

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE KOŞULLANDIRILMIŞ BESİYERİNİN OVARYUM HASARI ÜZERİNDEKİ TEDAVİ EDİCİ ETKİLERİ

THERAPEUTIC EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELL AND CONDITIONED MEDIUM ON OVARIAN DAMAGE

Burak ÜN¹, Meryem AKPOLAT FERAH², Büşra ÇETİNKAYA ÜN²

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi Adana Şehir Eğitim ve Arş. Hastanesi, Kadın Hast. ve Doğum A.D., Adana, Türkiye
²Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D., Zonguldak, Türkiye

Cite this article as: Ün B, Akpolat Ferah M, Çetinkaya Ün B. Therapeutic Effects Of Mesenchymal Stem Cell And Conditioned Medium On Ovarian Damage. Med J SDU 2021; 28(1): 179-185.

Öz

Yapılan pek çok yeni çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin (MSC) farklı hastalık modellerinde terapötik etkileri gösterilmiştir. İnfertilite, yaygınlığı yüksek küresel bir hastalık olup erkek faktörü, azalmış over rezervi, ovulatuvar faktör, tubal faktör, uterin faktör, pelvik faktör ve açıklanamayan infertilite nedeniyle ortaya çıkabilir. MSC'lerin, farklılaşma kapasiteleri ve parakrin etki özellikleri nedeniyle, ovaryan yetmezlik tedavisindeki etkilerini belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Araştırmalarda farklı kaynaklardan elde edilen MSC'lerin germ hücrelerine farklılaşma kapasiteleri in vitro'da belirlenirken over nişi üzerindeki etkileri MSC'lerin transplantasyonu ile belirlenmiştir. Bu derlemede, ovaryum hasarına bağlı gelişen ovaryan yetmezlik sebeplerini ele alarak, MSC'lerin ve koşullandırılmış besiyerinin ovaryum hasarı üzerindeki terapötik etkilerini belirlemek için mevcut çalışmaları özetledik.

Anahtar Kelimeler Kadın İnfertilitesi, Ovaryum Hasarı, Prematür Ovaryan Yetmezlik, Mezenkimal Kök Hücre, Koşullandırılmış Besiyeri

Abstract

Many recent studies have demonstrated the therapeutic effects of mesenchymal stem cells (MSC) in different disease models. Infertility is a global disease with high prevalence and may be caused by male factor, decreased ovarian reserve, ovulatory factor, tubal factor, uterine factor, pelvic factor and unexplained infertility. Many studies have been conducted to determine the effects of MSCs in the treatment of ovarian insufficiency due to their differentiation capacity and paracrine effects. The differentiation capacities of MSCs obtained from different sources to germ cells were determined in vitro and their effects on ovarian niche were determined by transplantation of MSCs. In this review, we discuss the causes of ovarian insufficiency due to ovarian damage and summarize the current studies to determine the therapeutic effects of MSCs and conditioned media on ovarian damage.

Keywords: Female Infertility, Ovarian Damage, Premature Ovarian Failure, Mesenchymal Stem Cell, Conditioned Medium

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: burakun81@gmail.com

Müracaat tarihi/Application Date: 04.12.2019 • Kabul tarihi/Accepted Date: 21.05.2020

ORCID IDs of the authors: B. Ü. 0000-0002-8885-7062; M.A.F. 0000-0002-3419-1728;

B.Ç.Ü. 0000-0001-9466-4278

Giriş

İnfertilite bir yıl süre ile korunmasız cinsel birliktelik olmasına rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır. Korunmasız düzenli cinsel birlikle birlikte bir yılın sonunda çiftlerin % 90'ı gebelik elde etmektedir (1, 2). Gebelik planlanmasından sonra bir yıldan daha uzun sürede gebelik elde edilmesi ise subfertilite olarak adlandırılmaktadır (2). Fekundabilite siklus başına elde edilen gebelik olasılığı, fekundite ise bir siklus sonrası canlı doğum elde etme olasılığı olarak tanımlanır. Sterilite ise spontan gebelik elde edilme olasılığının bulunmadığı durumları tanımlamaktadır (1, 3, 4).

ABD'de çiftlerin % 20'si yaşamları boyunca infertilite sorunu ile karşılaşmaktadır ve infertilite prevalansı %7,4 civarındadır (5). Tüm dünyada ise üreme çağındaki çiftlerin %8-12'sinin infertil olduğu düşünülmektedir (6). Yaşla birlikte oosit kalitesinde azalma meydana gelip folliküler atrezide artış olmakta ve over rezervi azalmaktadır (7). Korunmasız birliktelik sonrası çocuk sahibi olamayan kadınların oranı 20-24 yaş arası %6, 25-29 yaş arası %9, 30-34 yaş arası %15, 35-39 yaş arası %30 ve 40-44 yaş arası %64'dür (8).

