



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve koşullu besiyerinin deneysel prematür over yetmezliği modeli üzerine etkileri

Effects of adipose tissue derived mesenchymal stem cells and conditioned medium on experimental premature ovarian insufficiency model

Büşra Şen Halicioğlu¹, Mehmet İbrahim Tuğlu²

¹Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Turkey

²Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Turkey

Cukurova Medical Journal 2021;46(2):523-531

Abstract

Purpose: The aim of this study was to investigate the effects of adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and conditioned medium (CM), which can be recommended for the treatment of chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency (POI), on oxidative stress and apoptosis.

Materials and Methods: In the study, adult female Wistar albino rats were divided into 4 groups; Control, POI, POI+ADMSC, POI+CM. H&E staining was performed for histopathological evaluations in the ovary and all ovarian follicles were counted. iNOS and Caspase3 expressions were shown immunohistochemically as markers of oxidative stress and apoptosis.

Results: Follicular cell degenerations and vacuolization were observed in the ovaries of the POI group, while significant decreases were observed in these degenerations in the ADMSC and CM groups. Increased iNOS and Caspase3 expressions in the POI group were statistically significant decreased in both the ADMSC and CM groups.

Conclusion: Mesenchymal stem cells and cell-free conditioned medium, which are increasingly used in the field of regenerative medicine, can be an alternative treatment strategy for POI by reducing apoptosis and oxidative stress, which are the main mechanisms of the disease.

Keywords: premature ovarian insufficiency, adipose derived mesenchymal stem cell, conditioned medium, apoptosis, oxidative stress

Öz

Amaç: Kemoterapi kaynaklı prematür over yetmezliği (POY) tedavisi için önerilebilecek yağ doku mezenkimal kök hücreleri (YDMKH) ve bu hücrelerden elde edilmiş koşullu besiyerinin (KB) oksidatif stres ve apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada Wistar albino cinsi erişkin dişi sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Kontrol, POY, POY+YDMKH, POY+KB. Ovaryumda histopatolojik değerlendirmeler için H&E boyamaları yapıldı ve tüm ovaryum folikülleri sayıldı. Oksidatif stres ve apoptoz belirteci olarak iNOS ve Caspase3 ekspresyonları immunohistokimyasal olarak gösterildi.

Bulgular: Analizler sonucu POY grubu ovaryumlarında foliküller hücre dejenerasyonları, vakuolizasyon, gibi dejenerasyonlar gözlenirken, YDMKH ve KB gruplarında bu dejenerasyonlarda anlamlı azalmalar görüldü. POY grubunda artmış olan iNOS ve Caspase3 ekspresyonları YDMKH ve KB gruplarının her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı.

Sonuç: Rejeneratif tıp alanında her geçen gün kullanımı artan mezenkimal kök hücrelerin ve hücresiz koşullu besiyerinin prematür over yetmezliğinde hastalığın temel mekanizmalarından olan apoptoz ve oksidatif stresin azaltılması yoluyla, POY için alternatif bir tedavi stratejisi olabileceği gösterildi.

Anahtar kelimeler: prematür over yetmezliği, mezenkimal kök hücre, koşullu besiyeri, apoptoz, oksidatif stres

GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler (MKH), multipotent yetişkin kök hücrelerdir. Mezoderm kaynaklı

olmalarına rağmen bu hücreler uygun koşullarda nöronlar dahil farklı birçok hücre tipine farklılaşabilme kapasitesine sahiptir¹. Hücrel

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Büşra Şen Halicioğlu, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Turkey E-mail: busrasen89@gmail.com

Geliş tarihi/Received: 13.01.2021 Kabul tarihi/Accepted: 08.03.2021 Çevrimiçi yayın/Published online: 03.05.2021

tedavilerde en fazla tercih edilen kök hücre tipi olan MKH'ler yaklaşık on beş yıldır tedavi amaçlı olarak klinikte kullanılmaktadır. MKH'ler kemik iliği, yağ dokusu, amniyotik sıvı, göbük kordonu, plasenta gibi birçok kaynaktan elde edilebilmektedir². Düşük immunojenik özelliklere sahip olan bu hücreler birçok önemli büyüme faktörü, sitokin, trofik faktör ve rejeneratif faktörleri salgılayabilme kapasitesine sahiptir³. Yağ doku mezenkimal kök hücreleri de (YDMKH) tıpkı diğer MKH'ler gibi adiposit, kondrosit, osteosit, endotel vb. birçok hücre tipine farklılaşabilmektedir⁴. Diğer MKH türlerine benzer şekilde CD44, CD73, CD90, CD105 gibi yüzey antijenleri için pozitifken, CD34 ve CD45 gibi hematopoetik kök hücre belirteçleri için negatifler⁵. YDMKH'ler otolog hücre onarımı ve rejenerasyonunda erişim kolaylığı ve tekrarlanabilen uygulanabilirlikleri ile büyük avantajlar sunmaktadır⁶. İnsan çalışmalarında subkutan yağ dokunun bolca bulunabilmesi ve kolaylıkla erişilebilir olmasından dolayı YDMKH'ler tercih sebebi olmaktadır⁷. Diğer MKH türleri ile kıyaslandığında daha az invaziv yöntemlerle, daha fazla miktarda hücrenin daha düşük maliyette elde edilebiliyor olması da YDMKH'leri tercih sebebi yapmaktadır⁸. YDMKH'ler antiapoptotik, antiinflamatuvar, immunomodülasyon gibi birçok özelliklerinden dolayı rejeneratif tıp tedavilerinde kullanılır⁴. YDMKH etkinliği diyabet, multipl skleroz, miyokard enfarktüsü, iskelet doku hasarları, greft-versus host hastalığı, Chron hastalığı gibi birçok hastalığın tedavisinde klinik olarak da önem kazanmıştır⁹.

