

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

RAPAMİSİN UYGULAMASININ FARE
SPERMATOGENİK HÜCRELERE ETKİSİ

Pınar ŞAHİN

Yüksek lisans tezi

Antalya, 2012

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

RAPAMİSİN UYGULAMASININ FARE SPERMATOGENİK HÜCRELERE ETKİSİ

Pınar ŞAHİN

Yüksek lisans tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (Proje No: 2010.02.0122.009) ve TÜBİTAK (Proje no: 110S309) Tarafından Desteklenmiştir.

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Üreme Biyolojisi programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.
09/07/2010

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Arda TAŞATARGİL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Gökhan AKKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri
tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2010 tarih ve
.. / .. sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Spermatogenez, hücre yenilenmesi ve farklılaşmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Rapamisin'in memeli hedefi (Mammalian target of rapamycin/mTOR) sinyal yolağı; hücre metabolizması, büyümesi ve kurtuluşunda merkezi bir düzenleyicidir. mTOR, çeşitli proteinler ile fiziksel ilişki kurarak, mTORC1(mTOR kompleks 1) ve mTORC2 (mTOR kompleks 2) protein komplekslerini oluşturur. mTOR inhibitörü rapamisine duyarlı olan mTORC1, hücre büyümesi için gerekli olan protein sentezini ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E)-bağlanma proteini 1 (4E-BP1) ve p70 ribozomal S6 Kinaz 1 (p70S6K1)'i fosforlayarak tetikler. Tübero Skleroz Kompleks (TSC2/Tuberin), mTOR aktivitesini negatif yönde düzenleyen bir tümör baskılayıcıdır. mTOR inhibitörleri, organ transplantasyonu hastalarında bağışıklık sistemini baskılamak için kullanılan ilaçlardır. Son yıllardaki raporlar rapamisin'in, organ nakli hastalarında kullanılmasının testosteron düzeylerinde ve sperm sayılarında düşüşe neden olarak, fertilitiyi olumsuz etkilediğini ortaya koymaktadır. Rapamisin ve ilişkili mTOR sinyal yolağının sperm üretimi üzerine olan bu etkiyi ne şekilde gerçekleştirdiği hakkında literatürde bilgi oldukça eksiktir. Bu noktadan yola çıkarak birinci aşamada mTOR sinyal yolağı ile ilişkili proteinlerin erişkin fare testisinde esasen erken spermatogenik seri hücrelerinde ekspre olduğunu gösterdik. İkinci aşamada bu yolağın testiste ne şekilde rolü olabileceğini araştırmayı hedefledik. Çalışmada erişkin erkek farelerden kontrol, taşıyıcı ve rapamisin olarak 3 grup oluşturulmuştur. Farelerin testisinden elde edilen seminifer tübüller 24 saat seminifer tübül damla kültüründe kültüre edilmiştir. Rapamisin grubu 200 nmol rapamisin varlığında, taşıyıcı grubu etanol (rapamisin çözücüsü) varlığında kültüre edilirken, kontrol grubu %0,1 lik BSA içeren RPMI medyumunda içerisinde kültüre edilmiştir. Kültür sonrası tüm gruplar için canlılık testi yapılmıştır. mTOR sinyal yolağı inhibisyonunun belirteci olan fosforile S6K, hücre bölünme belirteçleri olan PCNA, mayoz bölünmelere girişin belirteci olan Stra8 ve bir başka mayoz bölünme belirteci olan sycp3, germ hücre belirteci olan VASA ve mTOR sinyal yolağı ilişkili proteinlerinin ekspresyonları western blot tekniği ve immünohistokimya teknikleri ile gösterilmiştir. Tüm gruplara TUNEL metodu uygulanarak hücre ölümü değerlendirilmiştir. Tüm proteinlerin genlerinin mRNA düzeyleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmiştir. Tüm gruplarda hücre canlılıklarının eşit olduğu gözlenmiştir. Rapamisin grubunda kontrole oranla p-S6K, PCNA ve Stra8 ekspresyonlarının anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. VASA ekspresyonunun tüm gruplarda eşit olduğu gösterilmiştir. Apoptoza uğrayan hücre sayılarında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 4EBP1 seviyesinin rapamisin grubunda azaldığı gözlemlendi. VASA ve PCNA genlerinin mRNA seviyelerinin rapamisin uygulanan gruplarda diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Çalışmamız mTOR sinyal yolağının spermatogonyal kök hücrelerin proliferasyonu ve mayoz bölünmeye girerek farklılaşmasında rolü olabileceğini gösteren ilk fonksiyonel çalışmadır. Bu çalışma mTOR sinyal yolağının erkek üreme sistemindeki rolüne ek olarak ileride yapılacak olan kök hücre çalışmaları için ışık tutabilecek bulguları ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: mTOR, rapamisin, testis, spermatogenez

ABSTRACT

Spermatogenesis is a complex process of cellular renewal and differentiation. mTOR signaling pathway serves as a central regulator of cell metabolism, proliferation and survival. mTOR forms two protein complexes, mTORC1 and mTORC2, by interacting various proteins. Rapamycin sensitive-mTORC1 positively controls protein synthesis by phosphorylating the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)- binding protein 1 (4E-BP1) and the p70 ribosomal S6 kinase 1 (p70 S6K1). Tuberous sclerosis complex (TSC/Tuberin) is a negative regulator of mTORC1. mTOR inhibitors are immunosuppressive drugs used in organ transplantation patients. Recently, several studies have emphasized potential impact of rapamycin on male gonadal function by decreasing testosterone levels and sperm counts. Recently, we have shown immunohistochemical distributions of mTOR signalling proteins in early spermatogenic cells of adult mice. Thus; we aimed to investigate the effect of rapamycin administration to spermatogenic cells utilizing seminiferous tubule cultures from adult mice. We grouped adult mice as control, vehicle and rapamycin. We used 200 nmol rapamycin. We cultured vehicle group mice with ethanol (solvent of rapamycin) and control group seminiferous tubules with %0,1 BSA and RPMI medium for 24 hours. After culture cell viability assay were performed at 0. And 24 hours. Western blot and immunohistochemistry were applied for p-S6K, PCNA, Stra8, VASA, Sycp3 and proteins associated mTOR signaling pathway. For all groups TUNEL was performed for cell death. mRNA levels were evaluate with RT-PCR. Our results have indicated that cell viability was similar between groups. For western blot analysis p-S6K, PCNA and Stra8 expression was decreased in rapamycin administrated group significantly. No differences were observed for VASA expression between the groups. For all groups the number of apoptotic cells was similar. 4EBP1 levels decreased in rapamycin group. mRNA levels of VASA and PCNA increased significantly in rapamycin administrated group. This is the first functional study that reports mTOR signaling pathway may have an important role in spermatogonial proliferation and differentiation. Our findings would also contribute to stem cell studies as well.

Key words: mTOR, rapamycin, testis, spermatogenesis

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ'ye,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' nın tüm hocalarına ve çalışanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü' nün değerli elemanlarına,

Son olarak, beni yalnız bırakmayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ailemin tüm üyelerine en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Pınar ŞAHİN

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
1.1 HİPOTEZ ve AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Memelilerde Testis Gelişimi	3
2.1.1. Memeli Testisinin Genel Yapısı	3
2.1.2. Spermatogoniya	5
2.1.3. Spermatositler	7
2.1.4. Spermatidler	11
2.1.5. Yetişkin Kemirgen Testisi	12
2.1.6. Kemirgen Testisinin Somatik Hücreleri	15
2.1.6.1. Sertoli Hücreleri	15
2.1.6.2. Leydig Hücreleri	16
2.1.6.3. Peritübüler Myoid Hücreler	17
2.1.6.4. Endotelyal Hücreler	17
2.1.7. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü	17
2.1.7.1. Follikül Stimüle Edici Hormonun Rolü	18
2.1.7.2. Luteinize Edici Hormonun Rolü	19
2.2. mTOR(Rapamisin memeli hedefi) sinyal yolağı	20
2.3. Rapamisin	22
2.3.1. Rapamisin ve erkek infertilitesi	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Seminifer tübül damla kültürü	26
3.2. Hücre canlılık testi	26
3.2.1. Hücreizolasyonu	26
3.3. Doku takibi ve kesit alma	27
3.4. İmmünohistokimya metodu	27
3.5. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve western blot	28
3.6. Tunel metodu	29
3.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)	29

3.8. İstatistiksel analizler	29
4. BULGULAR	31
4.1. Seminifer tübül damla kültürü	31
4.2. Canlılık testi	31
4.3. Western blot	32
4.4. TUNEL	36
4.5. İmmünohistokimya	36
4.6. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)	40
5.TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR	50
7. KAYNAKLAR	51
8. ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Al	:	Tip A dizilmiş spermatogoniya
AKT	:	Protein kinaz B
Apr	:	Tip A çift spermatogoniya
As	:	Tip A tek spermatogoniya
BSA	:	Bovine serum albumin
BTB	:	Kan-testis bariyeri
cDNA	:	Komplementer DNA
CaMKIV	:	Ca ²⁺ /Calmodulin bağımlı protein kinaz IV
CDK	:	Siklin bağımlı kinaz
CDK2	:	Siklin bağımlı kinaz 2
CL-HRP	:	Chemiluminisans – horse radish peroksidaz
DAB	:	3,3' Diaminobenzidine
Deptor	:	DEP-domain-containing mTOR-interacting protein
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
Dhh	:	Desert hedgehog
E	:	Embriyonik gün
ELİSA	:	Enzyme linked immunosorbent assay
FKBP12	:	FK506 bağlanma proteini 12 kDa
FRB	:	FKBP12-rapamisin bağlanma domeyni
FSH	:	Folikül stimüle edici hormon
FSHβ	:	Folikül stimüle edici hormon beta
FSH-R	:	Folikül stimüle edici hormon reseptör
GnRH	:	Gonodotropin salgılayıcı hormon
IL-2	:	İnterlökin 2
LH	:	Luteinize edici hormon
LH-R	:	Luteinize edici hormon reseptör
MAPK	:	Mitojen ile aktive protein kinaz
mLST8	:	Mammalian lethal with Sec13 protein 8
mRNA	:	Mesajcı ribonükleik asit
mRNP	:	Messenger ribonükleoprotein parçacıkları
mTOR	:	Rapamisin memeli hedefi
mTORC1	:	mTOR kompleks 1
mTORC2	:	mTOR kompleks 2
mRNP	:	Mesajcı ribonükleoprotein parçacıkları
MTT	:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole
MVH	:	Fare VASA homolog protein
Ngn3	:	Neurogenin-3
PGH	:	Primordiyal germ hücre
PNG	:	Postnatal gün
PRAS40	:	Prolinerich AKT substrate 40 kDa
P70S6K	:	p70 ribozomal S6 Kinaz 1
PDGF	:	Platelet-kökenli büyüme faktörü
PDGF-R	:	Platelet-kökenli büyüme faktörü reseptörü
PVDF	:	Polyvinylidene fluoride
PBS	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PCNA	:	Prolifere olan hücre çekirdek antijeni
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	:	Fosfo inositol 3 kinaz
Raptor	:	Regulatory-associated protein of mTOR
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SC	:	Sinaptonemal kompleks
SCF	:	Kök hücre faktörü
SD	:	Standart sapma
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SOX9	:	(Sex determining region on Y kromozom) box9
SRY	:	Sex determining region on Y chromosome
Stra8	:	Stimulated retinoic acid gene 8
Sycp1	:	Sinaptonemal kompleks 1
Sycp2	:	Sinaptonemal kompleks 2
Sycp3	:	Sinaptonemal kompleks 3
TB-RBP	:	Testis beyin ribonükleik asit bağlanma proteini
TBS	:	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TBS-T	:	Tween-20'li tris tamponlu tuz çözeltisi
TNFα	:	Tümör nekroz faktör alfa
TOR	:	Rapamisin hedefi
TP	:	Tranzisyon proteinleri
TRAX	:	Translin bağımlı faktör X
TSC1	:	Tuberoz skleroz kompleks 1
TSC2	:	Tuberoz skleroz kompleks 2
TUNEL	:	Terminal d-UTP Nick-End Labeling
4EBP1	:	4E (eIF4E)-bağlanma proteini 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
Şekil 2.1. Testis genel histolojik görünümü	4
Şekil 2.2. Memeli testisinin genel yapısı	4
Şekil 2.3. Seminifer epitelin organizasyonu	5
Şekil 2.4. Mayoz hücre siklusunun basamakları	8
Şekil 2.5. Mayoz profaz 1 aşamasının kromozomal olayları ve sinaptonemal kompleks dağılımı	10
Şekil 2.6. Seminifer epitelyum ve intersitisyumun genel histolojik görünümü	13
Şekil 2.7. Seminifer tübül evrelerinin basamaklandırılması	14
Şekil 2.8. Spermatogenezin hipotalamus-hipofiz-gonad aksı üzerinden hormonal kontrolü	18
Şekil 2.9. mTOR organizasyonu ve sinyal kompleksleri	21
Şekil 2.10. mTOR sinyal ağı	22
Şekil 2.11. Rapamisin'in molekül yapısı	23
Şekil 2.12. Rapamisin'in mTOR sinyal yolağı üzerindeki etkisi	24
Şekil 4.1. Kontrol 0. saatte izole edilen seminifer tübüllerin genel mikroskopik görünümü	31

Şekil 4.2. Kontrol 24. saatte kültürden izole edilen seminifer tübülün genel mikroskopik görünümü	31
Şekil 4.3. Kontrol 0. saat ve 24 saatlik kültür sonunda elde edilen hücre canlılık değerleri	32
Şekil 4.4. Kontrol 0. saat ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerin p70S6K ekspresyonu	32
Şekil 4.5. Her grup için elde edilen fosforile S6K / GAPDH oranları	33
Şekil 4.6. Kontrol 0. saat ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerin proliferasyon ve mayoz bölünme belirteçlerinin ekspresyonları	33
Şekil 4.7. Her grup için elde edilen PCNA / GAPDH oranları	34
Şekil 4.8. Her grup için elde edilen Stra8 / GAPDH oranları	34
Şekil 4.9. Kontrol 0. saat ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerin VASA (Germ hücre belirteci) ekspresyonları	35
Şekil 4.10. Her grup için elde edilen fosforile VASA / GAPDH oranları	35
Şekil 4.11. Kontrol 0. Saat ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki TUNEL reaksiyonu	36
Şekil 4.12. Kontrol 0. Saat ve 24 saat kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki mTOR ekspresyonu	37
Şekil 4.13. Kontrol 0. Saat ve 24 saat kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki p- mTOR ekspresyonu	38

Şekil 4.14. Kontrol 0. Saat ve 24 saat kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki sinaptonemal kompleks 3 ekspresyonu	39
Şekil 4.15. Kontrol 0. Saat ve 24 saat kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki 4EBP1 ekspresyonu	40
Şekil 4.16. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki S6K mRNA ekspresyonu	41
Şekil 4.17. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki mTOR mRNA ekspresyonu	42
Şekil 4.18. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki 4EBP1 mRNA ekspresyonu	42
Şekil 4.19. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki TSC2 mRNA ekspresyonu	43
Şekil 4.20. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki Sycp3 mRNA ekspresyonu	43
Şekil 4.21. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki Stra8 mRNA ekspresyonu	44
Şekil 4.22. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki VASA mRNA ekspresyonu	44
Şekil 4.23. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki PCNA mRNA ekspresyonu	45

GİRİŞ

1.1. Hipotezin temeli ve amaç

Spermatogenez, hücre yenilenmesi ve farklılaşmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Testis kök hücreleri olan Tip A spermatogonyumların farklılaşması ile başlayarak olgun sperm hücresinin oluşumuna kadar devam etmektedir [1].

mTOR(mammalian target of rapamycin/rapamisininin memeli hedefi) fosfo inozitol 3 kinaz ailesinin bir üyesidir. Evrimsel olarak korunmuş bir serin treonin kinazdır [2]. mTOR kompleks1 (mTORC1) ve mTOR kompleks2 (mTORC2) olmak üzere 2 farklı formu bulunmaktadır. mTORC1 kompleksi beş bileşenden oluşur: katalitik subunitte özelliğinde olan mammalian target of rapamycin (mTOR), regulatory-associated protein of mTOR (Raptor), mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLST8, diğer ismiyle GbL, prolinerich AKT substrate 40 kDa (PRAS40), DEP-domain-containing mTOR-interacting protein (Deptor) [3]. Rapamisine duyarlı olan mTORC1 protein kompleksi, hücre büyümesi için gerekli olan protein sentezini çeşitli alt yolak proteinlerini aktive ederek pozitif şekilde kontrol eder. mTORC1 hücre büyümesini; protein, lipid, organel biyosentezi gibi anabolik olayları indükleyerek ve otofaji gibi katabolik süreçleri sınırlandırarak gerçekleştirir [2]. mTORC1; ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E)-bağlanma proteini 1 (4E-BP1) ve p70 ribozomal S6 Kinaz 1 (S6K1)'i fosforlayarak protein sentezini tetikler. 4E-BP1'in fosforilasyonu sonucunda cap-bağımlı translasyon [4] ve S6K aktivasyonu sonucunda da mRNA biyogenezi, cap-bağımlı translasyon ve uzama, ribozomal protein translasyonu artar [5]. mTOR bağımlı, 4E-BP1 ve S6K1 aracılı yollar hücre büyümesi ve çoğalmasını birbirlerinden bağımsız olarak kontrol ederler. mTORC2 Akt (protein kinaz B) tarafından aktive edilmektedir. mTORC1 hücre büyümesini düzenleyen 4 esas sinyali analiz ederek birleştirir: (i) büyüme faktörleri, (ii) enerji durumu, (iii) oksijen, (iv) aminoasitler. mTORC1 aktivitesinin en önemli düzenleyicilerinden birisi, TSC1 (hamartin) ve TSC2 (tüberin) heterodimerlerinden oluşan Tübero Skleroz Kompleks (TSC)'tir [6]. TSC1 ve TSC2, mTORC1 kompleksinin aktivitesini negatif yönde düzenleyen önemli tümör baskılayıcılardır ve bu genlerin heterozigot mutasyonlarında, benign karakterli tübero skleroz tümörleri oluşur. mTORC2 ile ilgili yapılan çalışmalar bu kompleksin hücre iskeletinin düzenlenmesinde rolü olduğunu ve indirekt olarak mTORC1 kompleksini aktive ettiğini göstermektedir [6].

Son yıllardaki bulgular, mTOR yolağının T-hücre aktivasyonu, adipogenez, insülin direnci, tümör oluşumu ve anjiyogenez gibi çeşitli hücresel süreçlerde aktive olduğunu ve kanser, tip-2 diyabet gibi hastalıklarda ise düzenlenmesinin bozulduğunu göstermiştir [7]. Bu gözlemler, mTOR sinyal yolağına olan bilimsel ve klinik ilginin artmasına neden olmuştur. mTOR inhibitörleri olan rapamisin ve analoglarının, romatoid artrit, koroner restenoz, organ nakli ve solid tümörlerin tedavisi gibi patolojik durumlarda artan kullanımıyla birlikte mTOR sinyal yolağına karşı olan ilgi daha da belirginleşmiştir [7].

Bir mTOR inhibitörü olan rapamisin *Streptomyces hygroscopicus*'dan izole edilmiş olan bakteriyel bir makrolidtir [8]. Rapamisin ' in bulunması ile birlikte mTOR sinyal yolağına olan ilgi artmıştır. Rapamisin FK506 bağlanma protein(12 kDa) bölümü (FKBP12) ile mTOR'a bağlanarak mTOR'u inhibe etmektedir [2]. mTOR inhibitörleri klinikte organ nakli hastalarında immünsüpresif ajan olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda yayınlanan raporlar, bir mTOR inhibitörü olan rapamisinin (sirolimus), kalp ve böbrek nakli hastalarında kullanılmasının testosteron düzeylerinde ve sperm sayılarında belirgin bir düşüşe neden olarak, erkek gonad fonksiyonuna ve fertiliteye olumsuz etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır [9-16]. Ayrıca bu hastalarda, FSH ve LH hormonlarının düzeyleri de belirgin olarak artmıştır. 2003-2008 yılları arasında rapor edilen bu çalışmaların sonuçları; sirolimusun "hipergonadotropik hipogonadizm" tipinde bir etki oluşturarak gonad fonksiyonunu direkt etkilediği fikrini desteklemektedir. Literatürde bu etkinin araştırıldığı çok az çalışma mevcuttur. 2000 yılında yapılan *in vitro* bir çalışmada, mTOR'un spermatogonyal kök hücre proliferasyonunda anahtar bir düzenleyici olduğu ortaya konmuştur [17].

İlk olarak ön çalışmamızda mTOR sinyal yolağı ilişkili proteinlerin erişkin testisindeki ekspresyonları gösterilmiştir [18]. Bu sinyal yolağı ile ilişkili proteinlerin erken spermatogenik hücrelerde lokalize olması mTOR sinyal yolağının spermatogonyal kök hücre proliferasyonu ve farklanmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgiler ışığında 'mTOR sinyal yolağı spermatogonyumların proliferasyonu ve spermatositlerin mayoz bölünmeleri için gereklidir.' hipotezi kurulmuştur.

Bu çalışmanın amacı; Seminifer tübül damla kültürüne rapamisin uygulanarak mTOR sinyal yolağının inhibe edilmesi ve inhibisyonun spermatogenez sürecindeki rolünün değerlendirilmesidir. İlk olarak uygulanan kültürün hücre canlılığı üzerine etkisi ve rapamisin uygulamasının apoptoz oluşumuna etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. mTOR sinyal yolağı inhibisyonunun ardından spermatogenezde rol alan proteinler (PCNA, Stra8, Sycp3, VASA) ve mTOR sinyal yolağı ile ilişkili proteinlerin (mTOR, p-mTOR, 4EBP1) ekspresyonlarının western blot ve immünohistokimya teknikleri ile değerlendirilmesi ve bu genlerin mRNA seviyelerinin RT-PCR tekniği ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylece rapamisin uygulaması sonucu oluşan gonadal disfonksiyonun moleküler mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Memelilerde Testis Gelişimi

Testis dokusunda, germ hücre gelişimi, embriyonik gelişimin erken döneminde başlayarak yetişkinlik dönemine kadar devam eden ve birçok hücrel farklılaşma aşamasını içeren bir olgunlaşma sürecidir.

2.1.1. Memeli Testisinin Genel Yapısı

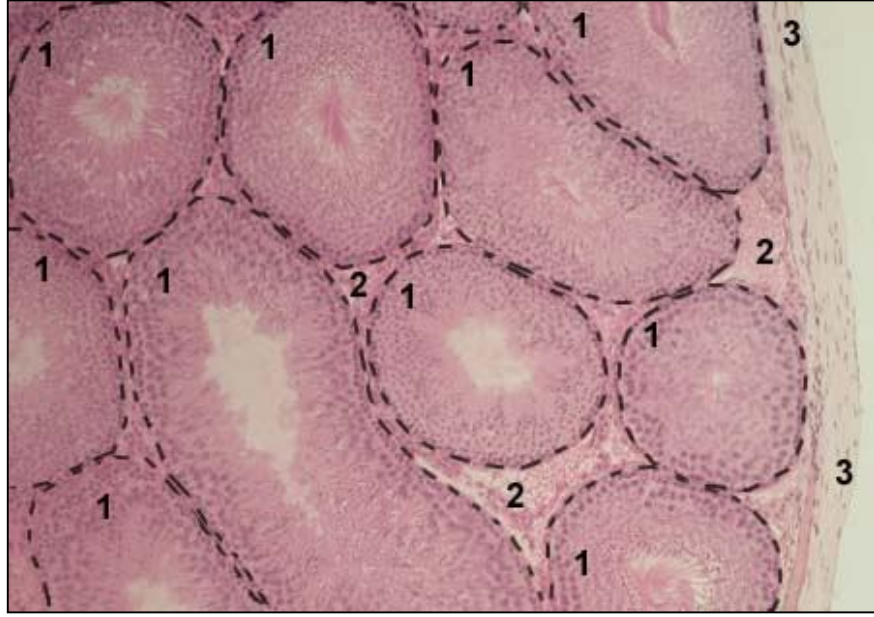
Yetişkin testisi, fonksiyonel olarak birbirinden farklı iki bölge içerir; interstisiyum ve seminifer tübüller [19] (Şekil 2.1). İnterstisiyumda, kan ve lenfatik damarlar, androjenlerin ve diğer bazı steroidlerin üretiminden sorumlu Leydig hücreleri ve makrofajlar bulunur [20]. Seminifer tübüller (şekil 2.2), yoğun olarak kıvrıntılı bir morfoloji sergiler ve geliştirmekte olan germ hücrelerini ve bu hücrelerin gelişimini destekleyen epitelyal hücre soyundan gelen somatik Sertoli hücrelerini içerir [20]. Bu tübüller, germ hücre olgunlaşmasının gerçekleşebilmesi için şekil 2.3'de gösterildiği gibi oldukça düzenli bir hücrel yapıya sahiptir. Her bir Sertoli hücresi, tübülün bazal laminaya yakın bölgesinden tübül lümenine kadar uzanır. Bu hücreler, hem kendisine komşu olan Sertoli hücresiyle hem geliştirmekte olan germ hücreleriyle sıkı bağlantı (tight junction) ve oluklu bağlantılar (gap junction) yaparlar [21]. Bu bağlantılar, seminifer tübül epitelinin bazal ve adlüminal bölgelere ayıran kan-testis bariyerini oluşturur ve post-mitotik germ hücrelerinin tübül içerisinde gelişimi için bir mikroçevre oluşturur. Sertoli hücrelerinin sitoplazması ile ilişkide olan hücreler germ hücreleridir. Bu hücreler, seminifer tübüllerde olgunlaşma aşamalarına göre tabakalanırlar:

Mitotik spermatogoniyum, seminifer tübüldeki en az farklılaşma geçirmiş (en az olgun) hücre olup bazal membrana yakın yerleşir ve seminifer epitelin bazal bölümünde bulunur.

