oositleri içine enjekte edildiğinde Ca⁺² salınımını başlatamadığı ya da fertil erkeklerle kıyaslandığında yaptıkları Ca⁺² salınımlarının karakteristik olmadığı ve salınımların genlik ve frekanslarının az olduğu gözlenmiştir (14, 15). Ayrıca, immunfloresan ve immunoblot analizlerle, bu infertil hastaların sperm hücrelerinin ICSI'de başarısız olduğu ve Ca⁺² salınımı başlatamadığı ve PLC ζ ekspresyonunun da anormal olduğu gösterilmiştir (14, 15). Biz çalışmamızda düşük fertilizasyona neden olan grup altında incelediğimiz fertilizasyon başarısızlığı gösteren TFF grubunda, PLC ζ lokalizasyonunun fertil normospermi grubu bulguları ile aynı olduğunu gösterdik. Ancak bu bölgelerdeki reaksiyonda belirgin azalma gözlemedik. Bunun sonucu olarak; bu hastalarda TFF'ye neden olarak, PLC ζ ekspresyonunun düşüklüğünü gösterebiliriz.

Literatürde, düşük fertilizasyon grupları arasında yer alan, sperm hücrelerinin hareketsizliğine dayalı olan total immotil grubunun, fertilizasyonda oosit aktivasyonuna neden olan PLC ζ reaksiyonu ile ilişkili olabileceğine dair herhangi bir görüş bulunmamaktadır. Biz çalışmamızda total immotil grubunda PLC ζ lokalizasyonları ağırlıklı olarak post-akrozom ve baş membranda olmakla birlikte insan fertil gruplarına kıyasla lokalizasyonları açısından çok büyük farklılığın olmadığını söyleyebiliriz.

Yine aynı şekilde düşük fertilizasyona neden olan nükleer anomali grubunun PLC ζ ile ilişkisini gösteren herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Ancak yapmış olduğumuz çalışmada nükleer anomali grubunda PLC ζ reaksiyonunu gözlemedik. Bu durum nükleer anomaliye bağlı olarak PLC ζ ekspresyonunda bir defekt olduğunu düşündürmektedir.

Genetik mekanizmadaki bazı bozuklukların da PLC ζ ile ilişkili OAD'ye sebep olduğu bilinmektedir (80). İnsan infertilitesi ve PLC ζ mutasyonları arasındaki ilk bağlantı bir OAD hastasında H398P mutasyonunun keşfiyle ortaya konmuştur (15).

PLC ζ ile yapılan yoğun ekspresyon çalışmalarına ek olarak PLC ζ 'nin fonksiyonunun bozulmasına ve dolayısıyla infertiliteye neden olan bir nokta mutasyonu (PLC ζ , H398P) tespit edilmiştir (15). Aynı genetik görüntüleme metodu modifiye edilerek kullanılan bir diğer çalışmada da yine aynı hastada PLC ζ , H233L mutasyonunu belirlenmiştir (80). Bu çalışmada H233L mutasyonunun da benzer bir şekilde lokal protein etkileşimlerini bozduğu, anormal Ca⁺² salınımına yol açtığı ayrıca 3 boyutlu modelleme ile ortaya konmuştur. Bu çalışmada ayrıca bu vakada birleşik heterozigotluk olduğu, mutasyonların birinin maternal, diğerinin paternal aktarıldığı belirlenmiştir. Bu bilgi doğrultusunda erkek infertilitesi ve sperm hücresi fonksiyon eksikliğine sebebiyet veren maternal aktarılan ilk otozomal nokta mutasyonunun H233L olduğu belirlenmiştir (80).

Kashir ve arkadaşları erkek infertilitesiyle ilişkili yaptıkları genetik çalışmalarında; infertil erkeğe aktarılan gen mutasyonlarında, sadece paternal aktarılan gen mutasyonlarının değil maternal aktarılanların da etkili olduğu bildirilmiş ve PLC ζ 'daki mutasyonların resesif şekilde fonksiyonel olabildiği de açıklamışlardır (80).

İnsan erkek infertilitesine; Y kromozomuna bağlı anomaliler ve bazı mikrodelesyonlar sebep olabildiği gibi, spermatogeneziste meydana gelebilecek bir bozuklukta veya spermatogeneziste X kromozomuna bağlı genlerde olabilecek mutasyonlarında sebep olabileceği bilinmektedir (97, 98).