Tüm MKH türlerinin sağlamış olduğu birçok avantaja rağmen insan uygulamalarında bazı kısıtlamaları olabilmektedir. MKH transplantasyonlarında meydana gelen immun rejeksiyon veya trombojenik problemler bu hücrelere alternatif olarak hücresiz ortamlarında tedavisel yaklaşımlarda önerilmesini sağlamıştır¹⁰. Kök hücrelerin kültüre edildikleri ortama salgıladıkları sekretom, mikrovezikül, eksozom, trofik faktörler gibi salgıların tümünü içeren besiyeri ortamı koşullu besiyeri (KB) olarak adlandırılır¹¹. KB, kök hücreler tarafından salgılanan çeşitli büyüme faktörlerini ve doku yenileyici ajanları içerir. KB içinde VEGF, PDGF, EGF gibi büyüme faktörleri¹², TGFβ1, IL-6, IL-10, IL-8, IL-9 gibi pro ve antiinflamatuvar sitokinler^{13,14}, FGF2, HGF gibi anjiyogenik faktörler bulunmaktadır ve bu salgılanan faktörler çeşitli proteomik çalışmalarla gösterilmiştir^{13,15}.

Kadın infertilitesi çeşitli üreme sistemi

bozukluklarından dolayı her geçen gün artmaktadır. Prematür over yetmezliği (POY) kadınlarda görülen, sonucu geri dönüşümsüz olarak infertiliteye varabilen önemli bir hastalıktır. Özellikle 40 yaş altındaki kadınlarda ovaryumların fonksiyonlarını kaybetmesi sonucu amenore ve hipergonadotropik hipogonadizm ile tanımlanır¹⁶. Menopoz öncesi ovaryum foliküllerinin tamamen tükenmesi ya da fonksiyon bozukluğuna uğramasıyla karakterizedir¹⁷. Hastalığın görülme insidansı yaş ilerledikçe artar, 20 yaş altı kadınlarda 1/10000 iken, 40'lı yaşlarda 1/100'dür¹⁶. Hastaların %70'i bilinmeyen sebeplerle bu hastalığa yakalanmıştır. Özellikle kemoterapi ve radyasyon tedavisi alan kadınlarda hastalığa sıkça rastlanır^{17,18}. Kemoterapinin ovaryum fonksiyonu üzerindeki gonadotoksik etkisi yaş, doz, kemoterapötik ajan tipi ve maruz kalma miktarına göre değişkenlik gösterir¹⁹. Ancak siklofosamid (CYP), busulfan, melfalan gibi alkilleyici tür kemoterapötiklere maruz kalan kadınlarda POY görülme riski 9 kat fazladır²⁰. Alkilleyici grupta bulunan CYP yaygın kullanılan bir kemoterapötik ajan ve aynı zamanda immün supresör bir ilaçtır. CYP nükleik asitleri alkilleyerek hücrede DNA kırıklarına ya da çapraz bağlanmalarına sebep olur. Böylece hücre bölünmesini inhibe eder²¹. Aynı zamanda CYP'nin metabolizasyonu sonucu ortaya çıkan akrolein gibi bileşiklerin hücrelerde reaktif oksijen türlerinin birikimine sebep olur²². CYP'ye akut maruziyet bile ovaryum foliküllerinde apoptozu indükleyerek yumurtalık rezervinin büyük ölçüde kaybına neden olur²³. POY'un karmaşık bir oluşum mekanizması olduğundan dolayı henüz etkili bir tedavi yöntemi yoktur. Her ne kadar hormon replasman tedavisi ya da androjen kullanımı hastalara önerilse de bu hormonal tedavilerin kanser oluşum riskini tetiklemeden dolayı güvenilirliği azdır²⁴.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar mezenkimal kök hücre uygulamalarının POY'un tedavisi için alternatif olabileceği yönündedir. MKH'lerin özellikle hastalığın temel klinik bulgusu olan hormon seviyelerinin düzeltilmesinde ve granüloza hücrelerinde meydana gelen apoptozun önlenmesini sağlayarak iyileştirici etki gösterdiği bildirilmiştir²⁵. Kök hücrelere alternatif olarak bu hücrelerin salgıladığı birçok faktörü içinde bulunduran koşullu besiyerinin de POY tedavi stratejileri arasında olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen bu bilgiler doğrultusunda yapılan çalışmada sıçanlarda kemoterapi kaynaklı deneysel POY modelinde hastalığın tedavisine alternatif olabilecek YDMKH ve

koşullu besiyerinin ovaryumda oksidatif stres ve apoptoz üzerine etkilerinin gösterilmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 13.03.2018 tarih, 77.637.435 numaralı onayı ile etik onay alınmıştır.