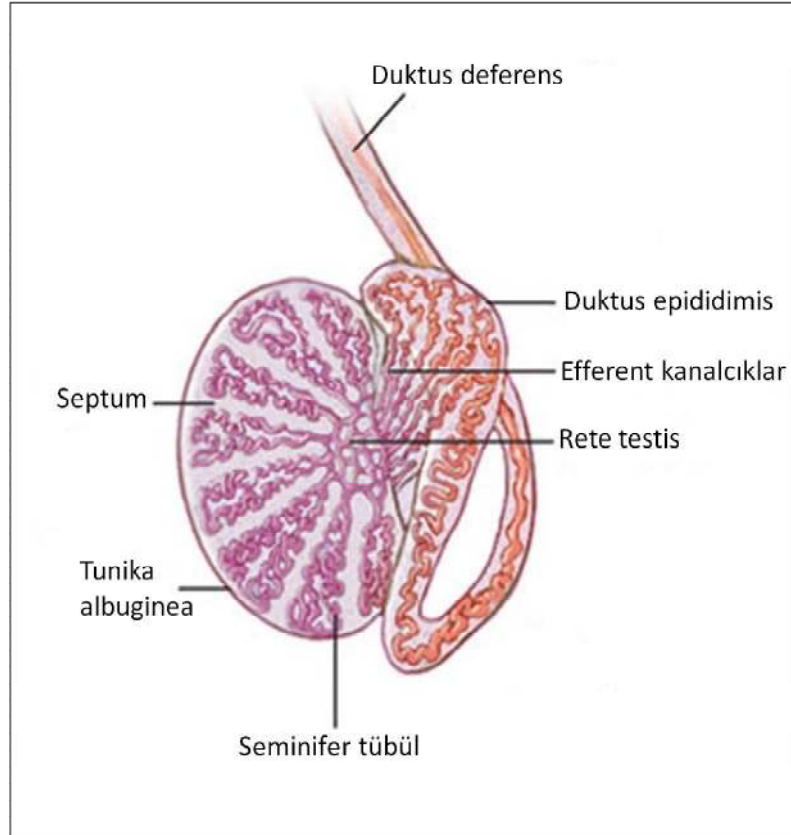
En olgun germ hücreleri adlüminal bölümde yerleşir; mayotik spermatositler, tübülün kaideye yakın bölgesine yerleşirken yuvarlak ve uzamış haploid spermatidler tübül lümenine yakın yerleşirler [20] (Şekil 2.3).

Sertoli-germ hücre mikroçevresi, bazal lamina ve peritübüler myoid hücreleri ile sarılıdır.

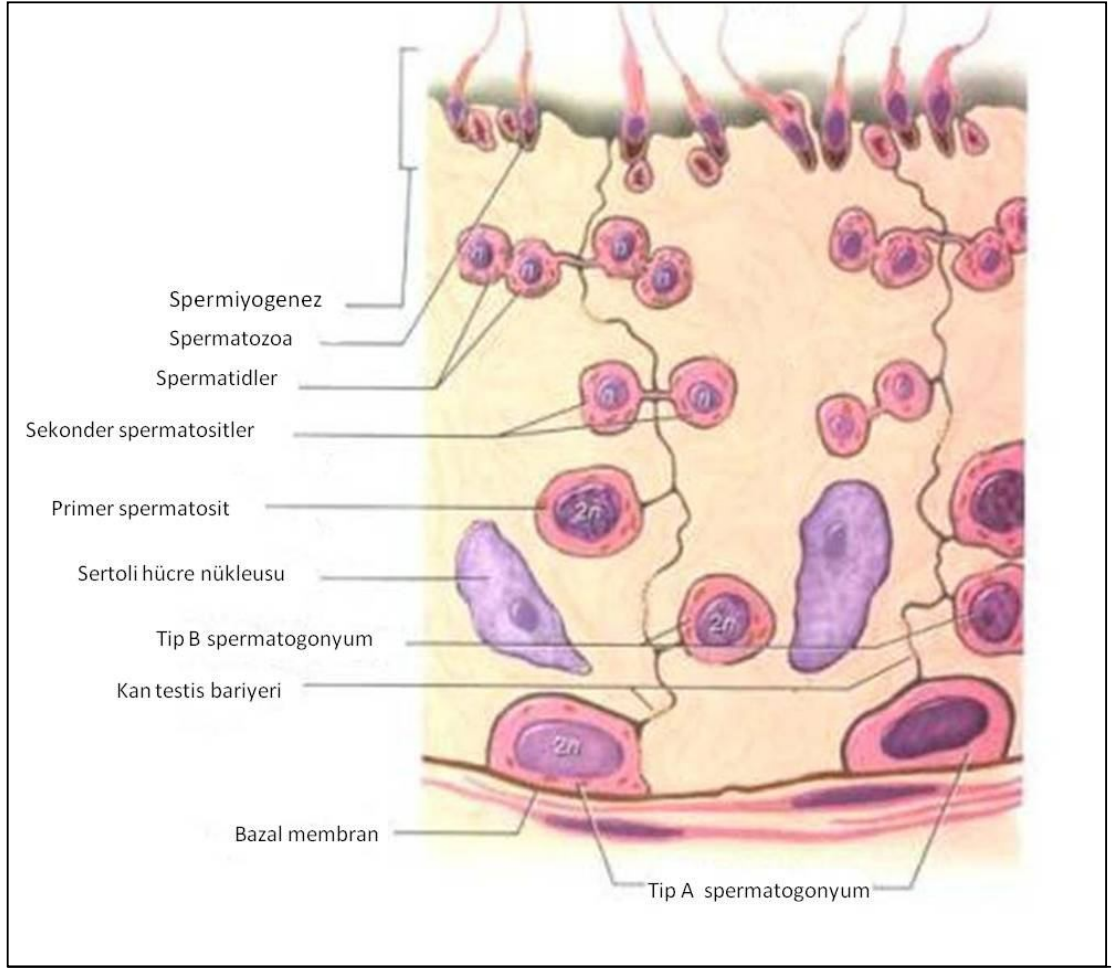
Yetişkin testisinde seminifer tübüller, sperm hücresi üretimi için özelleşmiş yapılardır. Yukarıda tanımlanan düzen, embriyonik gelişimin erken basamaklarında başlayan olaylar zincirinin sonucudur.



Şekil 2.1. Testis genel histolojik görünümü.
1: Seminifer tübül 2: interstisiyum 3: Tunika albuginea [22]



Şekil 2.2. Memeli testisinin genel yapısı [23]
numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.



Şekil 2.3: Seminifer epitelin organizasyonu [24] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

2.1.2. Spermatogoniya

Doğum sonrası dönemde, testis dokusunda mitotik bölünme ile çoğalan germ hücreleri spermatogonya olarak adlandırılır. Bu hücreler, yetişkin yaşamı boyunca testiste germ hücre popülasyonunun yenilenmesi ve varlığı için çoğalmak durumundadır. Spermatogonyalar üç kategoride sınıflandırılır; Tip A, İntermediyet ve Tip B [25]. Tip A farklılaşmamış spermatogonya, kendi kendini yenileyebilen spermatogonyal kök hücre tipi olup, tek bir hücre ya da A single (As) olarak adlandırılır [25]. Tip A spermatogonyalar bölünerek kendilerini çoğaltıkları gibi diğer taraftan A paired (Apr) ve A aligned (Aal) gibi diğer tip spermatogonyaları da oluşturur. Apr ve Aal gibi spermatogonya tipleri sitoplazmik köprüler aracılığı ile birbirleriyle bağlantı halindedir [19]. Hücreler arasındaki bu sitoplazmik köprüler, spermatogenez boyunca varlığını sürdürür ve kardeş germ hücreleri arasında mRNA'ların ve proteinlerin hareketini sağlar [26]. Aal spermatogoniya, mitotik çoğalmanın interfaz basamağında bir farklılaşma geçirerek A1 spermatogonyaya farklanır [26]. A1 spermatogonya, mitotik bölünmeler geçirdikten sonra sırasıyla A2, A3, A4, İntermediyet (In) ve Tip B spermatogonyaya farklanır. Tip B spermatogonyalarda preleptoten spermatositlere farklanır ve daha sonra bu hücreler mayoz girer [20]. Spermatogonyumlar her zaman seminifer tübüllerin bazal membranı ile fiziksel

bağlantı halindedir [19] (şekil 2.3) ancak, hücrelerin farklılaşması sırasında bu fiziksel temas azalır. As spermatogonyadan Aal spermatogony'ya doğru gelişen hücreler, bazal lamina ile yüksek derecede ilişkide iken, Tip B spermatogonyadan preleptoten spermatogonyaya gelişen hücrelerin bazal membran ile teması tamamen kopar [26].

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada [27], puberte öncesi kemirgen testisindeki gonositlerin spermatogonyaya farklılaşmasında önemli bir özellik keşfedilmiştir. Doğum sonrasında hücre siklusuna tekrar giren ve bazal membrana doğru göç eden gonositlerin kaderleri, *neurogenin-3* (Ngn3) eksprese edip etmemelerine göre değişmektedir; *Ngn3* eksprese etmeyen bir grup gonosit kendi kendilerini yenileme basamağını atlayarak direkt olarak A1 spermatogonyaya farklılaşmaktadır. Bu germ hücreleri, spermatogenezin ilk dalgası boyunca ilerler ve matür spermatozoa'yı oluşturur. *Ngn3* eksprese eden gonositler ise kendi kendilerini yenileme potansiyeline sahip ve sperm üretiminin devamlılığını sağlayan hücreler olan farklılaşmış spermatogonyumları oluştururlar [27].

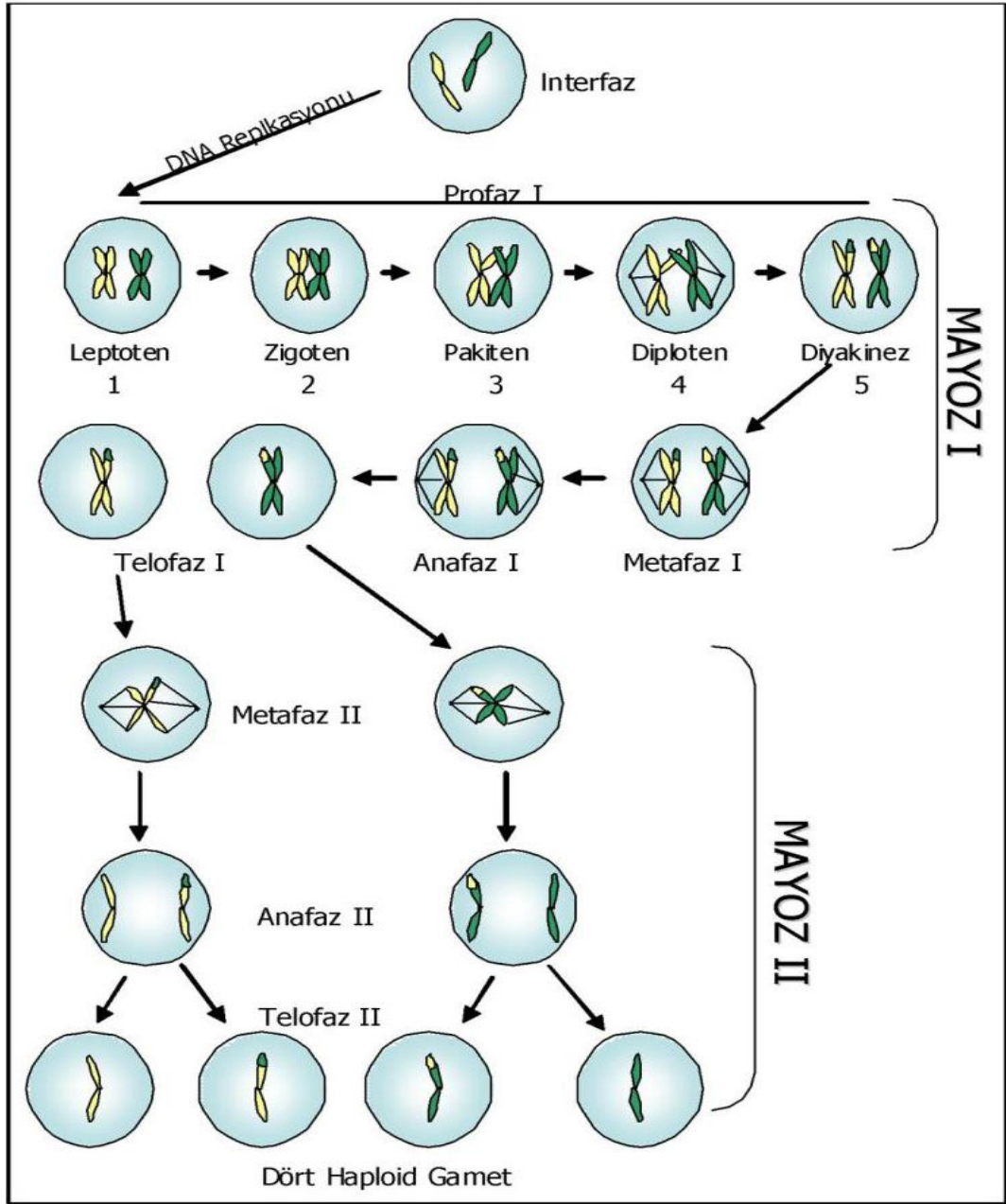
Embriyonik germ hücre gelişimini kontrol eden iki kritik faktör c-kit/SCF ve retinoik asit, spermatogonyal farklılaşmayı da kontrol eder. Sertoli hücrelerinde bulunan SCF proteini ile spermatogonyada bulunan c-kit proteini, spermatogonyal hücre farklılaşmasının kontrolünde önemli role sahiptir [28,29]. Spermatogonyumlarda c-kit/SCF sinyalinin durdurulması, Tip A1-4 spermatogonyal hücre çoğalmasının bozulmasına neden olur [28, 30] ve spermatogonyal hücrelerin apoptozla ölüm oranını artırır [31]. Retinol (Vitamin A) ve retinoik asit, spermatogonyal farklılaşmanın anahtar düzenleyicilerinden birisidir. Retinoik asit sinyali, farklılaşmamış spermatogonyanın A1 spermatogonyaya geçişinde önemli rol oynadığından, Vitamin-A hasarlı fare testislerinde, sadece Tip A farklılaşmamış spermatogonyalar bulunur [32]. Retinoik asit sinyal yolağına ait nükleer retinoik asit reseptörleri, hem Sertoli hücrelerinde hem de spermatogonyada eksprese olmaktadır. Retinoik asit varlığında *stra8* (stimulated retinoic acid gene 8) proteini ekspre olmakta ve germ hücrelerinin mayoz bölünmeye girişini tetiklemektedir. A vitamininin aktif bir metaboliti olan retinoik asit postnatal testiste spermatogonyal proliferasyon ve germ hücrelerinin mayotik profaza girmeleri için önemlidir [33]. Postnatal testiste 5. günde, germ hücrelerinin mayoz bölünmeye girdikleri süreçte, *Stra8* ekspresyonun başladığı gösterilmiştir [33]. Erişkin testiste *stra8* ekspresyonun tip A, tip B spermatogonyalarda ve preleptoten spermatositlerde ekspre olduğu gösterilmektedir [33].

Spermatogonyal farklılaşmayı kontrol eden diğer bir mekanizma ise hormonal regülasyondur. Sıçanlarda, normal spermatogenez sırasında, follikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron sinerjistik olarak bu olayı yönlendirir [34, 35]. Radyasyona maruz bırakılan sıçan testisinde, hem testosteron hem de FSH'un spermatogonyal farklılaşmayı durdurduğu gösterilmiştir [36, 37]. Hem FSH hem de intratestiküler testosteron düzeyleri yüksek olan bu sıçanların testisinde, sadece Tip A spermatogonyumlar bulunur [36]. Bu patolojik modelde, FSH ve testosteron düzeylerinin baskılanmasıyla spermatogonyal farklılaşmanın tekrar stimüle edildiği gözlenmiştir [36]. Tüm bu sonuçlardan görüldüğü gibi spermatogonyal matürasyon,

gen ekspresyonunda değişiklikleri tetikleyen birçok bütünleşmiş faktör tarafından kontrol edilmektedir.

2.1.3. Spermatositler

Spermatositler, mayoz olarak adlandırılan özelleşmiş hücre bölünmesi geçirirler (Şekil 2.4). Bu bölünme, testiste ve ovaryumda bulunan germ hücrelerine özel bir bölünme şekli olup diploid gametten haploid gamet oluşumunu sağlar. Mayoz iki fazda incelenir. Birincisi, homolog kromozomların eşleşmesi ve rekombinasyonu, ikincisi ise kardeş kromatidlerin ayrılmasıdır [38] (Şekil 2.4).

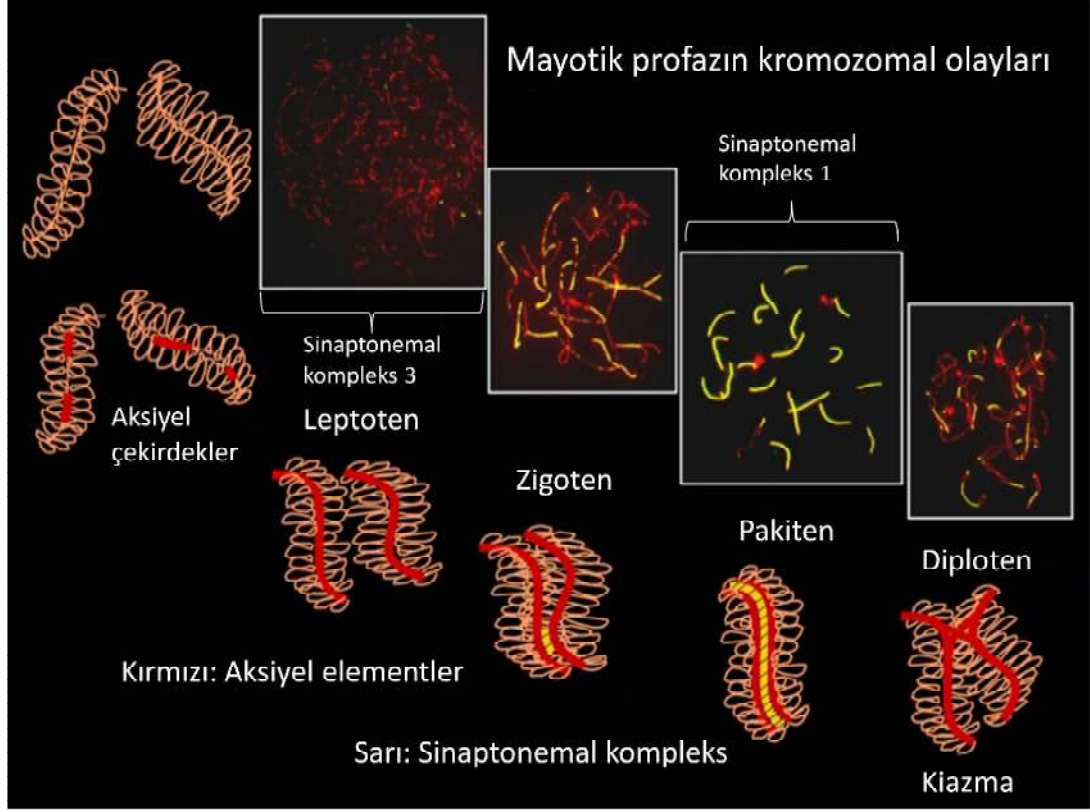


Şekil 2.4. Mayoz hücre siklusunun basamakları. Kromozomlar, Profaz I'e girmeden önce replike olurlar. Profaz I, 5 alt basamağa ayrılır: 1) leptoten, 2) zigoten: kromozomlar yoğunlaşmaya ve eşleşmeye başlar, 3) pakiten: rekombinasyon gerçekleşir, 4) diploten: kromozomlar rekombinasyon bölgesinde biraraya gelir ve 5) diyakinez: kromozomlar ayrılır ve tamamen yoğun hale gelir. Bundan sonraki aşama metafaz I ve anafaz I'dir. Burada homolog kromozomlar birbirlerinden ayrılarak hücrenin karşı kutuplarına yerleşir. Telofaz sırasında oluşan iki kardeş hücre hızlıca mayoz II'ye başlar. Metafaz II ve anafaz II sırasında kardeş kromatidler birbirinden ayrılır ve hücrenin karşı kutuplarına gider. Mayoz hücre siklusu sonucu dört tane haploid gamet oluşur [39].

Fare testisinde, primer spermatositler bazal membran ile ilişkisini koparan Tip B spermatogonyumlardan köken alırlar [19]. Bu hücreler ilk önce preleptoten spermatositler olarak adlandırılır. Preleptoten spermatositler, DNA'sını replike eden son germ hücreleridir [26]. DNA sentezi tamamlandığında preleptoten spermatositler mayozun profaz I'ine girer ve artık leptoten spermatositler olarak adlandırılır [20]. Preleptoten spermatositlerin, leptoten spermatosite farklanması, bu hücrelerin Sertoli hücreleri arasından geçerek bazal membrandan uzaklaşması ve seminifer tübüllerde intermediyet kompartman olarak adlandırılan 3. bir kompartman oluşturması ile karakterizedir [20]. Bu göç olayı sırasında, germ ve Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerinin kırılması ve yeniden yapılması söz konusudur.

Memeli kemirgenlerinde mayotik profaz I, doğum sonrası yaklaşık 3. haftada sonlanır. Mayotik profaz I, spermatositlerde gerçekleşen kromatin değişiklikleri göz önüne alınarak beş faza ayrılır; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez (şekil 2.4) [38]. Profaz I sırasında homolog kromozom rekombinasyonu da gerçekleşir. Bu olayda çift zincirli DNA'da kırıklar oluşur ancak eşleşen kromozomlar arasındaki DNA değiş-tokuşuyla DNA zincir tamiri gerçekleşir [40]. Mayoz bölünmeye özgü olan bu değiş-tokuş olayı sinoptenamel kompleks (SC) tarafından kontrol edilir [38, 41].

Mayotik profazın ilk fazı olan leptoten, iplik-benzeri kromozomların oluşumuyla başlar [19]. Zigoten fazında homolog kromozomların eşleşmesi görülmeye başlar ve SC oluşur (sinaps). Ayrıca hücrelerde kromatin kalınlaşması da zigoten fazıyla karakterizedir [29]. Burada görev alan üç önemli SC proteini; SYCP1 (Sinaptonemal complex 1), SYCP2 (Sinaptonemal complex 2) ve SYCP3 (Sinaptonemal complex 3)'dür. Tüm bu proteinler "fermuar" yapısında yer almakta ve rekombinasyonun gerçekleşmesi için iki homolog kromozomu birbirine yakın olarak tutmaktadır. Bu proteinler, kromozom yoğunlaşması (kondenzasyon) ve sinaps olaylarında da görev alırlar [38] (Şekil 2.5). Pakiten hücrelerinde, kromozomlar tamamen sinaps yapmış ve SC oluşumu tamamlanmıştır [41]. 2005 yılında yapılan bir çalışmada, SYCP1 geninin silinmesi sonucunda sinaps oluşturmada defektler olduğu ve 1. mayoz bölünmenin pakiten evresinde apoptozun arttığı gösterilmektedir. Bunun sonucunda bu deney modelinde erkek ve dişi hayvanların infertil oldukları gösterilmiştir [42]. 2009 yılında yapılan bir çalışmada, azospermi ve olizospermi tanısı alan hastalarda SYCP3 proteininin ekspresyonları immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada spermatogenik defektli hastaların 1. Mayozun pakiten evresinde sinaps yapısının oluşmaması, düzensiz sinaptonemal kompleks oluşumu ve sinaptonemal kompleks fragmentasyonu gibi anormallikler olduğu gösterilmiştir [43]. Rekombinasyonun gerçekleştiği ve hücrelerin hızlı bir şekilde büyüme gösterdiği faz olan pakiten, memelilerde yaklaşık bir hafta sonunda tamamlanır [20]. Diploten, rekombinasyonun olduğu, kiazmata bölgelerinin görüntülenemediği, SC kompleksinin birbirinden ayrılmaya başlayarak sadece rekombinasyonun olduğu bölgelerde kontağın kaldığı fazdır [38]. Profaz I, diyakinezle sona erer. Diyakinez, kromatinlerin ileri derecede kondanse olduğu ve kromozom ayrılmasına hazırlık olarak kiazmatanın serbestlendiği fazdır [29].



