

## Rapamisin ve erkek infertilitesi: Literatürdeki yeni bulgulara kısa bir bakış

Arş. Gör. Pınar Şahin, Doç. Dr. Çiler Çelik-Özenci  
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Spermatogenez hücre proliferasyonu ve farklanmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Spermatogonyumlar bölünmeler geçirerek bir taraftan kök hücre havuzunun devamlılığını sağlarken, diğer taraftan farklanırlar. Farklanan spermatogonyumlar bir seri mitoz bölünmenin ardından mayoz bölünmeler geçiren spermatositleri, spermatositler de geçirdikleri mayoz bölünmeler sonucu yuvarlak spermatidleri oluşturmaktadırlar (1). Yuvarlak spermatidlerin spermiyogenez aşamasının ardından olgun sperm hücresi üretilmektedir. Spermatogenez sürecinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

### mTOR (rapamisin memeli hedefi)

mTOR (rapamisin memeli hedefi) evrimsel olarak korunmuş, 289 kDa ağırlığında bir serin treonin kinazdır. mTOR çeşitli proteinlere bağlanarak, mTORC1 (mTOR kompleks 1) ve mTORC2 (mTOR kompleks 2) komplekslerini oluşturmaktadır (2). mTORC1 alt yolağında bulunan ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E)-bağlanma proteini 1 (4E-BP1) ve p70 ribozomal S6 Kinaz 1 (S6K1)'i fosforlayarak protein sentezini aktive etmektedir (2) (Şekil 1).

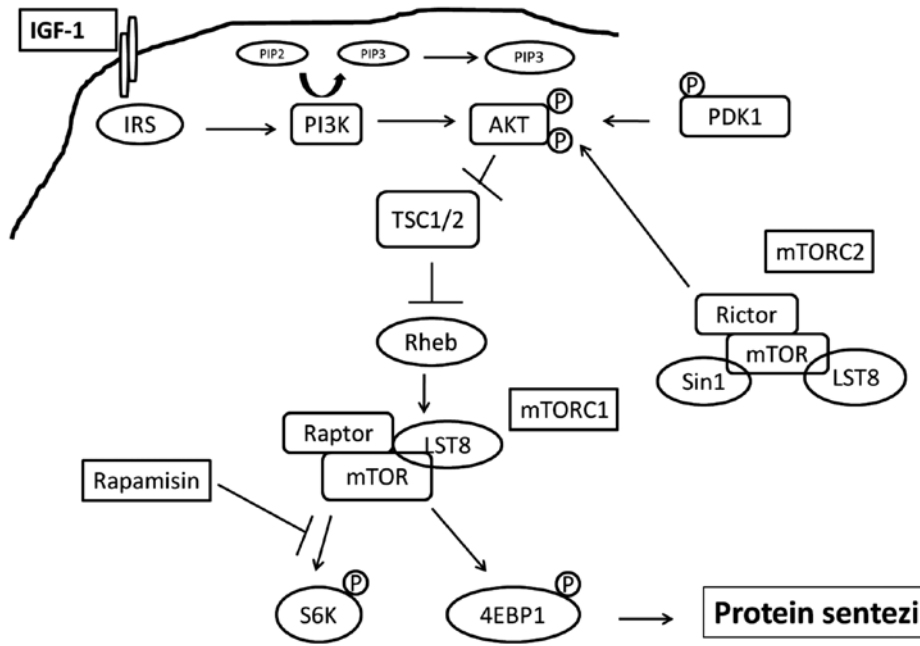
mTORC1 protein sentezini aktive ederek hücre büyümesi, bölünmesi ve metabolizması üzerinde düzenleyici etki yapmaktadır (3). mTORC1 fonksiyonları hakkında elde edilen bilgilerin çoğu, bakteriyel bir makrolit olan rapamisin'in kullanımı ile ortaya çıkmıştır. Rapamisin hücre içine girdikten sonra; FK506-bağlanma proteini 12kDa (FKBP12)'ye bağlanır ve mTOR'un FKBP12-rapamisin bağlama domeni (FRB)'ye bağlanarak aktivitesini inhibe eder (2). mTOR sinyal yolağının; hücre dönüşümünün düzenlenmesi, T hücre aktivasyonu, anjiogenez, adipogenez ve puberteye giriş gibi fizyolojik süreçlerde önemli rolleri olduğu son yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (3). mTORC1 aktivitesi hücreye ulaşan besin miktarı, büyüme faktörleri ve hücrenin enerji seviyesi ile

kontrol edilmektedir, buna karşılık stres ve hipoksi gibi durumlarda düzenlenmesi bozulmaktadır. mTOR sinyal yolağının düzenlenmesinin bozulması ile kanser, diyabet gibi hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. mTORC1 aktivitesinin en önemli düzenleyicilerinden birisi, TSC1 (hamartin) ve TSC2 (tüberin) heterodimerlerinden oluşan Tübero Skleroz Kompleks (TSC)'tir (4).

