

Azoospermi etyolojisinde sertoli hücresi enerji metabolizması bozuklukları

Energy metabolism disorders of sertoli cells in azoospermia etiology

Sena E. Aydos¹, Yunus Yükselten¹, Merve Gulsen Bal¹, Isıl Yükselen², Kaan Aydos³, Asuman Sunguroglu¹

¹ Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

² Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hematoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

³ Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Özet

Amaç: Nonobstrüktif (NOA) ve obstrüktif (OA) azoospermili bireylerin Sertoli hücrelerinde spermatozoanın başlıca kullandığı enerji kaynağı olan laktatın sentezlenmesinde farklılık olabileceği hipotezinden yola çıkarak, PKM1, PKM2 ve LDHB enzimlerinin ifadelerinin, mitokondri sayısının hasta ve kontrol grubunun Sertoli hücrelerinde karşılaştırmalı olarak belirlenmesi ve metabolizmanın fertilité üzerine olası etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada NOA ve OA'lı bireylerin testis dokularından Sertoli hücreleri izole edildi. Sertoli hücrelerinde enerji metabolizmasında görevli PKM1,PKM2 ve LDHB genlerinin ifadesi RT-PCR analizi ile ölçüldü. OA ve NOA'lı Sertoli hücrelerinde mitokondri boyaması Mitotraker Red ile gerçekleştirildi. Boyanan Mitokondri yüzdeleri flow sitometri analizi ile tespit edildi.

Bulgular: Real Time PCR analiz sonuçlarına göre PKM1, PKM2, LDHB gen ifadeleri OA'lı gruba göre sırasıyla 198,01-, 162,01-, 50.79- kat düşük olduğu hesaplandı. Mitotraker boyama sonuçlarına göre OA'lı bireylerin Sertoli hücreleri NOA'lı bireylerin Sertoli hücreleri ile karşılaştırıldığında, NOA'lı grupta %34,6 boyanma mevcutken OA'lı grupta %52,4 boyanma tespit edildi.

Sonuç: Hastalarımızın mitokondri sayısında azalma olmasına rağmen glikolitik yolak enzimlerinde de kontrole göre önemli bir azalma saptanması, Sertoli hücrelerindeki metabolik disfonksiyonun sperm hücre gelişiminde, dolayısıyla infertilitede önemli rolü olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Sertoli hücresi, enerji metabolizması, erkek infertilitesi, azoospermi

Abstract

Objective: Based on the hypothesis, there may be difference in synthesis of lactose which is the main energy source used by spermatozoa in Sertoli cells between nonobstructive azoospermia (NOA) and obstructive azoospermia (OA) males, we aimed to analyze PKM1, PKM2 and LDHB gene expression levels and mitochondria numbers in the patient and control groups' Sertoli cells comparatively.

Material and Methods: In this study, Sertoli cells were isolated from NOA and OA patients' testis tissues. PKM1, PKM2 and LDHB genes expression levels were measured by RT-PCR. Mitochondria were stained by Mitotracker red. Stained mitochondria percentage were determined by flow cytometry analysis.

Results: PKM1, PKM2, LDHB genes expression levels were observed 198,01-, 162,01-, 50.79- fold lower in NOA group than OA group, respectively. According to the results of mitotracker stained test, 34,6% mitochondria were stained in NOA group, 52,4% mitochondria were stained in OA group.

Conclusion: Despite the reduction in the mitochondria numbers of our patients, significant decrease in gene expression levels of the enzyme in the glycolytic pathway compared to the control was observed. This result showed that there was metabolic dysfunction in the development of sperm cells, thus playing an important role in infertility.

Keywords: Sertoli cells, energy metabolism, male infertility, azoospermia

Geliş tarihi (Submitted): 26.03.2016
Kabul tarihi (Accepted): 27.04.2016

Yazışma / Correspondence

Arş. Gör. Yunus Yükselten
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD
Tel: 0312- 595 8052
E-mail: yukselten@gmail.com

Giriş

Seminifer epitelin bazal membranından lümenine doğru uzayan somatik bileşenler olarak tanımlanan Sertoli hücreleri, spermatogenez sürecinde önemli rol oynayan hücrelerdendir. Bu hücreler FSH ve testosteron gibi hormonal faktörler tarafından gelen endokrin ve parakrin sinyallere yanıt olarak, germ hücrelerin diferansiyasyonu için yapısal destek sağlarlar (1).

