

DENEYSSEL OVERYAN YETMEZLİKLERDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OVARYUM DOKUSUNA ETKİSİ

EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON OVARIUM TISSUE IN EXPERIMENTAL OVARIAN FAILURE CASES

Gizem KABASAKAL, Emine TURAL, Murat Serkant ÜNAL

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

ÖZET

Prematür Overyan Yetmezlik (POY), folikül stimulan hormonun (FSH) yüksek düzeylerinin (40 IU/l ve üzeri) eşliğinde, 40 yaşından küçük bir hastada menstrüel siklusların düzeninin 4-6 aydan uzun bir süre boyunca kesilmesi olarak tanımlanmaktadır. Etiyolojisinde genetik nedenler, toksik ajanlar, cerrahi girişimler, otoimmün nedenler, enfeksiyonlar ve kalıtsal problemler bulunabilir. Reprodüktif dönemde kadın hastaların kanser tedavisi için kullandıkları kemoterapik ajanlar, sitotoksik etkilidir. Kemoterapik ajanlar hem oosit hem de oositi çevreleyen granuloza hücrelerinde hasara neden olarak folikül kaybı ve buna bağlı olarak da prematür over yetmezliğine sebep olmaktadır. Primordial folikül aktivasyonunda oluşabilecek bir düzensizlik over rezerv kaybına ve prematür menopoza yol açabilmektedir. Primordial folikülde primer foliküle geçişte, kontrollü aktive edici ve basıkılayıcı rol oynayarak folikül havuzunun korunmasında rol alan sinyal yolları birbirinden bağımsız ancak dengeli bir şekilde çalışır. Dengenin bozulduğu durumlarda, foliküllerin kitlesel aktivasyonu ve folikül havuzunun erkenden tükenmesi meydana gelmektedir. Overyan rezervin değerlendirilmesinde serum FSH, anti-Müllerian hormon (AMH), inhibin B ölçümleri ve ultrasonografi ile over hacmi ölçümü, antral folikül sayımı (AFS) ölçümü yapılır. POY, anovulasyonun yaygın nedenlerinden biridir. Kadınlarda kemoterapiye bağlı POY'nin azaltılması, over dokusunun yenilenmesi ve hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonlarını geri kazanılması için birçok tedavi yöntemi araştırılmaktadır. Son zamanlarda birçok çalışmaya konu olan mezenkimal kök hücreler (MKH) stromal kökenli multipotent özellikte erişkin kök hücreleridir. Göbek kordonu, adipoz doku, plasenta, kemik iliği, ovaryum dokusu, amniyotik sıvı, endometriyal doku, karaciğer gibi birçok dokudan izole edilebilirler. MKH'lerin antiapoptotik, anjiyogenik, antifibrotik özellikleri bulunmaktadır. Uyguladıkları dokularda immün yanıtı neden olma ihtimalleri de düşüktür. Bu özellikleri sayesinde doku hasarı onarımında ve yenilenmesinde önemli roller üstlenirler. Yapılan deneysel çalışmalarda çeşitli kaynaklardan elde edilen MKH'lerin, overyan yetmezlikte foliküller gelişime katkısı ve overyan fonksiyonlara olumlu etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, şu an için çözümsüz olan bazı POY olgularının tedavisinde MKH'ler ile ilgili gelecekteki klinik çalışmalara ışık tutabilir. Bu derlemedeki amacımız farklı kaynaklardan izole edilen MKH'lerin POY hastalarının over dokusu üzerindeki özelliklerini araştırmaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: Mezenkimal kök hücre, Folikül, Ovaryum, Kemoterapi

