

## Farklı Sentez Aktivitelerindeki Anti-Müller Hormonun Müller Kanalı Yıkımına Apoptotik Etkisi

Remziye DEVECİ<sup>1\*</sup>

Erdal BALCAN<sup>2</sup>

Atabak NAGHAVI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

<sup>2</sup>Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa

\*Corresponding author:

E-mail: remziye.deveci@ege.edu.tr

Geliş Tarihi : 17.02.2013

Kabul Tarihi : 04.04.2013

### Özet

Erkek fütüste Sertoli hücrelerinde sentezlenen Anti-Müller hormonu (AMH), dişiye özgü Müller kanalının gerilemesine neden olur. Bu çalışmada; farklı embriyonik dönemlerde Müller kanalının apoptotik yıkımının AMH aktivitesiyle ilişkisini belirlemek ve istatistiksel olarak değerlendirmek amaçlandı. Çalışmada Balb/c farelerin 13. ve 15. günlerdeki (E13 ve E15) erkek embriyoları kullanıldı. Müller kanalındaki apoptotik hücreleri belirlemek için TUNEL ve Hoechst 33342 ile işaretleme yapıldı. Apoptozisin istatistiksel olarak ifade edilmesi için Stereo Investigator programından yararlanarak Müller kanalının 1mm<sup>3</sup>'ündeki apoptotik hücre sayısı hesaplandı. Elde edilen verilere student t testi (%95 güven aralığı) uygulandı. AMH'nin sentezlenmeye henüz başladığı ve Müller kanalının da gelişimini tamamladığı E13'te Müller kanalından geçen pek çok kesit düzleminde apoptotik hücreye rastlanmadı. AMH sentezinin tamamlandığı ve Müller kanalının yoğun şekilde yıkıldığı E15'te apoptotik hücre sayısında önemli bir artış görüldü. Müller kanalının 1mm<sup>3</sup> 'ündeki apoptotik hücre yoğunluğu E13'te ortalama 0.358, E15'te 1.438 olarak belirlendi. Fark, % 95 güven aralığına göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.005) bulundu. Bu çalışma, embriyonik hayatta cinsiyetin belirlenmesi sürecinde Müller kanalı gerilemesindeki iki major olayın, AMH aracılığı ile gerçekleşen programlanmış hücre ölümü ve hormon değişikliğinin önemini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelime:** Müller Kanalı, Anti-Müller Hormon, Apoptozis, TUNEL, Stereoloji, Balb/c fare

## The Apoptotic Effect of Anti-Mullerian Hormone at Different Synthetic Activities on Mullerian Duct Degeneration

### Abstract

Anti-Mullerian hormone (AMH) secreted by Sertoli cells in the male fetus leads to the regression of the female-specific Mullerian duct. In this study, our aim was to determine and statistically examine the link between the activity of AMH and the apoptosis of the Mullerian duct. We made use of 13th and 15th days old male embryos (E13 and E15) obtained from Balb/c mice in the study. TUNEL and Hoechst 33342 labeling was performed in order to distinguish apoptotic cells within the Mullerian duct. For the statistical analysis of apoptosis, we used the Stereo Investigator program and calculated the number apoptotic cells within 1 mm<sup>3</sup> of the Mullerian duct. Student t test (95% confidence interval) was applied on the data we acquired. In E13, when the AMH just starts being produced and the Mullerian duct completes its differentiation, we did not come across to any apoptotic cells on the many section layers crossing the Mullerian duct. In E15 where AMH hormone synthesis has finished and the Mullerian duct is being broken down intensely, we have found a significant increase in apoptotic cell numbers. Apoptotic cell density per 1 mm<sup>3</sup> of the Mullerian duct was determined as 0.358 in E13 and as 1.438 in E15. The difference was determined to be statistically significant (p<0.005) within the confidence interval of 95%. This study points out the importance of AMH-mediated programmed cell death and hormonal alterations; two major events taking place during the regression of the Mullerian duct and the determination of gender in embryogenesis.