İnfertilitenin temel nedenleri; erkek faktörü, azalmış over rezervi, ovulatuvar faktör, tubal faktör, uterin faktör, pelvik faktör ve açıklanamayan infertilitedir. İnfertil olgularda % 15-20 ovulasyon bozukluğu, % 30-40 pelvik faktör, % 30-40 erkek faktörü mevcuttur. İnfertil çiftlerin % 20-30'unda herhangi bir neden ortaya koyulamamış olup açıklanamayan infertilite olarak tanımlanmıştır (9, 10).

Over Rezervi ve Azalmış Over Rezervi

Kadın reproduktif yaşlanması, genel kabul edilen teoriye göre oositlerin sayısı ve kalite olarak azalması ve yenilenmemesi sürecidir. Embriyoda 3. hafta sonunda vitellus kesesi duvarında beliren primordial germ hücreleri buradan göç ederek 5. hafta başında gonad taslaklarına ulaşır ve bölünerek oogoniumlara dönüşürler. Sayıları intrauterin yaşamın 5. ayında 7 milyona ulaşır. Gebeliğin 7. ayında oogoniumların çoğu primer oositlere dönüşmüş olsa da primer oositlerin çoğu da programlanmış hücre ölümü ile atreziye uğrar ve oosit sayısı azalır. Böylece pubertede overlerde yaklaşık 300,000 oosit bulunmaktadır. Overlerin primer fonksiyonu fertilizasyon yeteneğine sahip matür oosit üretmektir. Over rezervi tanınması herhangi bir yaşta, menstrüel siklusun folliküler fazının geç döneminde dominant follikül oluşumunu sağlayabilecek oositlerin miktar ve kalitesini belirtmek için kullanılmaktadır. Azalmış over rezervi bulunan kadınların çoğunda regüler mens görülmekte

olup, ovaryan follikül sayısının azaldığı belirlenmiştir. Bu duruma bağlı olarak infertilite tedavisinde ovaryan stimülasyona yanıtta kısıtlı cevap ve azalmış fekundite saptanmıştır. Yaşa bağlı infertilite canlı oosit kaybı ile yakından ilişki göstermektedir. Dominant olmayan folliküllerin atrezisinin devam etmesi kadının üreme yaşamı süresince devam eder (11-15). Yaşlanma ile beraber kalan oositlerde genetik anomali riski ve mitokondriyal delesyon riski belirgin olarak artmıştır. Bu faktörler gebelik oranlarının azalmasına, hem spontan hem de tedavi sikluslarındaki gebelik kaybı oranlarının artışına neden olmaktadır. Düşük over rezervinin genel göstergesi IVF sikluslarında 3-5 follikülden daha az follikül gelişmesi olarak tanımlanabilir. İleri üreme yaşı (35 yaş üstü), ailesel erken menapoz öyküsü, genetik hastalıklar (örn. 45X mozaizizm), FMR1 premütasyonu (Frajil X), over zedelenmesi yaratan durumlar (örn. endometriozis, pelvik enfeksiyon), geçirilmiş over cerrahisi (örn. endometrioma ameliyatı), ooferektomi, kanser sebebiyle gonadotoksik tedavi ve pelvik radyasyon öyküsü, gonadotoksik tedavi öyküsü ve sigara gibi sebepler over rezervinde azalma için risk faktörleridir (11, 15-18).

Prematür Ovaryan Yetmezlik

Prematür ovaryan yetmezlik (POF) ya da primer over yetmezliği (POI), ilk kez 1942 yılında Fuller Albright tarafından 40 yaşından genç kadınlardaki hipergonadotropik hipogonadizm olarak tariflenmiştir. 40 yaşın altındaki bir kadında dört ay ya da daha uzun süre ile amenorenin görülmesi ve iki farklı ara ile ölçülen follikül stimülan hormon (FSH) düzeyinin menapozal aralıkta olması (FSH> 40 mIU/L) olarak tanımlanmaktadır. Hipergonadizm ve kandaki seks steroidlerinin seviyesinin düşmesi ile birlikte gelişen fizyolojik ve psikolojik problemler eşik etmektedir. Ovaryan yetmezlik folliküler rezervde azalma ve hızlanmış folliküler atrezi sonucu oluşabilmektedir (19, 20).