Şekil 2.5. Mayoz profaz 1 aşamasının kromozomal olayları ve sinaptonemal kompleks dağılımı [44] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

Erkeklerde, homolog kromozomların mayotik eşlenmesi dişilerden farklılık gösterirler. Erkek diploid germ hücreleri, 22 çift homolog otozom ve X-Y seks kromozomlarını taşır (XY, bivalent). Profaz I sırasında, seks kromozomları genellikle eşleşmemiş olarak kalır. Rekombinasyon sadece pseudootozomal bölgelerde (bu iki kromozomun eşleştiği) kalmaktadır [38]. XY bivalent, pakiten ve metafaz arasında transkripsiyonel olarak inaktif olup XY cisimciğini yapmak için heterokromatin yapısında belirgin değişiklikler yapar [45]. XY cisimciği, spermatositlerin nükleusuna özgüdür ve mayotik bölünmenin ilerlemesi için gereklidir [46].

Profazı takip eden metafaz aşamasında homolog kromozomlar, iç iplikçiklerine tutunurlar ve anafaz aşamasında hücrenin karşıt kutuplarına yerleşirler [47] (şekil 2.4). Telofaz sırasında, her biri iki kromatid içeren haploid kromozomlu iki kardeş hücre meydana gelir ve bu hücreler, hücrelerarası köprülerle halen birbirlerine bağlıdır [29].

Birinci mayozun profazı tamamlandıktan sonra sekonder spermatositler oluşur. Testiste, mayoz II çok hızlı bir şekilde gerçekleşen bir olay olduğundan bu hücreler kısa ömürlü hücrelerdir. Sekonder spermatositler adeta mitozu taklit ederler; kardeş kromatidler iç iplikçikleriyle birbirlerine tutunurlar ve metafaz-anafaz II

sırasında hücrenin karşıt kutuplarına yerleşirler [19]. Mayoz II sonunda oluşan en son ürün, spermatid olarak adlandırılan 4 adet haploid gamettir.

Mayoz sırasında meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon germ hücre soyu boyunca kalıtıldığından mayoz hücre bölünmesi sıkı bir şekilde kontrol edilir. Sinaptonemal kompleks, mayozun kontrolünde büyük önem taşır; çift zincirli DNA'nın rekombinasyonu ve tamirini kontrol eden hücre siklusu düzenleyici proteinler için yerleşim bölgesidir [38]. Hücre siklusunda kontrol noktalarının düzenlenmesi, mayozun düzgün ilerlemesi için gereklidir ve mitozda olduğu gibi siklinler ve siklin bağımlı kinazlar, (cdks) ile kontrol edilir. Mayoz için önemli olan iki düzenleyici cdk2 ve siklin A1 dir. *cdk2* geni olmayan erkek farelerde, spermatositler pakiten fazına kadar ilerlemekte ancak bu hayvanların testislerinde diploten spermatosit görülmeyip SYCP3 dağılımı bozulmaktadır [48]. Siklin A1, germ hücre özellikli bir siklin olup mayoz I de profazdan metafaz geçişi düzenler [49]. Bu proteini ekspre etmeyen mutant hayvanların testislerinde spermatositler metafaz geçişinde duraklar ve bu hayvanlar infertil bir fenotip sergilerler.

2.1.4. Spermatidler

Spermatidler, spermiyogenezin habercisidir. Spermiyogenez, yuvarlak ve haploid olan spermatid'in olgun spermatozoaya farklılaşmasıdır. Spermiyogenez sırasında 5 farklı işlem gerçekleşir; 1) akrozom oluşumu 2) nükleer yoğunlaşma ve uzama 3) kuyruk (flagellum) gelişimi 4) sitoplazmanın yeniden organizasyonu 5) spermiyasyon [29].

Akrozom, spermatozoanın ovosite penetrasyonu sırasında gerekli olan enzimleri içerir [19]. Akrozom, Golgi kompleksi tarafından üretilen küçük proakrozomal veziküllerin bir araya gelerek yuvarlak, membran-bağımlı vezikül haline gelmesiyle oluşur [20]. Akrozom daha sonra, spermatid hücre nükleusu ile fiziksel olarak ilişkiye girer ve yassılaşılarak spermatidlerin ön yarısını kaplar [29]. Nükleusun spermatid yüzeyine hareketiyle birlikte akrozomda hücre membranıyla yakın ilişkiye geçer [20]. Bu olay, spermatidlerin polarize olmasını sağlar; baş (ön kısım bölgesi) ve kuyruk (flagellum) bölgesi oluşur.

Spermatidlerde nükleusun pozisyon değiştirmesi dışında, kromatin de kademeli olarak kondenzasyona uğrar ve şekil değiştirir [20, 29]. Bu yeniden organizasyon sırasında histonlar, protaminler olarak bilinen küçük nükleozom proteinleri ile yer değiştirir. Histonların protaminlerle yer değiştirmesi, kademeli bir işlem olup ilk önce, histonların tranzisyon proteinleri (TP) ile daha sonra da bunların protaminlerle yer değişimi söz konusudur. Kromatin yeniden modellenmesi sayesinde spermatid DNA'sı çok küçük hacimde paketlenir (somatik hücre nükleusunun 1/20'si kadar) [50]. Protamin genlerinden herhangi birisine sahip olmayan erkek farelerde, spermin nükleer yoğunlaşması tahrip olur [51]. Günümüzde, spermatidlerde histonların yer değiştirme mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen bu olayın düzenlenmesinde, Ca^{+2} /Calmodulin-bağımlı protein kinaz IV'ün (CaMKIV) direkt bir rol oynadığı bilinmektedir [29, 52].

Spermatidlerde, kromatinin yeniden düzenlenmesinin ardından transkripsiyon durur. Transkripsiyonun durmasından önce mRNA'lar spermatidlerde depo edilir ve daha sonra bu depo mRNA'ların kullanılmasıyla birlikte protein translasyonu gerçekleşir. Bu olay translasyonel gecikme olarak adlandırılır [53]. Mayozdan sonra ve spermatid kondenzasyonundan önce, büyük miktarda mRNA transkripte edilir ve messenger ribonükleoprotein parçacıkları (mRNP) olarak depo edilir. mRNP'ler daha sonra uzamış spermatidlerde translasyona uğratılır [53]. Ayrıca, spermatositlerde ve yuvarlak spermatidlerde, mRNA depolanmasını kolaylaştırmak amacıyla çok miktarda RNA-bağlayıcı protein üretilir. Bu RNA-bağlayıcı proteinlerin en önemlileri TRAX ve TB-RBP'dir.

Sperm kuyruğu (flagellum)'nın gelişimi, haploid erkek germ hücrelerinde başlar. Spermatid sitoplazmasının periferinde bulunan bir çift sentriyol, flagellum oluşumunun başlamasından sorumludur [29]. İki sentriyolden birisi, 9+2 şeklinde düzenlenme gösteren mikrotübül yapısındaki aksonemi yapar. Mikrotübüllerin aksonem yapısına eklenmesiyle beraber flagellum, seminifer tübül lümenine uzanmaya başlar. Mikrotübül organizasyonunu başlatan sentriyol çifti daha sonra spermatid nükleusuna doğru hareket eder ve en sonunda akrozomun karşıt kutbunda nükleusa yapışır [20]. Aksonem uzamaya devam eder ve aksiyal filamanı oluşturur [54].

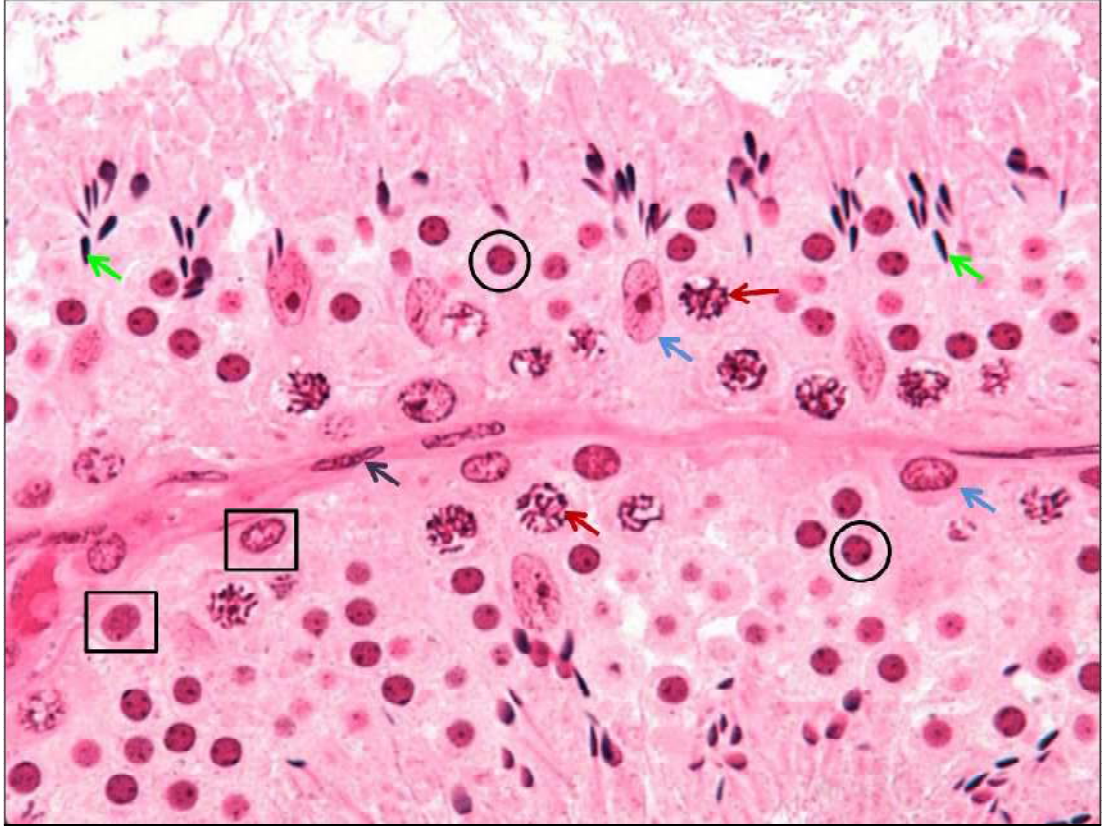
Flagellar gelişim, yapısına aksesuar bileşenlerin eklenmesiyle tamamlanır ve kuyruğun farklı segmentleri oluşur; orta, esas ve son parça [54].

Spermatidlerdeki yeniden şekillenmede, kuyruk oluşumu dışında, sitoplazma içeriğinin büyük kısmının atılması da söz konusudur. Bu olay sonrasında, daha küçük ve kendi genetik bilgisini etkili bir şekilde ovosite aktaracak olan hücre soyu ortaya çıkar [20]. Sitoplazmanın yeniden organizasyonu sırasında spermatidler kendi orijinal hacimlerinin %25ine kadar küçülür [55]. Bu olayda, nükleus ve sitoplazmadaki suyun eliminasyonu, bazı sitoplazmik kısımların uzayan spermatidlerden atılması[56] ve sperm salınımı sırasında rezidual cisim olarak adlandırılan paketlenmiş sitoplazmanın atılması söz konusudur [57].

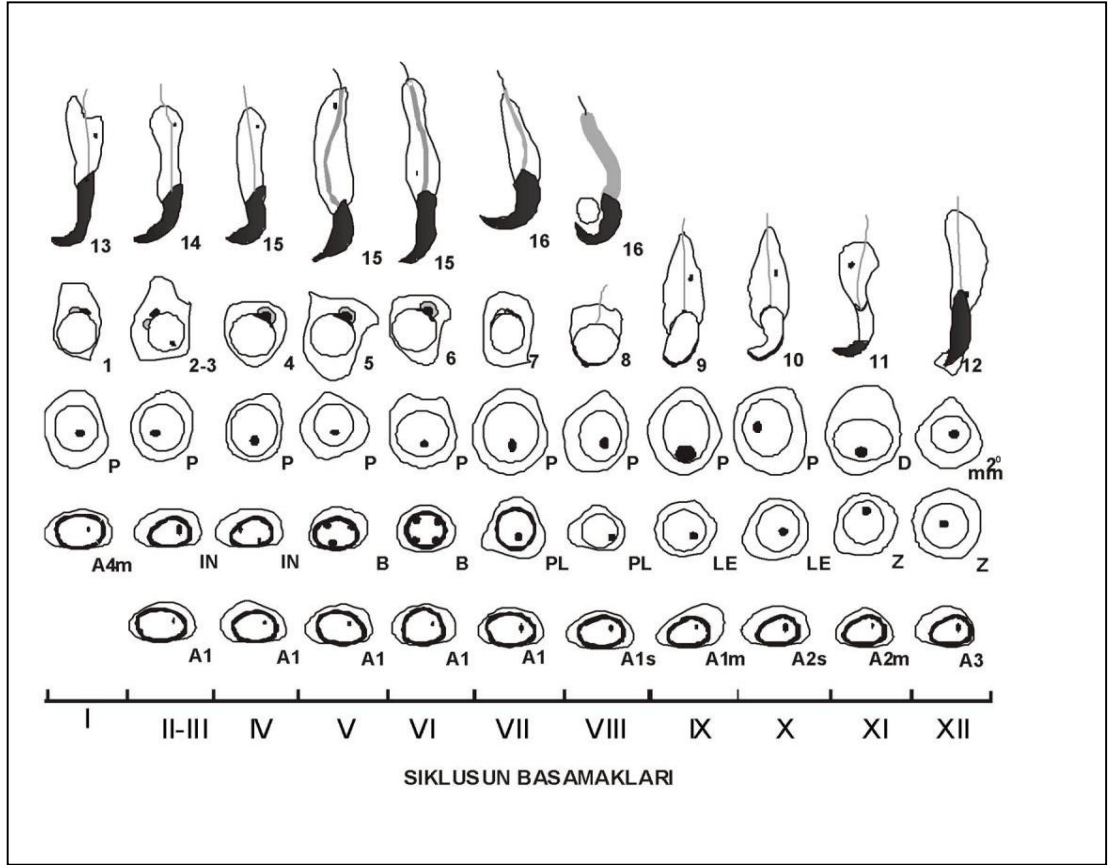
Spermiasyon, matür spermatozoanın tübül lümenine atılmasını tarif eder. Bu olay farede yaklaşık doğum sonrası 35.günde başlar [20]. Memelilerde, geç spermatidler, tübül lümenine salınımlarından önce kademeli olarak Sertoli hücreleri ile olan bağlantılarını kaybeder [29]. Ancak bu olayı kontrol eden yegâne mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.1.5. Yetişkin Kemirgen Testisi

Yetişkin testisinde, farklılaşmamış spermatogonyumdan spermatozoaya kadar olan farklı gelişim evrelerindeki hücreler yer alır. Spermatogenez olayında gelişimsel evreler sıkı bir şekilde takip edilir (Şekil 2.6). Spermatogonya, spermatosit ve spermatid populasyonları her zaman bir arada görülür. Bu nedenle enine kesitteki her bir tübül, barındırdığı germ hücre çeşidine bağlı olarak sınıflandırılır (Şekil 2.7). Seminifer tübüldeki bu evre, olgun sperm üretimini garantiler.



Şekil 2.6. Seminifer epitelyum ve intersitisyumun genel histolojik görünümü. Kare: Spermatogoniya, Kırmızı ok: Primer spermatosit, Daire: Yuvarlak spermatid, Yeşil ok: Uzamış spermatid, Mavi ok: Sertoli hücre nükleusu, Siyah ok: Myoid hücre [58] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.



Şekil 2.7. Fare seminifer tübül evrelerinin basamaklandırılması. Yetişkin fare testisi germ hücreleri birbirleriyle “basamak (stage)” olarak bilinen belirli bir düzen ilişkisi içerisinde bulunurlar. Spermatogenik dalga, seminifer tübülün uzunluğu boyunca lineer bir düzlemde bulunur. Yetişkin fare testisinde 12 tane basamak tanımlanmış olup aşağıda belirtilmiştir. A: Tip A spermatogoniya, 1-4, (m: M faz s: S faz), IN: Intermediate spermatogoniya, B: Tip B spermatogoniya, PL: preleptoten primer spermatosit, LE: Leptoten primer spermatosit, Z: Zygoten spermatosit, P: Pakiten spermatosit, D: Diploten spermatosit, m2°m: Sekonder spermatosit, 1-16: spermiogenez basamakları boyunca bulunan spermatidler [39].

2.1.6. Kemirgen Testisinin Somatik Hücreleri

Germ hücre gelişimi, Sertoli ve Leydig hücrelerini içeren birçok farklı somatik hücre tipi tarafından desteklenir. Sertoli hücreleri, germ hücre gelişimini direkt olarak desteklerken Leydig hücreleri, testiküler gelişim ve testis fonksiyonu için gerekli olan androjenlerin üretiminden sorumludur.

2.1.6.1. Sertoli Hücreleri

Germ hücreleri, Sertoli hücreleri ile fiziksel temas ederek gelişimlerini tamamlar. Sertoli hücreleri, hem fetal hem de doğum sonrası testis gelişiminde germ hücreleri için bir destek görevi görür. Sertoli hücre öncülleri, sölomik epitelyum hücrelerinden köken alır. Bu hücreler, sölomik epitelin yüzeyinden ayrılarak genital kabarıntı bölgesine göç eder. Öncü-Sertoli hücreleri olarak adlandırılan bu hücreler, E11.5'de *Sry* eksprese eder ve gelişmekte olan gonaddaki bipotent hücre soylarını erkek-özellikli farklılaşmaya yönlendirerek testis gelişimine öncülük eder [59]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, öncü Sertoli hücrelerinin prostaglandin D2 ürettiği [60] ve prostaglandin D2'nin reseptörüne bağlanmasıyla *Sox9* ekspresyonunu stimüle ederek öncül hücreleri Sertoli hücre soyuna yönlendirdiği belirtilmektedir [61]. Gelişmekte olan erkek gonadlarda, PGH kolonizasyonundan sonra öncü-Sertoli hücreleri, germ hücrelerini çevreleyerek seminifer kordonları oluşturur ve PGH'nin spermatogenez yönünde farklılaşmasını sağlar.

Fötal dönem ve puberte öncesi dönem, Sertoli hücre gelişimi ve proliferasyonu için kritik bir süreçtir. Doğumla beraber Sertoli hücreleri, alçak prizmatik bir morfoloji sergiler, düzensiz bir yerleşim gösterir ve bazal membrana yakın bir konumda bulunur. İmmatür Sertoli hücreleri metabolik olarak aktif olup proliferasyon, aromataz aktivitesi, östrojen ve anti-Müllerian hormon salgılanması ve FSH'a maksimum düzeyde yanıt oluşturma gibi fonksiyonları gerçekleştirir [62]. Sertoli hücrelerinde şekil ve pozisyon değişimi, Sertoli hücreleri olgunlaşırken olmaktadır. Bu anda Sertoli hücreleri uzamakta, bazal membrana dikey bir konuma yerleşmekte ve sitoplazmasını uzatarak seminifer kordonun merkezine apikal olarak uzanmaktadır. Yeniden düzenleme sırasında Sertoli hücreleri, sıkı bağlantılar ve bağlantı kompleksleri de kurmaktadır [63]. Bu hücreler, matürasyonları sırasında proliferasyon kapasitelerini yitirir ve spermatogenez destekleyebilecekleri fonksiyonlar kazanırlar [63, 64]. Sertoli hücrelerinin destek görevi görmesi ve ilettikleri çeşitli sinyaller, yetişkinlerde germ hücre farklılaşması, mayoz bölünme, spermiogenez ve spermatogoniyal kök hücre havuzunun devamlılığı için kritik öneme sahiptir [65, 66].

Sertoli hücresi sıkı bağlantıları farede PNG (postnatal gün)7 ile PNG14 arasında oluşturulmakta ve böylelikle kan-testis bariyeri (BTB) kurularak mayotik ve post-mayotik germ hücreleri, lenf ve kan dolaşımında olan faktörlerden uzak tutulmaktadır. Tip B spermatogoniyal kök hücresinin pre-leptoten spermatosit farklılaşması sırasında germ hücrelerinin bazal kompartmandan adluminal kompartmana geçişi söz konusu olup, bu sırada BTB bütünlüğünde herhangi bir hasar oluşmamaktadır [67]. Germ hücrelerinin sıkı bağlantı komplekslerinden geçişi sırasında bağlantı komplekslerinin hızlı bir şekilde açılması ve pre-leptoten spermatositin göçünden sonra hızlı bir şekilde kapanması gerekmektedir [68].

Seminifer tübüllerin bazal kompartımanında bulunan Sertoli ve germ hücrelerinden üretilen ve mikroçevreye salınan tümör nekroz faktör- α (TNF α)'nın Sertoli hücreleri arasındaki bağlantıları geçici süre yeniden yapılandırarak germ hücre göçünü sağladığı düşünülmektedir [69]. Germ hücreleri BTB'yi geçtikten sonra, seminifer epitelinde tübül lümenine doğru hareketleri sırasında, Sertoli hücreleriyle geçici adhezyon bağlantıları yapar. Hücre adezyon moleküllerinden JAM/CTX ve nektin ailesi testiste yoğun bir şekilde eksprese olmakta ve homofilik ya da heterofilik etkileşimler yaparak germ hücrelerinin tübül lümenlerine doğru göçlerine katılmaktadır [68]. Bu etkileşimler spermatogenezin ilerlemesi için kritik öneme sahiptir ve her bir Sertoli hücresi belirli kapasitede germ hücresinin gelişimine destek verebilir [70, 71]

Spermatogenez için gerekli olan pek çok faktör Sertoli hücreleri tarafından üretilmektedir. Örneğin, primer spermatositler glikoliz olaylarında glukoz yerine laktat'ı tercih etmektedir; Sertoli hücreleri, FSH'n kontrolü altında laktat üretimi yaparak primer spermatositlerin glikoliz olayına katılır [72, 73]. Demir bağlayıcı bir protein olan testiküler transferrin de, FSH kontrolünde Sertoli hücrelerinde üretilen diğer bir önemli salgı ürünüdür. Transferrin, reseptör-aracılı endositozla primer spermatositlere demir getirir [74-76]. Sertoli hücreleri aynı zamanda bakır bağlayıcı bir protein olan ceruloplasmin de salgılar. Serüloplasmin, germ hücrelerine bakır getirilmesinden sorumludur [70].

Özetle, Sertoli-germ hücre etkileşimi spermatogenezin düzgün olarak gerçekleşebilmesinde çok büyük önem taşımaktadır.

2.1.6.2. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri, luteinize edeci hormon (LH) stimülasyonuna yanıt olarak testiste androjen üretiminden sorumlu olan hücrelerdir. Bu hücreler, tübüller arası alanda yer alıp genellikle kan damarları çevresinde yığınlar oluşturmalarına rağmen seminifer tübüllere yakın olarak da yerleşim gösterirler [19].

Memelilerde, fetal ve doğum sonrası dönemlerde farklı Leydig hücre popülasyonu bulunur. Fetal Leydig hücreleri, mezonefroza köken alır ve testisin farklılaşması esnasında interstisyel alanda bulunan mezenşim-benzeri kök hücrelerden gelişir [77-79]. Fetal Leydig hücrelerinin gelişimi, Sertoli hücrelerince kontrol edilir [80]. Fetal Leydig hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşması, platelet derived growth factor (PDGF) ve reseptörü PDGFRA [81], Desert Hedgehog (Dhh) ve reseptörü Patched [82] gibi proteinleri gerektirmekte ve bu faktörler için mutant olan hayvanlarda, Leydig hücre gelişiminin bozulduğu görülmektedir [81, 82]. Fetal Leydig hücreleri, E12.5 günde, testiste ana androjen olan testosteron üretimini başlatarak maskülenizasyonu sağlar. Bu dönemde üretilen testosteron, yetişkin Leydig hücrelerinde olduğu gibi LH'a bağımlı değildir [79]. Fetal Leydig hücreleri embriyonik gelişim boyunca sayılarını artırır [83].

