

## BÖLÜM 5

### MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ERKEK İNFERTİLİTESİNDEKİ ROLÜ

Büşra ÇETİNKAYA ÜN<sup>1</sup>

#### GİRİŞ

İnfertilite, 12 ay korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamayan çiftlerde Dünya çapında önemli bir sorundur ve çiftlerin yaklaşık olarak %15'i bu sorunu yaşamaktadır. Bu küresel halk sağlığı sorununun %50-60 oranında erkek faktörü eşlik etmektedir. Hatta çocuk sahibi olamayan çiftlerin %20'si tek başına erkek kaynaklıdır (1-4). Genetik, fizyolojik ve çevresel faktörler erkek infertilitesinde önemli rol oynamaktadır. Çevresel faktörler arasında sigara, enfeksiyonlar, yaralanmalar, kemoterapötik ilaçların kullanımı, toksik ajanlara ve radyasyona maruziyet yer almaktadır (5). Sperm analizi için semen hacmi, sperm sayısı, morfolojisi ve motilitesi gibi parametrelerin belirlenmesi gereklidir. 2010 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı kılavuzda (6) belirtildiği üzere, semen parametreleri normal ise normozoospermi, hafif sperm sayısı (5-20 milyon/ml, ağır: <5 milyon/ml) ise oligozoospermi, menide hiç sperm yoksa azospermi denir. Azospermi pretestiküler azospermi, testiküler azospermi ve posttestiküler azospermi olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır (7). Seks hormonlarının (GnRH, LH, FSH) düzensizliği veya eksikliği, Y kromozomunda mikrodelesyonlar, Klinefelter Sendromu, kriptorşidizm, germ hücrelerinin farklılaşması, varikosel, testis travması, testis torsiyonu testiküler azospermiden sorumludur (5, 8, 9).

Semen analizi parametreleri normal olan erkeklerde de infertilite meydana gelebilir. Bilinmeyen nedenlerle kısırlığın ortaya çıkması idiyopatik olarak tanımlanır. İdiyopatik infertilite, erkek infertilitesinin %25-50'si kadar yüksektir (10,11). Yardımcı üreme tekniklerindeki (YÜT) son gelişmeler infertilite tedavisinde infertil çiftler için büyük bir umut olmuştur. Fakat mevcut YÜT, fonksiyonel gametleri olmayan infertil çiftlere (donör gametler kullanılmadıkça) yardımcı olamamaktadır. Bu yüzden terapötik olarak kök hücrenin kullanımı infertil çiftler için yeni bir umut olabilir (12,13).

<sup>1</sup> Dr. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Adana Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, busracetinkayaun@gmail.com

Kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşabildikleri belirlendikten sonra yapılan araştırmalar, erkek infertilitesine yönelik kök hücre kullanımı ve hücre temelli tedavilerin terapötik uygulamaların mümkün olabileceğini göstermişlerdir. Genetik olarak stabil, non-greft reddi ve immünosupresif mezenkimal kök hücreler (MKH) erkek infertilitesinin tedavisine yeni bir pencere açmaktadır (14-16).

## **1. OBSTRÜKTİF OLMAYAN ERKEK TESTİS HASARİNİN NEDENLERİ**

### **1.1. Çevresel Faktörler - Sigaralar ve alkoller**

Sigaraların çok fazla toksik kimyasal içerdiği bilinmektedir. Erkek kısırlığında sigaranın rolü reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olarak oksidatif stresi ortaya çıkarır. DNA hasarı ve apoptoz meydana gelir, böylece spermatogenez, sperm olgunlaşması, sperm fonksiyonu bozulur ve infertiliteye katkıda bulunur (17, 18). Bu konuda deneysel hayvan ve insan çalışmaları yapılmıştır. İnsan çalışmalarında sperm konsantrasyonunda azalma, sperm motilitesi, sperm kreatin kinaz aktivitesi, DNA metilasyon paterninde artış, sperm yapı anormallikleri ve mitokondriyal aktivite, akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon bozuklukları saptanmıştır (19-23). Ek olarak, annenin fetüs veya yeni doğan bebek için sigara içmesi erkek yavru doğurganlığı üzerinde zararlı olabilir. Annenin sigaraya maruz kalması nedeniyle erkek yavrularda eşey hücre DNA hasarı ve kusurlu sperm tespit edilmiştir [24].