Germ hücreleri ve Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantılar mevcuttur. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar germ hücre diferansiyasyonu sırasında germ hücrelerinin lokalizasyonunu ve lümenine doğru hareketlerini kontrol ederler. Sertoli hücreleri salgı hücreleri olarak bilinmektedir. Büyüme faktörleri, anti-apoptotik faktörler, Androjen bağlayıcı protein, transferrin, plazminojen aktivatörü, glikoproteinler, sülfoproteinler, proteazlar, proteaz inhibitörleri, hormonlar, enerji substratları ve ekstrasellüler matriks komponentleri Sertoli hücreleri tarafından salgılanmaktadır (2-5). Sertoli hücreleri, erkek germ hücrelerinin olgunlaştığı bazal membranda, çeşitli çevresel nişleri kontrol etmek için gereklidir (6). Sertoli hücreleri germ hücrelerine yapısal destek sağlamalarının yanında, germ hücrelerinin gelişiminde enerji metabolizmalarının düzenlenmesinde çok önemli rolleri vardır.

Glukoz hücreye alındığında değişik enzimler aracılığıyla çok adımlı metabolik olaylar gerçekleşir. Glukoz metabolizmasında ilk ve önemli bir adım olan basamak fosfofruktokinaz enzimi aracılığıyla fruktoz-6-fosfat, fruktoz-1,6-bisfosfata kataliz edilir. Bu enzimin fonksiyonu hücrede enerjinin açığa çıkmasında ve özellikle Sertoli hücre metabolizmasında enerji metabolizmasının düzenlenmesinde çok önemli role sahiptir.

Glikolizin son basamağında fosfoenol pirüvattaki fosfat grubu ADP'ye transfer edilir; ATP ile pirüvat oluşur; reaksiyonu pirüvat kinaz katalizlemektedir. Bu reaksiyon da substrat basamağında bir fosforilasyon reaksiyonudur. Fosfoenolpirüvattan oluşan pirüvat, önce enol formunda ortaya çıkar. Sonra hızlı ve nonenzimatik olarak keto forma dönüşür (7,8).

Fruktoz-1,6-bisfosfat ise pirüvat kinazı aktive eder. Pirüvat kinaz (PK), immünolojik ve yerleşik olduğu gene göre iki temel gruba ayrılabilir. M tipi M1 ve M2 izoenzimleri, L tipi ise L ve R izoenzimleri şeklindedir (9). PKM1 ve PKM2 fetus ve tümör dokularının majör izoen-

zimi olup en fazla erişkin dokularda bulunmaktadır (10).

Glikolitik yolun son enzimi olan laktat dehidrogenaz (LDH), sitozolik bir enzimdir. LDH, memelilerde iki farklı alt birimin birleşiminden oluşan beş tetramerik yapıda bulunur. LDH enziminin bu formları katalitik, fiziksel ve immünolojik özellikleri yönünden farklılık gösterebilmektedir. Yapılan çalışmalarda LDH enziminin testisin gelişimiyle paralel olarak testiste ifadesinin arttığı bildirilmiştir (11). Bu da LDH'nin erkek infertilitesindeki önemini göstermektedir.

Spermatozoada LDH, testiküler germ hücrelerinde bulunur ve germ hücreleri laktatı ana enerji kaynağı olarak kullanır. LDH oviduktal sıvıda ve seminal plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Sertoli hücreleri spermatide laktat sağlayan önemli bir hücredir (12). Spermatozoa enerjisini glukoz, fruktoz, laktattan sağlamasına karşın ana enerji kaynağı olarak Sertoli hücrelerinin kendisine sağladığı laktatı kullanır (13,14). Monokarboksilat taşıyıcıları (MCT) memelilerde aminoasit içeriğine göre belirlenmiş 14 üyeden oluşan büyük bir taşıyıcı protein ailesidir. Laktat ve diğer monokarboksilatların plazma membranından taşınmalarını gerçekleştirir (15). Laktat yapısal olarak monokarboksilik asit yapısında olup, metabolizmasında gerçekleşen bozukluklar, spermatogenezde bozulmaya neden olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, seminal plazma ve testiküler biyopsilerde LDH enziminin ifadesinin çok düşük olması veya yokluğu azoospermi veya aspermi ile birliktelik göstermiştir (16).