### Rapamisin ve erkek fertilitesi

Bir mTOR inhibitörü olan rapamisin *Streptomyces hygroscopicus* dan izole edilmiş olan bakteriyel bir makrolittir (5). Rapamisin'in keşfi ile birlikte mTOR sinyal yolağına olan ilgi artmıştır. mTOR inhibitörleri klinikte organ nakli hastalarında immünsüpresif ajan olarak kullanılmaktadır. Rapamisin, İnterlökin 2(IL-2) geninin mRNA translasyonunu baskılayarak IL-2 stabilitesini bozmaktadır ve bu etki ile immün yanıtta rol alan T hücrelerini inaktive etmektedir (6).

Rapamisin hücre içerisine girdiğinde, FK506 bağlanma protein bölümü ile mTOR'a bağlanarak mTOR'u inhibe etmektedir (Şekil 1). 2004 yılında Frietsche ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, rapamisin uygulanan böbrek transplantasyon hastalarında testosteron seviyesinin rapamisin uygulanmayanlara göre düşük olduğu belirtilmiştir (7). 2004 yılında Kaczmarek ve arkadaşlarının rapamisin uygulanan kalp transplantasyon hastalarında yaptıkları diğer bir çalışmada; erkek hastaların testosteron seviyelerinde düşüş ve gonadotropin seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir (8). 2007 yılında yayınlanan bir raporda; böbrek transplantasyon hastalarında rapamisin (sirolimus) uygulaması sonucu gelişen hipergonadotropik hipogonadizm etkisinin, hastalara uygulanan immünsüpresif ajan değiştirildiğinde geri döndüğü gösterilmiştir (9). 2003-2008 yılları arasında yayınlanan bu hasta raporlarında rapamisin uygulanan erkek hastaların testosteron



**Şekil 1:** mTOR sinyal ağı ve rapamisinin etkisi

IGF-1: İnsülin growth factor, IRS: İnsülin receptor, PI3K: Phospho inositol 3 kinase, AKT: Protein kinase B, PDK: Phospho inositol dependent kinase, TSC 1/2: Tuberous sclerosis kompleks 1/2, RHEB: Ras homolog enriched brain, mTOR: mammalian target of rapamycin, Raptor: regulatory-associated protein of mTOR, mLST8: mammalian lethal with Sec13 protein 8, S6K: S6 kinaz, 4EBP1: 4E bağlanma proteini 1

düzeylerinde ve sperm sayılarında düşüş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu hastalarda FSH ve LH seviyelerinde artış olduğu gösterilmektedir (7-14). Rapor edilen bu çalışmaların sonuçları; sirolimusun “hipergonadotropik hipogonadizm” şeklinde bir etki oluşturarak gonad fonksiyonunu doğrudan etkilediği fikrini desteklemektedir. Literatürde rapamisin’in erkek gonad fonksiyonuna olumsuz etkisinin değerlendirildiği çok az çalışma mevcuttur. Rapamisin’in testis üzerindeki olumsuz etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada rapamisin’in spermatogonyal kök hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (15). Feng ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, rapamisin’in spermatogonyal proliferasyonu PI3K/AKT/mTOR/P70S6K sinyalini baskılayarak bloke ettiği gösterilmiştir (15). Ancak bu çalışma, rapamisin’in spermatogonyal kök hücre kültürüne uygulandığı bir çalışmadır.

2010 yılında, grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, mTOR sinyal yolağı proteinlerinin (mTOR, p-mTOR, p-S6K, 4EBP1 ve TSC1) erişkin fare testisinde spermatogonyal kök hücrelerde ve preleptoten spermatozitlerde ekspre olduğu gösterilmiştir (16). Bu çalışmamız, mTOR sinyal yolağı proteinlerinin testisteki ekspresyonlarını değerlendiren literatürdeki ilk kapsamlı çalışmadır. Bunun ardından, 2011 yılında gerçekleştirdiğimiz ex vivo bir

çalışmada, seminifer tübül kültürüne rapamisin uygulayarak mTOR sinyal yolağı inhibe edilmiştir (17). Bu çalışmamızda, mTOR inhibisyonunun spermatogenez sürecindeki mitoz ve mayoz bölünmeleri olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Rapamisin uygulamasının hücre proliferasyon belirteci olan PCNA proliferen olan hücre nükleer antijeni), pre-mayotik hücre belirteci olan Stra8 (Retinoik asit tarafından aktive edilen gen 8) ve mayotik hücre belirteci olan Sycp3 (Sinaptonemal kompleks 3) proteinlerinin ekspresyonunu düşürdüğü gösterilmiştir (17). Bulgularımız; mTOR sinyal yolağının spermatogonyal kök hücrelerin proliferasyonu ve mayoz bölünmelerin başlaması için gerekli olabileceğini ortaya koyan literatürdeki ilk sonuçlardır (yayın aşamasında).