ABSTRACT

Premature ovarian failure (POF) is defined as the cessation of regular menstrual cycles for more than 4-6 months in woman under 40 years of age, accompanied by high follicle stimulating hormone (FSH) levels (40 IU/l and above). There can be found various etiologies of POF such as; genetic causes, toxic agents, surgical interventions, autoimmune causes, infections and hereditary problems. Chemotherapy agents used by female patients in the reproductive period for cancer treatment are cytotoxic. Chemotherapy agents cause damage to both the oocyte and the granulosa cells surrounding the oocyte, resulting in follicle loss and consequently premature ovarian failure. An irregularity in primordial follicle activation may lead to loss of ovarian reserve and premature menopause. In the transition from the primordial follicle to the primary follicle, the signaling pathways that play a controlled activating and suppressor role in protecting the follicle pool work independently but in a balanced way. In cases where the balance is disturbed, mass activation of the follicles and premature depletion of the follicle pool occurs. In the evaluation of ovarian reserve, serum FSH, anti-Müllerian hormone (AMH), inhibin B measurements and ovarian volume measurement by ultrasonography, antral follicle count (AFS) are performed. POF is one of the common causes of anovulation. Many treatment methods are being investigated to reduce the chemotherapy-induced POF in women, to regenerate ovarian tissue and to restore both endocrine and exocrine functions. Mesenchymal stem cells (MSCs), which have been the subject of many studies recently, are adult stem cells of stromal origin with multi-potential properties. MSCs can be isolated from many tissues such as umbilical cord, adipose tissue, placenta, bone marrow, ovarian tissue, amniotic fluid, endometrial tissue, liver. MSCs have properties like that of antiapoptotic, angiogenic, antifibrotic. They are also uncommon to create an immune response in the tissues they are administered. Through these properties, they act an important role in tissue damage repair and renewal. In experimental studies, it has been shown that MSCs obtained from various sources improve ovarian failure follicular development and ovarian functions. The results obtained may shed light on future clinical studies of MSCs in the treatment of some POF cases that are currently unsolved. Our aim in this review is to investigate the properties of MSCs isolated from different sources on ovarian tissue in POF patients.

KEYWORDS: Mesenchymal stem cell, Follicle, Ovary, Chemotherapy

Geliş Tarihi / Received: 29.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 15.11.2021

Yazışma Adresi / Correspondence: Dr. Gizem KABASAKAL

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

E-mail: gizemkabasakal7@gmail.com

Orcid No (Sırasıyla): 0000-0003-4512-3904, 0000-0003-3624-1378, 0000-0003-1992-7909

GİRİŞ

Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), multipotent erişkin kök hücrelerdir. Şimdiye kadar MKH'ler; kemik iliği, adipoz doku, kıkırdak, amniyon sıvısı, plasenta, göbek kordonu, endometrium, testis ve ovaryum gibi birçok dokudan izole edilmişlerdir (1). MKH'ler faz kontrast mikroskopu ile incelendiğinde iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücreler olarak gözükürler (2). MKH'ler, Uluslararası Hücre Tedavi Derneği (ISCT)'nin tanımladığı üç önemli özelliğe göre belirlenir: 1) Standart kültür ortamında plastik yüzeye yapışabilmeleri 2) CD105, CD73 ve CD90 gibi belirteçler taşımaları, ancak CD45, CD34, CD14 ve HLA-DR belirteçlerini taşımamaları 3) İn vitro ortamda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri (3).

MKH'ler, verildikleri alıcı dokularda MHC sınıf II antijenleri olmadığı için immün yanıtı neden olmazlar. Farklı dokulardan izole edilen hücreler benzer fenotipik özellikler gösterebilir de bazı farklılıklara sahiptirler. Yağ dokusundan elde edilen MKH'ler yüzeylerinde CD49d taşımaktayken, CD106 taşımazlar. Kemik iliğinden izole edilen MKH'lerde ise CD49d negatif, C106 pozitifdir. MKH'lerin rejeneratif ve reperatif özellikleri vardır. MKH'lerin inflamasyonu ve fibrozisi azalttıkları, dokularda anjiogeneze sebep oldukları ve doku hasarı tamir işleminde önemli bir role sahip oldukları gösterilmiştir (1, 3).