LDH, memelilerde iki farklı altbirimin birleşiminden oluşan beş tetramerik izozim olarak bulunur. Cahn ve ark. (1962) polipeptit altbirimlerini "H" ve "M" olarak göstermişlerdir. Bu alt birimler birçok kaynaktan A ve B olarak tanımlanmıştır (17). LDH klinik olarak önemlidir. İnsanda, olgun testis ve spermde altıncı izozimin gösterilmesinden sonra pek çok canlıda A ve B'den başka LDH kodlayan gen bulunduğu bildirilmiştir (18).

Spermatositler, yuvarlak spermatidler ve olgunlaşmış spermatidler LDH-C izozimi içermektedir. Somatik hücrelerdeki LDH'lar B altbirim içermekte olup bu altbirim germ hücrelerinde spermatogenez boyunca bulunmaz. Özellikle Sertoli hücreleri, A ve B altbirimlerinin birleşimi sonucu oluşan bütün izozimler için pozitif durumdadır (19).

Spermatogenezde bir diğer önemli enzim grubu piru-

vatın oluşumunda görevli PK'lardır. Mitokondri, hücrel devamlılık ve üremede enerji üretimini koordine eden sistem içerisinde yer alır. Bazı vital hücrel parametreler mitokondri tarafından kontrol edilir. ROS üretimi mitofajiyi tetikler. Mitokondriyal fonksiyonun azalması laktat üretimini artırır. Sertoli hücrelerinden yüksek miktarda laktat salgılanması ile sperm hücrelerinin bunu yakıt olarak kullanması büyüme ve gelişmelerine katkıda bulunması söz konusudur.

Mitokondriler enerji metabolizması ile ilgili hücre içi molekülleridir. Esas fonksiyonu elektron transport zinciri ile iç ve dış membran arasında proton gradienti oluşturarak ATP üretimini sağlamaktır. Mitokondriyal aktivite ile sperm motilitesi ve sperm hücrelerinin fertilizasyon potansiyelinin birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (20). Mitokondriyal aktivasyonlar çeşitli floresan boyalar ile örneğin mitotraker ailesine ait problemler ile görüntülenebilmektedir. Bir diğer taraftan mitokondriyal fonksiyonlar mitokondri membranında bulunan bazı enzimlerin ifadelerinin protein düzeyindeki ifadeleri ile İmmünohistokimyasal olarak belirlenebilmektedir (21). Biz de çalışmamızda Sertoli hücrelerindeki mitokondri volümlerini Mitotraker Red ile boyayarak flow sitometrik olarak araştırdık.

Bu çalışmanın amacı, NOA ve OA'lı bireylerin Sertoli hücrelerinde spermatozoonların başlıca kullandığı enerji kaynağı olan laktatın sentezlenmesinde farklılık olabileceği hipotezinden yola çıkarak, PKM1, PKM2 ve LDHB enzimlerinin ifadelerinin, mitokondri sayısının hasta ve kontrol grubunun Sertoli hücrelerinde karşılaştırmalı olarak belirlenmesi ve metabolizmanın fertilitate üzerine olası etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntemler

Bu çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı polikliniğine başvuran toplam 7 azoospermik olgu (NOA n=5, OA n=2) dahil edildi. Hastalar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kuruldan alınan 06-264-14 nolu etik onayı ile onam formları doldurularak çalışmaya dahil edildi. Her hastanın FSH, LH ve testostereon hormon düzeyleri klinik olarak değerlendirildi. Tüm NOA hastalarına genetik tarama olarak Y- mikrodelsiyon ve karyotip analizi yapıldı ve sonuçları normal olanlar çalışmaya dahil edildi. Ultrason ile hastaların testiküler volümleri ölçüldü. Transrektal ultrasonografik incelemede

distal ejakülatör kanal patolojileri olanlar çalışmadan hariç tutuldu. Semen örnekleri Dünya Sağlık Örgütü 2010 yılı rehberi esas alınarak değerlendirildi (22). 3 gün cinsel perhizi takiben yapılan semen analizinde, santrifüj sonrasında azoospermi saptanan hastalarda, işlem en az iki hafta sonra tekrarlanarak azoospermi olduğu konfirme edildi. NOA tanısı bilateral vas deferens, yassı epididim, düşük testiküler hacim, ejakülatör kanal patolojisi olmayan, yüksek FSH serum düzeyleri ve cerrahi skrotal inceleme sonucunda elde edilen bulgularla beraber değerlendirildi. Çalışmaya hipogonadotropik hipogonadizm, kriptorşidizm, klinik varikosel, genital enfeksiyonu olan hastalar dahil edilmedi. Klinik muayene ve skrotal eksplorasyon sonrası elde edilen bulgular değerlendirilerek, hastalar temel olarak 2 gruba ayrıldı:: OA (n=2) and NOA (n=5).