**Keywords:** Mullerian duct, Anti-Mullerian hormone, Apoptosis, TUNEL, Stereology, Balb/c mice

## GİRİŞ

İnsanda embriyonik gelişimin 8. haftasına kadar, fetus eşeyssel değişime uğramamıştır ve hem erkek genital kanalını (mezonefrik kanal-Wolf Kanalı) hem de dişi genital kanalını (paramezonefrik kanal-Müller Kanalı) içerir. Erkek fütüste testise farklılaşmaya başlayan gonadin Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron, Wolf kanalının gelişip farklılaşmasında etkili olurken, Sertoli hücrelerinden üretilen ve doğru eşeyssel farklılaşma açısından son derece önemli olan AMH, apoptotik mekanizmalarla Müller kanalının gerilemesine neden olur [1]. AMH sentezinin yapılmadığı dişi fütüste Müller kanalı ovidukt, uterus serviks ve vaginanın üst kısmı gibi bölgelerin şekillenmesini sağlar [2,3]. AMH, transforming büyüme faktörü- $\beta$ /kemik morfogenetik protein (BMP) sinyalleme ailesine ait dimerik bir glikoproteindir ve Tip I (ALK2, ALK3 ve ALK6) ve tip II (AMHRII) heterodimerik hücre yüzey reseptör kompleksine bağlanır [4,5]. Ligand bağlanması ile AMRHII Smad 1, 5 ve 8'i fosforilleyerek apoptotik süreci ve erkeklerde Müller kanalı dejenerasyonunu başlatır [4,6]. Mekanizmadaki ilk morfolojik olay, kanal hücrelerindeki lizozomların artışıdır. Bazal tabakanın parçalanması, hücrelerde polarite ve oryantasyonun kaybindan sonra, bozulan hücreler fagosite edilir [7]. Bazı hücreler ise, epitelial-mezenşimal dönüşüm geçirecek mezenşimin iç kısımlarına göç ederler. AMH-tipII reseptörünün sadece kanalı çevreleyen mezenşim hücrelerinde ekspresye olmasına karşın, apoptozisin kanal epitelinde meydana gelmesi, AMH'nin parakrin etki mekanizması ile apoptozisi gerçekleştirdiğini göstermektedir. Bu mekanizma ile ilgili olarak hâlâ birçok bilinmeyen vardır ve moleküler düzeydeki çalışmalar devam etmektedir [8].

Bu çalışmada; AMH aktivitesiyle Müller kanalının apoptotik yıkımı arasındaki ilişkiyi; TUNEL ve Hoechst 33342 (Bisbenzimit) uygulamasıyla belirlemek ve stereolojik uygulamalarla istatistiksel olarak değerlendirmek amaçlandı.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada Balb/c türü farelerin erkek embriyoları kullanıldı (Bu çalışma, 107T129 No.lu Tübitak Projesinin bir bölümüdür. Proje için, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır. Karar Numarası: 2007-4). Fareler 20-24 °C sıcaklık, 14 saat aydınlık 10 saat karanlık fotoperiyotta özel karışım pellet yem ve kaynatılmış musluk suyu kullanılarak şeffaf plastik kafeslerde yetiştirildi. Embriyolarının elde edilmesi için, dişi farelerin üreme siklusları vaginal smear ile kontrol edildi. Vaginal plak oluşumu gözlenen fareler hamileliğin 0. günü olarak kabul edildi. Fareler, gebeliğin 13. ve 15. günlerinde dissekte edilerek embriyoları (E13 ve E15) çıkartıldı.

E13 ve E15 embriyolarında Müller kanalındaki apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) yöntemi, uygun kit (ApoTag® Plus Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon) kullanılarak yapıldı. %4 formalin ile tespit edilen örnekler rutin işlemlerden sonra parafine gömüldü. Alınan 5  $\mu$ m'lik kesitler önce proteinaz K ile ardından içsel peroksidad aktivitesini bloke etmek için %0,3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildi. Dengeleme tamponu ve PBS ile yıkamanın ardından kesitler TdT enzim ile inkübe edildi. Reaksiyonun durdurulmasından sonra Anti-digoksijenin konjugat ile inkübasyon ve yıkamaların ardından DAB

(diaminobenzidin) substrat ile reaksiyon görülür hale getirildi. Zıt boyama için %0.5'lik metil yeşili (Sigma) kullanıldı. Kanada balzamu ile kapatılan kesitler Leica DM 4000B araştırma mikroskobunda incelenerek Olympus DP71 kamera ile fotoğraflandı [9].