Ovaryumun Histolojisi

Ovaryum yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı yassı epitel veya kübik hücre tabakasıyla döşelidir. Overin yüzey epitel, foliküllerden tunika albuginea adı verilen fibröz bir kapsül ile ayrılır. Ovaryum korteks ve medulla'dan oluşur. Ovaryum folikülleri korteksin stromasında yerleşmiştir. Korteks ile medulla arasında keskin bir sınır yoktur (4). Bir ovaryum folikülü bir ya da daha fazla folikül hücresi veya granüloza hücre tabakasıyla çevrili bir oosit içerir. Sayıca en fazla görülen foliküller, yassı hücrelerle çevrili primordiyal foliküllerdir. Oosit çevresinde tek veya çok katlı kübik hücre tabakası bulduran foliküller primer foliküllerdir. Antrum denilen boşluklara sahip foliküllere sekonder folikül denilir. En büyük çapa sahip olan olgunlaşmış foliküllerse graaf folikül olarak adlandırılırlar (5).

Prematür Overyan Yetmezlik

Prematür Overyan Yetmezlik'te (POY) 40 yaşından genç hastalarda en az 4-6 ay süreyle adetlerin kesilmesi ve bir ay aralarla ölçülen folikül stimulan hormon (FSH) değerlerinin 40 IU/L'nin üzerinde olması tanı kriteri olarak kabul edilmiştir (6). Etiyoloji tam olarak bilinmemekle beraber, genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin (kemoterapi, radyoterapi) rol oynayabileceği düşünülmektedir (7). Primordiyal folikülden primer foliküle geçişte rol alan sinyal yolları, aktive edici veya baskılayıcı olarak rol oynayarak folikül havuzunun korunmasında dengeli bir şekilde çalışmalıdır (8). Dengenin bozulduğu durumlarda, klinikte POY olarak bilinen, foliküllerin zamanından erken aktivasyonu ile folikül havuzunun büyük kısmının erkenden tükenmesine sebep olmaktadır (9, 10).

Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN), serine/threonine protein kinaz (AKT) ve forkhead box O (FOXO)'den oluşan PTEN/AKT/FOXO3a sinyal yolağının, primordiyal folikül kaybının önlenmesi ve over rezervinin korunması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yolakta önemli diğer faktörler TSC1 (tuber skleroz kompleks 1) ve mTOR (memeli rapamisin hedefi) kompleks 1 (mTORC1)'dir. TSC1, mTORC1'i baskılamakta ve foliküllerin sessiz fazda kalmasına neden olmaktadır. Folikülogenezde rolü olan bir başka faktör ise nörotrofinlerdir. NGF/TrkA sinyal yolunun (nöral büyüme faktörü - nöral büyüme faktörü reseptörü) primordiyal folikül aktivasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (11). Her yıl reproduktif dönemde binlerce kadın kanser tedavisi için kemoterapi ve radyoterapinin etkilerine maruz kalmaktadır. Bu tedavilerin en önemli yan etkilerinden biri de over dokusu üzerine olan gonadotoksik etkilerinden dolayı bu hastalarda POY gelişmesidir. Kemoterapi ve radyoterapi over dokusunda over rezervini temsil eden primordiyal foliküllerin erken ve kitlesel kaybına neden olarak amenore ve erken menapozu neden olur. Bu ajanlardan sıklıkla kullanılan siklofosamid ve sisplatin hem oosit hem de onu çevreleyen granüloza hücrelerinde hasara neden olarak folikül kaybı ve buna bağlı olarak prematür over yetmezliğine sebep olur (12). Ovaryum primordiyal foliküllerin çoğunluğu, dişi üreme dönemi boyunca gametlerin düzenli olarak üretimini

sağlamak için farklılaşma olmadan korunmalıdır. Bazı çalışmalarda, kemoterapinin sessiz olarak duran primordiyal foliküllerin apoptozunu tetiklediğini ve overyan yetmezliğe neden olduğunu bildirilmiştir. Bunun tersine siklofosfamidin primordiyal folliküllerin apoptozunu indüklediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Siklofosfamid tedavisinin, aktif olarak büyüyen folliküllerin apoptozunu indüklediğini ve primordiyal folliküllerden primer foliküllere geçişini tetiklediğini iddia etmişlerdir (13, 14).