Primer Sertoli Hücre Kültürü

NOA ve OA hastalarından TESE yöntemiyle alınan doku örneklerinden primer Sertoli hücre kültürü daha önce tanımlanan protokole göre yapıldı (23). Alınan doku örneği %1'lik Penisilin/Streptomisin içeren PBS ile yıkandı. Sonrasında hazırlanan enzim karışımı (5 ml Tripsin/EDTA, 50 µl kollajenaz-4 ve 5 µl hiyaluronidaz) doku örneğinin üzerine eklendi ve 37 °C'de 45 dakika boyunca inkübe edildi. 800 G'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM/F12 besiyeri ile yeniden süspansiyon edildi. Süspansiyon halindeki hücreler flakslara aktarıldı. 48 saat boyunca 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübasiyona bırakıldı. Sonrasında hücrelerin pasajı takip edildi.

RNA izolasyonu, Komplementer DNA (cDNA) sentezi , Real Time PCR analizi

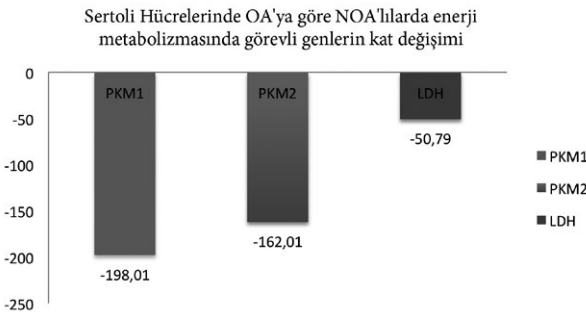
Sertoli hücrelerinden Trizol ile RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların miktar tayini yapıldı. RNA elde edilen hücrelerden Real Time PCR'da (RT-PCR) ekspresyon analizi için kullanılmak amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi için Bio-Rad cDNA sentez kiti kullanıldı(Iscript cDNA sentez kiti, Bio-Rad,CA). Ticari olarak satın alınan master mix (Syber Green Master mix, Bio-Rad,CA) ve cDNA örneği ile bir karışım hazırlandıktan sonra karışımdan her kuyucuğa eşit miktarda dağıtıldı ve gerçek zamanlı PCR programında okutuldu. Alınan CP değerlerinden kat artışları şeklinde hesaplandı ve sonuçlar analiz edildi. Çalışmada PKM1,PKM2,LDH gen ifadelerine bakıldı.

Mitotraker Red Boyama

Sertoli hücreleri tripsinize edildi. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra boya kullanılmayan hücre grubu ve boya kullanılan hücre grubu olacak şekilde ikiye ayrıldı. Her tüpte 300 bin/ml olacak şekilde hesaplandı. Hücreler besiyeri ortamında %2.5 Mito Tracker Red 580 (Molecular Probes, Thermo Science, OR) kiti ile boyandı. 30dk inkubasyon sonrasında yine 3 kez PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Sertoli hücre mitokondrilerinin sayılarındaki değişim flow sitometrik analiz ile hesaplandı.

Sonuçlar

Çalışmada, kontrol olarak değerlendirdiğimiz OA bireylerin Sertoli hücreleri ile NOA bireylerin Sertoli hücreleri kültüre edilip, Sertoli hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, RT-PCR analiz sonuçlarına göre PKM1, PKM2, LDHB gen ifadelerinin OA'lı gruba göre sırasıyla 198,01-, 162,01-, 50,79- kat düşük olduğu hesaplandı (Şekil 1).