Doğum sonrasında, fetal Leydig hücre sayısı hızlı bir şekilde azalır ve bu hücreler yetişkin Leydig hücre popülasyonu ile yer değiştirir. Yetişkin Leydig hücre popülasyonu köken olarak, fetal Leydig hücrelerden değil, interstisyel alanda

bulunan farklılaşmamış mezenşimal hücrelerden gelişmektedir [80-84]. Bu mezenşimal hücreler, Leydig hücre soyunu oluşturmak üzere yönlendirilir ve LH stimülasyonu ile beraber olgunlaşmamış Leydig hücrelerine dönüşürler. Hücre çapında büyüme, düz endoplazmik retikulum hacminde artış ve sitoplazmik yağ damlacıkları oranında azalma olgunlaşmamış Leydig hücrelerinin, yetişkin Leydig hücrelerine dönüştüğünün göstergesidir. Yetişkin Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması LH ve reseptörleri aracılığıyla kontrol edilir; LH ve reseptörleri, steroid ilişkili yolların çalışabilmesi için gerekli enzimlere ait genlerin transkripsiyonunu uyarır [85]. Androjen reseptörleri, Sertoli hücrelerinde ve peritübüler myoid hücrelerde yerleşim gösterir [86].

2.1.6.3. Peritübüler Myoid Hücreler

Öncü Sertoli hücrelerindeki *Sry* ekspresyonu ile beraber başlayan testiküler gelişim sırasında, mezonefroza gelişmekte olan gonada, hücre göçü devam eder [87, 88]. Bu göç eden hücrelerden bazıları peritübüler myoid hücreler haline gelir ve Sertoli hücreleri ile etkileşime geçerek bazal membran kordonunu oluşturur. Peritübüler myoid hücrelerin gelişim ve farklılaşması Sertoli hücrelerinden eksprese olan ve peritübüler myoid hücrelerinde reseptörü bulunan Dhh kontrolünde gelişir [89]. Mezonefroza göç eden hücreler aynı zamanda Leydig hücre ve interstisyumda bulunan vasküler yapının gelişimine de katılır [78].

Peritübüler myoid hücreleri yassı, düz-kas-benzeri hücreler olup testiküler kordonları sarar. Farede, bu hücreler sadece tek kat şeklinde bulunur [90]. Myoid hücreler birbirlerine bağlantı kompleksleri ile bağlanır ve çok miktarda aktin filamanı içerir. Bu aktin filamanları, seminifer tübüllerin düzensiz kasılmalarına olanak sağlar ve böylece Sertoli hücrelerince üretilen salgının ve spermatositlerin lümenine atılmasını kolaylaştırır [91]. Bu hücreler, Sertoli hücre fonksiyonunu etkileyen, hücre dışı matriks bileşenleri ve büyüme faktörleri gibi diğer bazı maddeler de salgırlar [90].

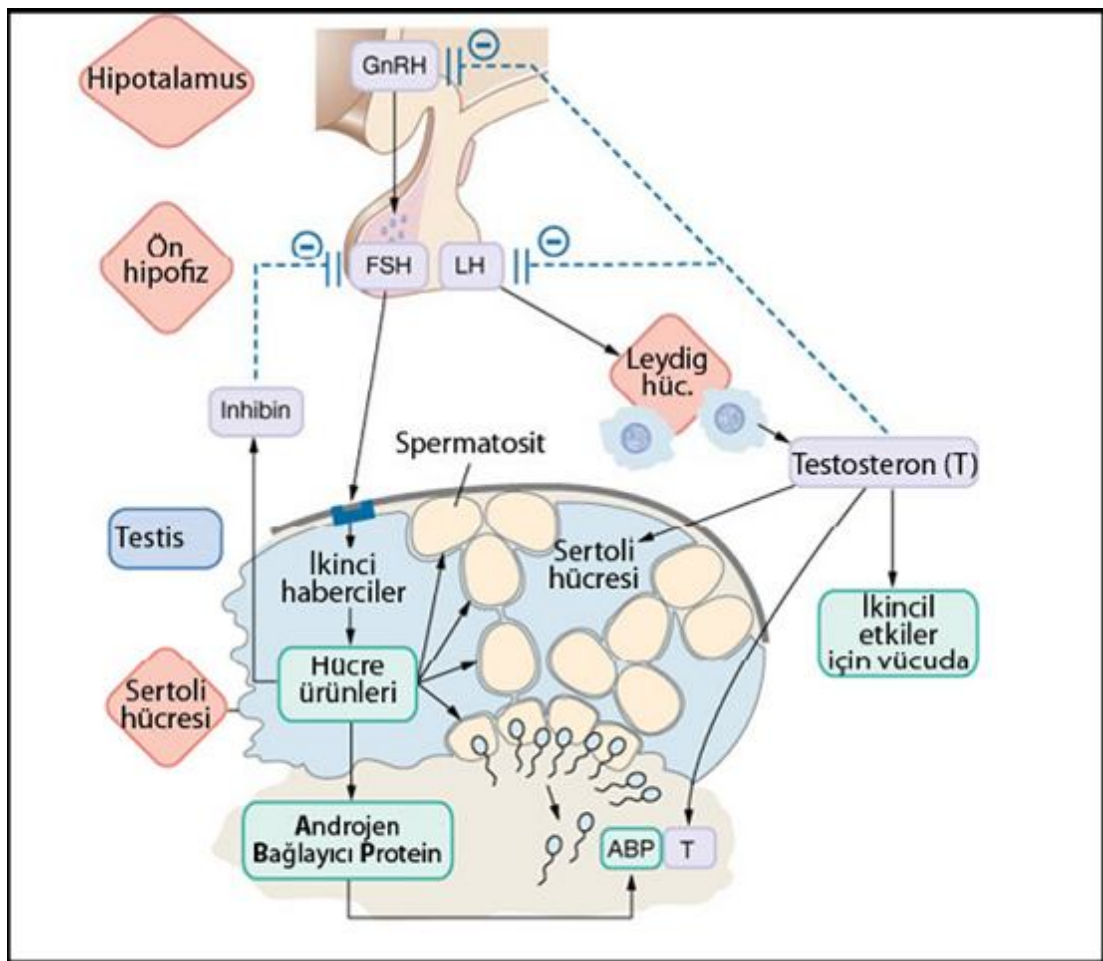
Myoid hücrelerin, testis gelişimi için gerekli olan androjen reseptörü içerdiği ve retinol işlevinde görev aldığı da bilinmektedir [90]. Özetle, myoid hücreleri testisin yapısal bütünlüğünün korunmasında ve normal spermatogenik fonksiyonun işleminde görev üstlenmektedirler.

2.1.6.4. Endotelial Hücreler

Her iki cinsiyete ait gonadlar, fetal dönemlerde oldukça yoğun damarlanma gösterir [81, 92]. Testisteki endotelial hücreler, özellikle anti-mezonefrik yüzeyde ve testis kordonları arasındaki bölgelerde yoğun bir damarlanma gösterir [61]. Kan damarları ve testis kordonları, birbirlerini tamamlayan yapılar olduğundan, testis kordonlarının oluşumu ve vasküler yolak arasında karşılıklı bir etkileşim söz konusudur. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, germ hücrelerinin kendi kendilerini yenileme kapasitelerinin, farklılaşmamış olan spermatogonyanın vasküler ağa yakın bir konumda yerleşim göstermesine bağlı olduğu gösterilmiştir [93]. Vasküler sistem, aynı zamanda testis matürasyonu ve fonksiyonu için gerekli olan Leydig ve Sertoli hücrelerince üretilen hormonların dolaşıma katılmasını da sağlar.

2.1.7. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü

Testiküler fonksiyonun gerçekleşebilmesi için, hipotalamustan salınan gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH)'un salgılanması ve bunun hipofizi uyarak FSH ve LH gibi, testis üzerinde direkt etki gösteren, glikoprotein yapısındaki hormonları salgılatması gerekir. Testiküler fonksiyonun düzenlenmesinde gonadotropin üretimini negatif yönde etkileyen aktivin, inhibin ve follistatin gibi hormonlar da rol oynar. İlerleyen bölümde spermatogenezin hormonal kontrolü ve hormonların Sertoli ve Leydig hücreleri üzerindeki özel fonksiyonları anlatılacaktır. Şekil 2.8. hipotalamus-hipofiz-gonad aksında LH, FSH, aktivin, inhibin ve follistatin'in spermatogenez düzenlenmesindeki rolü özetlenmiştir.



ŞEKİL 2.8. Spermatogenezin hipotalamus-hipofiz-gonad aksı üzerinden hormonal kontrolü. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipotalamus tarafından salgılandıktan sonra hipofizi etkileyerek buradan Luteinize edici hormon (LH) ve folikül stimule edici hormon (FSH) gibi gonodotropinlerin salgılanmasını uyarır. LH, Leydig hücrelerini uyararak testosteron üretimini sağlar; testosteron, Sertoli hücreleri üzerinde rol oynar ve germ hücre davranışını düzenler. FSH Sertoli hücreleri üzerinde etkisini göstererek bu hücrelerin proliferasyonunu düzenler ve indirekt olarak germ hücre sayısını belirler. Aktivin, inhibin ve follistatin, testis geribildirimıyla FSH seviyesini düzenlemek için hipofizden üretilir [24].

2.1.7.1. Follikül Stimüle Edici Hormonun Rolü

Erkek bireylerde FSH, Sertoli hücre sayısının belirlenmesi, sperm üretiminin indüklenmesi ve devamlılığı için gereklidir. Testiste, FSH reseptörünün ekspresyonu (FSH-R) yalnızca Sertoli hücreleriyle sınırlıdır [94]. Spermatogenez olayında FSH'ın birincil rolü, puberte öncesi dönemde Sertoli hücre proliferasyonunun indüklenmesidir [95]. GnRH hasarlı farelere testosteron verildiğinde bu hayvanlarda kalitatif olarak normal spermatogenez görülmesine rağmen testis büyüklüğünde ve germ hücre sayısında azalma olmaktadır. Testosterona ilaveten FSH verilen aynı hayvanlarda hem kalitatif olarak normal spermatogenez hemde normal testis büyüklüğü görülmektedir [96, 97]. Ayrıca, FSH'ın neonatal ve pre-pubertal testislere eklenmesiyle testis büyüklüğünün normalden daha fazla arttığı ve Sertoli hücre sayısının artmasına bağlı olarak toplam germ hücre sayısının da daha yüksek olduğu gösterilmiştir [98, 99].

Özetle, FSH ekspresyonu, Sertoli hücre proliferasyonunu ve matürasyonunu etkileyerek testisin büyüklüğünü ve dolayısıyla testisin spermatozoa yapım kapasitesini etkilemektedir.

FSH düzeyi, hipofiz bezindeki aktivin, inhibin ve follistatin aktivitesi ile belirlenir. Aktivin, hem FSH salgılanmasını hemde *FSH β* mRNA ekspresyonunun artmasını sağlarken, inhibin ve follistatin bu mRNA ekspresyonunu azaltmakta ve belirlenemeyecek düzeylere kadar yıkıma uğratmaktadır [100-104]. Aktivin ve follistatin gonad, hipofiz ve hipotalamus tarafından sentezlenir [105]. Follistatin, aktivine dönüşümsüz olarak bağlanarak aktivitesini negatif yönde düzenler. İnhibin, Sertoli hücrelerinden dolaşıma salgılanır ve hipofizde aktivin tip II reseptörüne bağlanarak FSH salgılanmasını baskılar. Böylece aktivin sinyali durdurulur. Dolaşımdaki FSH düzeyinin, yeri geldiğinde Sertoli hücrelerince üretilen inhibin üretimini düzenlemesi bu olayın, klasik bir negatif kontrol mekanizmasıyla çalıştığını gösterir.

2.1.7.2. Luteinize Edici Hormonun Rolü

LH, heterodimerik bir glikoprotein olup hipofizden GnRH stimülasyonuna yanıt olarak eksprese olur. LH reseptörleri (LH-R) başlıca Leydig hücrelerinde bulunmasına rağmen reseptöre ait boyanmalara spermatogonik hücrelerde de rastlanır [106]. LH-R eksik erkek fareler, fenotipik olarak normal doğmakta ve vahşi-tip yavrulardan ayırt edilememektedir. Ancak, postnatal farelerde, testiküler büyüme ve testiküler inme defektleri, eksternal genitallerin ve aksesuar bezlerin olgunlaşmasında durma ve spermatogenezin yuvarlak spermatid basamağında durması (arrest olması) gibi bozukluklar görülür. Bu farelerde, Leydig hücre sayısı ve hacmi de anlamlı bir şekilde azalır. Testiküler testosteron üretimi, neonatal mutant ve vahşi-tip hayvanlarda aynıken, yetişkin homozigot mutant farelerde anlamlı bir azalma söz konusudur. Bu nedenle, LH'nın fetal fare Leydig hücrelerinin farklılaşma ve fonksiyonu için gerekli olmadığı ancak yetişkin Leydig hücrelerinin endokrin fonksiyonunda görev aldığı düşünülür [107, 108].

LH fonksiyonu, özellikle testisteki Leydig hücrelerinden üretilen testosteron sentezinin düzenlenmesinde gereklidir [109]. LH-R silinmiş farelere dışarıdan testosteron verildiğinde bu hayvanlarda spermatogenezin kurtarıldığı gösterilmiştir

[106, 110]. Testosteron uygulaması aynı zamanda, hem FSH hem de LH dan yoksun olan erkek farelerde spermatogenezin kurtarılmasını başarmıştır [97]. Testosteron fonksiyonu, cinsiyet farklılaşmasının düzgün gerçekleşebilmesi ve spermatogenezin normal devam edebilmesi için gereklidir. Testosteron'un ortamdaki çıkarılmasıyla, ilk olarak yuvarlak spermatidlerin ve daha sonra uzamış spermatidlerin kaybolduğu gösterilmiştir [111]. Germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasındaki adezyon da androjen-bağımlıdır. Testosteron'un azalmasıyla beraber matür uzamış spermatidlerin fagositoza uğradığı ve yuvarlak spermatidlerin prematür olarak kaldığı gözlenmiştir [112-114].

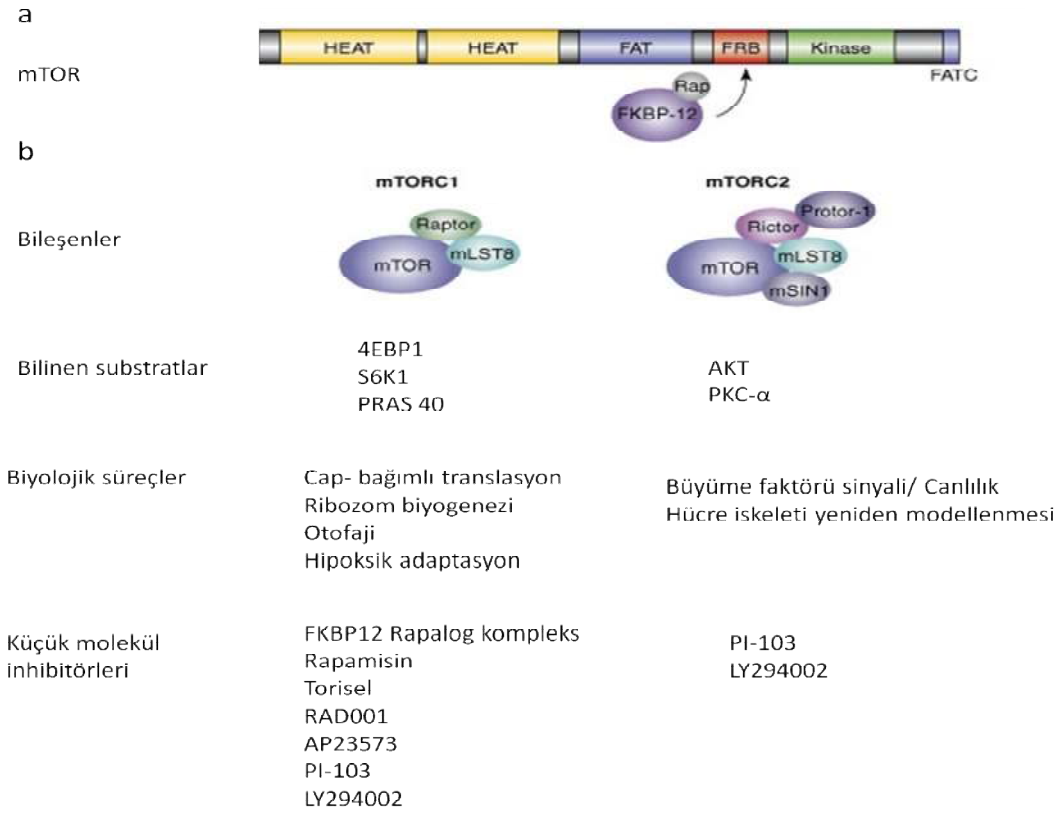
2.2 mTOR (rapamisin memeli hedefi) sinyal yolağı

mTOR proteini evrimsel olarak korunmuş, 289kDa ağırlığında bir serin-treonin kinazdır ve çeşitli proteinler ile fiziksel ilişki kurarak, mTORC1 ve mTORC2 protein komplekslerini oluşturur [2]. Rapamisine duyarlı olan mTORC1 protein kompleksi, hücre büyümesi için gerekli olan protein sentezini çeşitli alt yolak proteinlerini aktive ederek pozitif şekilde kontrol eder. mTORC1 hücre büyümesini; protein, lipid, organel biyosentezi gibi anabolik olayları indükleyerek ve otofaji gibi katabolik süreçleri sınırlandırarak gerçekleştirir.

mTORC1 fonksiyonları hakkında elde edilen bilgilerin çoğu, bakteriyel bir makrolid olan rapamisin'in kullanımı ile ortaya çıkmıştır. Rapamisin hücreye girdikten sonra; FK506-bağlanma proteini 12kDa (FKBP12)'ye bağlanır ve mTOR'un FKBP12-rapamisin bağlama domeni (FRB)'ye bağlanarak aktivitesini inhibe eder [2], (Şekil 2.2.1).

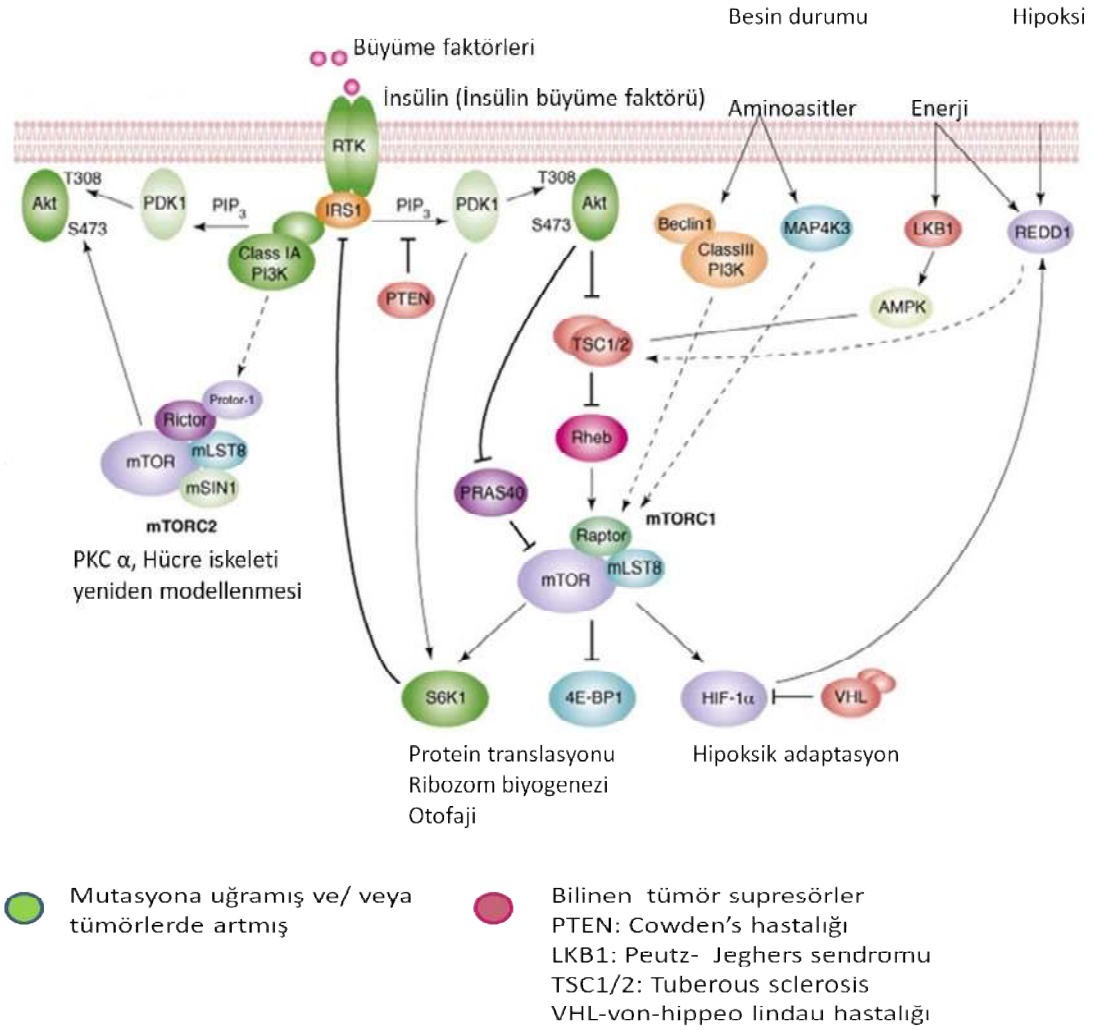
mTORC1 kompleksi beş bileşenden oluşur: (i) katalitik subunit özelliğinde olan mammalian target of rapamycin (mTOR); (ii) regulatory-associated protein of mTOR (Raptor); (iii) mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLST8, diğer ismiyle GbL); (iv) prolinerich AKT substrate 40 kDa (PRAS40); (v) DEP-domain-containing mTOR-interacting protein (Deptor) [3]. Bu kompleksi oluşturan proteinlerin rolleri henüz net olarak aydınlatılmamış olsa da; üst sinyal yolları tarafından fosforlanarak aktive olduğunda mTOR'un hücre büyümesini ve çoğalmasını destekleyen sinyal yollarını çalıştırdığı bilinmektedir (Şekil 2.9). Rapamisinin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağı, hücre içi ve hücre dışı sinyalleri bir araya getirir ve hücre metabolizması, büyümesi, çoğalması ve kurtuluşunda merkezi bir düzenleyicidir [7]. Son yıllardaki bulgular, mTOR yolağının T-hücre aktivasyonu, adipogenez, insülin direnci, tümör oluşumu ve anjiyogenez gibi çeşitli hücrelerel süreçlerde aktive olduğunu ve kanser, tip-2 diyabet gibi hastalıklarda ise düzenlenmesinin bozulduğunu göstermiştir [7].

Bu gözlemler, mTOR sinyal yolağına olan bilimsel ve klinik ilginin artmasına neden olmuştur. mTOR inhibitörleri olan rapamisin ve analoglarının, romatoid artrit, koroner restenoz, organ nakli ve solid tümörlerin tedavisi gibi patolojik durumlarda artan kullanımıyla birlikte mTOR sinyal yolağına karşı olan ilgi daha da belirginleşmiştir [7].



Şekil 2.9. mTOR organizasyonu ve sinyal kompleksleri. (a) mTOR'un yapısının şematik çizimi. (b) mTORC komplekslerinin özeti ve fonksiyonları [115] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

mTORC1; ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E)-bağlanma proteini 1 (4E-BP1) ve p70 ribozomal S6 Kinaz 1 (S6K1)'i fosforlayarak protein sentezini tetikler (Şekil 2.10). 4E-BP1'in fosforilasyonu sonucunda cap-bağımlı translasyon [4] ve S6K aktivasyonu sonucunda da mRNA biyogenezi, cap-bağımlı translasyon ve uzama, ribozomal protein translasyonu artar [5]. mTOR bağımlı, 4E-BP1 ve S6K1 aracılı yollar hücre büyümesi ve çoğalmasını birbirlerinden bağımsız olarak kontrol ederler. mTORC1 hücre büyümesini düzenleyen 4 esas sinyali analiz ederek birleştirir: (i) büyüme faktörleri, (ii) enerji durumu, (iii) oksijen, (iv) amino asitler mTORC1 aktivitesinin en önemli düzenleyicilerinden birisi, TSC1 (hamartin) ve TSC2 (tüberin) heterodimerlerinden oluşan Tübero Skleroz Kompleks (TSC)'tir [6] (Şekil 2.10). TSC1 ve TSC2, mTORC1 kompleksinin aktivitesini negatif yönde düzenleyen önemli tümör baskılayıcılardır ve bu genlerin heterozigot mutasyonlarında, benign karakterli tübero skleroz tümörleri oluşur [6].