Aşırı alkol alımı erkek üreme sistemini olumsuz etkiler. Çünkü aşırı alkol testosteron düzeylerini düşürüp FSH, LH ve E2 hormon düzeylerini yükselttiği gibi Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonlarını da bozar. Ayrıca sperm hareketliliğini ve morfolojisini bozar, sperm konsantrasyonunu ve sayısını azaltır (8). Deneysel bir çalışma, intraperitoneal etanol enjeksiyonundan sonra spermatojenik hücre apoptozunun indüklendiğini gösterilmiştir. Ardından aktif kaspaz-3, p53, Fas ve Fas-L ekspresyonlarının artışı belirlenmiştir. Ayrıca testis dokusunda ROS oluşumunun artmasıyla mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığı gösterilmiştir (25). Benzer şekilde annenin sigara içmesi, gebelik sırasında annenin alkol alması erkek yavruların sperm kalitesini etkileyebilir (26).

### **1.2. Y Kromozom Mikrodelesyonları**

Azospermik veya şiddetli oligospermik vakaların yaklaşık %7'sinde Y kromozom mikrodelesyonları gözlenmektedir (27). Bu mikrodelesyonlar, Y kromozomunun uzun kolundaki Yq11'de bulunur. Azospermi faktörü (AZF) bölgesi Yq11'de belirlenmiştir. Bir çalışmada azospermisi olan hastalar incelenmiş ve bu hastaların

%13'ünde AZF bölgesinde delesyonların varlığı saptanmıştır. AZF bölgesi 3 bölgeye ayrılmakta ve AZFa, AZFb ve AZFc olarak adlandırılmaktadır (28,29). AZFc bölgesinde lokalize olan DAZ (azospermid silinen) geni keşfedilmiştir ve bu genin bu genin ekspresyonunun normalde testise özel olduğu bulunmuştur. DAZ geni gibi testis germ hücrelerinde spesifik olarak eksprese edilen RMBY geni (RNA bağlayıcı motif geni), azospermiden sorumlu gen olarak tanımlanmıştır (28, 30).

### **1.3. ROS ve Erkek İnfertilitesi**

Oksidatif stres, oksidanlarda veya reaktif oksijen türlerinde (ROS) aşırı bir artış karşısında antioksidan mekanizmanın savunmasının yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkar (31). Normal koşullar altında spermatozoa tarafından ROS üretimi yapılır çünkü sperm kapasitesinin düzenlenmesi, akrozom reaksiyonunun kolaylaştırılması, sperm-oosit etkileşimi ve sinyal iletim mekanizmaları için ROS'un varlığı gereklidir. ROS'un sperm kapasitesini, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonunu ve oosit füzyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bunun yanında spermatozoanın dölleme kapasitesi kazanması için eser miktarda ROS olmalıdır. Kapasiteasyon sürecinde, spermatozoanın mobilizasyonunu uyaran siklik adenosin fosfat (cAMP), ROS ve hücre içi kalsiyum tirozin kinazda küçük bir artış ile oluşturulur. Normal şartlarda, spermin bu işlevleri yerine getirmesi için antioksidan mekanizmalar tarafından ROS sürekli olarak azaltılır (32-35). Fakat, fazla miktarda ROS üretimi olduğunda, antioksidan kapasitesinin bozulur ve oksidatif stress ortaya çıkar. Spermatozoa, oksidatif stresin neden olduğu hasara karşı oldukça duyarlıdır. Bunun sebebi spermatozoanın plazma membranlarının büyük miktarlarda çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) içermesindedir. cytoplasm (31, 33, 36, 37). ROS, sperm membran lipid peroksidasyonu nedeniyle sperm fonksiyonunu ve sperm morfolojisini bozmakta, ayrıca motilitenin azalmasına ve sperm-oosit füzyonunun etkisiz olmasına neden olmaktadır (33, 34). Oksidatif stres yükseldiğinde, PUFA'nın sperm plazma zarındaki peroksidasyonu, erkek germ hatında normal döllemenin gerçekleşmesini engeller (31). Lipid peroksidasyonu membran bütünlüğüne zarar vererek hücre ölümüne neden olur. Oksidatif hasar, DNA zincir kırılmalarına, baz bozulmasına, DNA parçalanmasına, DNA lezyonuna ve protein çapraz bağlanmasına neden olur. Ayrıca oksidatif stres, sperm çekirdeği ve mitokondrideki DNA'nın bütünlüğünü de etkiler. İnfertil erkeklerin spermlerinde DNA parçalanmasının hızlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, ejakülatta olgunlaşmamış sperm varlığı görülmektedir. Olgunlaşmamış sperm, ROS'un aşırı miktarda üretimine ve DNA hasarına neden olmaktadır (35, 38-40). Yüksek miktardaki ROS, mitokondrinin iç ve dış zarlarını bozarak kaspazlardan sitokrom c'nin salınmasına sebep olur ve apoptoz meydana gelir (35).