Yapılan moleküler analizler sonucunda; PLC ζ geninin 12. kromozom üzerinde yer aldığı, 15 ekzon içerdiği ve 608 aminoasitlik proteine kodlandığı bulunmuştur. PLC ζ genine ait 15 ekzon üzerinde literatürde iki mutasyon tanımlanmıştır (80).

Yaptığımız bu çalışma da literatürde hiç yer almamış ve protein farklılaşmasına neden olan bazı değişikliklerin yanı sıra stop kodonuna dönüşen bir nükleotid değişimi de bulmuş durumdayız. Çalışmamızda literatürde önceden rapor edilenlerde yapılan popülasyon çalışması sonrasında %5'in altında görülen değişikliklere (p.Q94X, p.R197H, p.L440R, p.T303A, p.S500L) özellikle odaklanıldı. Henüz insan genom mutasyon databankına bu genin değişimlerinin rapor edilmemiş olması ve sınırlı sayıdaki literatürde polimorfizm ve mutasyonların bakılmış olması düşük fertilizasyon görülen bu olgularda yaptığımız taramayı anlamlı kılmaktadır.

Klinik amaçlar için sperm örneklerinde immunoblot ve immunfloresan analizlerin birlikte kullanılması ve PLC ζ kodlayan bölgenin seçici olarak hedeflendiği genetik analizlerle kombinasyonu, YÜT klinikleri için yararlı tanısal testleri ortaya koyabilir.

Sonuç olarak; düşük fertilizasyona neden olan sperm örneklerindeki PLC ζ molekülünde meydana gelen değişimlerin proteinin fonksiyonel düşüklüğüne sebep olduğu ortaya koyulmaktadır.



8. SONUÇ

Çalışmamıza infertilite merkezine başvurmuş olan yaşları 24-42 arasında değişen, normospermik 20 olgu ve fertilizasyon başarısızlığına ya da düşük fertilizasyona neden olan globozoospermik, total immotil, nükleer anomali gösteren semen örnekleri ile TFF görülen 18 olgu dahil edildi. Aynı zamanda bu gruplardan DNA sekans analizi için kan örnekleri alındı.

Düşük fertilizasyon gösteren semen örnekleri ile normospermi örneklerinin değerlendirilmesinde faydalı olması açısından, bu olguların sperm hücrelerinde PLC ζ 'nin lokalizasyonunu immunfloresan yöntemini kullanarak belirledik.

Düşük fertilizasyon görülen olgularda PLC ζ molekülünün oosit aktivasyonu üzerine etkisi ayrıntılı bir biçimde incelendiğinden; biz de globozoospermik, TFF gösteren, nükleer anomali gösteren ve total immotil olan sperm parametrelerine sahip düşük fertilizasyon görülen olgularda bu molekülün 15 ekzonunu sekans ile tarayarak gen değişikliklerini izledik. PLC ζ molekülünün lokalizasyonunun; düşük fertilizasyona neden olan sperm örneklerinin baş bölgesi membranında, ekvatoryal veya post-akrozomal bölgelerinde normospermi örneklerine kıyasla azalmış bir reaksiyon gösterdiği ya da hiç reaksiyon göstermediğini gözlemledik.

Henüz insan genom mutasyon databankına bu genin değişimlerinin rapor edilmemiş olması ve sınırlı sayıdaki literatürde polimorfizm ve mutasyonların bakılmış olması düşük fertilizasyon görülen bu olgularda yaptığımız taramayı anlamlı kılmaktaydı. Keza bu gruplarda bulgular bölümünde de görüldüğü üzere pek çok değişim saptamış, literatürde hiç yer almamış ve protein farklılaşmasına neden olan bazı değişikliklerin yanı sıra stop kodonuna dönüşen bir nükleotid değişimi de bulmuş durumdayız. Bulduğumuz değişikliklerde literatürde önceden rapor edilenlerde yapılan populasyon çalışması sonrasında %5'in altında görülen değişikliklere özellikle odaklandık ve bulduğumuz p.Q94X, p.R197H, p.L440R, p.T303A, p.S500L değişimlerinin Türk populasyonunda da sıklıklarının bakılması ve aile taramalarının planlanmasının anlamlı olacağını ileri sürmekteyiz.

9. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve tamamlanmasında katkılarını, hoşgörüsünü ve desteğini esirgemeyen, örnek teminatını gerçekleştiren, bilgi ve tecrübesi ile bilimsel çalışmama yol gösteren tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Evrim ÜNSAL'a,

Tezimi hazırlama döneminde deneyimleri ve desteği ile her zaman yanımda olan, bilgi birikimini paylaşmış, katkılarını ve hoş görüşünü hiçbir zaman esirgemeyen bölüm başkanımız Sayın Doç. Dr. Canan HÜRDAĞ'a,

Laboratuvar çalışmalarım süresince yanımda olan, büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi, öneri ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Yasemin ERSOY ÇANILLIOĞLU'na,

İmmunfloresan çalışmalarımda bilgisini ve desteğini bizimle paylaşan ve zamanını ayıran Arş. Gör. Dr. Naziye ÖZKAN'a,

DNA Sekans Analizi çalışmalarımın yapılmasında yardım, anlayış ve desteklerini gördüğüm tüm Gen-Art Tüp Bebek, Kadın Sağlığı ve Üreme Biyoteknoloji Merkezi çalışanlarına,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olup desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Msc. Bio. Ayşe ALTUN'a ve Msc. Bio. Narin AHMETOĞLU'na,

Tüm yaşamım boyunca bana her zaman güvenen, teşvik eden, yüksek lisans programına başlamamda ve bitirmemde en büyük desteği gördüğüm var oluş sebebim sevgili anneme, sevgili babama ve canım kardeşlerime,

Emeği geçen ve sevgisini hissettiğim herkese,

Sonsuz teşekkürler.

10. KAYNAKLAR

1. Evens EM. A global perspective on infertility: an under recognized public health issue. *Carol Pap Int Health*. 2004, 18: 1 – 42.
2. Flaherty SP, Payne D, Matthews CD. Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998, 13: 155 – 164.
3. Forti G, Krausz C. Clinical review 100: Evaluation and treatment of the infertile couple. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998, 83: 4177 – 4188.
4. Inhorn MC. Global infertility and the globalization of new reproductive technologies: illustrations from Egypt. *Soc Sci Med*. 2003, 56: 1837 – 1851.
5. Kumtepe Y, Beyazyürek C, Çınar C, Özbey I, Özkan S, Çetinkaya K, Karlıkaya G, Karagözoğlu H, Kahraman S. A genetic survey of 1935 Turkish men with severe male factor infertility. *Reprod BiomedOnline*. 2009, 18: 465 – 474.
6. Bourne H, Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Normal fertilization and embryo development by intracytoplasmic sperm injection of round-headed acrosomeless sperm. *Fertil Steril* 1995, 63: 1329 – 1332.
7. Bourne H, Richings N, Harari O, Watkins W, Speirs AL, Johnston WI, Baker HW. The use of intracytoplasmic sperm injection for the treatment of severe and extreme male infertility. *Reprod Fertil Dev*. 1995, 7: 237 – 245.
8. Elliot DJ, Cooke HJ. The molecular genetics of male infertility. *Bioessays*. 1997, 19: 801 – 809.
9. Mahutte NG, Arici A. Failed Fertilization: is it possible? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003, 15: 211 – 218.
10. Heindryckx B, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod*. 2005, 20: 2237 – 2241.
11. Whitaker M. Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev*. 2006, 86: 25 – 88
12. Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA. Sperm phospholipase C zeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca^{2+} oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction*. 2002, 124: 611 – 623.