*Pozitif kontrol* amacıyla bazı kesitler reaksiyon tamponla dilüe edilmiş RNaz free DNaz ile inkübe edilerek durdurma tamponunda bekletildikten sonra PBS ile yıkandı. *Negatif kontrol* için ise kesitlere TdT içermeyen işaretleme solüsyonu konuldu.

Apoptozisin floresan mikroskop ile gösterilmesi için Hoechst 33342 (Bisbenzimit) ile işaretleme yapıldı. %4'lük paraformaldehit ile tespit edilip parafine gömülmüş örneklerden alınan 5  $\mu$ m'lik kesitlere PBS içindeki 1 mg/mL stok solüsyonun tekrar PBS ile 1:500 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmış Hoechst 33342 uygulandı. Örnekler, Leica DM 4000B floresan ataçmanlı araştırma mikroskobunda incelenerek Olympus DP71 kamera ile fotoğraflandı [10,11].

Çalışılan embriyonik dönemlere bağlı olarak Müller kanalında gözlenen apoptozisin istatistiksel olarak ifade edilmesi için stereolojik teknikler kullanıldı. Müller kanalının gelişimini henüz tamamladığı E13 (n=4) ve yıkımının gerçekleştiği E15 embriyolarında (n=4) Müller kanal hücrelerinde gerçekleşen apoptozisin karşılaştırılması için 25  $\mu$ m kalınlığındaki kesitlerde Z-ekseni boyunca optik disektör yöntemiyle apoptotik hücrelerin sayımı yapıldı [12,13]. Kesitin başlangıç ve son 5  $\mu$ m'lik bölümlerinde sayım yapılmadı. Aradaki 15  $\mu$ m lik derinlik boyunca apoptotik hücreler sayıldı. Müller kanalının alanı kesit kalınlıkları ile çarpılarak hacimsel değerler elde edildi. Müller kanalının 1mm<sup>3</sup> üdeki apoptotik hücre sayısı hesaplandı. Bu işlemler için "Stereo Investigator" programından yararlanıldı. Elde edilen verilere student t testi (%95 güven aralığı) uygulandı.

## BULGULAR

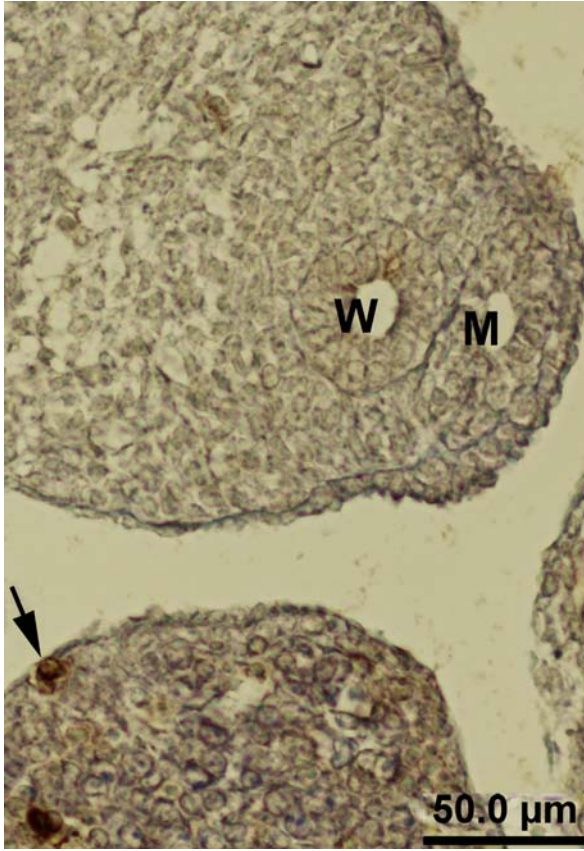
Müller kanal hücrelerinde gerçekleşen apoptozis süreci iki farklı embriyonik dönemde karşılaştırıldı. Müller kanalının yıkımından sorumlu AMH'nin sentezlenmeye henüz başladığı, Müller kanalının ise gelişimini hemen tamamlayarak geniş bir kanal yapısı sergilediği E13 embriyolar ile AMH sentezinin tamamlandığı ancak dolaşımında hala bulunmaya devam ettiği ve Müller kanalının yoğun şekilde yıkıma uğradığı E15 embriyolar tercih edildi [11].