Deney hayvanlarının bakımı ve temini

Çalışma da Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ağırlıkları 180 ± 50 gr arasında değişen 26 adet erişkin Wistar dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 3 gün boyunca (adaptasyon için) herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletildi. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar altında (22°C sıcaklık, %30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat) tutuldu, yiyecek ve suya sınırsız erişimi sağlandı.

Deneyel POY modeli

Sıçanlar kontrol (n=5), POY (n=7), POY+YDMKH (n=7), POY+KB (N=7) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. POY grubu sıçanlara deneyin ilk günü ve 8. günü 120mg/kg i.p yolla CYP enjeksiyonu yapıldı. POY+YDMKH grubuna ise ilk ve 8. gün i.p olarak CYP enjeksiyonu yapıldıktan sonra deneyin 15. gününden itibaren art arda 3 gün 1×10^6 YDMKH i.p olarak verildi. POY+KB grubunda ilk ve 8. gün i.p olarak CYP enjeksiyonu yapıldıktan sonra deneyin 15. gününden itibaren art arda 3 gün 0,1ml KB i.p olarak verildi. Deneyin 24. günü tüm sıçanlar sakrifiye edildi. Sıçanların sol ovaryumları H&E ve immunohistokimya boyamaları için %10'luk formalin içerisine alınıp fikse edildi.

Yağ doku mezenkimal kök hücre eldesi

YDMKH'leri anestezi altında diyabetik olmayan 6-8 haftalık bir sıçanın subkutan inguinal yağından elde edildi. Öncelikle çıkartılan yağ dokusu herhangi bir kontaminasyona karşı birçok kez PBS tamponunda yıkandı. Yağ dokusu küçük parçalar şeklinde kesilerek %0,1 tip 1 kollajenaz içerisnde inkübe edildikten sonra $800 \times g$ 'de 10 dk santrifüj edildi. Enzim aktivasyonunu inhibe etmek için %10 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri ilave edildi ve tekrar santrifüj yapıldı. Daha sonra hücre süspansiyonu $100 \mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek tekrar santrifüj işlemi yapıldı. Elde edilen süpernatant atıldı, pellet üzerine %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin-amfoterisin B içeren

DMEM/F12 besiyeri eklenerek hücreler 25cm^2 'lik flaskalara ekildi.²⁶ Hücrelerin kültür tabağına yapışıp çoğalması için beklendi. 3. ve 4. pasajdaki hücreler deney için kullanıldı. Hücreleri karakterize etmek için spesifik yüzey antijeni kriterlerine göre immunohistokimyasal boyamalar yapıldı ve skorlandı.

Yağ doku mezenkimal kök hücre koşullu besiyerinin eldesi

7. pasajdaki YDMKH'leri %85-90 konfluensiye ulaşıktan sonra hücreler 24 saat serumsuz taze besiyerinde inkübe edildi. 24 saat beklendikten sonra alınan hücresiz KB ortamı ölü hücre debrislerinin uzaklaştırılması için $800g$ 'de 10 dk santrifüj yapıldı.²⁷

Ovaryumların histopatolojik değerlendirilmesi

Deney sonucunda sakrifiye edilen sıçanların ovaryumları %10'luk formalin içerisinde fikse edildikten sonra dokular fiksatifin uzaklaştırılması için bir gece akar su altında bekletildi. Dehidratasyon için artan alkol serilerinden geçirilen dokular şeffaflaştırma için tolüende bekletildi. Daha sonra parafin bloklara gömülen ovaryumlardan $5\mu\text{m}$ kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlere histopatolojik incelemeler için rutin H&E boyaması yapıldı.

Ovaryumların immunohistokimyasal değerlendirilmesi

İmmunohistokimyasal incelemeler için ise alınan kesitler deparafinize edildikten sonra %3'lük hidrojen peroksit ile endojen peroksit inaktivasyonu yapıldı. Antijen retrieval için 37°C 'de 10 dk tripsin ile inkübasyon yapıldıktan sonra kesitler PBS ile yıkandı. Daha sonra nonspesifik bağlanma bölgelerinin bloklanması için kesitler üzerine bloklama solüsyonu damlatıldı. Bu basamaktan sonra PBS ile yıkama yapılmadan primer antikolar anti Casp3 (Santu Cruz, sc-56053), anti-NOS2 (sc-7271, Santa Cruz) ile $+4^\circ\text{C}$ 'de 1 gece inkübasyon yapıldı. Ertesi gün kesitler PBS ile yıkandıktan sonra immun reaksiyonun gözlenmesi için DAB ile inkübe edildi. Mayer's hematoksilen ile de çekirdek boyaması yapıldı ve kesitler entellan ile kapatıldı.