13. Saunders CM., Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K and Lai F. PLCz: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 2002, 129: 3533 - 3544
14. Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, Lee HC, Yoo MS, Coward K, Parrington J, Grow D, Cibelli JB, Visconti PE 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 – 3681.
15. Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon SY, Fissore RA, Hamer R, Deane CM, Ruas M, Grasa P, Soleimani R, Cuvelier CA, Gerris J, Dhont M, Deforce D, Leybaert L, De Sutter P. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod*. 2009, 24: 2417 – 2428.
16. Abraham L. Kierszenbaum. Çev. Ed. Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006, 531 - 544.
17. Keith L. Moore, T.V.N. Persaud. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Ed. Dalçık H, Yıldırım M. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009.
18. Junqueira L.C. Carneiro J. Temel Histoloji. Çeviri editörleri: Solakoğlu S, Aytekin Y. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009.
19. Ross. M. H. Histology a Text and Atlas with Cell and Molecular Biology, Fourth Edition, Lippincott Williams&Wilkins, 2003.
20. Abraham L Kierszenbaum. Fertilization, Placentation and Lactation. Histology and Cell Biology. An Introduction to Pathology.3rd edn. Philadelphia, Saunders, 2012, 660 – 661.
21. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri, Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2008.
22. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Laboratuvar El Kitabı: İnsan Semeni ve Sperm-Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi. Çev. Ed. Günalp S. Ankara, Tıp Teknik Kitapevi, 2002.
23. William K Ovalle, Patrick C Nahirney. Çev. Ed. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. Netter Temel Histoloji. Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2009.
24. Green DP. Mammalian Fertilization as a Biological Machine: a Working Model for Adhesion and Fusion of Sperm and Oocyte. *Hum Reprod*. 1993, 8: 91 - 96.

25. David KG , Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Yardımla Üreme Teknikleri Temel Kitabı (Laboratuvar ve Klinik Görüşler). İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2010.
26. David K.G. In Vitro Fertilization Pratik Yaklaşım. Çeviri Editörü: Serdaroğlu H. İstanbul, Doğan Tıp Kitabevi, 2009.
27. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory and Clinical Perspectives. UK, Martin Dunitz, 2001.
28. Longo FJ. Fertilization. Chapman and Hall, 2nd ed., 1997
29. Jones R. Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Development*. 1991, 111: 1156 - 63.
30. Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril*. 1981, 35 (6): 662-65.
31. Jones KT. Ca^{+2} oscillations in the activation of the egg and development of the embryo in mammals. *Int J Dev Biol*. 1998, 42: 1 - 10.
32. Jones KT. Mammalian egg activation: from Ca^{2+} spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 2005, 130: 813 – 823.
33. Jones KT. Intracellular calcium in the fertilization and development of mammalian eggs. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007, 34: 1804 – 1089.
34. Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol*. 1992, 149: 80 – 89.
35. Swann K, Ozil JP. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol*. 1994, 152: 183 – 222.
36. Miyazaki S, Ito M. Calcium signals for egg activation in mammals. *J Pharmacol Sci*. 2006, 100: 545 – 552.
37. Publicover S, Harper CV, Barratt C. $[Ca^{2+}]_i$ Signalling in Sperm – Making the Most of What You've Got. *Nat Cell Biol* 2007, 9: 235 – 242.
38. Swann K, Yu Y. The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *Int J Dev Biol*. 2008, 52: 585 – 594.
39. Cuthbertson KS, Cobbold PH. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{+2} . *Nature*. 1985, 316: 541 - 542.

40. Sousa M, Barros A, Mendoza C, Tesarik J. Effects of protein kinase C activation and inhibition on sperm-, thimerosal-, and ryanodine-induced calcium responses of human oocytes. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2: 699 - 708.
41. Tesarik J, Sousa M. Mechanism of calcium oscillations in human oocytes: a two-store model. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2: 383 - 386.
42. Tesarik J. Oscillin-reopening the hunting season. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4: 1007-1009.
43. Parrington J, Jones KT, Lai A, Swann K. The soluble sperm factor that causes Ca^{2+} release from sea-urchin (*Lytechinus pictus*) egg homogenates also triggers Ca^{2+} oscillations after injection into mouse eggs. *BiochemJ.* 1999, 341: 1 - 4.
44. Jones KT, Matsuda M, Parrington J, Katan M, Swann K. Different Ca^{2+} -releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs. *Biochem J.* 2000, 346: 743 - 749.
45. Rice A, Parrington J, Jones KT, Swann K. Mammalian sperm contain a $\text{Ca}^{(2+)-}$ sensitive phospholipase C activity that can generate $\text{InsP}_{(3)}$ from $\text{PIP}_{(2)}$ associated with intracellular organelles. *Dev Biol.* 2000, 228: 125 - 135.
46. Parrington J, Lai FA, Swann K. The soluble mammalian sperm factor protein that triggers Ca^{2+} oscillations in eggs: evidence for expression of mRNA(s) coding for sperm factor protein(s) in spermatogenic cells. *Biol Cell.* 2000; 92: 267 - 275.
47. Parrington J, Jones ML, Tunwell R, Devader C, Katan M, Swann K. Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca^{2+} release in eggs. *Reproduction.* 2002, 123: 31 - 39.
48. Kouchi Z, Shikano T, Nakamura Y, Shirakawa H, Fukami K, Miyazaki S. The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase Czeta. *J Biol Chem.* 2005, 280: 21015 - 21021.
49. Live Strong: Mens Health. [<http://www.livestrong.com/article/86470-abnormalities-sperm>]
50. Kahraman S, Akarsu C, Cengiz G, Dirican K, Sözen E, Can B, Güven C and Vanderzwalmen P. Fertility of ejaculated and testicular megalohed spermatozoa with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999, 14 (3): 726 - 730.
51. Schirren CG, Holstein A, Schirren C. Über die Morphogenese rundkopfiger Spermatozoen des Menschen. *Andrologie.* 1971, 3: 117 - 125.