#### 1.4. Kanser Tedavisi ve Erkek İnfertilitesi

Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonu kanser tedavisinin başarısında oldukça önemlidir. Spermatogenezin gerçekleşmesinde hipotalamik-hipofizgonadal eksen (HPG) kritik öneme sahiptir. Çünkü HPG ekseninde herhangi bir defekt ortaya çıkarsa gonadotropin üretimi ve hareketli sperm sayısı önemli derecede azalabilir. HPG eksenine ışınlama uygulandığında gonadotropin eksikliğine yol açabilir. Bu durum spermatogenezini etkileyebilir (41-43). Kısacası kansere yönelik tedaviler HPG ekseninin bozulması, epitelde sitotoksik etkiler gibi sorunlara neden olabilmekte ve erkek fertilitasını olumsuz etkileyebilmektedir (44).

Radyoterapi ve kemoterapi, testisler için gonadotoksiktir. Özellikle testis germinal epiteli (doz, fraksiyon ve bölge) radyasyona karşı hassastır. Radyoterapi, kemik iliği veya kök hücre nakli öncesinde retroperiton veya pelvisteki maligniteler için uygulandığında spermatogenezini azaltabilir (0.1 Gray gibi düşük doz dahil). 2 Gy'nin üzerindeki dozlar, oligospermi veya azospermiye sebep olabilir (45, 46). Hematopoetik kök hücre nakli öncesi tüm vücut ışınlanması germ hücre yetmezliğine yol açabilir. 12 Gy-15 Gy tüm vücut ışınlama uygulanan erkeklerde infertilite olduğu belirlenmiştir. Sarkom, Hodgkin hastalığı veya CNS tümörü gibi durumlarda, testisler modern tekniklerle korunsa bile, pelvik, kasık veya spinal radyasyon alan hastalarda, yüksek doz radyasyonun yayılması nedeniyle oligospermi veya azospermi meydana gelebilir (43, 47). Radyoterapinin etkilerinden korumak için çeşitli yöntemler denenmiştir. Spermatozid DNA'sını korumak için sperm kriyoprezervasyonu etkili bir yöntem olsa bile puberteye kadar sperm olmadığı için çocukluk çağı kanserlerinde kriyoprezervasyon etkili bir yöntem değildir (48, 49).

Kemoterapi, normal veya malign hücrelerden bağımsız olarak aktif olarak bölünen hücreleri hedefler. Özellikle germinal epiteldeki spermler hızlı bölünme nedeniyle en çok etkilenen hücrelerdir. Kemoterapinin dozu, kombinasyonu ve süresi fertilizasyonu farklı şekillerde etkileyebilir (49). Ayrıca alkilleyici ajanlar, prokarbazin ve sisplatin gibi kemoterapötik ilaçlar azospermiyi indükledikleri ve kemoterapiden sonra uzun süre devam ettikleri için spermatogenez üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Azospermi, siklofosamid veya ifosfamid gibi alkilleyici ajanlardan birinin veya her ikisinin kullanıldığı tedavilerde (Ewing Sendromu gibi) ortaya çıkar. Ayrıca sisplatinin alkilleyici ajanlardan biri ile kombinasyonu oligospermiye veya azospermiye neden olur. Hodgkin hastalığının tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların farklı kombinasyonları da azospermiye neden olur. Hematopoetik malignitesi olan hastalarda mekloreタミン, oncovorin/vincristine, prokarbazin, prednizon (MOPP/MVPP) ile başarılı sonuçlar alınsa da çocuklukta alınan bu kemoterapötik ilaçlar hastaların %85'inde azospermi ve hipogonadizme neden olabilir ve 15 yıla kadar sürebilir (50-52).