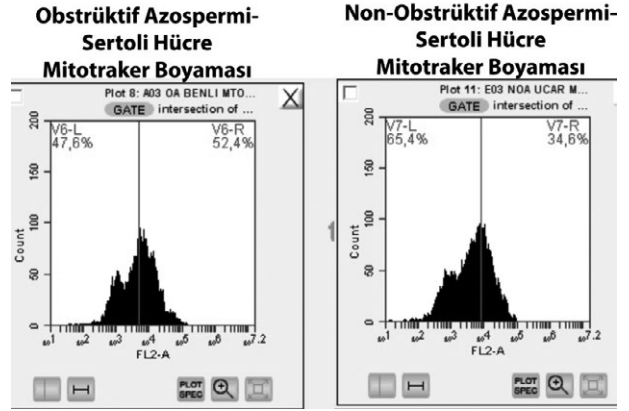


Şekil 1: NOA'lı bireylerin Sertoli hücrelerinde enerji metabolizmasında görevli genlerin OA'lı bireylere göre kıyaslanması. **PKM1:** Piruvat Kinaz İzoenzim 1 **PKM2:** Piruvat Kinaz İzoenzim 1 **LDHB:** Laktat Dehidrogenaz B

Mitotraker boyama sonuçlarına göre OA'lı bireylerin Sertoli hücreleri NOA'lı bireylerin Sertoli hücreleri ile karşılaştırıldığında, NOA'lı grupta %34,6 boyanma mevcutken OA'lı grupta %52,4 boyanma tespit edildi (Şekil 2).

Tartışma

Testiste sperm hücreleri hareketsiz formda olup, epididimal maturasyondan sonra hareket kabiliyetini elde etmek ve korumak için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Spermatozoa ileri differansiyasyon sırasında spermiyogenez sürecinde sitoplazmasının büyük kısmını kaybeder ve spesifik bölgelerinin eksikliği nedeni ile enerji ihtiyacını Sertoli hücre kaynaklı laktattan karşılar. Bundan yola çıkarak



Şekil 2: Mitotraker Red Boyama ile OA ve NOA Sertoli hücreleri arasında mitokondri boyanma yüzdeleri.

biz de NOA'lı bireylerin Sertoli hücreleri ile spermatogenezin normal olarak kabul edildiği OA'lı bireylerin Sertoli hücreleri arasındaki enerji metabolizmasındaki değişim karşılaştırılarak, enerji metabolizma farklılıklarının sperm hücresi oluşumu üzerine etkilerini inceledik.

Enerji metabolizmasındaki önemli rolü olan PKM1, PKM2 ve LDHB genlerinin, mRNA seviyesinde NOA'lı hastaların Sertoli hücrelerinde, kontrol olarak kabul ettiğimiz OA'lı gruptan elde edilen Sertoli hücrelerine göre çok düşük ifade edildiği gözlemlendi. Oysa Sertoli hücreleri germ hücrelerin gelişiminde kritik role sahip olup, enerji ihtiyaçları için de önemli bir laktat kaynağıdır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, infertil olgularda Sertoli hücrelerinin yetersiz enerji desteği, sperm üretimini bozarak NOA'nın bir nedeni olabilir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, olgunlaşmış fare testisinde yaşa göre LDH enziminin tüm subünitlerinin ifadesinin birlikte arttığı, testisin gelişimi ve spermatogenezin devamlılığı açısından önemli olduğu gösterilmiştir (24-26). Sertoli hücreleri değişik substratları metabolize edebilmektedir. Krebs döngüsüne girmeden glukozu laktata dönüştürmeyi tercih etmektedir. Bunu neden tercih ettiği çok açık olarak anlaşılammıştır. Ancak, laktat germ hücrelerinin gelişiminde ana enerji kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Laktatın varlığının bu hücreler üzerinde anti-apoptotik bir etki oluşturduğu bildirilmiştir (27). Sertoli hücreleri tarafından laktat salınımı bir takım biyokimyasal mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalardan en önemlisi glukoz taşıyıcı sistemler (GLUT) dir. Bunlar plasma membranından glukozun

içeri alınmasını sağlamaktadır. Sonrasında glukozun piruvata dönüşmesiyle LDH enzimleri aracılığıyla laktata dönüşmektedir. Laktatın germ hücrelerine taşınmasında monokarboksilat taşıyıcıları görev alır.