Prematür ovaryan yetmezlik (POF); kromozomal etiyoloji (ör. Turner sendromu), FMR1 premütasyonu (Frajil X taşıyıcılığı), enfeksiyonlar (Kabakulak, HIV, CMV), otoimmün lenfositik ooforit, galaktozemi, Perrault sendromu gibi sebeplere bağlı olarak oluşabilmektedir. Vakaların %80-90'lık kısmını ise iyatrojenik nedenler oluşturmaktadır. İyatrojenik nedenlerden biri olan pelvik cerrahi, ovaryan kanlanmayı bozup inflamasyona sebep olarak ya da doğrudan follikül kaybına neden olarak POF'a yol açabilmektedir. İyatrojenik nedenler arasında POF'a en sık sebep olanlar ise radyoterapi ve kemoterapidir. 6 Gy üzerindeki radyasyon dozunda POF oluşabilmekte, 8 Gy üzerindeki dozlarda ise sterilite gelişmektedir. Siklofosamid gibi alkilleyici kemoterapotikler, bölünmeyen oositleri ve primordiyal follikülleri etkileyerek POF'a

neden olabilmektedir (21, 22).

POF olan kadınlarda infertilite yaygın olup yalnızca %5-10 oranındaki kısmi gebe kalabilmektedir (23). POF gelişme riski olan hastalarda oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu gibi YÜT (Yardımlı üreme teknikleri) kullanılmaktadır. Fakat POF geliştikten sonra kullanılabilir yöntemler sınırlıdır. Günümüzde POF hastalarında en yüksek gebelik olasılığı oosit donasyonu ile sağlanabilmektedir. Ülkemiz dahil çoğu ülkede yasal olmadığı için uygulama olanağı yoktur (24, 25). Kök hücre tedavisinde ilerlemeler ve bu konuda yapılan çalışmalar, kök hücre ve kök hücre koşullandırılmış besiyerinin bu hastalar için yeni bir tedavi seçeneği olacağı yönündedir (26, 27).

Mezenkimal Kök Hücreler ve Koşullandırılmış Besiyeri

21.yüzyılda, kök hücre teknolojisi geliştikçe rejeneratif tıpla ilgili umut da gün geçtikçe artmaktadır. Kök hücrelerin özellikleri tanımlandıkça, kök hücrelerin çeşitli doku tiplerine farklılaşabileceği gösterilmektedir (28). Hastalık, hasar ya da yaşlanma gibi durumlardan sonra zarar gören hücrelerin, dokuların veya yapıların yenilenmesi rejeneratif tıbbın hedefidir. Günümüzde yapılan çalışmalarda ise, kök hücre biyolojisi yardımıyla embriyonik gelişme ve doku restorasyonu anlaşılmasına çalışılmaktadır (29-32). Kök hücreler, kendilerine has sinyaller ile uzun süre çoğalabilen, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen eşsiz hücrelerdir (33). Kök hücreler, ana hücrenin karakteristik özelliklerini koruyarak simetrik hücre bölünmesiyle çoğalabilirler. Bunun yanı sıra, asimetrik bölünmeyle farklı dokulara ait öncü hücrelere farklılaşabilirler (34).

Friedenstein ve ark. farede kemik iliği stromasını başka dokuya transplante ettiklerinde kemik, yağ, kıkırdak gibi hücrelere farklılaşabileceğini göstermişlerdir (35). Böylece kemik iliğinde hematopoetik olmayan başka öncü hücrelerin bulunduğu belirtilmiştir ve bu hücrelerin fibroblastların öncüsü oldukları rapor edilmiştir (36). Bu hücrelerin farklı hücre serilerine dönüşebilmeleri (multipotensi) ve kendilerini yenilemeleri nedeniyle bu hücreler mezenkimal kök hücreler (MSC) olarak tanımlanırlar (37, 38). MSC'ler heterojen oldukları için tanımlanmalarında spesifik hücre yüzey belirteçleri tek başına yeterli değildir. Bunun yerine, MSC'lerin fonksiyonel özellikleri, çeşitli hücrelere farklılaşması ve fenotipik karakterlerinin kombinasyonu ile tanımlanırlar (39). Hücrelerin MSC olarak değerlendirilmesi için hücre popülasyonunun minimal kriterleri şunlardır: (1) İzole edilen hücrelerin plastiğe yapışma özelliği olması, (2) CD105, CD73 ve CD90 gibi hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonunun %95'ten fazla olması, (3) CD34, CD45, CD14, Cd11b, CD79α ya da CD19 ve HLA-DR

belirteçlerinin ekspresyonlarının çok düşük olması veya olmaması, (4) MSC'lerin kemik, yağ ve kıkırdak gibi hücrelere farklılaşmaları gerekmektedir (40).