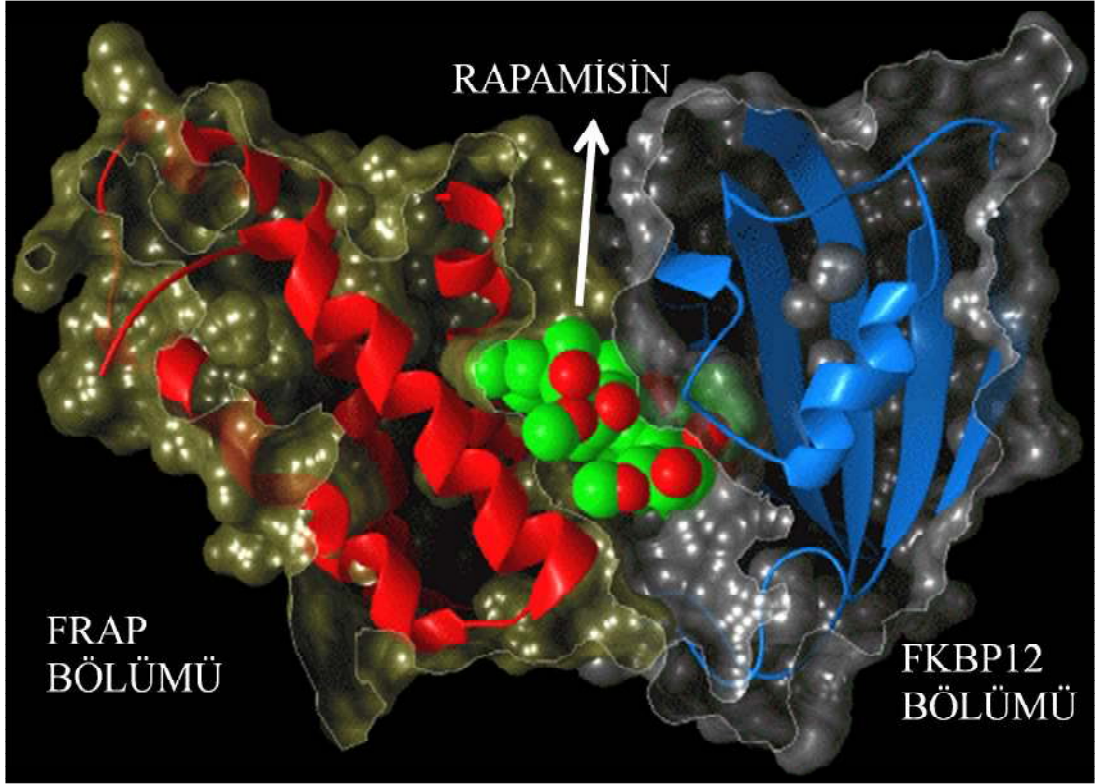


Şekil 2.10. mTOR sinyal ağı [115] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

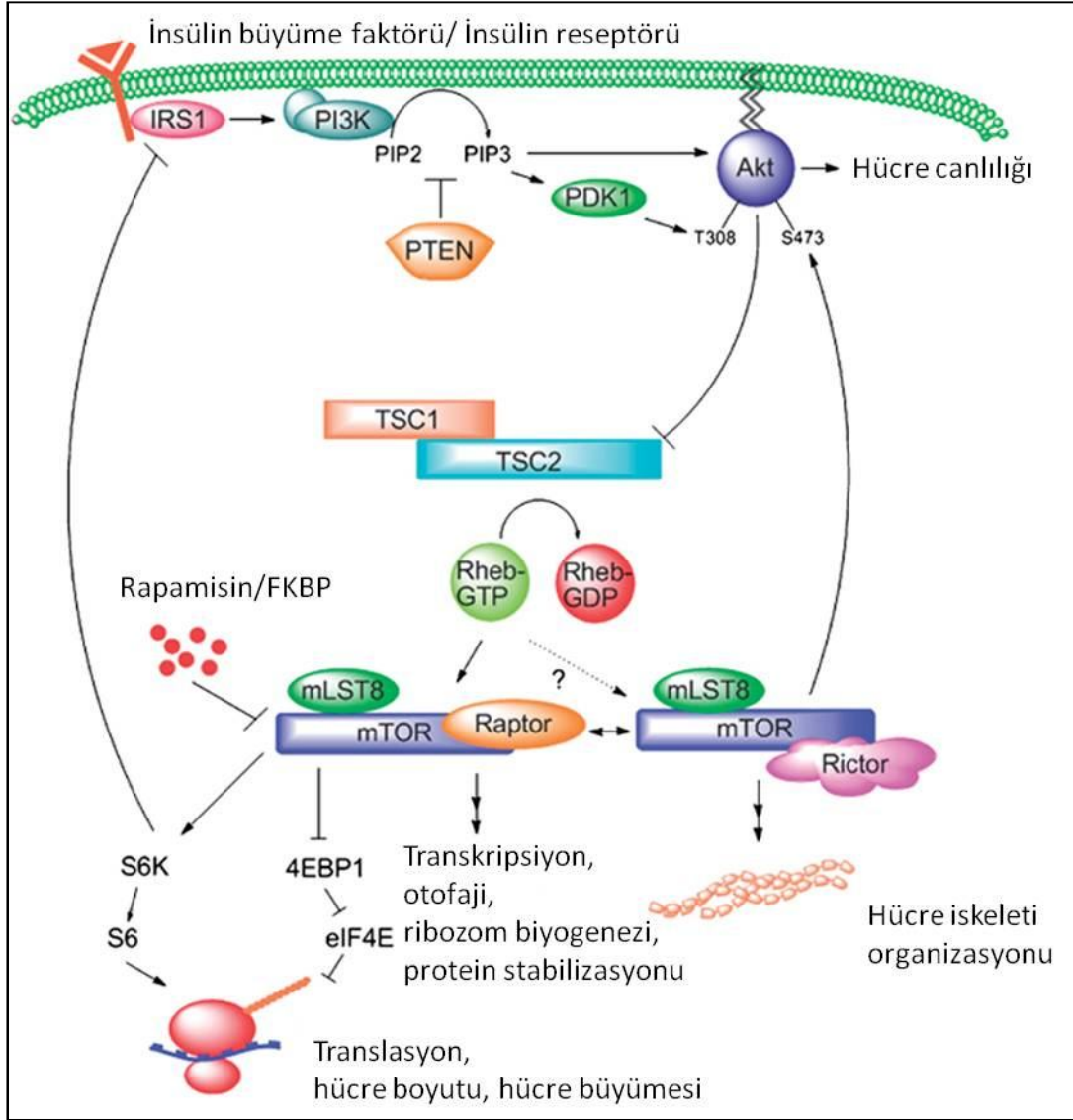
2.3. Rapamisin:

Bir mTOR inhibitörü olan rapamisin 1975 yılında *Streptomyces hygroscopicus* dan izole edilmiş olan bakteriyel bir makrolidtir [8]. Rapamisin'in antifungal ve antiprolifreatif etkileri bulunmaktadır. İnterlökin 2 reseptörünün İnterlökin 2'ye bağlanması T hücre proliferasyonu kontrol etmektedir [116]. Rapamisin İnterlökin 2(IL-2) mRNA translasyonunu baskılamakta ve IL-2 stabilitesini bozmaktadır ve bu etki ile immün yanıtta rol alan T hücrelerini inaktive olmaktadır [116]. Rapamisin kalp, böbrek transplantasyonu hastalarında immünsüpresif olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

1991 yılında proteini rapamisine duyarlı olan TOR (target of rapamycin/rapamisin hedefi) isimli bir gen bulunmuştur. Rapamisinin bulunması ile birlikte mTOR(rapamisin memeli hedefi) sinyal yolağına olan ilgi artmıştır. Rapamisin hücreye girdikten sonra; FK506-bağlanma proteini 12kDa (FKBP12)'ye bağlanır ve mTOR'un FKBP12-rapamisin bağlama domeyni (FRB)'ye bağlanarak aktivitesini inhibe eder [2] (Şekil 2-11, 2-12)



Şekil 2.11. Rapamisin'in molekül yapısı [117] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.



Şekil 2.12. Rapamisin'in mTOR sinyal yolağı üzerindeki etkisi. Rapamisin mTORC1'in aktivasyonunu inhibe etmektedir. mTORC1'in baskılanması sonucu alt yolağında bulunan S6K ve 4EBP1 proteinlerinin fosforilasyonunu baskılanmakta ve transkripsiyon, ribozom biyogenezi gibi olaylar gerçekleşmemektedir. [118] numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir.

2.3.1. Rapamisin ve erkek infertilitesi

mTOR inhibitörleri, organ nakli hastalarında bağışıklık sistemini baskılamak için kullanılan ve böbrekte toksik etki oluşturmeyen yeni sınıf ilaçlardır. Bununla birlikte, son yıllarda yayınlanan raporlar, bir mTOR inhibitörü olan rapamisinin (sirolimus), kalp ve böbrek nakli hastalarında kullanılmasının testosteron düzeylerinde ve sperm sayılarında belirgin bir düşüşe neden olarak, erkek gonad fonksiyonuna ve fertiliteye olumsuz etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır [9-16].

Ayrıca bu hastalarda, FSH ve LH hormonlarının düzeyleri de belirgin olarak artmıştır. 2003-2008 yılları arasında rapor edilen bu çalışmaların sonuçları;

sirolimusun “hipergonadotropik hipogonadizm” tipinde bir etki oluşturarak gonad fonksiyonunu direkt etkilediği fikrini desteklemektedir. Literatürde rapamisinin erkek gonad fonksiyonuna olumsuz etkisinin değerlendirildiği çok az çalışma mevcuttur. 2000 yılında yapılan *in vitro* bir çalışmada, mTOR’un spermatogonyal kök hücre proliferasyonunda anahtar bir düzenleyici olduğu ortaya konmuştur [17].

Rapamisinin literatürde artarak rapor edilen erkek fertilitesindeki olumsuz etkilerine rağmen, bu etkilerin mekanizmasında rol oynayabileceğini düşündüğümüz mTOR sinyal yolağı proteinlerinin, erişkin testisindeki ekspresyonları henüz tanımlanmamıştır. Yapmış olduğumuz ön çalışmada mTOR sinyal yolağı ile ilişkili proteinlerin erişkin fare testisindeki ekspresyonlarının değerlendirilmiştir. Bu alışma ile mTOR sinyal yolağı proteinlerinin spermatogonyal kök hücrelerde ve erken spermatositlerde ekspre olduğu gösterilmiştir [18].

Bu çalışmada; erişkin fare seminifer tüböl kültüründe mTOR sinyal yolağı inhibisyonunun fare spermatogenik hücrelere etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Akdeniz Üniversitesi “Deney Hayvanları Ünitesi” tarafından sağlanan ve standart laboratuvar koşullarında beslenen 18 adet Mus Musculus BALB/C ırkı yetişkin (8 haftalık) erkek fare kullanıldı. Farelerden elde edilen testis dokularından seminifer tübülleri elde edildi. Çalışma için aşağıdaki gruplar oluşturuldu.

1. Kontrol (n=6)
2. Taşıyıcı (n=6)
3. Rapamisin(n=6)

3.1 . Seminifer tübül damla kültürü

Farelerden elde edilen testis dokuları RPMI medyumuna içerisine alındı. Mikroskop altında kapsülü uzaklaştırılan testis içerisindeki seminifer tübülleri bir pens yardımı ile tutularak çekildi ve 5 mm'lik parçalara bölündü. Tübül parçaları petri kabının kapağı içerisinde oluşturulan 30 µl'lik damlalara (RPMI + % 0,1'lik BSA içeren) alındı. Bir damla içerisine 5 adet tübül konuldu. Petri kabının alt kısmına yüzeyi kaplayacak kadar distile su konuldu. Damlaları içeren kapak kısmı distile su içeren kısım üzerine kapatıldı. Bu şekilde damlalar içerisinde bulunan seminifer tübüllerin askıda kalması sağlandı.

Rapamisin grubu için alınan tübülleri 200 nmol rapamisin varlığında, taşıyıcı grubu rapamisinin çözücüsü olan etanol (200nmol) varlığında kültüre edilirken, kontrol grubu ise RPMI ve % 0,1 lik BSA içeren damlalarda kültüre edildi. Tübülleri 32°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat kültüre edildi. Bu gruplar için kullanılan hayvanlardan kontrol 0. saat için de doku temin edildi.

3.2. Hücre canlılık testi:

Kültür ortamının sağlıklı olup olmadığını ve kültüre edilen hücrelerin canlılığını test etmek amacıyla ilk olarak tüm gruplardan elde edilen seminifer tübülleri için canlılık testi yapıldı. Bu amaçla ‘Roche Cell proliferation assay MTT kit’ kullanıldı. Canlılık testi metabolik olarak aktif hücrelerde dehidrogenaz enzimi aktivitesi ile birlikte tetrazolium’un formazana dönüşümünün ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

3.2.1. Hücre izolasyonu

Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden sonra tübülleri 10 dk. süre ile 1mg/ml konsantrasyondaki kollajenaz varlığında 32°C ve %5CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Ardından ortama %0.025 konsantrasyonunda tripsin-EDTA eklendi ve 15 dk. inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyonlar sırasında mekanik çalkalama ve pipetaj yapılarak tübülleri parçalandı ve hücreler ayrıştırıldı. Elde edilen hücreler santrifüj yapılarak çöktürüldü. 2 kez %0,5'lik BSA içeren RPMI medyumuna ile yıkandı ve resuspanse edildi. Ardından bu hücreler thoma lamında sayıldı. Tüm gruplar için eşit sayıda hücre 96 kuyucuklu plaklara yüklendi. Her grup için 6 ayrı kuyucuk

yüklenerek hücre sayısının eşitliği test edildi. Kuyucuklara MTT işaretleyici solüsyon eklendi ve 4 saat 32°C ve %5CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Ardından MTT çözücü solüsyon eklenerek gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün 570 nm’de ELİSA plak okuyucuda absorbanslar okundu. Elde edilen değerler karşılaştırıldı.

3.3. Doku takibi ve kesit alma

Kültüre edilen tüm gruplardaki tübüller, Bouin fiksatif ile 1 saat oda ısısında tespit edildi ve ardından fiksatifin fazlasını uzaklaştırmak amacıyla 3-4 saat %70 alkolde yıkandı. Yıkama işlemini takiben seminifer tübüller Akdeniz üniversitesi Patoloji Laboratuvarında otomatik doku takip cihazında takip edildi. Son olarak parafin bloklar hazırlandı ve hazırlanan bloklardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Bloklardan alınan kesitlere immünohistokimya ve TUNEL metodu uygulandı.

3.4. İmmünohistokimya protokolü

Beş µm kalınlığındaki parafin kesitler, pozitif yüklü lamalar (Superfrost) üzerine alınarak bir gece 45°C’lik etüvde bekletildi. Deparafinizasyon için iki kere 5’er dakika ksilollerden geçirildikten sonra, her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80 ve %70’lik alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Daha sonra, distile suda çalkalanarak, tris tamponunda (TBS; pH: 7.2-7.4) üç kere beşer dakika yıkandı. Antijenik maskenin giderilmesi amacıyla kesitler 200 ml glisin tamponu (pH:3.5) içerisinde mikrodalga fırında 10 dk muamele edildikten sonra, 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile su ve TBS’ten geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler %3’lük hidrojen peroksit ile 5 dk inkübe edildi. Distile suda çalkalanıp TBS’te yıkanan kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu (Lab Vision) ile 6 dk muamele edildi. Serumun fazlası alındıktan sonra kesitler, tavşan poliklonal anti-mTOR (Cell Signalling, Kat. 2983) ile 1:400 dilüsyon oranında, oda ısısında gece boyu; tavşan poliklonal anti-fosfo-mTOR (Ser2448) (Cell Signalling, Kat. 2976) ile 1:100 dilüsyon oranında oda ısısında gece boyu; tavşan poliklonal anti-fosfo-4EBP1 (Thr37/46) (Cell Signalling Kat. 2855) ile, 1:100 oranında oda ısısı gece boyu; anti-sinaptonemal complex 3 (Abcam Kat no: 15093) oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Kontrol kesitlerine primer antikörlerin protein miktarı ile aynı oranda protein içeren izotip kontrolleri uygulandı. Kesitler, inkübasyon sonunda TBS ile üç defa beşer dakika yıkandı.

Daha sonra sırasıyla, 1 saat oda ısısında biyotinli tavşan sekonder antikör (Vector) ile ve önceden 30 dk oda ısısında bekletilen Vectastain Avidin Biotin Complex Kit [Vector PK 4000] ile 30 dk inkübasyon yapıldı. Her iki uygulama sonrasında da, TBS ile 3 defa beşer dakika yıkama yapıldı. Sinyali geliştirmek için dokular üç dakika 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) kromojeni (Sigmafast Kat: 4168) ile muamele edildikten sonra, distile suda yıkandı. Mayer’in Hematoksilen’inde (Dako) 30 saniye zıt boyama yapıldıktan sonra 3’er dk sırasıyla %70, %80 ve %90’lık alkol, 10 dk %100’lük alkol ve son olarak 5’er dk ksilollerden geçirilerek entellan kapatma solüsyonu ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal tekniklerle boyanan

bütün kesitler Axioplan mikroskopunda (Zeiss) değerlendirildi ve Spot Advance Programı aracılığıyla resimler elde edildi.

3.5. Sds - poliakrilamid jel elektroforezi (page) ve western blot

Seminifer tübül örnekleri, proteaz inhibitör kokteyli içeren “Triton-X” solüsyonuna alındıktan sonra; sonikatör kullanılarak homojenize edildi. Tüm örnekler, 10.000 g’de, +4°C’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant -20°C’de buzdolabında saklandı. Total protein ekstraksiyonu yapılmış bu dokuların içerdiği protein miktarları, NanoDrop 2000 cihazıyla niceliksel olarak elde edildi. Elektroforezden hemen önce, 100 °C’deki suda örnekler 5 dakika kaynatıldı. Jel elektroforezi için, %4-12 lik gradient Bis-Tris jeller kullanıldı. Her kuyucuğa 20 mikrolitre örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde konuldu ve Mini protean sistem III tankının içine yerleştirildi. Mini protean sistem III tankına, elektroforez solüsyonu eklenerek, tank güç kaynağına bağlandı. Proteinler, güç kaynağı aracılığı ile 200 Volt, 115 miliamperde 35 dakika elektroforez edildi. Proteinler jelde yürürken, PVDF membran üstte ve altta 3 er adet filtre kağıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. PVDF membran üzerine proteinleri içeren jel konularak hazırlanan sandviç Mini protean III sistemindeki tank blot içerisine alındı. Mini protean III tankına transfer solüsyonu eklendi ve +4 °C’de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra elde edilen membran, Tris tuz solüsyonu (TBS) ile hazırlanan % 5 lik yağsız kuru süt tozu ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde blokladı. Membran, üreticinin tavsiyesine göre hazırlanmış ve bloklama solüsyonu içinde dilue edilmiş olan primer antikorlar (p-S6K, PCNA, Stra8, Vasa, GAPDH) kullanılarak oda sıcaklığında 2 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membran, primer antikorlar için uygun olan ve bloklama solüsyonu içerisinde dilue edilmiş olan horseradish peroksidaz (HRP) konjuge IgG içeren sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı. Membranlar, SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi ile 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında membranlardaki sinyaller hiperfilme karanlık odada kaset kullanılarak aktarıldı. Banyo sırasında film, developer ve fiksatiften geçirildi ve distile su ile yıkanıp kurutuldu.

Rapamisin’in mTOR sinyal yolağını inhibe edip etmediğini göstermek amacıyla; fosforile S6K1 antikoru kullanıldı. Böylece; mTOR sinyal yolağının seminifer tübüldeki aktivasyonu değerlendirildi. Ardından bu sinyal yolağının inhibisyonunun hücrelerin mitoz ve/veya mayoz bölünmelerinde rol alan belirteçleri etkileyip etkilemediğini araştırmak amacıyla aşağıdaki proteinlerin ekspresyonları değerlendirildi:

*Spermatogoniumların mitoz bölünmelerini belirlemek amacı ile PCNA antikoru kullanıldı.

*Premayotik hücreleri belirlemek amacı ile Stra 8 antikoru kullanıldı.

*Spermatogonyumlardan yuvarlak spermatidlere kadar olan germ hücrelerini belirlemek ve sayılarını değerlendirmek amacıyla; germ hücre belirteci olan MVH (Mouse VASA homolog protein) antikoru kullanıldı.

GAPDH primer antikoru ise; proteinlerin eşit yüklendiğini göstermek amacıyla internal kontrol olarak kullanıldı. Elde edilen sinyaller, NIH internet sitesinde mevcut olan ve densite ölçen bilgisayar programları ile niceliksel olarak değerlendirildi.

3.6. Tunel metodu

mTOR sinyal yolağı inhibisyonunun apoptoz etkisinin değerlendirilmesi amacıyla tüm gruplar arasında apoptotik hücrelerin sayısı değerlendirildi.

Beş µm kalınlığında seri kesitler Poli-L lizin kaplı lamlara alındı ve 24 saat ya da daha uzun süreyle oda ısısında kurutma yapıldı. Boyanmanın uygulanacağı günden 1 gece önce, kesitler 45°C'lik etüvde gece boyu bekletildi. Uygulamadan önce, kesitler 60°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. 2 kez, 5'er dakika ksilol solüsyonunda deparafinizasyon uygulandı. Alçalan alkol derecelerinde (%100, %90, %80, %70) 1'er dakika sürelerle rehidratasyon uygulandı. Kesitler suya konularak, TUNEL işlemine başlandı. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. Permeabilizasyon solüsyonunda, +4°C'de (buzdolabında ya da oda ısısında buz üzerinde) 8 dakika bekletildi. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. TUNEL solüsyonunda, 37°C'de, 1 saat, nemli ortamda, karanlıkta bekletildi. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. 30µl Converter-AP (vial 3) kesitler üzerine damlatılır ve 37°C'de, 30 dakika, nemli ortamda, karanlıkta bekletildi. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. Fast Red substrat solüsyonunda oda ısısında, 10 dakika, nemli ortamda, karanlıkta bekletildi. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. Kaisers jelatin ile kapatma yapıldı.

3.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR):

Rapamisin'in varlığında (deney grubu) ve yokluğunda (kontrol grubu) kültüre edilen seminifer tübüllerden, RNA izolasyon kiti kullanılarak, total RNA elde edildi ve daha sonra bu RNA, reverse transkriptaz aracılığıyla komplementer DNA'ya (cDNA) çevrildi. Bu cDNA'larda mTOR, S6K1, 4E-BP1, tuberin, VASA, PCNA, Sycp3, Stra8 genlerine ait mRNA'ların ekspresyonları tüm gruplarda RT-PCR reaksiyonu ile karşılaştırıldı. RT-PCR'de belirtilen genler için, önceden tasarlanmış ve kullanıma hazır plakalar kullanıldı. Reaksiyonda, 18S, beta-aktin ve alfa-tubulin referans genler olarak kullanıldı.

3.8. İstatistiksel analizler

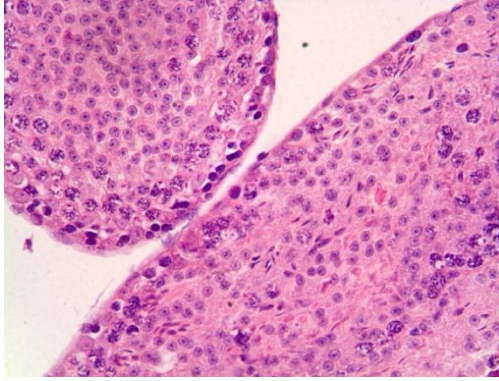
Tüm değerler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Rapamisin'in varlığında (deney grubu) ve yokluğunda (kontrol grubu ve sham grubu) 0. saat, 24. saatte kültüre edilen seminifer tübüllerde, hücre canlılığı; kontrol grubundaki hücrelerin %100 canlı olduğu kabul edilerek diğer gruplarla "Student's t" test kullanılarak karşılaştırıldı. Deney grubunun ve sham grubunun kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırılması için "One Sample t" testi kullanıldı. Western blot analizleri için gruplar arasındaki fark 'One Way Anova' testi ile değerlendirildi. Post hoc

analizlerde PCNA ve VASA için ‘Tukey’ testi, Stra8 ve S6K için ‘Holm Sidak’ testi kullanıldı. RT-PCR reaksiyonu sonunda One Way ANOVA ile istatistiksel analiz yapıldı ve gruplar arasındaki mRNA ekspresyonu karşılaştırıldı. *p* değerleri 0.05 altında olduğunda sonuçlar anlamlı kabul edildi.

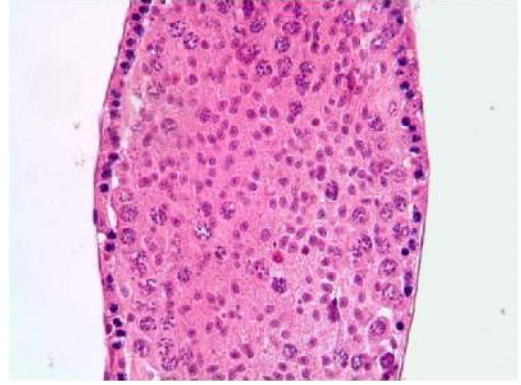
BULGULAR

4.1. Seminifer tübül damla kültürü

Seminifer tübül kültürü sonunda kontrol 0. Saat ve 24 saatlik inkübasyonlardan elde edilen tübüller rutin histolojik boyamalar yapılarak değerlendirildi (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Bu değerlendirmelerin sonunda seminifer tübül kültür koşullarının sağlıklı olduğu belirlenerek kontrol, taşıyıcı ve rapamisin grubu için kültüre devam edildi.