Geliştirilen fertilitte koruyucu teknikler içinde, en geniş kullanım alanına sahip olanı embriyo kriyoprezervasyonudur. Embriyo ve sperm kriyoprezervasyonu ile kıyaslandığında oosit kriyoprezervasyonu, oositlerin kriyo hasarına daha duyarlı olması sebebiyle, teknik olarak daha zordur. Bir diğer araştırma aşamasında olan teknik ise over dokusu kriyoprezervasyonudur. Bu tekniğin avantajı, kemoterapinin acil olduğu durumlarda overyan stimülasyona gerek olmadan kısa sürede uygulanabilmesidir (15).

POY tanısı için estradiol (E2), FSH ve lüteinizan hormon (LH) serum seviyeleri değerlendirilir. FSH serum konsantrasyonunun 25 mIU / ml'den yüksek, E2 seviyesinin 20 pg / ml'den düşük olması POY lehinedir (15, 16). Ayrıca overlerdeki foliküllerinin morfolojisi, primordiyal folikül sayıları ve serum Anti-Müllerian hormon (AMH) düzeyleri değerlendirilir. Serum AMH düzeyi, primordiyal folikül havuzu miktarının bir göstergesidir ve uygulanan kemoterapötik ajanların folikül sayısında ve serum AMH düzeyinde azalmaya neden olduğunu gösterilmiştir (16). Birçok dokudan (göbek kordonu, adipoz doku, plasenta, kemik iliği, ovaryum dokusu, amniyotik sıvı, endometriyal doku, karaciğer) MKH'ler izole edilip çoğaltılmış ve ovaryumlara transplante edilmiştir (15). MKH'ler hasarlı dokuyu doğrudan etkileyebildiği gibi parakrin ve otokrin yolla da etkilerler. Büyüme faktörleri, immünmodülatörler, proteinler ve kemokinler salgılayarak dokuda mRNA ve protein üretimini artırır ve rejenerasyona katkı sağlarlar (16, 17). Verilen MKH'lerin kemoterapi ile dejenere olmuş foliküler yapıları restore ettiği ve primordiyal folikül sayısında önemli bir artış sağlandığı gösterilmiştir (15). Göbek kordonundan elde edilen MKH'lerin verilmesiyle de ovaryumların

hem endokrin hem ekzokrin fonksiyonları düzelmiştir. Ayrıca oositin çevresindeki granüloza hücrelerinin proliferasyonu, tekrar ovulasyonun başladığı, hatta canlı doğumların olduğu gösterilmiştir (18, 19). MKH'ler antiapoptotik ve apoptotik gen ekspresyonlarını düzenleyerek dokulardaki apoptozu azaltırlar (15, 20, 21). Ayrıca bu hücrelerin mikro çevreyi düzenleyici etkileri de mevcuttur (18). İnsan plasentasından elde edilen MKH'ler, düzenleyici T (Treg) hücreler üzerinden immünmodülatör etki gösterebilirler (22). İnsan göbek kordonu kökenli MKH tedavileriyle E2 ve AMH hormonları artarken, FSH azalır; ovaryumdaki yapılar düzelir ve folikül sayıları artar. MKH'ler, hepatosit büyüme faktörü (HGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), plasental büyüme faktörü (PGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) ve transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) gibi birçok parakrin faktörler salgırlar (19, 20, 23). Fetal karaciğer kökenli MKH'lerin antioksidan özellikleri sayesinde oksijen radikallerinin oluşturduğu hasara karşı oksidatif stresin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (21).

PI3K/AKT sinyal yolağının aktivasyonu aşırı primordiyal folikül aktivasyonuna neden olarak over rezervinin azalmasına neden olur (24, 25). Bir tür makro-moleküler protein olan mTORC1; hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, metabolizma ve anjiyogenez gibi çeşitli süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenir (26, 27). Oositteki mTORC1 daha çok hücre büyümesi ile ilgilidir. mTORC2 (memeli rapamisin hedefi kompleks 2) kompleksinin ise hücre iskeletinin düzenlenmesinde rolü vardır ve indirekt olarak mTORC1 kompleksini aktive ettiği bilinmektedir (25, 28).