MSC'ler genellikle kemik iliğinden izole edilmelerine rağmen, adipoz doku, göbek kordonu, periosteum, iskelet kası, plasenta, diş, perisit, trabeküler kemik, artiküler kıkırdak, karaciğer ve timus ya da diğer pek çok dokudan da elde edilebilirler (41, 42).

MSC'ler kemik iliğinde sadece %0,01-0,1 oranında bulunurlar (43). MSC'ler fibroblastik morfolojiye sahiptirler ve iğsi yapıdadır. MSC'ler izole edildikten sonra çoğalmaları için genellikle serum ile desteklenen besiyerleri kullanılır ve bu hücrelerin farklılaşmaları için büyüme faktörleri ilave edilebilir (44). Uzun-sürekli göç ve immün cevabın başlamasından sonra bile bu hücreler çeşitli dokulara yerleşebilirler. MSC'ler, doku hasarından sonra salınan faktörlerin aracılığıyla hasarlı bölgeye göç edebilirler. MSC'lerin rejeneratif tıp için yüksek potansiyele sahip olmasıyla terapötik değerleri artmaktadır (45).

Yapılan çalışmalarda, transplante edilen kök hücreler tarafından salınan büyüme faktörleri ve sitokinlerin parakrin aktivitesi kök hücrelerin terapötik potansiyelini açıklamaktadır (46, 47). Çalışmalar, dejeneratif hastalıklarda kök hücrelerin yararlı etkilerini trofik faktörler salgılama yetenekleriyle hasar gören dokular üzerinde gösterebildiklerini belirlemiştir. Farklı çalışmalar, kök hücreler tarafından salınan faktörlerin hasarlı dokuları yenileyebildiğini göstermiştir (48). Sekretom olarak adlandırılan kök hücrelerin kültüre edildiği besiyerinde salınan faktörler bulunmaktadır ve bu besiyerine koşullandırılmış besiyeri denilmektedir. Hepatosit büyüme faktör (HGF), folikül matürasyonunu sağlayan ve over folülleri ve granuloza hücrelerinde apoptozu baskılayan bir sitokindir (49). Diğer bir büyüme faktörü olan temel fibroblastik büyüme faktör (bFGF) ise primordiyal folikül gelişimini indükleyen folikülogenez başlatıcı olarak rol oynar (50). Diğer çalışmalar da kök hücrelerin bu sitokinleri ve büyüme faktörlerini kendi koşullandırılmış besiyerlerine salgıladığını göstermişlerdir. Sekretom içeren koşullandırılmış kök hücre besiyerinin; paketlenilebilir olması, dondurularak uzun süre saklanabilir olması, daha kolay transport edilmesi ve donör-alıcı eşleşmesine gerek olmaması gibi birçok avantajı vardır (51, 52). Ovaryan hasar over rezerv kapasitesinde azalma olarak tanımlanmaktadır. Azalmış over rezervi, folikül ve oositlerin sayı ve kalitesinde azalma olarak tanımlanmaktadır. Klinikte over rezerv kapasitesinin değerlendirilmesi POF'un erken tespiti, fertilite potansiyelinin tahmini ve menapoz yaşı için büyük önem taşımaktadır (53, 54).

Ovaryum Hasarında MSC ve Koşullandırılmış Besiyeri Terapisi

Yapılan bir çalışmada hasarlı ovaryumların yeniden aktif olma durumu araştırılmıştır. Bunun için öncelikle antikanser ajanı olan siklofosamid (CTX) kullanılarak ovaryum hasar modeli oluşturulmuştur. Daha sonra adipoz türevli MSC'lerin (AD-MSC'ler) ovaryum fonksiyonu üzerindeki restoratif etkileri araştırılmıştır. MSC'lerin, anjiyogenez indükleyebildiği ve ovaryumdaki azalan foliküllerin ve korpus luteum'un sayısını arttırdığı gösterilmiştir. MSC transplante edilen hayvanlarda bir deformasyon, tümör oluşumu veya ölüm gözlenmemiştir. AD-MSC'lerin fibroblast hücrelerinden daha yüksek seviyelerde vasküler endotelial hücre büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) salgıladığını ortaya koyulmuştur ve AD-MSC transplantasyonundan sonra CTX ile tedavi edilen yumurtalıklarda yüksek VEGF, IGF-1 ve HGF ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Bu bulgular, MSC'lerin zarar görmüş over fonksiyonunu geri kazanmada bir rolü olabileceğini ve rejeneratif tıp için faydalı olabileceğini göstermektedir (55).