TUNEL uygulanmış E13'de çevre dokularda çok sayıda apoptotik hücreye rastlanırken Müller kanalından geçen pek çok kesit düzleminde apoptotik hücreye rastlanmadı (Şekil 1). E15'de artan AMH salgısı ile birlikte apoptotik hücre sayısında artış ve Müller kanalı yıkımının büyük ölçüde başladığı görüldü (Şekil 2). Ayrıca mezenşim hücreleri ve Wolf kanalı duvarında da apoptotik hücreler gözlemlendi. Hoechst 33342 (Bisbenzimit) uygulanmasıyla floresan mikroskopla da benzer sonuçlar elde edildi. Müller kanal hücrelerinin nükleuslarında mavi floresan ışımaya E13'de çok zayıfken E15'de yüksek şiddette gözlemlendi (Şekil 3a ve b).

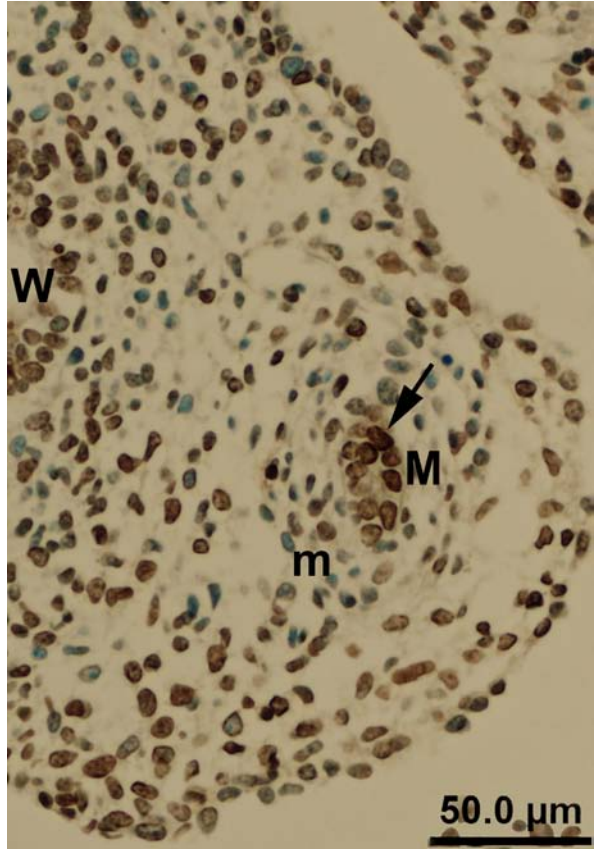
AMH ile ilişkili olarak seçilmiş E13 ve E15 fare embriyolarında Müller kanalında gözlenen apoptotik hücreleri nicel olarak da belirlemek için istatistiksel uygulamalar yapıldı. Bu hesaplamalar sonucunda Müller kanalının 1mm<sup>3</sup> üdeki apoptotik hücre sayısı yoğunluk değeri E13'e ait örneklerde ortalama 0.358 olarak, E15'e ait örneklerde ise ortalama 1.438 olarak belirlendi. İki grup arasındaki farkın istatistiksel anlam taşıyıp taşımadığının

belirlenmesi için Student t Testi uygulandığında, % 95 güven aralığına göre iki grup arasında istatistiksel fark 0.05'ten küçük ( $p < 0.000$ ) bulundu. Sonuçta, E15 embriyolardaki apoptotik hücre sayısı E13 embriyolarından

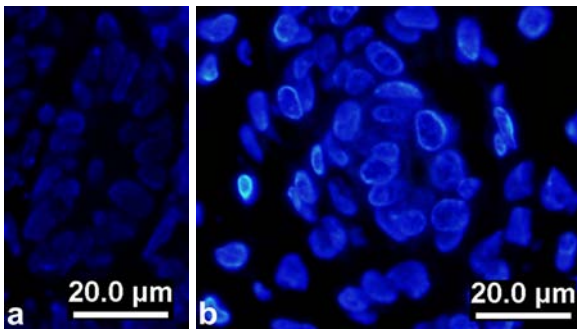
daha fazladır ve farklar istatistik açıdan önem taşımaktadır (Çizelge 1a,b; Şekil 4)



Şekil 1. E13 fare embriyosunda Müller kanalı (M). Apoptozis, kanal hücrelerinde gözlenmezken çevre dokularda bulunmaktadır (→). W, Wolf kanalı (Parafin kesit, TUNEL).