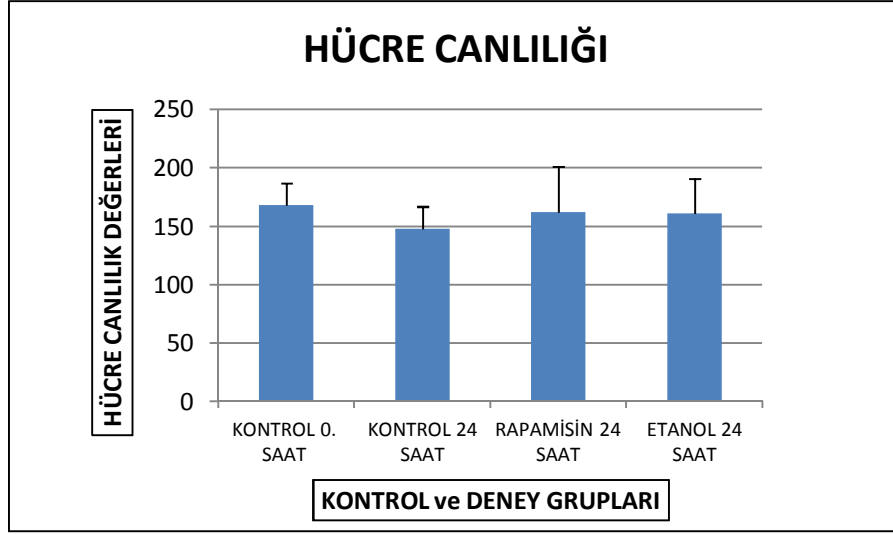
Şekil 4.1. Kontrol 0. saatte izole edilen seminifer tübüllerin genel mikroskopik görünümü (Büyütme: 40X) Kontrol 0. saatte sağlıklı tübüller elde edildiği gözlemlendi.



Şekil 4.2. Kontrol 24. saatte kültürden alınan seminifer tübülün genel mikroskopik görünümü (Büyütme: 40X). Seminifer tübül kültürü sonunda sağlıklı tübüller elde edildiği gözlemlendi.

4.2. Canlılık testi

Seminifer tübül kültürü sonrasında tüm gruplar için elde edilen canlılık testi sonuçları değerlendirildi. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. Bu sonuçlara göre seminifer tübül kültürü ve hücre izolasyonu aşamasında sonuçlarımızı etkileyecek bir hücre kaybı olmadığı gösterildi (Şekil 4.3).

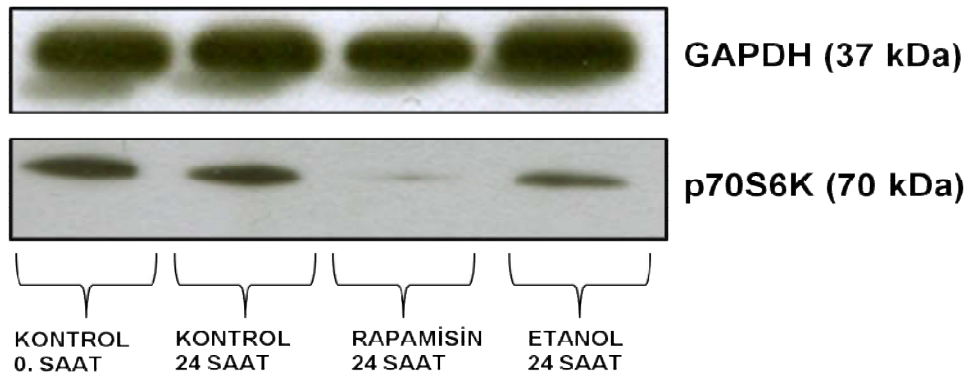


Şekil 4.3. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültür sonunda elde edilen hücre canlılık değerleri. Kontrol ve deney gruplarında hücre canlılığının benzer olduğu gözlemlendi.

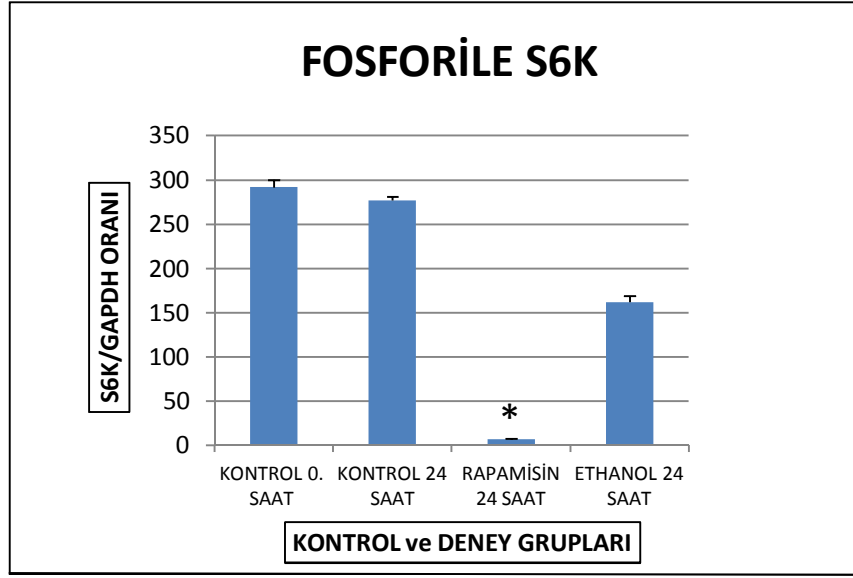
Her seminifer tübül kültürünün ardından canlılık testi ve rutin histolojik değerlendirme yapıldı.

4.3. Western blot

Seminifer tübül kültürü sonrasında ilk olarak mTOR sinyal yolağı inhibisyonunun bir belirteci olan p70S6K proteininin gruplar arasındaki değişimi western blot tekniği ile gösterildi. p70S6K miktarının 24 saatlik rapamisin grubunda kontrol 0. saat ve kontrol 24 saatlik gruplara göre anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. Elde edilen bu sonuçlara göre seminifer tübül kültürüne 200 nmol rapamisin uygulaması sonucunda mTOR sinyal yolağının inhibe edildiği gösterildi (Şekil 4.4, Şekil 4.5).

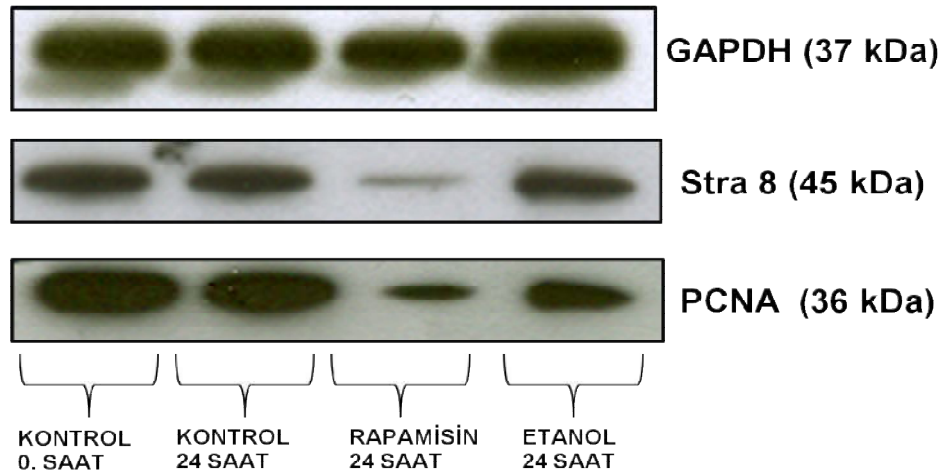


Şekil 4.4. Kontrol 0. saat ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerin p70S6K ekspresyonu. GAPDH (internal kontrol). Rapamisin uygulanan grupta p70S6K ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi.

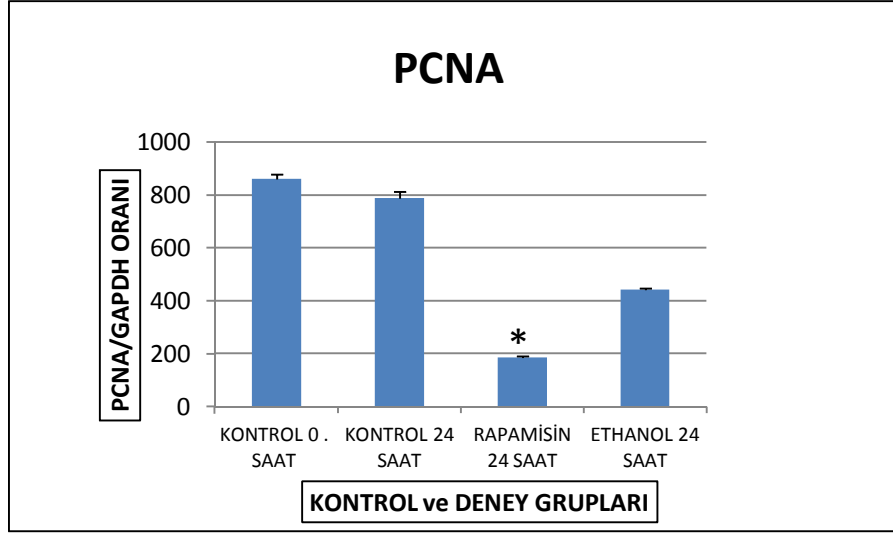


Şekil 4.5. Her grup için elde edilen fosforile S6K / GAPDH oranları
Rapamisin uygulanan grupta p70S6K ekspresyonun anlamlı
şekilde azaldığı gözlemlendi. (* $P < 0.05$)

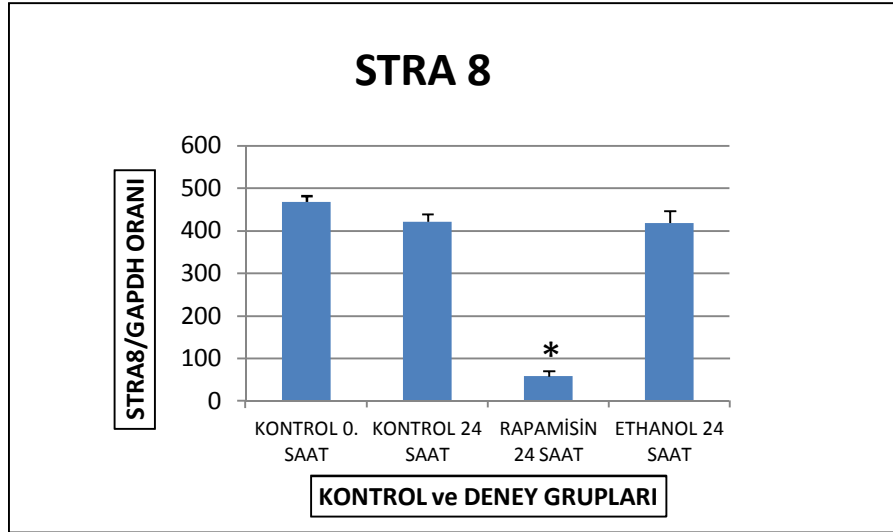
mTOR sinyal yolağı inhibisyonun ardından premayotik hücre belirteci olan Stra8 ve proliferen hücre belirteci olan PCNA seviyelerinin de p70S6K ile benzer bir şekilde rapamisin uygulanan grupta diğer gruplara göre anlamlı şekilde azaldığı gösterildi (Şekil 4.6-4.7-4.8).



Şekil 4.6. Kontrol 0. saat ve 24 saatlik kültür sonunda mitoz ve mayoz bölünme belirteçlerinin ekspresyonları. GAPDH (internal kontrol)
Rapamisin uygulanan grupta PCNA ve Stra8 ekspresyonlarının azaldığı gözlemlendi.

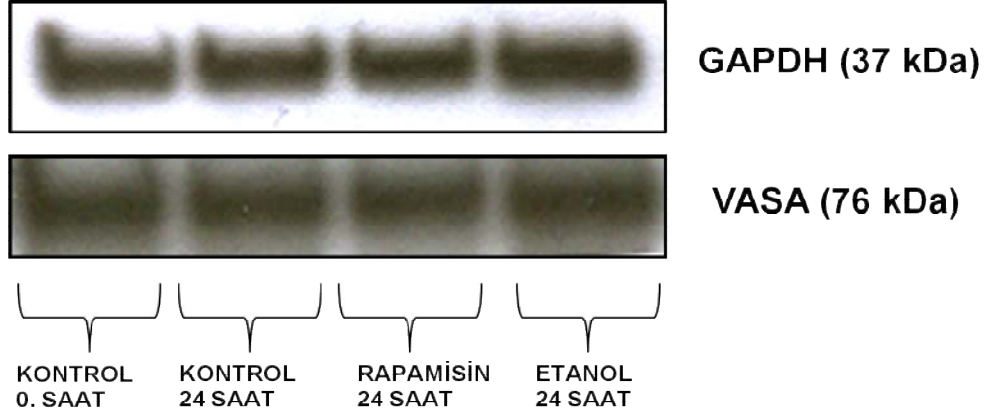


Şekil 4.7. Her grup için elde edilen PCNA / GAPDH oranları. Rapamisin uygulanan grupta PCNA ekspresyonunun anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. (* $p < 0.05$)

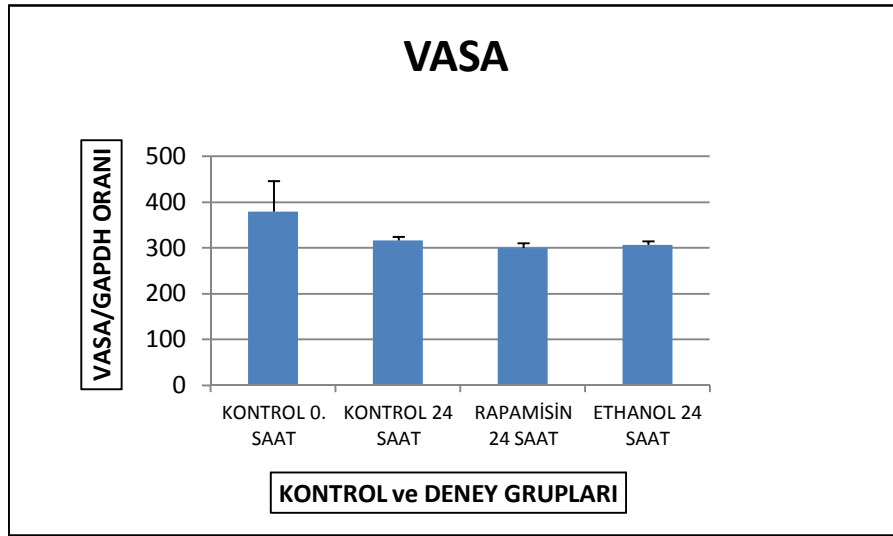


Şekil 4.8. Her grup için elde edilen Stra8 /GAPDH oranları. Rapamisin uygulanan grupta Stra8 ekspresyonunun anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. (* $p < 0.05$)

Germ hücre belirteci olan VASA (Mouse vasa homolog) proteininin tüm gruplarda eşit olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9-4.10).



Şekil 4.9. Kontrol 0. saat ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerin VASA (Germ hücre belirteci) ekspresyonları. GAPDH (internal kontrol) Kontrol ve deney gruplarında VASA ekspresyonunun benzer olduğu gözlemlendi.

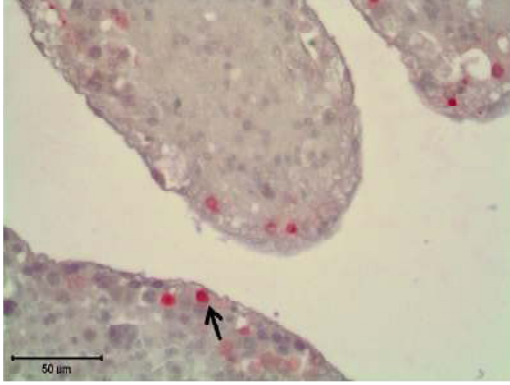


Şekil 4.10. Her grup için elde edilen VASA / GAPDH oranları. VASA ekspresyonunda kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

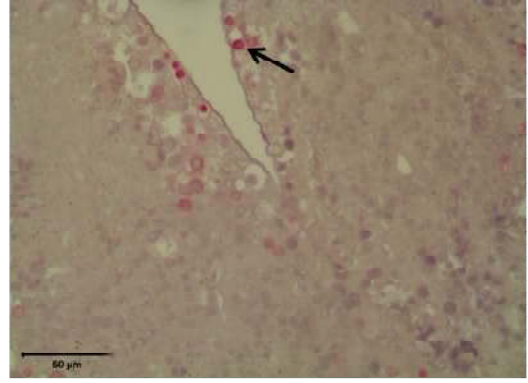
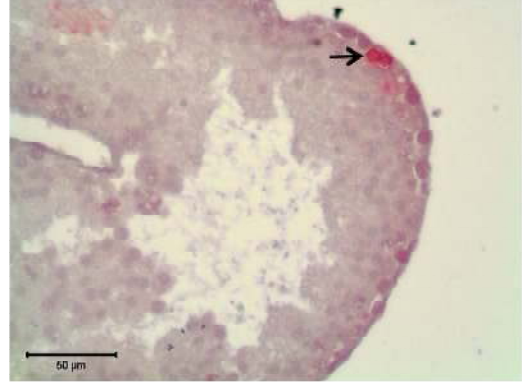
4.4. Tünel

Kontrol 0. saat ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerde apoptotik hücre sayısının benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11).

KONTROL 0. SAAT



KONTROL 24 SAAT



RAPAMİSİN 24 SAAT

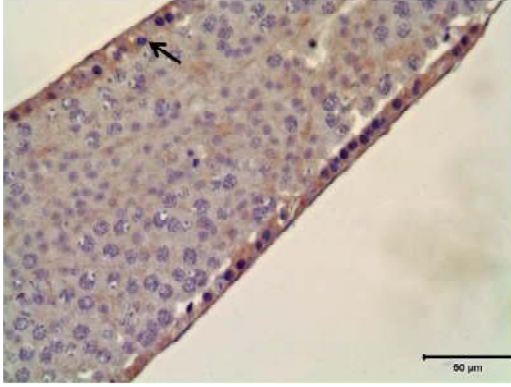
ETANOL 24 SAAT

Şekil 4.11. Kontrol 0. Saat ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki TUNEL reaksiyonu. Kontrol ve deney gruplarında apoptotik hücre sayısının benzer olduğu gözlemlendi. Siyah oklar: TUNEL reaksiyonu pozitif olan hücreler

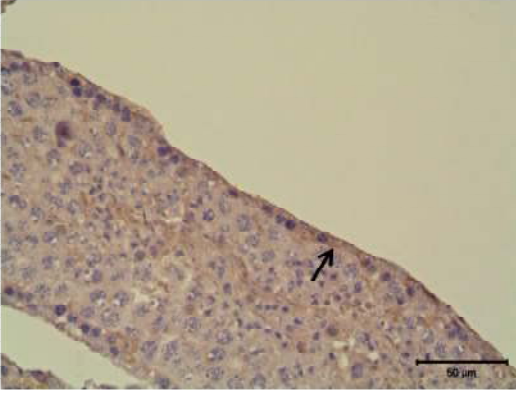
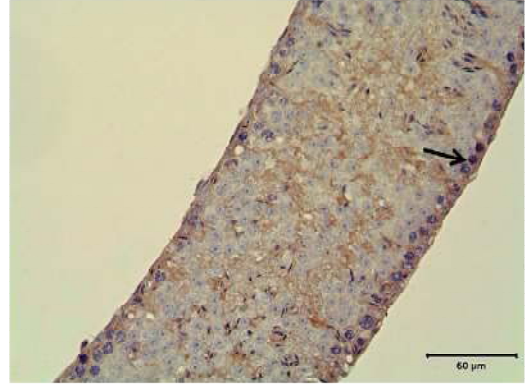
4.5. İmmünohistokimya

mTOR sinyal yolağı ilişkili proteinlerin mayoz belirteci olan sycp3 proteininin ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. mTOR, fosforile mTOR ve Sycp3 proteinlerinin ekspresyonlarında kontrol 0. Saat ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübülleri arasında fark olmadığı gözlemlendi. (Şekil 4.12, 4.13, 4.14). 4EBP1 ekspresyonunun rapamisin grubunda azaldığı gözlemlendi. (4.15).

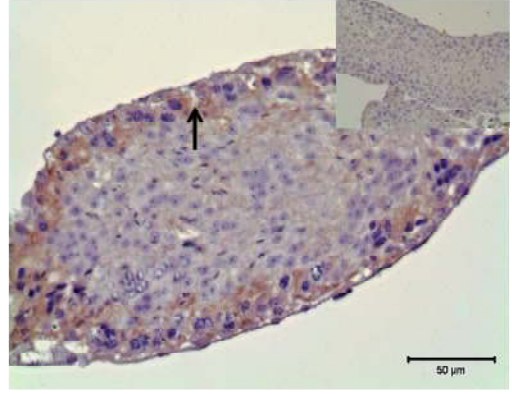
KONTROL 0. SAAT



KONTROL 24 SAAT



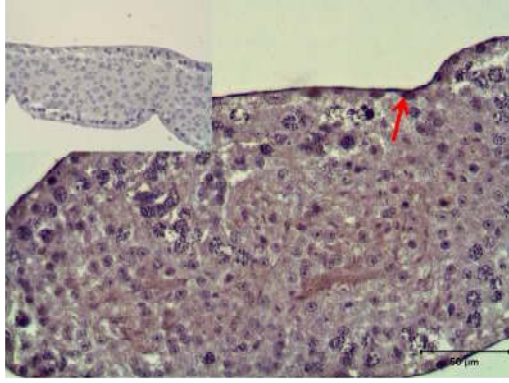
RAPAMİSİN 24 SAAT



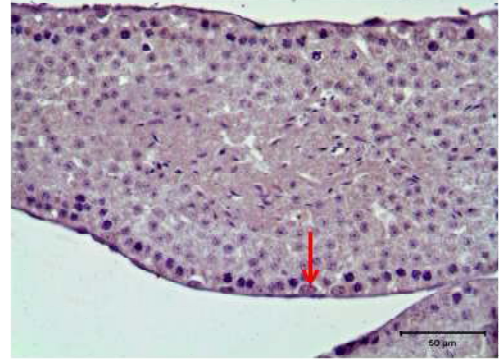
ETANOL 24 SAAT

Şekil 4.12. Kontrol 0. Saat ve 24 saat kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki mTOR ekspresyonu. mTOR ekspresyonunun kontrol ve deney gruplarında benzer olduğu gözlemlendi. Siyah oklar: preleptoten spermatositlerdeki mTOR ekspresyonu, Etanol 24 saat sağ üst köşe: negatif kontrol

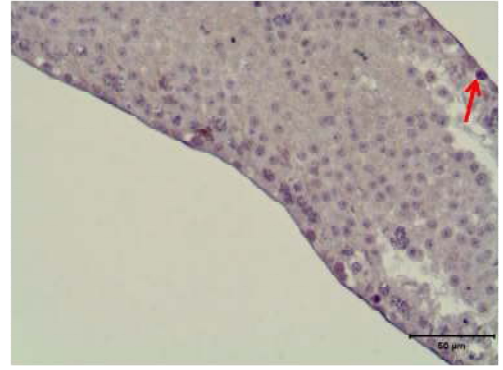
KONTROL 0. SAAT



KONTROL 24 SAAT



RAPAMİSİN 24 SAAT



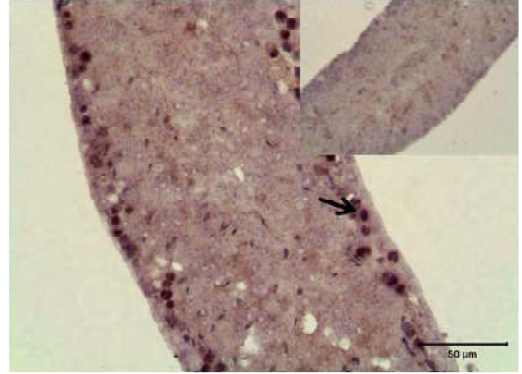
ETANOL 24 SAAT

Şekil 4.13. Kontrol 0. Saat ve 24 saat kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki p-mTOR ekspresyonu. P-mTOR ekspresyonunun kontrol ve deney gruplarında benzer olduğu gözlemlendi. Kırmızı oklar: Spermatogonyumlardaki p-mTOR ekspresyonu , Kontrol 0. Saat sol üst köşe: negatif kontrol