İnsan amniyotik sıvı kök hücreleri (hAFC'ler) ise çoklu hücre soylarına farklılaşabilmektedirler ve böylece rejeneratif tıp için bir donör hücre kaynağı olma potansiyeline sahip oldukları belirtilmiştir (56). hAFC'lerin germ hücresi ve oosit benzeri hücelere farklılaşma yetenekleri daha önce belgelenmiştir. İnsan amniyotik sıvısı, amniyosentez yoluyla elde edilmiştir. Elde edilen bir hücre hattına, lentivirüs-GFP ile transfekte edilmiş ve mezenkimal hücrelerin morfolojik özelliklerini sergileyen klon hücreler çoğaltılmıştır. CTX ve busulfan'ın intraperitoneal enjeksiyonu ile sterilize edilen farelerin ovaryumlarına hücre enjeksiyonunu takiben ovaryum morfolojisi restore olmuştur ve gelişimin her aşamasında birçok folikül içeren oosit belirlenmiştir. GFP ile etiketlenen kök hücrelerin hayatta kaldığını ve bu hücrelerin oosit olgunlaşmasını sağlayan granüloza hücrelerine farklılaştığını gösterilmiştir (56).

İmmünojenik olarak zayıf karakterde olan ve kuvvetli immünosüpresif aktiviteye sahip olan MSC'ler, çeşitli hastalıkların tedavisi için ümit verici hücreler terapötik olarak ortaya çıkmıştır. Wharton jelinden elde edilen göbek kordonu matriks kök hücreleri (UCMSC'ler) denilen mezenkimal benzeri hücrelerin, sitokinler ve büyüme faktörleri salgıladıkları bildirilmektedir. POF tedavisi için kullanılan UCMSC'ler, transplante edildikten sonra, ovaryum hasarı modelinde cumulus hücrelerinin apoptozisinin azaldığı ve over fonksiyonunun düzeldiği rapor edilmiştir. Böylece, UCMSC'lerin over fonksiyonelliğinin etkili bir şekilde geri kazandırabileceği ve granüloza hücrelerinin apoptozisini azalta-

bileceğini göstermektedir (57).

Deriden türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (SMSC'ler), üç embriyonik germ katmanına farklılaşabilme özelliklerinden dolayı doku tedavisinde kullanılması için yeni bir kaynak olarak görülmektedir. Son araştırmalar, deriden türetilen kök hücrelerin, in vitro germ hücreli spesifik belirteçlerini ekspres eden hücelere farklılaştırabildiğini ve in vivo oositler oluşturabildiğini göstermiştir. SMSC'lerin, hasarlı ovaryumu yeniden aktive etme kabiliyetini belirlemek için, busulfan ve CTX aracılığıyla zarar görmüş ovaryum hasarına sahip bir fare modeli geliştirilmiştir ve burada tarif edilmiştir. Ovaryum hasar modeli oluşturulan farelere SMSC'ler uygulandıktan sonra, gerçek zamanlı PCR ile TNF α , TGF- β , IL-8, IL-6, IL-1 β ve IFN γ gibi pro-enflamatuar sitokinlerin ekspresyon seviyelerinin azaldığı gözlenirken, bu gözlem ile tutarlı olarak, SMSC ile tedavi edilen farelerin ovaryumlarında oogenez belirteç genleri olan Nobox, Nanos3 ve Lhx8 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Böylece, SMSC'lerin hasarlı ovaryumun işlevini geri kazanmada bir rol oynayabileceğini göstermektedir (58).