Şekil 2. E15 fare embriyosunda Müller kanal (M) hücrelerinin çoğu apoptotiktir (→). Wolf kanalı (W) ve mezenşim (m) hücrelerinde de TUNEL + reaksiyon gözlenir (Parafin kesit, TUNEL).



Şekil 3. E13 (a) ve E15 (b) fare embriyolarının Müller kanal hücrelerinde apoptozis oranları. E15'de gözlenen mavi floresan ışımaya E13'de gözlenmemektedir (Parafin kesit, Hoechst 33342).

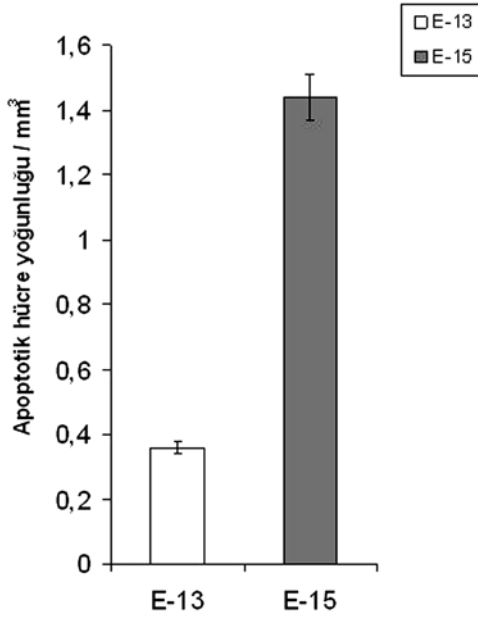
Çizelge 1a,b: E13 ve E15 fare embriyolarında Müller kanalının  $1 \text{ mm}^3$  içindeki ortalama apoptotik hücre yoğunluklarının Student t Testi ile istatistiksel değerleri (%95 güven aralığına göre).

Çizelge 1a

Grup istatistiği				
Embriyonik Dönem	n	Ort.	Std. Sapma	Std. Hata
E13	4	,35800	,090896	,045448
E15	4	1,46325	,242047	,121024

Çizelge 1b

	Bağımsız t Testi								
	Varyansların eşitliği için Levene Testi	Ortalamaların eşitliği için t Testi						Farkların 95% güven aralığı	
		F	Sıg.	t	df	Sig. (2-kuyruklu)	Ortalama anlamlı farkı	Std. Hataların farkı	Alt limit
Varyanslar eşit kabul edilmiş	11,571	,014	-8,550	6	,000	-1,105250	,129276	-1,421576	-,788924
Varyanslar eşit kabul edilmemiş			-8,550	3,830	,001	-1,105250	,129276	-1,470563	-,739937



Şekil 4. E13 ve E15 fare embriyolarında Müller kanalının 1 mm<sup>3</sup>'ündeki ortalama apoptotik hücre yoğunluklarının karşılaştırılması.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Tubulogenez birçok doku ve organın gelişimi ve fonksiyon göstermesi açısından gerekli olan bir süreçtir. Fötal gonadlardan salınan hormonlar üreme kanallarının ve diğer genital organların şekillenmesini kontrol eden önemli faktörlerdir. Embriyonik dönemde cinsiyetin belirlenmesindeki önemli aşamalardan biri de erkek embriyolarda, farklılaşan embriyonik testislerdeki Sertoli hücreleri tarafından üretilen glikoprotein yapısındaki AMH aracılığı ile Müller kanalının gerilemesidir [14-16]. Müller kanalı gerilemesi, programlanmış hücre ölümünün omurgalıların gelişimsel sürecinde rol aldığını gösteren önemli bir örnektir.

Kanal epitelyumu, kanalı çevreleyen mezenşim ve kanalın dış sınırlarını belirleyen sölomik epitelyum olmak üzere üç hücresel bileşende değerlendirilebilen [17] Müller kanalının gerilemesi ile ilgili yapılan hücre biyolojisi çalışmalarıyla, bu süreçte çeşitli hücresel değişikliklerin olduğu ortaya konmuştur. Bu değişiklikler; Müller kanalını çevreleyen mezenşimal hücrelerin morfolojik transformasyonu [18], Periduktal bazal tabakanın yıkılması, kanal içerisindeki bazı epitelyal hücrelerin oryantasyonunun değişerek mezenşimal kısma geçişleri [18,19] ve Müller kanalı epitelyum hücrelerinin apoptozisi [6,7,20] olarak özetlenebilir.