KONTROL 0. SAAT



KONTROL 24 SAAT



RAPAMİSİN 24 SAAT

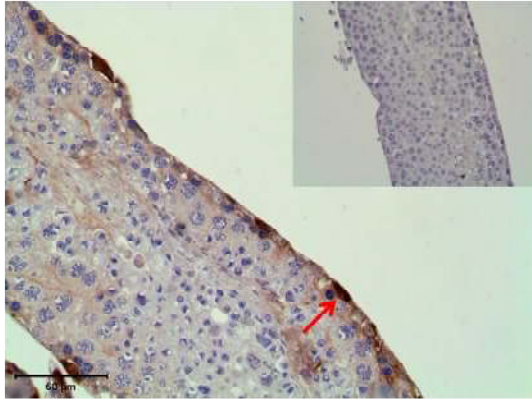
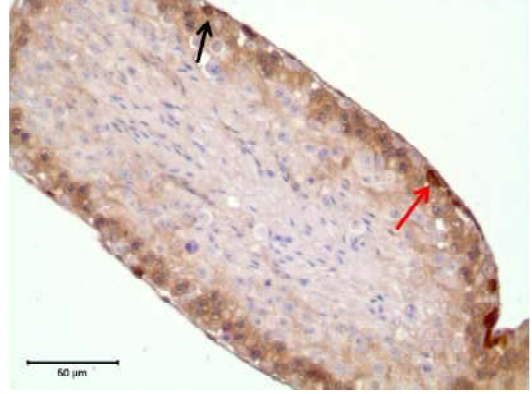
ETANOL 24 SAAT

Şekil 4.14. Kontrol 0. Saat ve 24 saat kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki sinaptonemal kompleks 3 ekspresyonu. Kontrol ve deney gruplarında Sycp3 ekspresyonunun benzer olduğu gözlemlendi. Siyah oklar: primer spermatositlerdeki sycp3 ekspresyonu, Kontrol 24 saat sağ üst köşe: negatif kontrol

KONTROL 0. SAAT



KONTROL 24 SAAT



RAPAMİSİN 24 SAAT

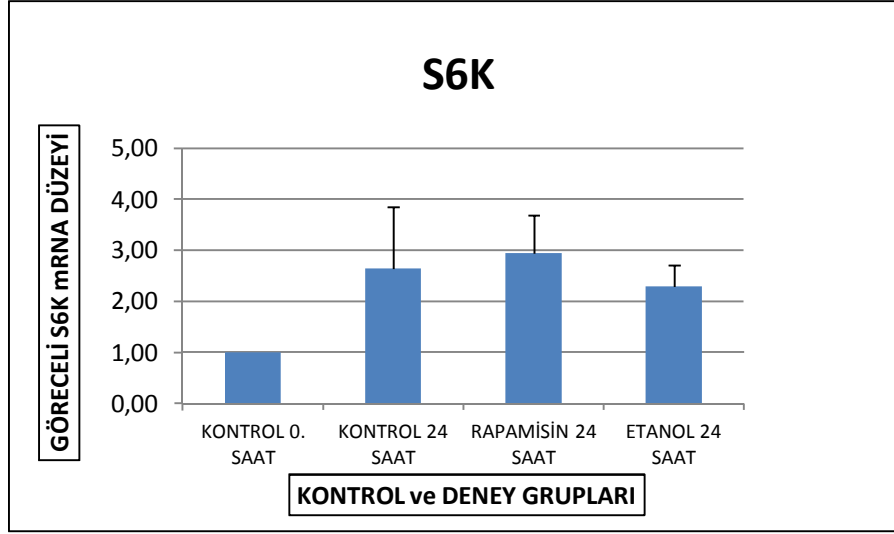


ETANOL 24 SAAT

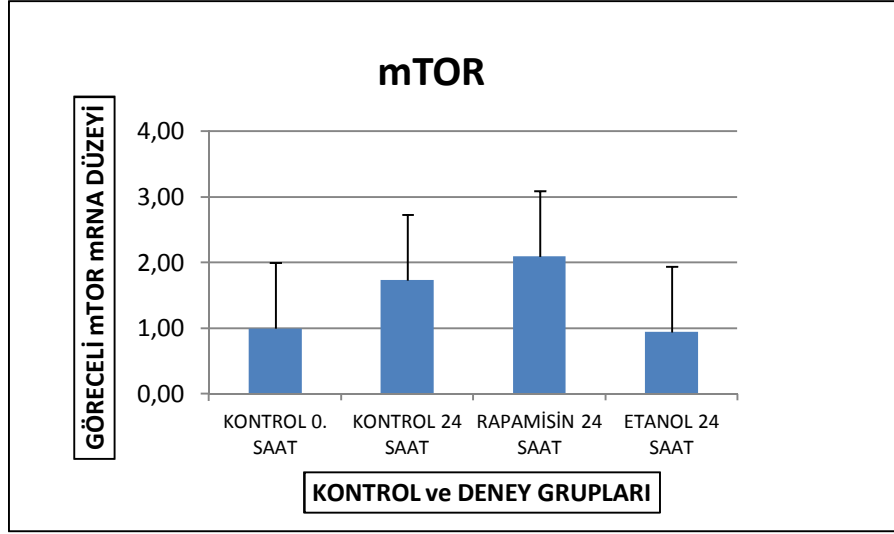
Şekil 4.15. Kontrol 0. Saat ve 24 saat kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki p-4EBP1 ekspresyonu. P-4EBP1 ekspresyonunun rapamisin uygulanan grupta anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. Siyah oklar: preleptoten spermatositlerdeki p-4EBP1 ekspresyonu, kırmızı oklar: spermatogonyumlardaki p-4EBP1 ekspresyonu, Rapamisin 24 saat sağ üst köşe: negatif kontrol

4.6. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

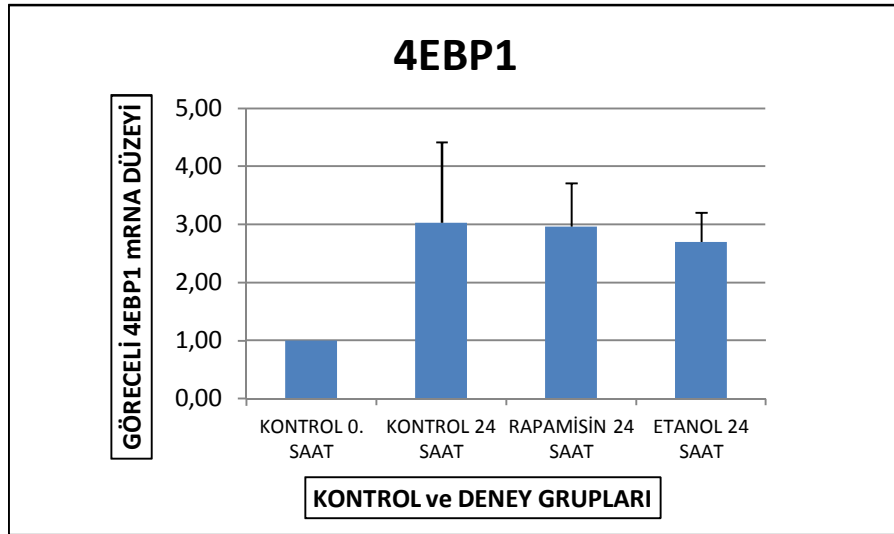
RT-PCR değerlendirmeleri sonucunda S6K geninin mRNA düzeylerinde gruplar arasında anlamlı şekilde fark olmadığı gösterildi (Şekil 4.16). mTOR, 4EBP1, TSC2, Stra8, Sycp3 genlerinin mRNA seviyelerinin gruplar arasında benzer olduğu gözlemlendi. İstatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21). Rapamisin uygulanan grupta VASA ve PCNA genlerinin mRNA seviyelerinin kontrol 0. saatteki seminifer tübüllere oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 4.22, 4.23).



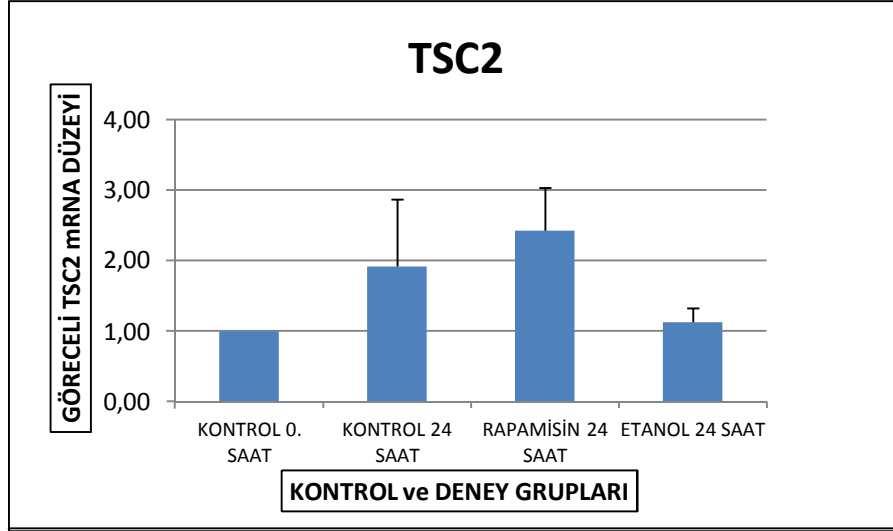
Şekil 4.16. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki S6K mRNA ekspresyonu. Kontrol ve deney gruplarında S6K ekspresyonunun benzer olduğu gözlemlendi.



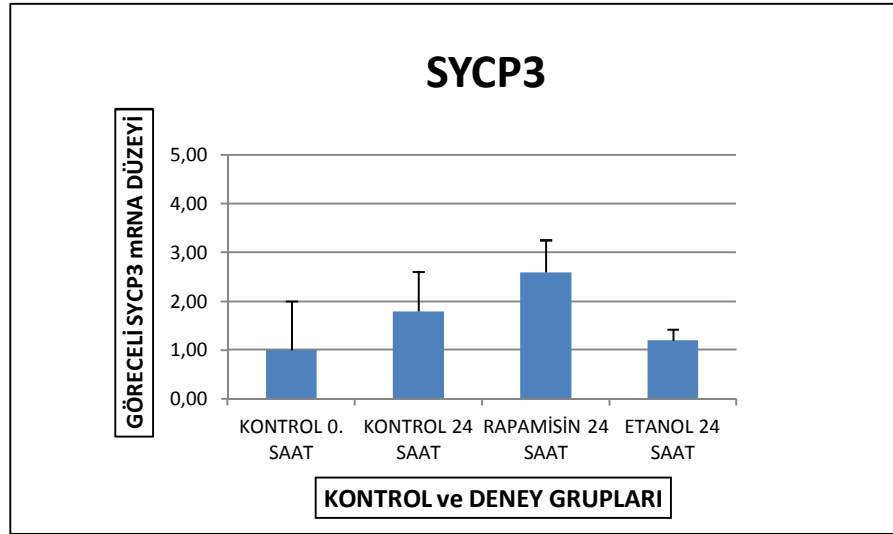
Şekil 4.17. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki mTOR mRNA ekspresyonu. Kontrol ve deney gruplarında mTOR ekspresyonunun benzer olduğu gözlemlendi.



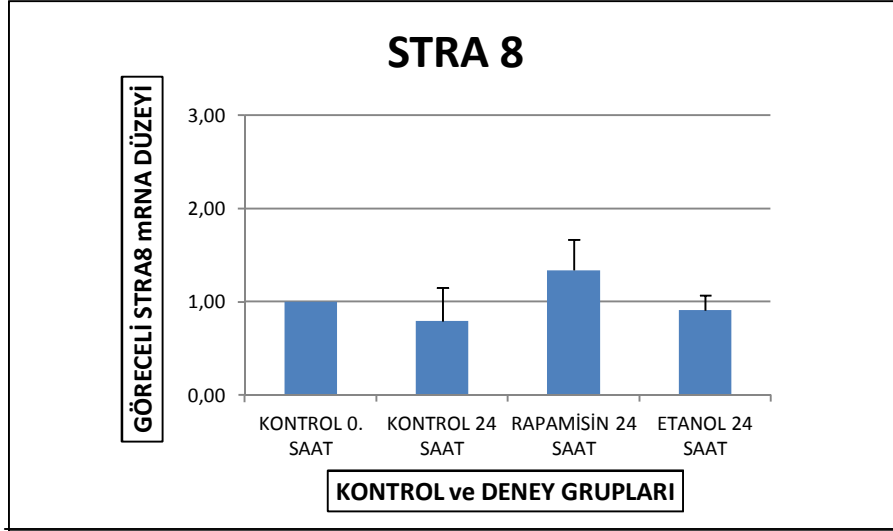
Şekil 4.18. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki 4EBP1 mRNA ekspresyonu. Kontrol ve deney gruplarında 4EBP1 ekspresyonunun benzer olduğu gözlemlendi.



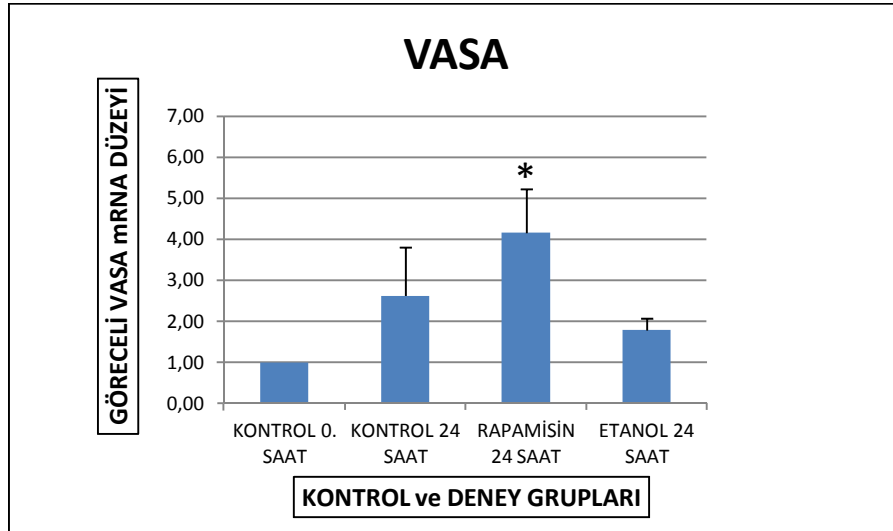
Şekil 4.19. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki TSC2 mRNA ekspresyonu. Kontrol ve deney gruplarında TSC2 ekspresyonunun benzer olduğu gözlemlendi.



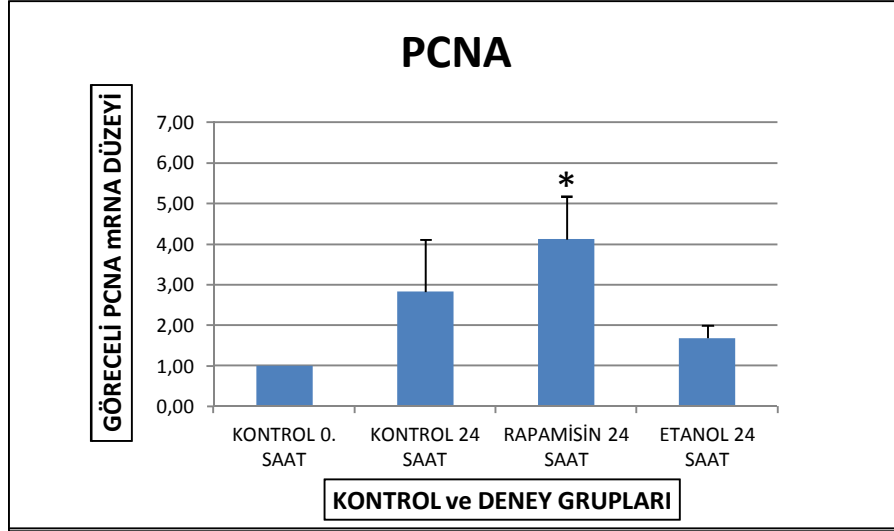
Şekil 4.20. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki SYCP3 mRNA ekspresyonu. Kontrol ve deney gruplarında Sycp3 ekspresyonunun benzer olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.21. Kontrol 0. saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki STRA8 mRNA ekspresyonu. Kontrol ve deney gruplarında Stra8 ekspresyonunun benzer olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.22. Kontrol 0. Saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki VASA mRNA ekspresyonu. VASA ekspresyonunun rapamisin uygulanan grupta anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi.
(*P< 0.05)



Şekil 4.23. Kontrol 0. Saatte ve 24 saatlik kültürden elde edilen seminifer tübüllerdeki PCNA mRNA ekspresyonu. PCNA ekspresyonunun rapamisin uygulanan grupta anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. (* $P < 0.05$)

TARTIŞMA

Rapamisin klinikte organ nakli hastalarında immün sistemi baskılamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda rapamisin kullanımının erkek hastalarda gonad fonksiyon bozukluğuna neden olduğunu gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Rapamisin uygulaması erkek hastalarda sperm sayısında düşüşe neden olarak geri dönüşümlü ya da kalıcı biçimde gonad fonksiyon bozukluğuna sebep olabilmektedir.

2004 yılında Kaczmarek ve arkadaşlarının rapamisin uygulanan kalp transplantasyon hastalarında yaptıkları bir çalışmada; erkek hastaların testosteron seviyelerinde düşüş ve gonadotropin seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir [11]. 2004 yılında Frietsche ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada, rapamisin uygulanan böbrek transplantasyon hastalarında testosteron seviyesinin rapamisin uygulanmayanlara göre düşük olduğu gösterilmiştir [10]. 2007 yılında yayınlanan bir raporda; böbrek transplantasyon hastalarında rapamisin (sirolimus) uygulaması sonucu gelişen hipergonadotropik hipogonadizm etkisinin, hastalara uygulanan immünsüpresif ajan değiştirildiğinde geri döndüğü gösterilmektedir [8]. Literatürde rapamisinin erkek fertilitesindeki olumsuz etkisinin değerlendirildiği çok az çalışma mevcuttur.

c-KİT/SCF (c-KİT reseptörü) sinyali mTOR sinyalinin üst yolağında bulunan fosfo inozitol 3 kinaz ile aktive olmaktadır ve spermatogenez ve erkek fertilitesi açısından önemlidir. c-KİT homozigot mutant hayvanların spermatogonyal kök hücre proliferasyonundaki düşüş ve kök hücre apoptozundaki artışa bağlı olarak steril oldukları 2000 yılında yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir [119]. 2000 yılında yapılan bir çalışmada rapamisin'in fosfo inozitol 3 kinaz c-KİT bağlantısının alt yolağını baskıladığı gösterilmiştir [17]. Feng ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada rapamisin'in spermatogonyal proliferasyonu PI3K/AKT/mTOR/P70S6K sinyalini baskılayarak bloke ettiği gösterilmiştir. Çalışmada spermatogonya kültüründe mTOR sinyalinin spermatogonyada SCF/c-KİT aracılığı ile siklin D3'ü upregüle ettiği ve hücre siklusunun devamlılığını sağladığı gösterilmektedir. Bu çalışmaya göre rapamisin önemli bir kök hücre faktörü olan c-KİT sinyalini baskılayarak spermatogenezi duraklatmaktadır [17]. Fakat bu çalışma sadece spermatogonya hücrelerin izole edilerek mTOR sinyal yolağının baskılandığı *in vitro* bir çalışmadır. Rapamisin'in diğer spermatogenik seri hücreleri üzerindeki olası etkisini gösteren başka bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu bilgiler ışığında yapmış olduğumuz ön çalışmada; mTOR sinyal yolağı proteinlerinin erişkin testisindeki ekspresyonları değerlendirilmiş ve mTOR sinyal yolağı proteinlerinin spermatogonyum ve premayotik hücrelerde ekspre olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar dahilinde mTOR sinyal yolağının spermatogenik hücrelerin proliferasyonunda ve mayoz bölünme sürecinde rolü olduğu düşünülmüş ve bu çalışma planlanmıştır.

Çalışmamız, mTOR sinyal yolağının spermatogenez üzerindeki rolünün detaylı olarak gösterildiği ilk fonksiyonel çalışmadır. Bizim çalışmamızda, seminifer tübül kültüründe bu sinyal yolağının olası etkisi araştırılmıştır. İlk olarak, uygulanan seminifer tübül kültüründe spermatogenik hücrelerin canlı kaldıkları ve rapamisin uygulaması sonrasında bu yolağın inhibe edildiği gösterilmiştir. Çünkü rapamisin

uygulamasının ardından, fosforile S6K proteininin ekspresyonu anlamlı olarak azalmıştır. Buna karşılık germ hücre sayısının tüm gruplarda eşit olduğu germ hücre belirteci (VASA) ile gösterilmiştir. Hem apoptoza giden hücre sayısının hem de germ hücre sayısının kontrol ve deney gruplarında benzer olması, 24 saat rapamisin uygulaması sonrasında seminifer tübülde henüz germ hücre sayısının değişmediğini göstermektedir. Rapamisin uygulamasından 24 saat sonra proliferasyon belirteci olan PCNA seviyesinin rapamisin uygulanan grupta diğer gruplara göre anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bir sonraki aşamada hücrelerin farklılaşma süreci değerlendirilmiştir.

Retinoik asit varlığında Stra8 proteininin ekspre olduğu ve germ hücrelerinin mayoz bölünmeye girişini tetiklediği bilinmektedir [33]. A vitamininin aktif bir metaboliti olan retinoik asitin postnatal testiste spermatogonyal proliferasyon ve germ hücrelerinin mayotik profaza girmeleri için önemli olduğu, 2008 yılında Qing Zhou ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada postnatal testiste 5. günde, germ hücrelerinin mayoz bölünmeye girdikleri süreçte, Stra8 ekspresyonun başladığı gösterilmektedir [33]. Erişkin testiste Stra8 ekspresyonun tip A, tip B spermatogonyumlarda ve preleptoten ve erken leptoten spermatositlerde ekspre olduğu gösterilmektedir [33].

Bizim çalışmamızda, rapamisin uygulanan grupta, premayotik hücre belirteci Stra8 seviyesinin diğer gruplara göre anlamlı şekilde azaldığı gösterilmektedir. Böylece mTOR sinyal yolağının mayoz bölünmeye girişteki etkisinin Stra8 proteini aracılığı ile olabileceği ortaya konmuştur.

2010 yılında yayınlanan bir çalışmada, mTOR ekspresyonunun testis dokusunda hücreler farklılaştıkça farklılaşan hücrelerde progresif olarak azaldığı gösterilmektedir [120]. Spermatogonyumlarda mTOR ekspresyonu yüksek iken farklılaşmadan itibaren mTOR ekspresyonu azalmaktadır. Yine bu çalışmada mTOR sinyalinin alt yolağında bulunan p-S6K ekspresyonunun mayotik profaz 1 aşamasında yüksek iken, mayozdan sonra azaldığı gösterilmektedir [120]. 2012 yılında yayınlanan bir çalışmada rapamisin uygulamasının yaşlanmayı geciktirdiği gösterilmektedir. Rapamisin uygulamasının doz bağımlı olarak karaciğer dejenerasyonunu azalttığı, kardiyak miyositlerde atipik nükleus oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Yüksek doz rapamisin'in endometrial hiperplaziyi engellediği, düşük ve yüksek rapamisin uygulamasının adrenal tümör oluşumunu azalttığı gösterilmektedir. Bu çalışmada ayrıca genç ve yaşlı hayvanlar ile düşük ve yüksek dozda rapamisin uygulanan gruplarda testiküler dejenerasyon değerlendirilmiştir. Erkeklerde testiküler tübüler lezyon oluşumu yaşlanma ile artmaktadır. Bu lezyon dejenere ve nekrotik spermatogenik hücre oluşumu ve çok nükleuslu hücrelerin görülmesi ile karakterizedir. Yaşlanmanın ileri aşamasında testiste birkaç Sertoli hücresi ve spermatogonya kalmaktadır. Bu çalışmada rapamisin uygulanan gruplarda kontrol grubu genç ve yaşlı hayvanlara göre testiküler dejenerasyonun arttığı gösterilmektedir. Dejenerasyon spermatid, spermatosit, farklılaşmış spermatogonya ve primer spermatogonyumların kaybı ile karakterizedir. Daha ileri aşamada tübüllerde bütün evrelerin kaybı, lümende çok çekirdekli hücreler, ölü hücreler ve debris gözlenmektedir. Kontrol grubunda dejenerasyon %13 iken, düşük doz rapamisin grubunda bile % 83 dejenerasyon olduğu gösterilmektedir. Bu çalışmada gösterilen

testiküler dejenerasyonun mekanizması tanımlanmamıştır. Yapmış olduğumuz çalışma literatürde tartışılan bu olası etkinin moleküler mekanizması hakkında aydınlatıcı bilgiler sunmaktadır.