52. Escalier D. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int J Dev Biol.* 1990, 34: 287 – 297.
53. Takenawa T and Nagai Y. Purification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from rat liver. *J. Biol. Chem.* 1981, 256: 6769 - 6775.
54. Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishii H, Bansal VS and Wilson DB. The metabolism of phosphoinositide-derived Messenger molecules. *Science.* 1986, 234: 1519 - 1526.
55. Singer WD, Brown HA and Sternweis PC. Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.* 1997, 66: 475-509.
56. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 2001, 70: 281 - 312.
57. Gresset A, Sondak J, Harden TK. The Phospholipase C Isozymes and Their Regulation. *Subcell Biochem.* 2012, 58: 61 – 94.
58. Stricker SA. Comparative biology of calcium signalling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol.* 1999, 211: 157 – 176.
59. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1793: 933 - 940.
60. Williams RL. Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1441 (2 – 3): 255 – 267.
61. Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, Fukami K, Kataoka T, Yun S, Ryu SH. Multiple roles of phosphoinositide - specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep.* 2008, 41 (6): 415 – 434.
62. Katan M. Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 1998, 1436: 5 – 17.
63. Rebecchi MJ, Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* 2000, 80: 1291 – 1335.
64. Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLCzeta (zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol.* 2006, 17: 264 – 273.

65. Kashir J, Heindryckx B, Jones C, De Sutter P, Parrington J, and Coward K. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum Reprod Update*. 2010, 16: 690 – 703.
66. Kouchi Z, Fukami K, Shikano T, Oda S, Nakamura Y, Takenawa T, Miyazaki S. Recombinant phospholipase C ζ has high Ca^{2+} sensitivity and induces Ca^{2+} oscillations in mouse eggs. *J Biol Chem*. 2004, 279 (11): 10408 – 10412.
67. Ramadan WM, Kashir J, Jones C, Coward K. Phospholipase C zeta and its potential role in infertility treatment. *Cell Commun Signal*. 2012, 10: 12.
68. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol*. 1993, 158 (1): 62 – 78.
69. Jones KT, Carroll J, Merriman JA, Whittingham DG, Kono T. Repetitive sperm-induced Ca^{2+} transients in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Development*. 1995, 121 (10): 3259 – 3266.
70. Mehlmann LM, Kline D. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol Reprod*. 1994, 51 (6): 1088 – 1098.
71. Wakai T, Vanderheyden V, Fissore RA. Ca^{2+} signaling during mammalian fertilization: requirements, players, and adaptations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, 3 (4): 006767.
72. Amdani SN, Jones C, Coward K. Phospholipase C zeta (PLC ζ): Oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Advances in Biological Regulation*. 2012, 1 - 17.
73. Marangos P, FitzHarris G, Carroll J. Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development*. 2003, 130: 1461 – 1472.
74. Grasa P, Coward K, Young C, Parrington J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C ζ , in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2008, 23 (11): 2513 – 2522.
75. Yıldırım A, Karadağ Y, Kandemir N, Sakin MA. Genetik. Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 2008.
76. Emil A Tanagho, Jack W McAninch. Çev. Ed. Kazancı G. Erkek İnfertilitesi. Smith Genel Üroloji. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009, 684 - 707.