Müller kanalını çevreleyen mezenşimal hücreler tip II reseptör (AMHR2) içerdiği için AMH, Müller epitelyumuna parakrin bir mekanizma ile etki gösterir [21-23]. Bu nedenle, erkek embriyolarda Müller kanalı oluşumu ve gerilemesi mezenşimal-epitelyal etkileşimleri ile gerçekleşir. Mezenşimal ve epitelyal tabakalar arasındaki bu karşılıklı etkileşim Müller kanalının kranio-kaudal gerilemesinden sorumlu olmaktadır [24].

Daha önce yapılan çalışmalar, apoptozisin Müller kanalı gerilemesinde önemli bir rol üstlendiğini göstermiştir [7,20,25]. Bununla birlikte, periduktal bazal

membranın bozulması, bazı epitelyal hücrelerin oryantasyonunun değişmesi ve bunun sonucunda mezenşimal kısma girişleri Müller kanalı gerilemesinde diğer önemli olaylardır [18,19,25,26].

Allard ve arkadaşları [25] erkek embriyolarda apoptotik hücrelerin büyük ölçüde artış gösterdiğini ve apoptotik indeks ile serum AMH arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Yaptığımız TUNEL uygulamaları ile yukarıdaki bulgulara benzer şekilde E13 'de apoptotik hücreler oldukça düşük orandadır (bkz. Şekil 1 ve 3a). E15 başında Müller kanalında apoptotik hücrelerin belirgin bir artış gösterdiğini belirledik (bkz. Şekil 2 ve 3b). Bu artış çok büyük olasılıkla artan AMH düzeyi ile paralellik göstermektedir. Öyle ki testiste E14'de aktif olarak görülen AMH'nin düzeyi E15'de azalmakta, Müller kanalı çevresinde ise varlığı devam etmektedir [11].

Müller kanalı gerilemesi sürecinde iki tip apoptozis görülmektedir. 1. Tip I apoptozis; hem Müller hem de Wolf kanalında görülür ve apoptotik hücrelerin komşu hücreler tarafından hızlı bir şekilde fagositozu ile karakterizedir. 2. Tip 2 apoptozis ise sadece Müller kanalında görülür ve farklılaşan epitelyal hücrelerin morfolojisinin korunması açısından önemli bir görev içeren bazal membranın bozulması ile karakterizedir. Oluşan apoptotik cisimlerin fagositozu ise mezenşimde gerçekleşir. Öte yandan, özel ekstrasellüler matris molekülleri ile etkileşimin kaybı proapoptotik sinyal olarak değerlendirilmektedir [27,28].

AMH indüklü Tip I apoptozisin E15'de hormonun reseptör ile etkileştikten yaklaşık 2 saat sonra önce kranial kısımda başladığı daha sonra tüm Müller kanalı boyunca devam ettiği, Tip II apoptozisin ise hemen sonra (E15'in sonlarına doğru) gerçekleştiği ileri sürülmektedir [3]. Bu çalışmada yapılan TUNEL uygulamalarında E15'in hem erken evresinde hem de ileri evresinde Müller kanalı ile birlikte Wolf kanalında da apoptotik hücrelere rastlanması, bunun yanında çevre mezenşimde de apoptotik hücrelerin sayısının fazla olması Tip I ve Tip II apoptozisin birbirinin içine geçmiş iki ardışık süreç olabileceğini düşündürmüştür. E15'in ileri evrelerinde Wolf kanalında apoptotik hücrelerin varlığı gelişimsel süreçte bu kanalın yapısal düzenlenmesi ile ilgili olabilir. Öyle ki Müller kanalı yapısal bir dejenerasyon gösterirken Wolf kanalının bütünlüğünde bir değişiklik olmamaktadır (bkz. Şekil 2). Yapılan çalışmalarda apoptotik hücrelerin fagosite olmaları mezenşime doğru hareket ettikleri ve böylece kanal duvarındaki apoptozise uğramayan komşu hücrelerin mezenşimal kısma geçiş için oryante olmalarına ve bu hücrelerin mezenşimal hücrelere dönüşmelerine olanak sağladıkları ileri sürülmektedir [19,25]. Gerçekten, E15'te Müller kanalını çevreleyen bazal tabakanın yıkılmaya başladığı ve kanal hücrelerinden transforme olan mezenşimal hücrelerin kanalı halkasal biçimde kuşattığı gözlemlenmektedir (bkz. Şekil 2). Bu transformasyonun hücrenin kaderini belirleyen bir sinyalleme yolağı ile kontrol edildiği öne sürülmektedir [29,30].