Messina ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, mTOR ekspresyonunun testis dokusunda hücreler farklılaştıkça farklı hücrelerde progresif olarak azaldığı gösterilmektedir (18). Bu çalışmaya göre; 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 (18).

2012 yılında yayınlanan bir çalışmada ise rapamisin uygulamasının yaşlanmayı geciktirdiği gösterilmektedir

(19). Bu çalışmada genç ve yaşlı hayvanlar ile düşük ve yüksek dozda rapamisin uygulanan gruplarda ayrıca testiküler dejenerasyon değerlendirilmiştir. Bu çalışmada rapamisin uygulanan gruplarda kontrol grubu genç ve yaşlı hayvanlara göre testiküler dejenerasyonun arttığı gösterilmektedir. Dejenerasyon spermatid, spermatosit, farklılaşmış spermatogonya ve primer spermatogonyuların kaybı ile karakterizedir. Daha ileri aşamada, tübüllerde bütün evrelerin kaybı, lümeninde çok çekirdekli hücreler, ölü hücreler ve debris gözlenmektedir. Kontrol grubunda dejenerasyon %13 iken, düşük doz rapamisin uygulanan grupta bile %83 düzeyinde dejenerasyonun olduğu gösterilmektedir (19). Bu çalışmada ortaya çıkan testiküler dejenerasyonun mekanizması tanımlanmamıştır. Riera ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada, FSH'nin PI3K/AKT/mTORC1 yolağı aracılığı ile Sertoli hücrelerinin proliferasyonunu sağladığı gösterilmektedir (20). Bu

çalışmada AMPK gibi farklı sinyallerin de mTOR sinyalini aktive ettiği ve bu aktivasyonun Sertoli hücre proliferasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir (20).

Tüm bu sonuçlar, rapamisin uygulamasının, dolayısıyla mTOR sinyal yolağı baskılanmasının, spermatogenik hücrelerin gelişimi üzerindeki olumsuz etkileri hakkında aydınlatıcı bilgiler sunmaktadır. 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 ya da kaybına neden olmaktadır. Rapamisin ve mTOR sinyal yolağının spermatogenez ve fertilité üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için daha detaylı ve in vivo çalışmalara gereksinim vardır. Fare testis gelişimi sürecinde ve erişkin fare testisinde rapamisin uygulamasının in vivo etkisinin değerlendirildiği çalışmalar laboratuvarlarımızda devam etmektedir.

#### Kaynaklar:

1. Dym M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11287-11289.
2. Guertin, DA and Sabatini, DM. (2007). Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* 12, 9-22.
3. Laplante M and Sabatini DM. (2009) mTOR signaling at a glance. *J Cell Science*, 122, 3589-3594.
4. Crino PB, Nathanson KL and Henske EP. (2006). The tuberous sclerosis complex. *N. Engl. J. Med.* 355, 1345-1356.
5. Skrzypek J. And Krause W. (2007) Azoospermia in a renal transplant recipient during sirolimus (rapamycin) treatment (Marburg, Germany) (Case report).
6. James J, Gibbons RTA, 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.
7. Fritsche L, et al., Testosterone concentrations and sirolimus in male renal transplant patients. *Am J Transplant*, 2004. 4(1): p. 130-1.
8. Kaczmarek I, et al., Sirolimus impairs gonadal function in heart transplant recipients. *Am J Transplant*, 2004. 4(7): p. 1084-8.
9. Skrzypek J and W. Krause, Azoospermia in a renal transplant recipient during sirolimus (rapamycin) treatment. *Andrologia*, 2007. 39(5): p. 198-9.
10. Bererhi L, et al., Rapamycin-induced oligospermia. *Transplantation*, 2003. 76(5): p. 885-6.
11. Kramer BK, 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.
12. 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.
13. Tondolo V, et al., Gonadal function and immunosuppressive therapy after renal transplantation. *Transplant Proc*, 2005. 37(4): p. 1915-7.
14. 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.
15. Feng LX, Ravindranath N, and Dym M. 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.
16. Celik-Özenci CSP, 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.
17. Rapamisin uygulamasının fare spermatogenik hücrelere etkisi. Pınar Şahin Yüksek Lisans Tezi. Temmuz, 2012, Antalya.
18. 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.
19. Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, Chan CC, Friedline S, Harrison DE, Hejtmancik JF, Nadon N, Strong R, Wood LK, Woodward MA, Miller RA, Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell*, 2012. 11(4):675-82.
20. María F Riera MR, 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.