Piruvattan laktat üretimi Sertoli hücrelerinde temel olarak FSH, insulin, insulin benzeri büyüme faktörü gibi endokrin sistemler tarafından kontrol edilmektedir. Yapılan birkaç çalışmada testiste hücre-hücre iletişimde parakrin ve otokrin faktörlerin etkisiyle laktat metabolizmasını düzenlediği bildirilmiş olup, bu faktörlerin transforme edici büyüme faktörü (TGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), tümör nekrozis faktör (TNF) ve interlökin 1 α (IL1 α) gibi faktörler olduğu gösterilmiştir (28-33) Otosevic ve arkadaşları sperm kalitesi ve sperm mitokondri sayısını incelediklerinde sperm kalitesinin mitokondrileri mitotraker ile boyanan grupta daha yüksek bulmuşlardır (34). Veitinger ve arkadaşları ise memeli testisinde Sertoli hücrelerinin germ hücrelerinin gelişiminde fizyolojik olarak önemli rol oynadığını göstererek, Sertoli hücre stimülasyonunun potansiyel mekanizmasının lokal ATP salınımıyla ilgisini kanıtlamışlardır. Neticede de, kalsiyum salınımına bağlı olarak enerji metabolizmasındaki değişiklikler incelendiğinde testiste kalsiyum regülasyonunun esas elementinin mitokondri olduğunu ortaya koymuşlardır (35).

OA ve NOA'lı bireylerin Sertoli hücrelerinde mitotraker ile yapılan boyamada, NOA'lı bireylerin Sertoli hücreleri OA'lılara göre daha az olduğu saptandı. Çeşitli hücre grubu ve dokulardaki mitokondrial disfonksiyonlar birtakım hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Literatürü taradığımızda Sertoli hücrelerinde mitokondri sayısını araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Bizim çalışmamızda NOA'lı hastalarımızın Sertoli hücrelerinde mitokondri sayısının az olduğunun tespit edilmesi önemli bir bulgudur. Mitokondri sayısı azalan tümör hücrelerinde glikolitik yolağın aktive olması Warburg etkisi olarak bilinmektedir (35). Hastalarımızın mitokondri sayısında azalma olmasının yanı sıra, glikolitik yolak enzimlerinde de kontrole göre önemli bir azalma saptanması, Sertoli hücrelerindeki metabolik disfonksiyonun sperm hücre gelişiminde, dolayısıyla infertilitede önemli rolü olduğunu desteklemektedir. Bu konuda yapılacak daha fazla sayıda ve protein düzeyinde çalışmalar ile desteklenerek Sertoli hücresinde glikolitik yolak, mitokondri sayı ve fonksiyonlarının de-

taylı şekilde çalışılması, idiyopatik infertilite, azospermi etyolojisinin aydınlatılması ve tedavisinde yeni ufuklar açabilecek olması bakımından önemlidir.

Kaynaklar

1. Grisworld MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9:411-416.
2. Alves MG, Rato L, Carvalho RA et al. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:777-793.
3. Benahmed M. Growth factors and cytokines in the testis. In:Comhaire FH, ed. *Male Infertility*. Chapman and Hall Medical 1996 ; 324-336.
4. Dorrington JH, Kahn SA. Steroid production, metabolism, and release by Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD, eds. *The Sertoli Cell*. Clearwater, FL: Cache River Press 1993; 537-549.
5. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 2004; 25:747-806.
6. Hunter D, Anand-Ivell A, Danner S, Ivell R. Models of in vitro spermatogenesis. *Landes Bioscience* 2012; 2: 1 - 12.
7. Chehtane M, Khaled AR. Interleukin-7 mediates glucose utilization in lymphocytes through transcriptional regulation of the hexokinase II gene. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2010; 298:1560-1571.
8. Martins AD, Alves MG, Simoes VL et al. Control of Sertoli cell metabolism by sex steroid hormones is mediated through modulation in glycolysis-related transporters and enzymes. *Cell Tissue Res* 2013;354:861-868.
9. Heinrichs M, Jacobasch G, Scheiner-Bobis K et al. Human erythrocyte pyruvate kinase (L/R-piruvat kinaz): production and characterization of a monoclonal antibody. *Bio-med. Biochim Acta* 1987; 46: 223-228.
10. Mazurek S, Grimm H, Oehmke M et al. Tumor M2-Piruvat Kinaz and glutaminolytic enzymes in the metabolic shift of tumor cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 5151- 5154.
11. Hawtrey C, Goldberg E. Differential Synthesis of LDH In Mouse Testes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1968; 151: 611-615.
12. Mita M, Hall PF. Metabolism of round spermatid from rats: Lactate as the preferred substrate. *Biol. Reprod* 1982; 26:445-455.
13. Bajpai M, Gupta G, Setty BS. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *Eur J Endocrinol* 1998; 138:322-7.
14. Grootegeod JA , Den Boer PJ. Energy metabolism in spermatids: a review. In *Cellular and Molecular Events in Spermiogenesis*. Cambridge University Press 1989;193-215.
15. Urner F, Sakkas D. A possible role for the pentose phosphat-