Bu çalışma, embriyonik hayatta cinsiyetin belirlenmesi sürecinde Müller kanalı gerilemesindeki iki major olayın, AMH aracılığı ile gerçekleşen programlanmış hücre ölümü ve hormon özelliğinin önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu iki olayın Müller kanalı gerilemesi üzerine etkilerinin birbirlerinden bağımsız mı yoksa koordineli bir biçimde gerçekleştirdiği henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Kimi çalışmalar mezenşimal-epitelyal etkileşimlerin [31,32], matris metalloproteinazların [8] ve  $\beta$ -katenin aktivitesinin Müller kanalı gerilemesinde belirleyici olduğunu ileri sürmektedir [25,33]. Kanal gerilemesinde glikozilasyon değişikliklerinin rolü üzerine yeterli literatür bilgisi bulunmamaktadır ancak, glikanların hücre-hücre ya da hücre-

ekstrasellüler matriks etkileşimindeki önemli roller oynadığı kabul edilmektedir [34-37]. Öte yandan, hücrelerin ekstrasellüler matriksle etkileşimlerini kaybetmelerinin proapoptotik sinyaller oluşturduğu bilinmektedir [27,28]. Tüm bu bilgiler üst üste konulduğunda embriyonik dönemde Müller kanalı gerilemesinde genel bir ifade ile hücre içi, hücre dışı birden fazla moleküler mekanizmanın birbiriyle koordineli olarak görev yaptığı söylenebilir. Müller kanalının gerilemesinde rol alan diğer moleküler mekanizmaların çalışılmasıyla desteklenecek bu araştırmanın, kanal ile ilgili hastalıkların (örn. Daimi Müller Kanalı Sendromu) tedavisi için yararlı olması beklenmektedir.

#### Tesekkür

Bu çalışmaya 107T129 No.lu Proje kapsamında finansal destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu ile 2008 BİL 026 No.lu Proje kapsamında finansal destek sağlayan E.Ü. Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne çok teşekkür ederiz.