Çeşitli dokulardan elde edilen kök hücrelerin etkinliklerinin de farklı olduğu görülmüştür. Kemik iliğinden elde edilen MKH tedavisiyle ovaryumların atretik foliküllerinde önemli bir azalma, antral ve sekonder folikülde önemli miktarda artış olduğu gösterilmiştir (29). POY modelinde over stromal kök hücrelerinin, kemik iliğinden elde edilen MKH'lere göre folikül restorasyonu üzerine koruyucu etkisinin daha fazla olduğu bildirilmiştir (16). Bir başka çalışmada ise insan amniyotik MKH'lerinin, HGF VE EGR aracılığıyla, yaşlanma sürecindeki sıçanların ovaryen fonksi-

yonlarını önemli ölçüde düzelttiği gösterilmiştir (30). Kemik iliği, adipoz doku, karaciğer gibi dokulardan üretilen MKH'lerin bazı dezavantajları da vardır. Özellikle kemik iliği kökenli MKH'lerde enfeksiyon riski, sekonder hasar oluşumu ve hücre tedaviler sonrası tümör gelişme ihtimali vardır. İnsan göbek kordonu MKH'lerinde ise daha düşük onkojenite ve daha düşük kontaminasyon riski vardır. İmmünolojik ret ihtimali çok azdır (20). İnsan amniyotik sıvısından elde edilen MKH'ler birçok büyüme faktörlerini salgılayabilmektedirler. Bu kaynaktan elde edilen MKH'lerin farelerde canlılığını sürdürdüğünü ve çoğaldığı gösterilmiştir. İn vivo olarak ovaryumlarda yaşayabilmeleri POY için olası terapötik potansiyeli de beraberinde getirmektedir (31).

POY olgularında MKH'lerle yapılan çalışmalardan ayrı olarak adipoz doku kaynaklı MKH'lerden elde edilen eksozomlar da kullanılmıştır. Eksozomlar hücreler tarafından ortama salınan 30-200 nm çapında nano keseciklerdir. Bu kesecikler, endozomal sistem içerisinde veya plazma zarında üretilir. İçerisinde proteinler, lipidler, mRNA'lar, miRNA'lar ve kodlanmayan RNA gibi çeşitli spesifik molekülleri içerir. Eksozomların salgılanması, hücrelerin birbirleriyle iletişim kurma yollarından biridir. Eksozomlar bazı yönlerden dolayı MKH'lere göre daha avantajlı olarak görünmektedir. Fakat izolasyonlarında standartizasyon olmaması ve elde edildikleri hücrelerin bütün sekresyonlarını içermemeleri de bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (32).

Bütün bu çalışmalarda görüldüğü gibi çeşitli kaynaklardan elde edilen MKH'ler, POY oluşturulan deney hayvanlarına verilmiş ve bu hayvanların ovaryumlarında folikülogenezin tekrar başladığı görülmüştür. Başarılı deneysel çalışmalar malignite nedeniyle kemoterapi almış ve ileride gebelik planlayan hastalar için umut verici olarak görülebilir. Bu uygulamaların ileride tedavi protokollerinde yer alması için gönüllü hastaların katıldığı klinik çalışmalardan elde edilecek sonuçlar beklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Rastegar F, Shenaq D, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells*. 2010;2(4):67-80.

2. Unal MS, Tufan AC. Mesenchymal Stem Cells and C-type Natriuretic Peptide Signaling: A Proposal for a New Treatment Approach for Skeletal Dysplasias. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2016;11:513-21.

3. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992;13:69-80.

4. Ramazan DEMİR (Editör). *Histoloji Atlası, Fonksiyonel İlişkileriyle*. 11inci Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2008:375-87.

5. Seyhun SOLAKOĞLU, Yener AYTEKİN (Editör). *Temel Histoloji*. 10uncu Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009:435-43.