77. Mangoli V, Dandekar S, Desai S, Mangoli R. The outcome of ART in males with impaired spermatogenesis. *J Hum Reprod Sci.* 2008, 1: 73 – 76.
78. Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalae M. Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2010, 94 (2): 520 – 526.
79. Mahutte NG, Arici A. Failed Fertilization: is it possible? *Curr Opin ObstetGynecol.* 2003, 15: 211 – 218.
80. Kashir J, Konstantinidis M, Jones C, Lemmon B, Lee HC, Hamer R, Heindryckx B, Deane CM, De Sutter P, Fissore RA, Parrington J, Wells D, Coward K. A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility. *Hum Reprod.* 2012, 27: 222 – 31.
81. Nomikos M, Elgmati K, Theodoridou M, Calver BL, Cumbes B, Nounesis G, et al. Male infertility-linked point mutation disrupts the Ca⁺² oscillation-inducing and PIP₂ hydrolysis activity of sperm PLC ζ . *Biochem J.* 2011, 434: 211 – 7.
82. Aghajanpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalae M, Moshtaghian J, Parrington J, Nasr- Esfahani MH. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. *Hum Reprod.* 2011, 26: 2950 – 2956.
83. Jones KT, Cruttwell C, Parrington J. and Swann K. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates. *FEBS Lett.* 1998, 437: 297 - 300.
84. Brind S, Swann K, and Carroll J. Inositol 1, 4, 5 - trisphosphate receptors are downregulated in mouse oocytes in response to sperm and adenophostin A but not to increase in intracellular Ca²⁺ or egg activation. *Dev. Biol.* 2000, 223: 251 - 265.
85. Jellerette T, He CL, Wu H, Parys JB and Fissore RA. Down regulation of the inositol 1, 4, 5 - trisphosphate receptor in mouse eggs following fertilization or parthenogenetic activation. *Dev. Biol.* 2000, 223: 238 - 250.
86. Baltacı V, Ayvaz ÖU, Ünsal E, Aktaş Y, Baltacı A, Turhan F, Özcan S, Sönmezer M. The effectiveness of intracytoplasmic sperm injection combined with piezoelectric stimulation in infertile couples with total fertilization failure. *Fertil Steril.* 2010, 94 (3): 900 – 904.

87. Yanagida K, Morozumi K, Katayose H, Hayashi S, Sato A. Successful pregnancy after ICSI with strontium oocyte activation in low rates of fertilization. *Reprod BiomedOnline*. 2006, 13: 801 – 806.
88. Taylor SL, Yoon SY, Morshedi MS, Lacey DR, Jellerette T, Fissore RA, Oehninger S. Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod Biomed Online*. 2010, 20: 559 – 564.
89. Yoda A, Oda S, Shikano T, Kouchi Z, Awaji T, Shirakawa H, Kinoshita K and Miyazaki S. Ca^{2+} oscillation - inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Dev. Biol.* 2004, 268: 245 – 257.
90. Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, antipolysperm defense and assisted reproduction. *Microsc Res Tech.* 2003, 61 (4): 362 – 378.
91. Rybouchkin AV, Van der Straeten F, Quatacker J, De Sutter P, Dhont M. Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil Steril.* 1997, 68: 1144 – 1147.
92. Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amanai M, Isobe T, Itagaki C. Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev Biol.* 2004, 274: 370 – 83.
93. Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry AC, Yanagimachi H. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod.* 1998, 58: 1407 – 1415.
94. Perry AC, Wakayama T, Yanagimachi R. A novel trans-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. *Biol Reprod.* 1999, 60: 747 – 755.
95. Yoon AY, Fissore R. Release of phospholipase C ζ and $[Ca^{+2}]$ oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. *Reproduction.* 2007, 134: 695 - 704.
96. 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 – 2242.

97. Wang PJ and Pan J. The role of spermatogonially expressed germ cell-specific genes in mammalian meiosis. *Chromosome Res.* 2007, 15: 623 – 632.
98. Zheng K, Yang F, Wang PJ. Regulation of male fertility by X - linked genes. *J Androl.* 2010, 31: 79 – 85.

