

## Erkek infertilitesinin başarısız oosit aktivasyonunun fosfolipaz c $\zeta$ ile önlenmesi

Nomikos M, Yu Y, Elgmati K, Theodoridou M, Campbell K, Vasilakopoulou V, et al. *Fertil Steril* 2012; 2012Sep 19, Epub ahead of print).

Fertilizasyondan sonra embriyonel gelişimin ilk aşaması kalsiyum iyon ( $Ca^{2+}$ ) salınışı ile olan oosit aktivasyonudur. Bu aktivasyon aracılığı ile kapasitasyon ve embriyo gelişimi ile ilişkili olarak polispermi önlenir; mayoz tamamlanır ve pronükleus formasyonu sağlanır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda,  $Ca^{2+}$  iyon salınışının testiste spesifik fosfolipaz C zeta (PLC $\zeta$ ) izoenzimi ile sağlandığı gösterilmiştir. Bu enzim aktivasyonu ile hücre içi  $Ca^{2+}$  sinyal yolağı aktive olur ve inozitol 1, 4, 5-trifosfat (InsP3) ile membran fosfolipid uyarımı; fosfotidil inozitol 4, 5 bifosfat (PIP2) ile sitoplazmik  $Ca^{2+}$  salınışı gerçekleşir. Yetmiş kilo dalton ağırlığındaki PLC $\zeta$  izoenziminin dört EF bağlanma bölgesi vardır ve bunlar X, Y ve C2 bölgeleri olarak adlandırılır.

Yapılan çalışmalar anormal PLC $\zeta$  aktivasyonunun oosit içi  $Ca^{2+}$  salınışı yetersizliği ve bozulmuş aktivasyona bağlı başarısız ICSI uygulamaları ile sonuçlandığını ortaya koymaktadır. Yine yapılan çalışmalarda, PLC $\zeta$  H233L ve PLC $\zeta$ H938P olmak üzere iki farklı PLC $\zeta$  mutasyonu tanımlanmıştır. Bu yüzden PLC $\zeta$  yokluğunda normal (Wild Type=WT) PLC $\zeta$ 'nin tedavide kullanılabileceği belirtilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda mutant PLC $\zeta$  varlığında WT- PLC $\zeta$  ile oosit aktivasyonunun sağlandığı ve embriyo gelişiminin uyarıldığı ileri sürülmüştür.

Bu çalışmada amaç; PLC $\zeta$  mutasyonunun PIP2 hidrolizi ve  $Ca^{2+}$  salınışını etkileyerek erkek infertilitesine yol açtığı gösterilmesi; purifiye insan PLC $\zeta$ 'nin PIP2 aktivasyonu yapıcı etkisini ortaya konulması ve ICSI sonrası oosit aktivasyonu ve embriyo gelişimi sağlandığının gösterilmesidir.

cRNA sentezi için insan PLC lusiferansını kodlayan pCR3 plazmid kullanılarak fare ve insan WT-PLC $\zeta$  ve mutant- PLC $\zeta$  enzimleri elde edildi. NusA füzyon proteini ekspresyonu E. Coli ve pETMM60 plazmid kullanılarak sağlandı. PLC aktivasyonu PIP2 hidrolitik enzim aktivasyonu ile değerlendirildi.

Fare oositleri hCG sonrası 14,5-15,5 sa toplandı ve her

bir oosite oosit volümünün %3-5'i kadar cRNA veya rekombinant protein enjeksiyonu yapıldı. Oosit aktivasyonu ve embriyo gelişimi için 6 saat süre ile Cytochalasin B 5  $\mu$ g/mL içeren potasyum bazlı optimize medyum (H-KSOM) içinde tutuldu ve sonrasında 37°C'de %5CO<sub>2</sub> KSOM ile inkübe edildi. Embriyo gelişimleri 6, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde değerlendirildi.