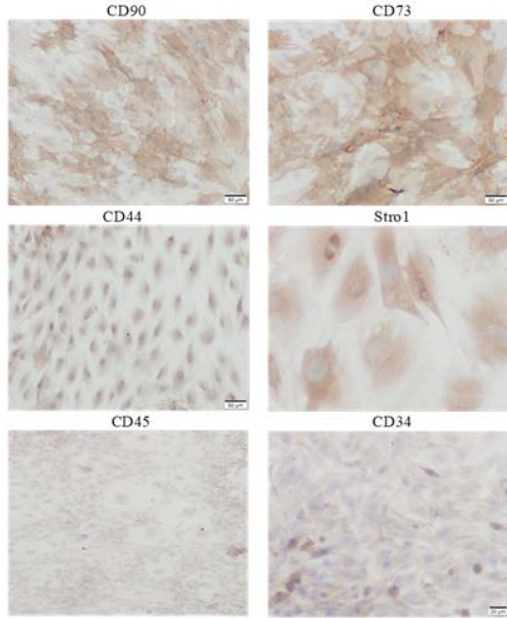
İstatistiksel analiz

İmmunohistokimyasal boyamaların skorlanması için h-skor analizi yapıldı. Her hayvana ait 10 ovaryum kesitinde, 30 alanda X40'luk objektif de boyanma yoğunluğu dikkate alınarak dokular değerlendirildi; 0: hiç boyanma yok, 1: zayıf boyanma, 2: orta boyanma, 3: kuvvetli/şiddetli boyanma kabul edilerek değerlendirildi. Elde edilen verilerin GraphPad Prism

8.3.1 programı ile istatistiksel analizi yapıldı. Tek yönlü varyans analizi testi kullanılarak gruplar arası farklar kıyaslandı. Çoklu grup karşılaştırmaları için Post hoc testlerinden Tukey's testi kullanıldı. Karşılaştırmalarda $p \leq 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

İzole edilen YDMKH'lerinin karakterizasyonu için yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda hücreler CD90, CD44, CD73 ve Stro1 için pozitif olma ve hematopoetik belirteçler olan CD45 ve 34 negatif olma özelliğini gösterdi (Şekil 1).



Gruplar	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	Medyan
CD90	254.67	7.024	4.055	254.00
CD73	245.00	9.000	5.196	245.00
CD44	235.00	9.539	5.508	234.00
STRO1	233.67	21.502	12.414	234.00
CD45	32.667	9.018	5.207	32.000
CD35	35.667	8.622	4.978	34.000

Şekil 1. YDMKH karakterizasyonu.

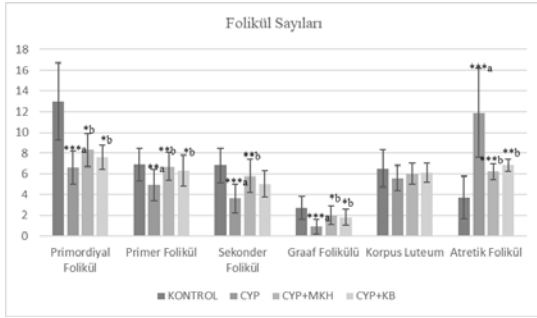
Yüzey antijenleri CD90, CD73, CD44, Stro1 için pozitif, CD45, CD34 için negatif hücreler²⁸

Ovaryum kesitlerinde yapılan H&E boyamalarında tüm gruplardaki folikül sayıları sayıldı ve ortalama-standart sapmaları ile gösterildi (Şekil 2). Kontrol grubuna kıyasla POY grubunda tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar vardı ($p < 0.001$). Atretik folikül sayısı ise POY grubunda kontrole göre anlamlı şekilde artış gösterdi ($p < 0.001$). Tüm gruplardaki korpus luteum sayılarında ise anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0.129$). YDMKH transplantasyonu sonrasında ise tüm folikül sayılarında POY grubuna göre anlamlı artışlar gözlemlendi ($p < 0.002$). Atretik folikül sayılarında ise anlamlı bir azalma mevcuttu. POY'lu sıçanlara yapılan KB uygulamasında da POY grubuna göre tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edildi ($p < 0.003$). KB grubundaki atretik folikül sayılarında ise anlamlı bir azalma vardı ($p < 0.002$). Tüm folikül tiplerinde YDMKH ve KB grubu kıyaslandığında ise iki grup arasında folikül sayıları açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Ovaryum kesitlerinin histopatolojik değerlendirmesinde ise kontrol grubu kesitlerinde organın medullası ve korteksi düzenli bir organizasyona sahipti.

Dışta germinal epitel tek katlı kübik hücrelerden oluşmuştu ve altında tunika albugenia izlenmekteydi. Kortekste ise farklı gelişim aşamalarında folikül tipleri görüldü (Şekil 3a-c). Medulla da ise kan damarlarından zengin bağ dokusu ve lifler izlendi. POY grubunda dışta germinal epitel hücrelerinde yer yer dejenerasyonlar mevcuttu. Korteksteki folikül tiplerinin birçoğunda dejenerasyonlar vardı. Çoğu folikül atretik ya da kistik folikül olarak izlendi (Şekil 3d). Korpus luteumlar içerisinde ve stromada bulunan hücrelerde vakuolizasyon tespit edildi (Şekil 3e). Özellikle gelişmiş foliküllerdeki granüloza hücrelerinde folikül lümenine dökülmüş birçok apoptotik hücre izlendi (Şekil 3f). YDMKH grubunda ise kortekste sağlıklı folikül sayılarında artışlar görüldü. Yer yer bazı hücrelerde vakuoller ve apoptotik durumlar gözlemlense de POY grubuna göre görünür şekilde iyileşmeler vardı (Şekil 3g-t). KB uygulaması yapılmış grupta da kök hücre grubuna benzer şekilde ovaryum dokusunda iyileşmeler vardı (Şekil 3j). Vakuollü hücreler kök hücre grubuna göre daha fazlaydı ancak POY grubu ile kıyaslandığında vakuolizasyonların azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 3k). Foliküller hücrelerdeki dökülmelerin ve apoptotik hücrelerin azaldığı da görüldü (Şekil 3l).