Kemoterapi alan genç kadın hastalar sıklıkla POF ile karşı karşıya kalmaktadır. Menstrüel kaynaklı kök hücrelerin (MenSC'ler) ise mezenkimal kök hücre benzeri özellikleri sergilemesinin kolay olduğu belirtilmiştir. Bu yüzden, MenSC'ler doku onarımı için kullanılabilecek yeni bir kök hücre kaynağı olarak gösterilmektedir. Wang ve ekibinin yaptığı çalışmada, sisplatin enjeksiyonuyla POF fare modeli oluşturulmuş ve daha sonra MenSC'ler veya MenSC türevli koşullandırılmış ortam (Koşullandırılmış besiyeri-CM) kuyruk veni yoluyla enjekte edilmiştir. 7 veya 21 günlük tedaviden sonra MenSC transplantasyonunun, granüloza hücrelerinde apoptozu ve ovaryan interstitium fibrozunu azaltarak ovaryum nişini iyileştirebildiği gösterilmiştir. Ayrıca foliküllerin sayılarını arttırdığı ve cinsiyet hormonu seviyelerini normal değerlere döndürdüğü rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra MenSC'ler ve CM, kısmen FGF2 salgılayarak ovarum hasarı üzerinde koruyucu etki yaptığı belirtilmiştir (59). Yapılan bir çalışmada, sıçanlara kemoterapötik ajan olan Siklofosamid uygulanmış ve ovaryum hasarı meydana gelmiştir. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler (BM-MSC) ve bu hücrelerin koşullandırılmış besiyeri Siklofosamid ile hasarlanan ovaryumlara direkt olarak enjekte edilmiştir. BM-MSC'lerin onarıcı etkisi saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, BM-MSC'lerin etkisi ile koşullandırılmış besiyerinin etkisi karşılaştırıldığında her ikisinin de iyileştirici, onarıcı etkisinin olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir (60).

İnsan amniyotik epitel hücreleri (hAEC'ler), işlevini yerine getiremeyen hücrelerle yer değiştirme potansiyeli olan ve hasar sonrası fonksiyonel iyileşmeyi sağlayabilen, rejeneratif tıp için önemli adaylardır. Önceki çalışmalar, hAEC'lerin transplantasyonunun, POF/POI hayvan modellerinde granüloza hücrelerinin apoptozunu inhibe ederek kemoterapinin neden olduğu ovaryum hasarını etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir (61, 62). hAEC'lerin salgıladığı sitokinlerin, kemoterapiye bağlı ovaryum hasarındaki etkilerinin araştırılması için POF/POI modeli oluşturulan farelerin ovaryumuna hAEC'ler veya hAEC kültür besiyeri (hAEC-CM) enjekte edilmiştir. Ayrıca hAEC'lerden elde edilmiş serumsuz besiyerinde 507 insan sitokinin olduğu belirlenirken hAEC-CM'deki 109 sitokinin, apoptoz, anjiyogenez, hücre döngüsü ve immün yanıt gibi çeşitli biyolojik işlemlere katılabileceğini göstermiştir. hAEC'ler veya hAEC-CM ile tedavi edilen ovaryumlarda sağlıklı ve olgun foliküllerin varlığı gözlemlenirken, tedavi edilmemiş yumurtalıklarında ise ciddi fibroz ve birçok atretik folikül bulunmuştur. Bu bulgular, POF / POI hayvan modellerinde hAEC aracılı over fonksiyonunun geri kazanımı sürecinde parakrin etkisinin kilit bir rol oynayabileceği gösterilmiştir (62).

Zhang ve ekibinin yaptığı çalışmada ise, otoimmün ilaca bağlı POF modelinde insan plasenta mezenkimal kök hücrelerin (hPMSC) over rezerv kapasitesi üzerindeki mekanizmalarını incelemek amacıyla, hPMSC'lerin granüloza hücre apoptozu ve anti-Müllerian hormon (AMH) ve folikül uyarıcı hormon reseptörü (FSHR) ekspresyonu üzerindeki etkisi belirlenmiştir. POF fare modeli, zona pellucida 3 peptidi (pZP3) enjeksiyonu ile oluşturulduktan sonra hPMSC transplantasyonu intravenöz enjeksiyonuyla yapılmış, ve FSH, LH, E2, AMH ve anti-zona pellucida antikörünün (AzpAb) serum seviyeleri ölçülmüştür. Sonuç olarak hPMSC transplantasyonundan sonra serum FSH, LH ve AzpAb seviyeleri önemli ölçüde azalırken, ancak E2 ve AMH seviyeleri önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Ayrıca granüloza hücreli apoptozun azaldığı gösterilmiştir. Böylece hPMSC transplantasyonu, foliküler gelişimi teşvik edebileceği, aşırı foliküler atrezi ve granüloza hücre apoptozunu inhibe edebileceği ve over rezerv kapasitesini artırabileceği rapor edilmiştir (63).