Sonuçlarımız mTOR sinyal yolağının spermatogenezde önemli bir rolü olabileceğini kanıtlar niteliktedir. Bu bağlamda ilk aşamada, 24 saatlik zaman diliminden sonra rapamisin uygulanan hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma ile ilgili faktörlerinin baskılandığı söylenebilmektedir. Bu baskılanma sonucunda germ hücreleri mayoz öncesi aşamada kalıyor olabilir ve böylece ilerleyen günlerde bu durum spermatogenezin duraklaması ile sonuçlanabilir. Bu olasılığın daha uzun sürelerle (Örn:48 saat veya 72 saat) seminifer tübül kültürü yapılarak ya da *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu konuyu irdeleyen çalışmalarımız devam etmektedir.

Riera ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada, FSH'nin PI3K/AKT/mTORC1 yolağı aracılığı ile Sertoli hücrelerinin proliferasyonunu sağladığı gösterilmektedir. Bu çalışmada AMPK gibi farklı sinyallerin de mTOR sinyalini aktive ettiği ve bu aktivasyonun Sertoli hücre proliferasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir [121]. Literatüre yeni giren bu bilgilerden ve bu çalışmaları destekleyici bulgularımızın orijinalliğinden destek alarak konuyu detaylı olarak irdeleyen çalışmalarımız devam etmektedir.

Elde edilen RT-PCR sonuçlarımıza göre; rapamisin uygulanan grupta PCNA ve Stra8 genlerinin mRNA ekspresyonlarının diğer gruplara göre artış gösterdiği gözlenmektedir. Buna karşılık, her iki molekülün protein miktarı rapamisin uygulanan grupta belirgin olarak azalmıştır. Bu nedenle bizim çalışmamızda rapamisinin bu genlerin mRNA'larının translasyonunu baskılıyor olabileceği söylenebilmektedir. Bunun yanı sıra bu çalışma ile ilk kez mTOR sinyal yolağı aktivasyonunun Stra8 geninin mRNA translasyonunu sağlayabileceği gösterilmiştir. S6K mRNA seviyesinin diğer gruplar ile benzer olması, rapamisinin S6K üzerindeki baskılayıcı etkisinin mRNA translasyonu sürecinde değil, protein fosforilasyonu aşamasında olduğunu açıklayabilmektedir. Sinaptonemal kompleks 3 proteini mayoz bölünme aşamasındaki hücrelerde ekspre olmaktadır [61]. Bu molekül, mayoz bölünme aşamasında kromozom sinapsları sırasında gözlemlendiğinden çalışmamızda mayoz bölünme belirteci olarak kullanılmıştır. Kontrol ve deney grupları arasında bu faktör molekülün mRNA ve protein seviyelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Seminifer tübül kültüründe rapamisin uygulaması 24 saat olduğundan, mTOR sinyal yolağı blokajı henüz mayoz bölünmeleri etkileyecek süreci tamamlayamamış olabileceği gibi belki de sadece mayoz bölünmelere başlayan hücreleri doğrudan etkiliyor olabilir. Bu konunun farklı çalışmalar ile desteklenmesi gerekir.

Tüm bu sonuçlar ile rapamisin uygulamasının, dolayısıyla mTOR sinyal yolağı baskılanmasının, erken spermatogenik hücrelerin gelişimi üzerinde olumsuz etkisi olabileceği gösterilmiştir. Klinikte organ nakli hastalarında T hücre aktivasyonunun baskılanması için uzun süreli rapamisin uygulaması, olasılıkla bu olumsuz etkinin uzun süreçlerde gerçekleşmesine ve dolayısıyla bu erkeklerde sperm sayısının azalması yada kaybına neden olmaktadır. Murakami ve arkadaşlarının

yapmış olduğu bir çalışmada, mTOR geni silinmiş hayvanların implantasyondan sonra letal olduğu, bu embriyolarda embriyonik ve ekstraembriyonik dokuların proliferasyonunun normal şekilde gelişmediği gösterilmiştir. Bu çalışmada mTOR ’un kinaz aktivitesi gösteren bölgesinin kondisyonel olarak silinmesi sonucunda embriyonik kök hücrelerin proliferasyonun ve hücre boyutlarının azaldığı gösterilmektedir. Bu alışma ile mTOR sinyal yolağının erken fare embriyolarında ve embriyonik kök hücrelerde büyüme ve proliferasyonda önemli rolü olduğu gösterilmiştir [122]. Literatürdeki bu çalışmalar mTOR sinyalinin kök hücre gelişimi üzerindeki rolünü göstermektedir.

Bizim çalışmamız rapamisin uygulamasının erkek hastaların üreme hücrelerine olumsuz etkisinin moleküler mekanizması hakkında aydınlatıcı, literatüre yeni bir katkı sağlayıcı niteliktedir. Diğer yandan elde ettiğimiz sonuçlar, mTOR sinyal yolağının spermatogonyal kök hücre gelişimi ve farklanmasındaki olası rolünü gösterdiğinden spermatogonyal kök hücreler ve /veya diğer kök hücrelerle ilgili çalışmalara da ışık tutabilecektir.

SONUÇLAR

1. Seminifer tübül kültürü sonunda kontrol, rapamisin ve taşıyıcı grupları arasında hücre canlılığı açısından bir fark olmadığı, kültür koşullarının ve rapamisin uygulamasının hücre kaybına neden olmadığı,
2. Rutin histolojik değerlendirmelere göre; 24 saat kültüre edilen seminifer tübüller ve 0. Saatteki seminifer tübüllere benzer şekilde sağlıklı bir hücresel organizasyon gösterdiği,
3. mTOR sinyal yolağı inhibisyonunun belirteci olan p70S6K proteininin 24 saatlik kültür sonunda rapamisin uygulanan grupta diğer gruplara göre anlamlı şekilde azaldığı,
4. Western blot analizlerinde; proliferen olan hücrelerin belirteci olan PCNA ve premyotik hücre belirteci olan Stra8 ekspresyonlarının rapamisin uygulanan grupta diğer gruplara göre anlamlı şekilde azaldığı, germ hücre belirteci VASA ekspresyonunun ise gruplar arasında benzer olduğu,
5. İmmünohistokimyasal analizlerde; mTOR sinyal yolağı ilişkili proteinlerden mTOR, p-mTOR, TSC2 ve mayoz bölünme belirteci olan sinaptonemal kompleks 3 (sycp3) immünreaktivitesinin gruplar arasında benzer olduğu, 4EBP1 proteininin immünreaktivitesinin ise rapamisin uygulanan grupta anlamlı şekilde azaldığı,
6. RT-PCR analizlerine göre; mTOR, S6K, TSC2, 4EBP1, Stra8, Sycp3 genlerinin mRNA düzeylerinin gruplar arasında benzer olduğu, PCNA ve VASA genlerinin mRNA düzeylerinin ise rapamisin uygulanan grupta diğer gruplara oranla anlamlı şekilde arttığı,
7. TUNEL analizlerine göre; kontrol, rapamisin ve taşıyıcı gruplarında apoptotik hücre sayısının benzer olduğu,
8. Rapamisinin spermatogenez sırasında mitoz bölünme ve mayoz bölünme ile ilişkili proteinleri baskılayarak spermatogenezini bozuyor olabileceği,
9. Erkek hastalarda organ nakli sonrasında immünsüpresif ajan olarak kullanılan rapamisinin, hücre bölünme ve farklılaşmalarına olan bu etkisi ile infertiliteye neden oluyor olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Weiss, L., ed. *Cell and Tissue Biology*. ed. M. Dym. Vol. 96. 1983: Elsevier Biomedical, New York 1717. 6.
2. Guertin, D.A. and D.M. Sabatini, *Defining the role of mTOR in cancer*. Cancer Cell, 2007. **12**(1): p. 9-22.
3. Peterson, T.R., et al., *DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival*. Cell, 2009. **137**(5): p. 873-86.
4. Richter, J.D. and N. Sonenberg, *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*. Nature, 2005. **433**(7025): p. 477-80.
5. Ma, X.M. and J. Blenis, *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): p. 307-18.
6. Crino, P.B., K.L. Nathanson, and E.P. Henske, *The tuberous sclerosis complex*. N Engl J Med, 2006. **355**(13): p. 1345-56.
7. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): p. 3589-94.
8. Skrzypek, J. and W. Krause, *Azoospermia in a renal transplant recipient during sirolimus (rapamycin) treatment*. Andrologia, 2007. **39**(5): p. 198-9.
9. Bererhi, L., et al., *Rapamycin-induced oligospermia*. Transplantation, 2003. **76**(5): p. 885-6.
10. Fritsche, L., et al., *Testosterone concentrations and sirolimus in male renal transplant patients*. Am J Transplant, 2004. **4**(1): p. 130-1.
11. Kaczmarek, I., et al., *Sirolimus impairs gonadal function in heart transplant recipients*. Am J Transplant, 2004. **4**(7): p. 1084-8.
12. Kramer, B.K., et al., *Graft function, cardiovascular risk factors, and sex hormones in renal transplant recipients on an immunosuppressive regimen of everolimus, reduced dose of cyclosporine, and basiliximab*. Transplant Proc, 2005. **37**(3): p. 1601-4.
13. Lee, S., et al., *The effect of sirolimus on sex hormone levels of male renal transplant recipients*. Clin Transplant, 2005. **19**(2): p. 162-7.
14. Tondolo, V., et al., *Gonadal function and immunosuppressive therapy after renal transplantation*. Transplant Proc, 2005. **37**(4): p. 1915-7.

15. Huyghe, E., et al., *Gonadal impact of target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) in male patients: an overview*. Transpl Int, 2007. **20**(4): p. 305-11.
16. Zuber, J., et al., *Sirolimus may reduce fertility in male renal transplant recipients*. Am J Transplant, 2008. **8**(7): p. 1471-9.
17. Feng, L.X., N. Ravindranath, and M. Dym, *Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25572-6.
18. CELIK-OZENCI C., S.P., Gungor E., Sahin Z. , *Hücre büyümesi ve çoğalmasını düzenleyen mTOR sinyal yolağı proteinleri erken spermatogenik hücrelerde eksprese olurlar*. X. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Çeşme/İzmir 2010 **37**
19. De Kretser, D., *Physiology of Reproduction*, 1994, Raven Press Ltd: New York
20. **Russell L, E.R., Sinha Hikim A, Clegg E., *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis***, 1990, Cache River Press.
21. M, S., ed. *Sertoli Cell Biology*. 2005: San Diego: Elsevier Academic Press.
22. www.histol.chuvashia.com.
23. www.urologyhealth.com.
24. <http://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Reproductive.html>.
25. de Rooij, D.G. and L.D. Russell, *All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask*. J Androl, 2000. **21**(6): p. 776-98.
26. Kerr JB, L., K.L., O.Bryan, M.K. and de Kretser, D.M. , *Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms*, 2006, Elsevier Science: USA.
27. Yoshida S, S.M., Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T, and N. Y., *The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage*. Development, 2006. **133**: p. 1495-1505.
28. Yoshinaga, K., et al., *Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function*. Development, 1991. **113**(2): p. 689-99.

29. Hakovirta, H., et al., *Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium*. Endocrinology, 1999. **140**(3): p. 1492-8.
30. Tajima Y, S.K., Morimoto T, Nishimune Y., *Switching of mouse spermatogonial proliferation from the c-kit receptor-independent type to the receptor-dependent type during differentiation*. J Reprod Fertil, 1994. **102**: p. 117-122.
31. Packer AI, B.P., Bachvarova RF., *Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes*. Mol Reprod Dev, 1995. **42**: p. 303-310.
32. van Pelt AM, v.D.-E.F., Gaemers IC, van der Burg MJ, Tanke and d.R.D. HJ, *Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis*. Biol Reprod, 1995. **53**: p. 570-578.
33. Qing Zhou, R.N., Ying Li, Patrick Friel, Debra Mitchell, Rex A. Hess, Christopher Small, and Michael D. Griswold. , *Expression of Stimulated by Retinoic Acid Gene 8 (Stra8) in Spermatogenic Cells Induced by Retinoic Acid: An In Vivo Study in Vitamin A-Sufficient Postnatal Murine Testes I*. Biol Reprod 2008. **79**: p. 35-42.
34. Huang HF, N.E., *Suppression of the intratesticular testosterone is associated with quantitative changes in spermatogonial populations in intact adult rats*. Endocrinology. Endocrinology, 1986. **118**: p. 619-627.
35. Meachem SJ, M.R., Stanton PG, Robertson DM, Wreford NG., *FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats*. J Androl 1999. **20**: p. 756-762.
36. Meistrich, M.L. and M. Kangasniemi, *Hormone treatment after irradiation stimulates recovery of rat spermatogenesis from surviving spermatogonia*. J Androl, 1997. **18**(1): p. 80-7.
37. Meistrich ML, S.G., *Inhibition of spermatogonial differentiation by testosterone*. J Androl 2003. **24**: p. 135-148.
38. Morelli MA, C.P., *Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis*. Reproduction 2005. **130**: p. 761-781.
39. ŞAHİN, Z., Üstünel,İ., Loveland, K., *Desert Hedgehog sinyali yolağının anormal spermatogenez ve testiküler kanser oluşumundaki rolünün araştırılması*. Doktora Tezi, Antalya, 2010.
40. Tarsounas, M. and P.B. Moens, *Checkpoint and DNA-repair proteins are associated with the cores of mammalian meiotic chromosomes*. Curr Top Dev Biol, 2001. **51**: p. 109-34.

41. C., H., *Synaptonemal complexes: structure and function*. Curr Opin Cell Biol 1996. **8**: p. 389-396.
42. de Vries, F.A., et al., *Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation*. Genes Dev, 2005. **19**(11): p. 1376-89.
43. Tassistro, V., et al., *Chronology of meiosis & synaptonemal complex abnormalities in normal & abnormal spermatogenesis*. Indian J Med Res, 2009. **129**(3): p. 268-78.
44. <http://microbiology.ucdavis.edu/hunter/styled/>.
45. Handel, M.A., *The XY body: a specialized meiotic chromatin domain*. Exp Cell Res, 2004. **296**(1): p. 57-63.
46. Celeste A, P.S., Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT,, et al., *Genomic instability in mice lacking histone H2AX*. Science, 2002. **296**: p. 922-927.
47. Ross M, R.L., Kaye G. , *Histology: A text and Atlas*. , 1995., Williams and Wilkins: Baltimore.
48. Ortega, S., et al., *Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice*. Nat Genet, 2003. **35**(1): p. 25-31.
49. Wolgemuth, D.J., E. Laurion, and K.M. Lele, *Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line*. Recent Prog Horm Res, 2002. **57**: p. 75-101.
50. Balhorn C, T.K., Krishnan V, Corzett M, Bench G, Kramer C, Lee, I.A. J, Hud N, Priety M, Meyer-Ilse W, Brown J, Kirz J, ZHANG X,, and M.B. Bradbury E, Breen W., *Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm*. , 1999, Cache River Press: Vienna.
51. Cho, C., et al., *Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 82-6.
52. Wu, J.Y., et al., *Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4*. Nat Genet, 2000. **25**(4): p. 448-52.
53. Kleene, K.C., *Patterns of translational regulation in the mammalian testis*. Mol Reprod Dev, 1996. **43**(2): p. 268-81.
54. Fawcett, D.W., *The mammalian spermatozoon*. Dev Biol, 1975. **44**(2): p. 394-436.

55. Sprando, R.L. and L.D. Russell, *Comparative study of cytoplasmic elimination in spermatids of selected mammalian species*. Am J Anat, 1987. **178**(1): p. 72-80.
56. Russell, L.D. and J.P. Malone, *A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals*. Tissue Cell, 1980. **12**(2): p. 263-85.
57. De Kretser, D.M., *Ultrastructural features of human spermiogenesis*. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1969. **98**(4): p. 477-505.
58. http://medcell.med.yale.edu/systems_cell_biology/male/spermatogenesis.php.
59. Karl, J. and B. Capel, *Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium*. Dev Biol, 1998. **203**(2): p. 323-33.
60. Adams, I.R. and A. McLaren, *Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis*. Development, 2002. **129**(5): p. 1155-64.
61. Bowles, J., et al., *Retinoid signaling determines germ cell fate in mice*. Science, 2006. **312**(5773): p. 596-600.
62. Chemes, H.E., *Infancy is not a quiescent period of testicular development*. Int J Androl, 2001. **24**(1): p. 2-7.
63. Vitale, R., D.W. Fawcett, and M. Dym, *The normal development of the blood-testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment*. Anat Rec, 1973. **176**(3): p. 331-44.
64. Fisher, J.S., et al., *Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate*. Hum Reprod, 2003. **18**(7): p. 1383-94.
65. Hess, R.A., et al., *Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche*. Cell Cycle, 2006. **5**(11): p. 1164-70.
66. Griswold, M.D., *Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis*. Biol Reprod, 1995. **52**(2): p. 211-6.
67. Russell, L.D. and Y. Clermont, *Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats*. Anat Rec, 1977. **187**(3): p. 347-66.
68. Peacock, C.D., et al., *Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4048-53.

69. Li, M.W., et al., *Tumor necrosis factor {alpha} reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes*. J Endocrinol, 2006. **190**(2): p. 313-29.
70. de Kretser, D.M., et al., *Spermatogenesis*. Hum Reprod, 1998. **13 Suppl 1**: p. 1-8.
71. Cooke, P.S., et al., *Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism*. Endocrinology, 1991. **129**(1): p. 244-8.
72. Jutte, N.H., et al., *FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis*. J Reprod Fertil, 1983. **68**(1): p. 219-26.
73. Jutte, N.H., et al., *Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids*. J Reprod Fertil, 1981. **62**(2): p. 399-405.
74. Djakiew, D. and M. Dym, *Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function*. Biol Reprod, 1988. **39**(5): p. 1193-205.
75. Morales, C., S.R. Sylvester, and M.D. Griswold, *Transport of iron and transferrin synthesis by the seminiferous epithelium of the rat in vivo*. Biol Reprod, 1987. **37**(4): p. 995-1005.
76. Holmes, S.D., et al., *Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes*. Endocrinology, 1983. **113**(5): p. 1916-8.
77. Mendis-Handagama, S.M., G.P. Risbridger, and D.M. de Kretser, *Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium*. Int J Androl, 1987. **10**(3): p. 525-34.
78. Martineau, J., et al., *Male-specific cell migration into the developing gonad*. Curr Biol, 1997. **7**(12): p. 958-68.
79. Merchant-Larios, H., N. Moreno-Mendoza, and M. Buehr, *The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis*. Int J Dev Biol, 1993. **37**(3): p. 407-15.
80. Hardy, M.P., et al., *Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat*. J Androl, 1996. **17**(3): p. 231-8.
81. Brennan, J., C. Tilmann, and B. Capel, *Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad*. Genes Dev, 2003. **17**(6): p. 800-10.

82. Yao, H.H., W. Whoriskey, and B. Capel, *Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis*. Genes Dev, 2002. **16**(11): p. 1433-40.
83. Habert, R., H. Lejeune, and J.M. Saez, *Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **179**(1-2): p. 47-74.
84. Vergouwen, R.P., et al., *Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice*. J Reprod Fertil, 1991. **93**(1): p. 233-43.
85. Waterman, M.R. and E.R. Simpson, *Regulation of steroid hydroxylase gene expression is multifactorial in nature*. Recent Prog Horm Res, 1989. **45**: p. 533-63; discussion 563-6.
86. Shan, L.X., et al., *Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization*. Endocrinology, 1995. **136**(9): p. 3856-62.
87. A., M., *Gonad development: assembling the mammalian testis*. Curr Biol, 1998. **8**: p. 175-177.
88. Capel B, A.K., Washburn LL, Eicher EM. , *Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry*. Mech Dev, 1999. **84**: p. 127-131.
89. Clark, A.M., K.K. Garland, and L.D. Russell, *Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules*. Biol Reprod, 2000. **63**(6): p. 1825-38.
90. Maekawa M, K.K., Nagano T. , *Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function*. Arch Histol Cytol, 1996. **59**: p. 1-13.
91. FJ, B.K., ed. *Handbook of Urology, Disturbances in Male Fertility*. Vol. vol. XVI. . 1982, Springer- Verlag: Berlin. 1-131.
92. Bullejos, M. and P. Koopman, *Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges*. Dev Dyn, 2001. **221**(2): p. 201-5.
93. Yoshida, S., M. Sueno, and Y. Nabeshima, *A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1722-6.
94. Rannikki, A.S., F.P. Zhang, and I.T. Huhtaniemi, *Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary*. Mol Cell Endocrinol, 1995. **107**(2): p. 199-208.

95. Heckert, L.L. and M.D. Griswold, *The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis*. Recent Prog Horm Res, 2002. **57**: p. 129-48.
96. Singh, J. and D.J. Handelsman, *Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice*. J Endocrinol, 1996. **151**(1): p. 37-48.
97. Singh, J., C. O'Neill, and D.J. Handelsman, *Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice*. Endocrinology, 1995. **136**(12): p. 5311-21.
98. Singh, J., et al., *Further observations on comparison of immunization coverage by lot quality assurance sampling and 30 cluster sampling*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1996. **27**(2): p. 267-73.
99. Meachem SJ, M.R., de Kretser DM, Robertson DM, Wreford NG., *Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers*. Biol Reprod. 1996. **54**: p. 36-44.
100. Corrigan, A.Z., et al., *Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures*. Endocrinology, 1991. **128**(3): p. 1682-4.
101. Carroll, R.S., et al., *Activin stabilizes follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels*. Endocrinology, 1991. **129**(4): p. 1721-6.
102. Carroll, R.S., et al., *In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin*. Endocrinology, 1991. **129**(6): p. 3299-304.
103. Carroll, R.S., et al., *Inhibin, activin, and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(12): p. 1969-76.
104. Attardi, B. and S.J. Winters, *Decay of follicle-stimulating hormone-beta messenger RNA in the presence of transcriptional inhibitors and/or inhibin, activin, or follistatin*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(5): p. 668-80.
105. Gregory, S.J. and U.B. Kaiser, *Regulation of gonadotropins by inhibin and activin*. Semin Reprod Med, 2004. **22**(3): p. 253-67.
106. Eblen, A., et al., *The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(6): p. 2643-8.
107. Zhang, F.P., et al., *Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice*. Endocrinology, 2004. **145**(3): p. 1453-63.

108. Zhang, F.P., et al., *Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(1): p. 172-83.
109. Mendis-Handagama, S.M., *Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function*. Histol Histopathol, 1997. **12**(3): p. 869-82.
110. Lei, Z.M., et al., *Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy*. Biol Reprod, 2004. **71**(5): p. 1605-13.
111. Kerr, J.B., S. Maddocks, and R.M. Sharpe, *Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis*. Cell Tissue Res, 1992. **268**(1): p. 179-89.
112. Holdcraft, R.W. and R.E. Braun, *Hormonal regulation of spermatogenesis*. Int J Androl, 2004. **27**(6): p. 335-42.
113. Kerr, J.B., et al., *Response of the seminiferous epithelium of the rat testis to withdrawal of androgen: evidence for direct effect upon intercellular spaces associated with Sertoli cell junctional complexes*. Cell Tissue Res, 1993. **274**(1): p. 153-61.
114. O'Donnell, L., et al., *Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium*. Biol Reprod, 1996. **55**(4): p. 895-901.
115. Chiang GG, A.R. and *Targeting the mTOR signaling network in cancer*. Trends Mol Med, 2007. **13**(10): p. 433-42.
116. James J. Gibbons, R.T.A., and Ker Yu, *Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth*. Semin Oncol 2009. **36** (Suppl 3):S3-S17.
117. <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/russell/binding.html>.
118. Corradetti MN, G.K., *Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?* Oncogene., 2006. **16**;25(48) p. 6347-60.
119. Hunter, P.B.-J.G.J.R.H.K.-F.L.S.O.G.T., *Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility* Nature Genetics, 2000. **24**: p. 157-162.
120. Messina, V., et al., *Differential contribution of the MTOR and MNK pathways to the regulation of mRNA translation in meiotic and postmeiotic mouse male germ cells*. Biol Reprod, 2010. **83**(4): p. 607-15.

- 121.** María F. Riera, M.R., María N. Galardo, Eliana H. Pellizzari, Silvina B. Meroni and Selva B. Cigorraga, *Sertoli cell proliferation Signal transduction pathways in FSH regulation of rat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**: p. E914-E923.
- 122.** Mirei Murakami, T.I., Mitsuyo Maeda, Noriko Oshiro, Kenta Hara, and H.K. Frank Edenhofer, Kazuyoshi Yonezawa, and Shinya Yamanaka, *mTOR Is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells*. Molecular and Cellular Biology 2004. **24**, No. 15: p. 6710-6718.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Karabük'te doğdu. 1996 yılında Devrek İstiklal İlkokulu'ndan, 2003 yılında Devrek Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2008 yılında Akdeniz Üniversitesi'nde Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans programına başladı. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Pınar Şahin İngilizce bilmektedir.