- te pathway of spermatozoa in gamete fusion in the mouse. *Biol Reprod* 1999; 60:733-9.
16. Gupta GS. LDH-C4: A Unique Target of Mammalia Spermatozoa. *Clin Rev Biochem Molec Biol* 1999; 34:361-385.
 17. Cahn RD, Zwilling E, Kaplan NO, Levine L. Nature and Development of Lactic Dehydrogenases. *Science* 1962;136:962-969.
 18. Markert CL, Holmes RS. Lactate dehydrogenase isozymes of the flatfish, Pleuronectiformes: kinetic, molecular and immunochemical analysis. *J. exp. Zool* 1969; 171: 85-104.
 19. Burgos C, Maldonado C, Gerez de Burgos NM, Aoki A, Blanco A. Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C4 in mice. *Biol Reprod* 1995;53:84-92.
 20. Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa AP et al. Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy. In *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* 2007;1:394-402.
 21. Aitken J, Auger J, Baker HWG et al. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed: World Health Organization 2010.
 22. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11:325-337.
 23. Anway MD, Folmer J, Wright WW, Zirkin BR. Isolation of sertoli cells from adult rat testes: an approach to ex vivo studies of sertoli cell function. *Biology of Reproduction* 2003;68 : 996-1002.
 24. Alcivar AA. DNA methylation and expression of the genes coding for lactate dehydrogenases A and C during rodent spermatogenesis. *Biol. Reprod* 1991; 44:527-535.
 25. Jen J, Deschepper CF, Shackelford GM, Lee CYG. Stage-specific expression of the lactate dehydrogenase-X gene in adult and developing mouse testes. *Mol. Reprod. Dev* 1990; 25: 14-21 .
 26. Thomas K, Del Mazo J, Eversole P, Bellve A, Hiraoka Y. Developmental regulation of expression of the lactate dehydrogenase (LDH) multigene family during mouse spermatogenesis. *Development* 1990; 109, 483-493.
 27. Rato L, Alves MG, Socorro S et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis, *Nature Reviews Urology* 2012; 9:6, 330-338.
 28. Boussouar F, Rene EG, Jingwei J, Mohamed B. Tumor necrosis factor- α stimulates lactate dehydrogenase A expression in porcine cultured Sertoli cells: mechanisms of action. *Endocrinology* 1999;140: 3054-3062.
 29. Nehar D, Mauduit C, Boussouar F , Mohamed B. Tumor necrosis factor- α -stimulated lactate production is linked to lactate dehydrogenase A expression and activity increase in porcine cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 1997: 138; 1964-1971.
 30. Nehar D, Mauduit C, Boussouar F , Mohamed B. Interleukin 1 α stimulates lactate dehydrogenase A expression and lactate production in cultured porcine Sertoli cells. *Biol. Reprod* 1998; 59, 1425-1432.
 31. Riera MF, Meroni SB, Schteingart HF, Pellizzari EH, Cigorraga SB. Regulation of lactate production and glucose transport as well as of glucose transporter 1 and lactate dehydrogenase A mRNA levels by basic fibroblast growth factor in rat Sertoli cells. *J. Endocrinol* 2002 ;173, 335-343.
 32. Grataroli R, Boussouar F , Mohamed B. Role of sphingosine in the tumor necrosis factor α stimulatory effect on lactate dehydrogenase A expression and activity in porcine Sertoli cells. *Biol. Reprod* 2000 ; 63: 1473-1481.
 33. Rhoden EL, Morgentaler A. Treatment of testosterone-induced gynecomastia with the aromatase inhibitor, anastrozole. *Int J Impot Res* 2004;16:95-7.
 34. Otasevic V, Korac A, Vucetic M et al. Is manganese (II) pentaazamacrocyclic superoxide dismutase mimic beneficial for human sperm mitochondria function and motility? *Antioxid Redox Signal* 2013;18:170-178.
 35. Veitinger S, Veitinger T, Cainarca S, et al. Purinergic signaling mobilizes mitochondrial Ca²⁺ in mouse Sertoli cells. *The Journal of Physiology* 2011;589:5033-5055.