İmmünohistokimyasal bulgular

Tüm grupların ovaryum kesitlerine yapılan iNOS immunohistokimyasal boyamaları sonucunda kontrol grubunda stromada bazı alanlarda hafif (+) iNOS ekspresyonu vardı (Şekil 4a, e). POY grubunda ise tüm folikül tiplerindeki granüloza hücrelerinde ve hatta yer yer oositlerde kuvvetli (+++) iNOS ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4b, f). Hücrelerde artmış olan iNOS ekspresyonu istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 5, $p<0.001$) YDMKH uygulamasında ise iNOS ekspresyonu CYP grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştı (Şekil 5, $p<0.001$). YDMKH grubunda ovaryum foliküllerinde hafif/orta (+/++) şiddette iNOS ekspresyonu vardı (Şekil 4c, g). KB grubuna bakıldığında da iNOS immunoreaktivitesi CYP grubuna göre anlamlı şekilde azalma gösterdi (Şekil 5, $p<0.001$). KB grubunda bazı alanlarda orta (++) bazı alanlarda hafif (+) şiddette iNOS ekspresyonu vardı (Şekil 4d, h).

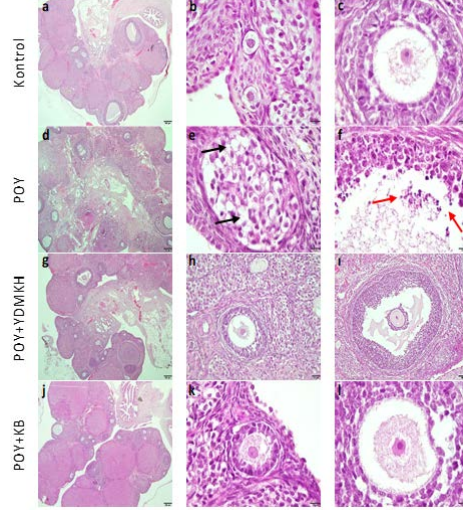


Şekil 2. Tüm gruplardaki folikül sayıları.

Veriler ort \pm ss şeklinde verilmiştir. ***: $p<0.001$, **: $p<0.002$, *: $p<0.033$. a: Kontrol grubuna göre anlamlı, b: POY grubuna göre anlamlı

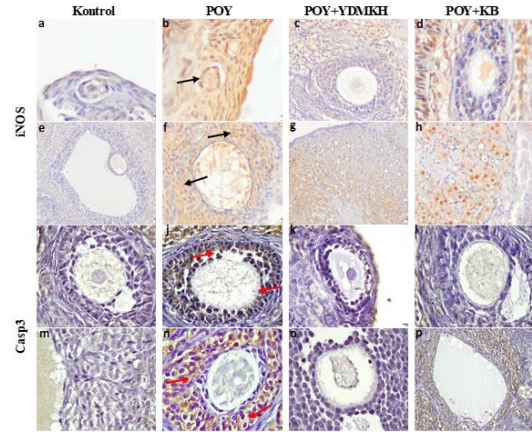
Tüm gruplardaki Casp3 ekspresyonlarına bakıldığında ise kontrol grubunda Casp3 immunoreaktivitesi hafif (+) şiddette gözlemlendi (Şekil 4i, m). POY grubunda tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı bir Casp3 ekspresyonu artışı görüldü (Şekil 5, $p<0.001$). POY grubu ovaryumlarındaki Casp3 ekspresyonu tüm folikül tiplerinde kuvvetli (+++) gözlemlendi (Şekil 4j, n). YDMKH grubunda Casp3 ekspresyonu CYP grubuna göre anlamlı şekilde azaldı (Şekil 5, $p<0.001$). YDMKH grubu foliküllerinde Casp3 immunoreaktivitesi orta/hafif (+/+) şiddette

görüldü (Şekil 4k, o). KB grubunda ise ovaryumlarındaki Casp3 immunoreaktivitesi hafif/orta (+/++) şiddette izlendi (Şekil 4l, p).



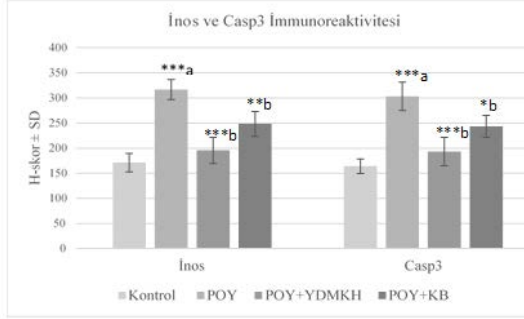
Şekil 3. Ovaryum dokusu H&E boyaması.

Siyah ok: vakuolizasyon. Kırmızı ok: foliküller hücre dejenerasyonları. Skala bar: a, d, g, j 200µm; e, f 50 µm; b, c, h, i, k, l 10 µm.



Şekil 4. iNOS ve Casp3 immunohistokimyasal boyaması.

Siyah ok: iNOS (+) hücreler. Kırmızı ok: Casp3 (+) hücreler.



Şekil 5. iNOS ve Casp3 immunohistokimyasal boyaması H-skor analizi.