Günümüzde POF için etkili bir tedavinin olmaması nedeniyle insan amniyon kaynaklı mezenkimal kök hücreler (hAD-MSC'ler) rejeneratif tıp için ümit vermektedir. Bu yüzden, sıçanlarda hAD-MSC transplantasyonunun kemoterapiye bağlı POF üzerindeki etkilerini ve mekanizmalarının araştırılması için CTX ile sıçanlarda POF modeli oluşturulmuştur. Ayrıca hAD-MSC-besiyerinin (hAD-MSC-CM) etkisinin be-

lirlenmesi için de POF sıçanlarının her iki ovaryumuna enjekte edilmiştir. hAD-MSC transplantasyonu ile, POF sıçanlarında ovaryum hasarı ve ovaryum fonksiyon bozukluğu azalmıştır. hAD-MSC-CM enjeksiyonunun ise POF ovaryumlarının lokal mikro-ortamını iyileştirdiği, Bax ekspresyonunda bir düşüşe neden olduğu ve kemoterapi nedeniyle artan granuloza hücre apoptozunu, ovaryum hücrelerinde inhibe olan anjiyogenez engelleyerek Bcl-2 ve endojen VEGF ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (64).

Sonuç

Kadın infertilitesi ciddi bir sorundur ve tedavi için farklı yollar araştırılmaktadır. Bugün yardımcı üreme teknikleri (YÜT), çocuk sahibi olamayan çiftler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak ovaryum hasarı gibi bazı durumlarda YÜT yetersiz olabilmektedir. Araştırmalar rejeneratif tıpa odaklanmış olup kök hücre teknolojisinin gelişimi kadın infertilitesinin tedavisi için bir umut olarak görülmektedir. Pek çok kaynaktan alınan MSC'ler, hem çoğalma hem de farklılaşma potansiyelleri nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir. MSC'lerin hasar görmüş over fonksiyonunu geri kazanmada bir rolü olabileceğini ve rejeneratif tıp için faydalı olabileceğini göstermektedir. Bazı çalışmalar MSC'lerin deney hayvanlarına nakledildiğini ve ovaryum hasarını hafiflettiğini ve MSC'lerin ovaryumda granuloza hücrelerine farklılaşabileceğini gösterdi. Hasarlı bölgede MSC'lerin çoğalmasına ek olarak, MSC'lerin parakrin özellikleri de hasarlı dokuyu iyileştirebilmektedir. MSC'ler kemokinler, sitokinler, büyüme faktörlerini salgırlar ve bu faktörler ovaryum dokusunu etkileyerek follikül sayısını arttırmaktadır. Sonuç olarak, MSC'ler ve koşullandırılmış kök hücre besiyeri, kadın infertilitesi tedavisine yeni bir bakış açısı getirmiştir.

Kaynaklar

1. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ, Organization WH. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. 1993.
2. Gnath C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. Hum Reprod. 2005;20(5):1144-7.
3. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. Fertil Steril. 2003;79(3):577-84.
4. Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. Fertil Steril. 1996;65(3):503-9.
5. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Hum Reprod. 2007;22(6):1506-12.
6. Johnson JA, Tough S, Sogc Genetics C. Delayed child-bearing. J Obstet Gynaecol Can. 2012;34(1):80-93.