Hücre içi  $Ca^{2+}$  ölçümü ve sitoplazmik  $Ca^{2+}$  değişimi Oregon Green BAPTA dextran immünofloresans yöntemi ile sperm PLC immünofloresans incelemesi ise konfokal mikroskop x1000-ImageJ aracılığı ile değerlendirildi. İnsan sperm protein ayrılması ise SDS-PAGE ve immünlot yöntemi ile yapıldı.

PLC $\zeta$ 'nin insan sperminde ekvatorial dağılım gösterdiği izlendi. Akrozomal bölgede de immünofloresan görüntü kaydedilmesine rağmen bunun yalancı pozitiflik olup olmadığı ve mevcut bulunsa bile klinik önemi henüz belli değildir.

Purifiye insan PLC $\zeta$  ile sağlanan PIP2 hidrolik enzim aktivitesi, fare PLC $\zeta$  ile sağlanandan daha fazla olmasına rağmen (655 $\pm$ 36 nmol/dk/mg vs 460 $\pm$ 24 nmol/dk/mg); enzim aktivitesine bağlı  $Ca^{2+}$  değişimi (EC<sub>50</sub>) anlamlı olmamıştır (70 nM vs 64 nM).

Rekombinan insan PLC $\zeta$  gerek insan oositlerinde gerekse fare oositlerinde  $Ca^{2+}$  salınışına yol açarken, füzyon proteini olarak kullanılan NusA'da bu etki elde edilmemiştir. Oosit  $Ca^{2+}$  aktivasyonu için gerekli doz insan ve oositleri için sırasıyla 0.05 ng/ml NusA-hPLC $\zeta$  ve 0,0167 ng/ml NusA-hPLC $\zeta$  olarak belirtilmiştir. ICSI sonrası pronükleus formasyonu, 2 ve 8 hücreli evre gelişimi ve blastosit formasyonu saptanmıştır.

Rekombinan ve mutant PLC $\zeta$  formları ile yapılan değerlendirmede WT-PLC $\zeta$  ile 25 dakika içinde  $Ca^{2+}$  salınışı gerçekleşir ve 2 saat içinde ortalama 9.02 $\pm$ 0.037  $Ca^{2+}$  dalgası olurken, mutant PLC $\zeta$ H233L ile 190 dakika içinde 2.84 $\pm$ 0.076  $Ca^{2+}$  dalgası izlenmiştir. Buna karşın mutant

PLC $\zeta$ H398P ile herhangi bir akitvasyon gözlenmemiştir. Mutant formlar ile 3 saat süreyle inkube edilen oositlere WT-PLC $\zeta$  konulduğu zaman oosit aktivasyonunun başladığı izlenmiştir.

Günümüzde başarısız IVF/ICSI uygulamalarında oosit aktivasyonun sağlamak amacı ile Ca iyonofor tedavisi kullanılmaktadır ve bu yöntem etkin ve güvenilir bir uygulamadır. Yapılan in vitro çalışmalarda mPLC $\zeta$  ile Ca<sup>2+</sup> salınımı sağlandığı gösterilmiştir. Aktif rekombinan hPLC $\zeta$  protein ile aynı etkinin daha yüksek düzeyde sağlanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler oosit aktivasyonu ve

embriyo gelişimi arasındaki ilişkiyi daha net olarak ortaya koymakta ve hPLC $\zeta$ 'nin başarısız ICSI uygulamalarında oosit aktivasyonu ve embriyo gelişimi için kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak, zor sentez yönteminin basitleştirilmesi yanında kullanılacak hPLC $\zeta$  protein dozunun da belirlenmesi amacı ile ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### Çeviri:

**Yrd. Doç. Dr. Şehime Temel<sup>1</sup>, Prof. Dr. M. Murad Basar<sup>2</sup>**  
**<sup>1</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı. Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi**  
**<sup>2</sup>Memorial Şişli Hastanesi, Üroloji-Androloji Bölümü**