Veriler ortalama ± SD şeklinde gösterilmiştir. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.002$, *: $p < 0.033$. a: Kontrol grubuna göre anlamlı, b: POY grubuna göre anlamlı.

TARTIŞMA

Rejeneratif tıpta mezenkimal kök hücre uygulamalarının kullanıldığı alanlar her geçen gün artmaktadır. Son zamanlarda artan infertilite vakalarından dolayı üreme sistemi hastalıklarında da tedavisel bir yaklaşım olarak kök hücreler önerilmektedir. Bu amaçla da bu alanda yapılan deneysel ve klinik çalışmalar sürekli artmaktadır. POY kadın infertilitesine sebep olan ve aynı zamanda hastaların ve çiftlerin yaşam kalitesini etkileyen önemli bir hastalıktır ve MKH'ler POY içinde alternatif tedavi yöntemleri arasında değerlendirilmektedir. MKH çalışmaları ile ilgili artan bu popüleritenin en önemli sebebi de bu hücrelerin, kendini yenileme, hasarlı doku ve organları onarma kapasitelerinin oldukça yüksek olmasıdır²⁹. Aynı zamanda düşük immunojenik cevaplar oluşturmaları da bu hücreleri tercih sebebi yapmaktadır. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda ise kök hücre uygulamasının yararlı etkilerinin hücrelerin farklı bir hücreye farklılaşma kapasitelerinden ziyade trofik faktörleri salgılaya yeteneklerinden dolayı doku iyileşmesine katkı sağladığını ortaya koymuştur³⁰. MKH'ler onarım sürecinde salgıladıkları bu faktörler ile parakrin etkiler göstererek iyileşme sürecine katkı sağlamaktadır. Bu salgılanan faktörlerde hücre kültüründe koşullandırılmış besiyeri içerisinde bulunmaktadır. Koşullandırılmış besiyeri özellikle allojenik transplantasyonlarda karşılaşılan doku reddi ya da graft versus host hastalığı gibi durumlara karşı alternatif olarak avantajlar sunmaktadır^{31,32}. Bu çalışmamızda özellikle düşük immunojenite, yüksek

çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahip aynı zamanda erişim kolaylığı ve invaziv olmayan elde edilme metodlarından dolayı⁴ yağ doku mezenkimal kök hücrelerinin ve bu hücrelerin KB'nin deneysel POY modeli üzerindeki iyileştirici etkileri gösterildi.

Yapılan bu çalışma sonucunda POY modelinde azalmış folikül sayıları YDMKH ve KB uygulaması sonucu her iki grupta da artış göstermiştir. Sun ve ark. yaptıkları çalışmada POY oluşturdukları farelerde YDMKH uygulaması sonucunda primordiyal ve primer folikül sayılarında artış gözlemlenmişler ve bu artışı da YDMKH'lerin granüloza hücrelerinin apoptozunu azalttığını ve bu sayede sağlıklı foliküllerin sayısının arttığını bildirmişlerdir⁹. Zhang ve ark. da otoimmün olarak POY oluşturdukları farelere amniyotik epitel kaynaklı MKH ve bu hücrelerin KB' ni vermişlerdir. Çalışmanın sonucunda da primordiyal ve primer folikül sayılarında artış bulmuşlardır. Ancak MKH grubundaki artışın daha fazla olduğunu belirtmişlerdir³³. Bu çalışmamız sonucunda da KB uygulamasından sonra folikül sayılarındaki artış bir miktar daha az bulunmuştur, ancak YDMKH grubu ile arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Mohammed ve arkadaşları da bir çalışmalarında göbek kordonu MKH'lerini POY oluşturdukları farelere transplante ettiklerinde 7 gün sonra farelerin ovaryumlarındaki atretik folikül sayısının azaldığını ve bu azalmanın MKH'lerin AMH ve FSHR seviyesindeki artışı tetikleyerek gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir³⁴. Elde edilen bulgularımızdan birisi de POY grubu ovaryum dokusunda meydana gelen vakuolizasyon, foliküller hücre dejenerasyonları gibi doku hasarını gösteren dejenerasyonların YDMKH ve KB grubunda azaldığıdır.

Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında kemoterapi kaynaklı POY modeli farelerinde amniyotik epitel MKH'si ve KB uygulamalarında her iki grupta da histopatolojik bulguların düzeldiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar bu sonucun MKH'lerin ortama salgıladıkları hücre çoğalması, büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden TGF- β süper ailesi proteinlerinin parakrin etkileriyle ovaryumun normal fonksiyonelliğini geri kazanabilmesin de etkili olduğunu bildirmişlerdir³⁵. Çalışmamız hem YDMKH ve KB'nin folikül sayılarındaki bu artışı ve genel olarak ovaryum dokusundaki iyileşmeyi salgılanan büyüme faktörleri, anti-inflamatuar sitokinler ve proliferatif sitokinler aracılığıyla yaptığını düşündürmektedir.