7. Hendershot GE, Mosher WD, Pratt WF. Infertility and age: an unresolved issue. *Fam Plann Perspect.* 1982;14(5):287-9.
8. Menken J, Trussell J, Larsen U. Age and infertility. *Science.* 1986;233(4771):1389-94.
9. Bradshaw K, Carr B. Modern diagnostic evaluation of the infertile couple. *Textbook of Reproductive Medicine East Norwalk, CT: Appleton & Lange.* 1993:443-52.
10. Ray A, Shah A, Gudi A, Homburg R. Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod Biomed Online.* 2012;24(6):591-602.
11. Hoffman BL, Schorge JO, Bradshaw KD, Halvorson LM, Schaffer JI, Corton MM. *Williams Gynecology, Third Edition: McGraw-Hill Education;* 2016.
12. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas : with Correlated Cell and Molecular Biology: Wolters Kluwer Health;* 2016.
13. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book: Elsevier Health Sciences; 2015.
14. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology E-Book: Elsevier Health Sciences;* 2015.
15. Committee on Gynecologic P. Committee opinion no. 618: Ovarian reserve testing. *Obstet Gynecol.* 2015;125(1):268-73.
16. Billig H, Chun S-Y, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Human reproduction update.* 1996;2(2):103-17.
17. Laml T, Schulz-Lobmeyr I, Obruca A, Huber J, Hartmann B. Premature ovarian failure: etiology and prospects. *Gynecological endocrinology.* 2000;14(4):292-302.
18. Amsterdam A, Dantes A, Selvaraj N, Aharoni D. Apoptosis in steroidogenic cells: structure-function analysis. *Steroids.* 1997;62(1):207-11.
19. Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 2009;360(6):606-14.
20. Albright F, Smith PH, Fraser R. A syndrome characterized by primary ovarian insufficiency and decreased stature: report of 11 cases with a digression on hormonal control of axillary and pubic hair. 1942.
21. Cooper AR, Baker VL, Sterling EW, Ryan ME, Woodruff TK, Nelson LM. The time is now for a new approach to primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2011;95(6):1890-7.
22. Rebar RW. Premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 2009;113(6):1355-63.
23. van Kasteren YM, Schoemaker J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Update.* 1999;5(5):483-92.
24. Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod.* 2010;25(9):2239-46.
25. Oktay K, Oktem O. Ovarian cryopreservation and transplantation for fertility preservation for medical indications: report of an ongoing experience. *Fertil Steril.* 2010;93(3):762-8.
26. Zhang C. The roles of different stem cells on premature ovarian failure. *Current stem cell research & therapy.* 2019.
27. Sheikhsari G, Aghebati-Maleki L, Nouri M, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. Current approaches for the treatment of premature ovarian failure with stem cell therapy. *Biomed Pharmacother.* 2018;102:254-62.
28. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol.* 1998;176(1):57-66.
29. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100 Suppl 1:11830-5.
30. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349-55.
31. Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science.* 2005;307(5717):1904-9.
32. Stocum DL. Tissue restoration through regenerative biology and medicine. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology.* 2004;176:III-VIII, 1-101, back cover.
33. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells.* 2001;19(3):193-204.
34. Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society.* 2001;9(6):429-42.
35. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology.* 1966;16(3):381-90.
36. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics.* 1970;3(4):393-403.
37. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 1991;9(5):641-50.
38. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-4.
39. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009;106(6):984-91.
40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
41. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):313-9.
42. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-95.
43. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
44. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568-84.
45. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001;226(6):507-20.
46. Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front Physiol.* 2012;3:359.
47. Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1834(11):2380-4.
48. Yang D, Wang W, Li L, Peng Y, Chen P, Huang H, et al. The relative contribution of paracrine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. *PLoS One.* 2013;8(3):e59020.
49. Fu X, He Y, Xie C, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy.* 2008;10(4):353-63.
50. Wang L, Ying YF, Ouyang YL, Wang JF, Xu J. VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(10):1301-11.
51. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int.* 2014;2014:965849.
52. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK, Kim BS. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther.* 2014;22(4):862-72.
53. Lutchman Singh K, Davies M, Chatterjee R. Fertility in female cancer survivors: pathophysiology, preservation and the role of

- ovarian reserve testing. *Hum Reprod Update*. 2005;11(1):69-89.
54. Boucret L, Chao de la Barca JM, Moriniere C, Desquiret V, Ferre-L'Hotellier V, Descamps P, et al. Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. *Hum Reprod*. 2015;30(7):1653-64.
 55. Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, Kuroda T, Yamadera R, Sano C, et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Lab Invest*. 2013;93(2):181-93.
 56. Lai D, Wang F, Chen Y, Wang L, Wang Y, Cheng W. Human amniotic fluid stem cells have a potential to recover ovarian function in mice with chemotherapy-induced sterility. *BMC Dev Biol*. 2013;13:34.
 57. Wang S, Yu L, Sun M, Mu S, Wang C, Wang D, et al. The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure. *Biomed Res Int*. 2013;2013:690491.
 58. Lai D, Wang F, Dong Z, Zhang Q. Skin-derived mesenchymal stem cells help restore function to ovaries in a premature ovarian failure mouse model. *PLoS One*. 2014;9(5):e98749.
 59. Wang Z, Wang Y, Yang T, Li J, Yang X. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):11.
 60. Khanmohammadi N, Sameni HR, Mohammadi M, Pakdel A, Mirmohammadkhani M, Parsaie H, et al. Effect of Transplantation of Bone Marrow Stromal Cell- Conditioned Medium on Ovarian Function, Morphology and Cell Death in Cyclophosphamide-Treated Rats. *Cell J*. 2018;20(1):10-8.
 61. Zhang Q, Xu M, Yao X, Li T, Wang Q, Lai D. Human amniotic epithelial cells inhibit granulosa cell apoptosis induced by chemotherapy and restore the fertility. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:152.
 62. 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(1):270.
 63. Zhang H, Luo Q, Lu X, Yin N, Zhou D, Zhang L, et al. Effects of hPMSCs on granulosa cell apoptosis and AMH expression and their role in the restoration of ovary function in premature ovarian failure mice. *Stem cell research & therapy*. 2018;9(1):20.
 64. Ling L, Feng X, Wei T, Wang Y, Wang Y, Wang Z, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):46.