6. Liu R, Zhang X, Fan Z, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):299.

7. Reddy P, Liu L, Adhikari D, et al. Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool. *Science*. 2008;319(5863):611-3.

8. Lai D, Wang F, Yao X, et al. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13:155.

9. Kara N, Tural S, Oktena G, et al. Prematüre ovaryen yetmezlik ve 46,X,del(X)(q21). *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2012;29:167-8.

10. He Y, Chen D, Yang L, et al. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;9(1):263.

11. Zheng Q, Fu X, Jiang J, et al. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation Prevents Chemotherapy Induced Ovarian Failure via the NGF/TrkA Pathway in Rats. *Biomed Res Int*. 2019;1-9.

12. Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reprod Sci*. 2018;25(1):51-63.

13. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burn out"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med*. 2013;5(185):185ra62.

14. Jang H, Lee OH, Lee Y, et al. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. *Journal of Pineal Research*. 2016;60(3):336-47.

- 15.** Afifi Noha M, Reyad Olfat N. Role of mesenchymal stem cell therapy in restoring ovarian function in a rat model of chemotherapy-induced ovarian failure: a histological and immunohistochemical study. *The Egyptian Journal of Histology*. 2013;36(1):114–26.
- 16.** Besikcioglu HE, Saribas GS, Ozogul C, et al. Determination of the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and ovarian stromal stem cells on follicular maturation in cyclophosphamide induced ovarian failure in rats. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2019;58(1):53-9.
- 17.** Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Lab Invest*. 2013;93(2):181-93.
- 18.** Mohamed SA, Shalaby S, Brakta S, et al. Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells as an Infertility Treatment for Chemotherapy Induced Premature Ovarian Insufficiency. *Biomedicines*. 2019;7(1):7.
- 19.** Song D, Zhong Y, Qian C, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *BioMed Research International*. 2016;(6):1-13.
- 20.** Zhu SF, Hu HB, Xu HY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries. *J Cell Mol Med*. 2015;19(9):2108-17.
- 21.** Huang B, Qian C, Ding C, et al. Fetal liver mesenchymal stem cells restore ovarian function in premature ovarian insufficiency by targeting MT1. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10:362.
- 22.** Yin N, Zhao W, Luo Q, et al. Restoring Ovarian Function With Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in Autoimmune-Induced Premature Ovarian Failure Mice Mediated by Treg Cells and Associated Cytokines. *Reprod Sci*. 2018;25(7):1073-82.
- 23.** Li J, Mao Q, He J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):55.
- 24.** Yang Z, Du X, Wang C, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived microvesicles on premature ovarian insufficiency in mice. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):250.
- 25.** Gorre N, Adhikari D, Lindkvist R, et al. mTORC1 Signaling in Oocytes Is Dispensable for the Survival of Primordial Follicles and for Female Fertility. *PLOS One*. 2014;9(10):e110491.
- 26.** Liu AL, Liao HQ, Li ZL, et al. New Insights into mTOR Signal Pathways in Ovarian-Related Diseases: Polycystic Ovary Syndrome and Ovarian Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(12):5087-94.
- 27.** Yaba A, Demir N. The mechanism of mTOR (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Ovarian Res*. 2012;5:38.
- 28.** Zhou L, Xie Y, Li S, et al. Rapamycin Prevents cyclophosphamide-induced Over-activation of Primordial Follicle pool through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in vivo. *J Ovarian Res*. 2017;16;10(1):56.
- 29.** Peng J, Xiao N, Cheng L. Therapeutic potential of BMSCs for premature ovarian failure in mice. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2018;43(1):7-13.
- 30.** Ding C, Zou Q, Wang F, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve ovarian function in natural aging through secreting hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):55.
- 31.** Liu T, Huang Y, Guo L, et al. CD44+/CD105+ Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells Survive and Proliferate in the Ovary Long-Term in a Mouse Model of Chemotherapy-Induced Premature Ovarian Failure. *Int J Med Sci*. 2012;9(7):592–602.
- 32.** Huang B, Lu J, Ding C, et al. 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):216.