Yapılan çalışmamızda oksidatif stres belirteci olarak ovaryum dokusundaki iNOS ekspresyonuna bakıldı ve POY grubunda artmış olan iNOS immunoreaktivitesi YDMKH ve KB uygulaması sonucu anlamlı şekilde azaldı. Literatür taramalarında YDMKH ve KB'nin POY'da oksidatif stres üzerine etkilerini bildiren çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu yüzden çalışmamızda ilk defa YDMKH ve KB'nin POY'da oksidatif stresi azalttığı ve hücre grubu ile KB ortamı kıyaslandığında da her iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bu durumda KB ortamının da nerdeyse hücrelerin kendisi kadar etkili olduğu düşünülmektedir. Ding ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında POY'lu farelere uyguladıkları insan plasantal mezenkimal kök hücreleri (İPMKH) ve bu hücrelerden elde edilmiş KB'ni farelere verdiklerinde oksidatif stresin azaldığını ve bu durumda İPMKH ve KB'nin oksidatif stres inhibitörü NRF-2'nin ve HO-1'in ekspresyonunu arttırarak ve PTEN ekspresyonunu inhibe ederek sağladığını ortaya koymuşlardır³⁶. Yapılan farklı çalışmalarda da bu hücrelerin salgıladıkları TGFβ, IL-6 ve IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinler gösterilmiştir³⁷. Sonuç olarak çalışmamızda hem hücre hemde KB gurubunda azalmış iNOS ekspresyonun hücrelerin salgıladıkları bu anti-inflamatuar sitokinler kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda apoptozun efektör enzimi Casp3 miktarı da değerlendirilmiştir. POY'da temel mekanizmalardan biri özellikle granüloza hücrelerinde ve oositte görülen artmış apoptozdur. Apoptozun engellenebilmesi ya da azaltılabilmesi hastalığın geri dönüşümsüz olarak infertiliteyi tetiklemesinin önüne geçilmesini sağlayabilecektir. Elde ettiğimiz veriler sonucunda POY grubunda artmış olan Casp3 ekspresyonu YDMKH ve koşullandırılmış besiyeri grubunda anlamlı olarak azalmıştır. Literatürde sadece YDMKH ve KB'in POY'da apoptoz üzerine etkisini gösteren az miktarda çalışmaya rastlanmıştır. Sun ve arkadaşları POY'lu farelere YDMKH verdiklerinde, Tunnel metodu ile apoptozdaki azalmayı gözlemlemişlerdir⁹. Başka bir araştırmacı grubu ise POY'lu farelere YDMKH'leri skafoldlar ile verdiklerinde Casp3 ekspresyonlarında anlamlı düşüş gözlemlemişlerdir³⁸. Farklı bir çalışmada ise YDMKH'lerinden eksozomları izole eden araştırmacılar POY'lu farelere bu eksozomları verdiklerinde onlarda Casp3 ekspresyonundaki azalmayı bildirmişlerdir³⁹. Yaptığımız çalışmamızda literatüre benzer şekilde hem hücre grubunda hem de hücresiz KB grubunda

azalmış olan Casp3 ekspresyonun en önemli sebebinin bu hücrelerin salgıladıkları antiapoptotik faktörler olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda YDMKH ve KB'nin POY üzerindeki antiapoptotik ve antioksidan özellikleri gösterilmiş oldu. Hücresiz KB'nin de neredeyse hücrelerin kendisi kadar etkili olmasının sebebi aslında kök hücrelerin doku rejenerasyonunu sadece ihtiyaç duyulan hücre tipine farklılaşarak değil, salgıladıkları faktörlerin etkisiyle sağlamasıdır. Geliştirilecek moleküler çalışmalar ile de bu sonuçların desteklenmesi POY tedavisi için hem kök hücrelerin hem de koşullu besiyerinin hastalar bir umut olması düşünülmektedir.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: BŞH, MİT; Veri toplama: BŞH; Veri analizi ve yorumlama: BŞH, MİT; Yazı taslağı: BŞH; İçeriğin eleştirel incelenmesi: MİT; Son onay ve sorumluluk: BŞH, MİT; Teknik ve malzeme desteği: BŞH, MİT; Süpervizyon: BŞH, MİT; Fon sağlama (mevcut ise): MİT.

Etik Onay: Bu çalışma için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 13/03/2018, 77.637.435 no ile etik onay alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2019-021 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Author Contributions: Concept/Design : BŞH, MİT; Data acquisition: BŞH; Data analysis and interpretation: BŞH, MİT; Drafting manuscript: BŞH; NÖM; Critical revision of manuscript: MİT; Final approval and accountability: BŞH, MİT; Technical or material support: BŞH, MİT; Supervision: BŞH, MİT; Securing funding (if available): MİT.

Ethical Approval: For this study, ethical approval was received from Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine Animal Experiments Local Ethics Committee (date: 13.03.2018 and numbered 77.637.435).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by the Scientific Research Projects Coordination Unit of Manisa Celal Bayar University with the project numbered 2019-021.