#### KAYNAKLAR

- [1] Gilbert SF. 2006. *Developmental Biology*. 8th edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. P.750.
- [2] Munsterberg A, Lovell-Badge R. 1991. Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*. 113(2):613-624.
- [3] Xavier F, Allard S. 2003. Anti-Müllerian hormone, beta-catenin and Müllerian duct regression. *Mol Cell Endocrinol*. 211(1-2):115-21.
- [4] Visser JA. 2003. AMH signaling: from receptor to target gene. *Mol Cell Endocrinol*. 211(1-2):65-73.
- [5] Belville C, Jamin SP, Picard JY, Josso N, di Clemente N. 2005. Role of type I receptors for anti-Mullerian hormone in the SMAT-1 Sertoli cell line. *Oncogene*. 24(31):4984-4992.
- [6] Catlin EA, Tonnu VC, Ebb RG, Pacheco BA, Manganaro TF, Ezzell RM, Donahoe PK, Teixeira J. 1997. Mullerian inhibiting substance inhibits branching morphogenesis and induces apoptosis in fetal rat lung. *Endocrinology*. 138(2):790-6.
- [7] Price JM, Donahoe PK, Ito Y, Hendren WH. 1977. Programmed cell death in the Müllerian inhibiting duct by Müllerian inhibiting substance. *Am J Anat*. 149(3):353-376.
- [8] Roberts LM, Visser JA, Ingraham HA. 2002. Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. *Development*. 129(6):1487-96.
- [9] Balcan E, Deveci R, Keskin N, Yıkılmaz MS, Sarıbek B. 2007. Tunikamisin uygulanmış fare karaciğer dokusunda histopatolojik değişiklikler. 18. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi Özet Kitapçığı. s.157.
- [10] Lalande M, Ling V, Miller R. 1981. Hoechst 33342 dye uptake as a probe of membrane permeability changes in mammalian cells. *PNAS*. 78(1):363-367.
- [11] Deveci R, Balcan E, Keskin N, Ün C, Karaçalı S. 2010. Embriyoda Cinsiyetin Belirlendiği Süreçte Antimüller Hormonda Sialik Asit Değişiklikleri ile Müller Kanalı Apoptozis İlişkinin Araştırılması, TÜBİTAK Projesi. 107T129. s.258.
- [12] Wreford NG. 1995. Theory and practice of stereological techniques applied to the estimation of cell number and nuclear volume in the testis. *Microsc Res Tech*. 32:423-436.
- [13] Zhengwei Y, Wreford NG, Royce P, de Kretser DM, McLachlan RI. 1998. Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment: heterogeneous pattern of spermatogenic impairment. *J Clin Endocrinol Metab*. 83(4):1284-91.
- [14] Josso N, Lamarre I, Picard JY, Berta P, Davies N, Morichon N, Peschanski M, Jeny R. 1993. Anti-müllerian hormone in early human development. *Early Hum Dev*. 33(2):91-9.
- [15] Lee MM, Donahoe PK. 1993. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev*. 14(2):152-64.
- [16] Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. 1994. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell*. 79(3):415-25.
- [17] Guioli S, Sekido R, Lovell-Badge R. 2007. The origin of the Mullerian duct in chick and Mouse. *Dev Biol*. 302(2):389-98.
- [18] Dyche WJ. 1979. A comparative study of the differentiation and involution of the Mullerian duct and Wolffian duct in the male and female fetal Mouse. *J Morphol*. 162(2):175-209.
- [19] Trelstad RL, Hayashi A, Hayashi K, Donahoe PK. 1982. The epithelial-mesenchymal interface of the male rat Mullerian duct: loss of basement membrane integrity and ductal regression. *Dev Biol*. 92(1):27-40.
- [20] Roberts LM, Hirokawa Y, Nachtigal MW, Ingraham HA. 1999. Paracrine-mediated apoptosis in reproductive tract development. *Dev Biol*. 208(1):110-22.
- [21] Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, Uilenbroek JT, Karels B, Wilming LG, Meijers JH. 1994. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development*. 120(1):189-97.
- [22] di Clemente N., Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard ., Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R. 1994. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone. *Mol Endocrinol*. 8(8):1006-20.
- [23] Teixeira J, He WW, Shah PC, Morikawa N, Lee MM, Catlin EA, Hudson PL, Wing J, Maclaughlin DT, Donahoe PK. 1996. Developmental expression of a candidate müllerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinology*. 137(1):160-165.
- [24] Tsuji M, Shima H, Yonemura CY, Brody J, Donahoe PK, Cunha GR. 1992. Effect of human recombinant müllerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during Mullerian duct regression in the rat. *Endocrinology*. 131(3):1481-8.
- [25] Allard S, Adin P, Gouedard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC, Picard JY, Xavier F. 2000. Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Development*. 127(15):3349-60.
- [26] Wartenberg H. 1985. Morphological studies on the role of the periductal stroma in the regression of the human male Müllerian duct. *Anat Embryol (Berl)*. 171(3):311-23.

- [27] Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA. 1993. The extracellular matrix as cell survival factor. *Mol Biol Cell*. 4:953-961.
- [28] Frisch SM, Francis H. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interaction induces apoptosis. *J Cell Biol*. 124:619-626.
- [29] Huelsken J, Birchmeier W. 2001. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genetics Dev*. 11:547-553.
- [30] Mlodzik M. 2002. Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation. *Trends Genet*. 18:564-571.
- [31] Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, Visser JA. 2000. Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res*. 55:53-67.
- [32] Zhan Y, Fujino A, MacLaughlin DT, Manganaro TF, Szotek PP, Arango N., Teixeira J, DONAHOE PK. 2006. Mullerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Mullerian duct regression. *Development*. 133(12):2359-69.
- [33] Deutscher E, Hung-Chang Yao H. 2007. Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Müllerian duct morphogenesis. *Dev Biol*. 307(2):227-36.
- [34] Stoolman LM. 1989. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell*. 56: 907-910.
- [35] Varki A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. 3(2):97-130.
- [36] Varki A. 1997. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J*. 11(4):248-55.
- [37] Lis H, Sharon N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Rev*. 98:637-674.