KAYNAKLAR

1. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6:2173-85.
2. Esfandyari S, Chugh RM, Park H-s, Hobeika E, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal stem cells as a bio organ for treatment of female infertility. *Cells.* 2020;9:2253.
3. Fazeli Z, Abedindo A, Omrani MD, Ghaderian SMH. Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy for recovery of fertility: a systematic review. *Stem Cell Rev Rep.* 2018;14:1-12.
4. Frese L, Dijkman PE, Hoerstrup SP. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfus Med Hemother.* 2016;43:268-74.
5. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL et al. Stromal cells from the adipose

- tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15:641-8.
6. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24:150-4.
 7. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*. 2007;100:1249-60.
 8. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*. 2008;26:664-75.
 9. Sun M, Wang S, Li Y, Yu L, Gu F, Wang C, et al. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:80.
 10. Bogatcheva N, Coleman M. Conditioned medium of mesenchymal stromal cells: a new class of therapeutics. *Biochemistry (Moscow)*. 2019;84:1375-89.
 11. Kim HO, Choi S-M, Kim H-S. Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. *Tissue Eng Regen Med*. 2013;10:93-101.
 12. Park B-S, Kim W-S, Choi J-S, Kim H-K, Won J-H, Ohkubo F, et al. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomed Res*. 2010;31:27-34.
 13. Di Santo S, Yang Z, von Ballmoos MW, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I et al. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One*. 2009;4:e5643.
 14. Mirabella T, Cilli M, Carlone S, Cancedda R, Gentili C. Amniotic liquid derived stem cells as reservoir of secreted angiogenic factors capable of stimulating neo-arteriogenesis in an ischemic model. *Biomaterials*. 2011;32:3689-99.
 15. Mishra PJ, Mishra PJ, Banerjee D. Cell-free derivatives from mesenchymal stem cells are effective in wound therapy. *World J Stem Cells*. 2012;4:35.
 16. ESHRE. Management of Women with Premature Ovarian Insufficiency. Belgium, ESHRE, 2015.
 17. Santoro NF, Cooper AR. Primary Ovarian Insufficiency: a Clinical Guide to Early Menopause: New York, Springer, 2016.
 18. Shelling AN. Premature ovarian failure. *Reproduction*. 2010;140:633-41.
 19. Meior D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update*. 2001;7:535-43.
 20. Byrne J, Fears TR, Gail MH, Pee D, Connelly RR, Austin DF, et al. Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166:788-93.
 21. Hao X, Anastácio A, Liu K, Rodriguez-Wallberg KA. Ovarian follicle depletion induced by chemotherapy and the investigational stages of potential fertility-protective treatments-a review. *Int J Mol Sci*. 2019;20:4720.
 22. Jeelani R, Khan SN, Shaeb F, Kohan-Ghadr H-R, Aldhaferi SR, Najafi T, et al. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. *Free Radic Biol Med*. 2017;110:11-8.
 23. Szymanska KJ, Tan X, Oktay K. Unraveling the mechanisms of chemotherapy-induced damage to human primordial follicle reserve: road to developing therapeutics for fertility preservation and reversing ovarian aging. *Mol Hum Reprod*. 2020;26:553-66.
 24. Sullivan SD, Sarrel PM, Nelson LM. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause. *Fertil Steril*. 2016;106:1588-99.
 25. Chen L, Guo S, Wei C, Li H, Wang H, Xu Y. Effect of stem cell transplantation of premature ovarian failure in animal models and patients: A meta-analysis and case report. *Exp Ther Med*. 2018;15:4105-18.
 26. Kasap B, Kasap Ş, Vatanserver S, Kendirci R, Yılmaz O, Çalısır M, et al. Effects of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells on vaginal atrophy in a rat menopause model. *Gene*. 2019;711:143937.
 27. Brini AT, Amodeo G, Ferreira LM, Milani A, Niada S, Moschetti G et al. Therapeutic effect of human adipose-derived stem cells and their secretome in experimental diabetic pain. *Sci Rep*. 2017;7:9904.
 28. Halıcıoğlu BŞ. Farklı deneysel prematür over yetmezliği modellerinde kök hücre tedavisinin etkinliği (Doktora tezi). Manisa, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, 2020.
 29. Ntege EH, Sunami H, Shimizu Y. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. *Regenerative Therapy*. 2020;14:136-53.
 30. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int*. 2014;2014:965849.
 31. Kichenbrand C, Velot E, Menu P, Moby V. Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy. *Tissue Eng Part B Rev*. 2019;25:78-88.
 32. Vacková I, Kubinová S. Stem cell conditioned medium for cell-free therapies. *Cesk Fysiol*. 2016;65:25-31.
 33. Zhang Q, Huang Y, Sun J, Gu T, Shao X, Lai D. Immunomodulatory effect of human amniotic epithelial cells on restoration of ovarian function in mice with autoimmune ovarian disease. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2019;51:845-55.

34. Mohamed SA, Shalaby S, Brakta S, Elam L, Elsharoud A, Al-Hendy A. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells as an infertility treatment for chemotherapy induced premature ovarian insufficiency. *Biomedicines*. 2019;7:7.
35. Zhang Q, Bu S, Sun J, Xu M, Yao X, He K, et al. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8:270.
36. Ding C, Zou Q, Wu Y, Lu J, Qian C, Li H et al. EGF released from human placental mesenchymal stem cells improves premature ovarian insufficiency via NRF2/HO-1 activation. *Aging (Albany NY)*. 2020;12:2992-3009.
37. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S et al. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *J Biomed Biotechnol*. 2012;295167:1-8.
38. Su J, Ding L, Cheng J, Yang J, Li Xa, Yan G et al. Transplantation of adipose-derived stem cells combined with collagen scaffolds restores ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2016;31:1075-86.
39. Huang B, Lu J, Ding C, Zou Q, Wang W, Li H. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of premature ovarian insufficiency by targeting SMAD. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:1-12.