### **1.5. Testis Torsiyonu**

Testisteki kan akımı azaldığında testis torsiyonu meydana gelebilir ve bu durum 25 yaşından küçük 1/4000 erkek popülasyonda kısırlığı tehdit eder. Bu nedenle testis hasarını önlemek için acil cerrahi müdahale olarak detorsiyon yapılırsa bile iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı oluşur. I/R yaralanması, spermatogenezin bozulması ve germ hücrelerinin apoptozunun artması nedeniyle erkeklerde kısırlığa neden olabilir. Torsiyonda testis iskemisinin süresi ve bükülmüş kordun şiddeti önemlidir. Çünkü bükülü kordona 6 saat içinde müdahale edildiğinde testis hasarı daha az, bükülmenin şiddeti yüksek ise 4 saat içinde hücre nekrozu başlar. 24 saatten uzun süre 360 dereceden fazla fleksiyon varsa ciddi testiküler atrofi kaçınılmazdır (53, 54).

## **2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER (MKH'LER)**

Multipotent kök hücreler kendi kendini kopyalayan, farklılaşan ve doku bütünlüğünü sağlayan hücrelerdir. Bu hücreler kendilerini yenileme potansiyeline sahip olduklarından doku ve organlarda homeostazı sağlarlar. Ayrıca yaşam boyunca çoğalırlar ve doku için gerekli olan hücre miktarını karşılarlar. MKH'ler, multipotent kök hücre özelliklerine sahiptir (55, 56). MKH'ler heterojen hücrelerdir ve MKH'lerin izolasyonu için sadece spesifik hücre yüzey belirteçlerini belirlemek yeterli değildir. Bunun yerine, MKH'lerin karakterleri, çoklu hücrelere farklılaşmaları ve fenotipik belirteçleri tam olarak tanımlanmalıdır. Kısacası, hücrelerin MKH olarak değerlendirilebilmesi için hücrelerin plastik adhezyona sahip olması ve osteosit, kondrosit ve adiposit gibi hücrelere farklılaşması gerekir. Ayrıca, CD105, CD73 ve CD90 gibi hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyon oranı %95'in üzerinde olmalı ve CD34, CD45, CD14, Cd11b, CD79, CD19 ve HLA-DR gibi belirteçlerin ekspresyon oranı, %5 'ten daha az olmalıdır (57, 58).

MKH'ler genellikle kemik iliğinden izole edilir, ayrıca göbek kordonu, yağ dokusu, iskelet kası, dermis, plasenta, diş, perisit, karaciğer, trabeküler kemik, eklem kıkırdağı, kordon kanı, periost, dalak ve timus ve diğer çeşitli organlardan elde edilebilirler (59, 60). Farklı kaynaklardan elde edilen hücreler MKH olarak nitelendirilse bile bu kaynaklardan elde edilen hücre sayısı, genetik aktivasyonları, farklılaşma özellikleri, büyüme hızları, fenotipleri, kemokin ve sitokin salgılama yetenekleri farklılık gösterebilir (61, 62).

MKH'ler belirli koşullar altında farklılaşmaya neden olabilir. Fibroblastik morfolojiye sahiptirler ve iğ şeklindedirler. Uygun koşullar altında, koloni oluşumunu sağlamak için kültür substratına yapışırlar. Hücre kültüründe, MKH'leri çoğaltmak için sıklıkla serum aracılı bazal ortamlar kullanılır ve MKH farklılaşması için büyüme faktörleri eklenebilir. MKH'ler kültürlendiğinde yüksek bir çoğalma po-

tansiyeline sahiptir. Bazı MKH kültürleri on beş defadan fazla pasajlanabilirken, bazı diğer kök hücre tipleri sadece dört pasaja kadar gidebilir. MKH'ler, in vitro yüksek proliferasyon potansiyeline rağmen telomeraz aktivitelerini ve normal karyotip yapılarını kaybetmezler. Ancak; aşırı pasajlama yapıldığında yaşlanma ve apoptoz belirtileri görülebilir (63).

MKH'lerin önemli bir özelliği, bağışıklık yanıtının gelişmesinden sonra bile uzun süreli göç ile çeşitli dokulara yerleşme yetenekleridir. İmplant edilen MKH'ler doku hasarı sonrası salınan faktörlerin yardımıyla hasarın farklı bölgelerine göç edebilir (64). MKH'ler vücuda sistemik olarak uygulandığında, sadece farklılaşma yoluyla hasarlı bölgeyi tedavi etmekle kalmaz, aynı zamanda uyarıcılar ve inhibitörler gibi düzenleyici parakrin etkileri indükleyerek diğer hücreler üzerinde de etki gösterirler (65, 66). MKH'lerin hepatosit büyüme faktörü (HGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü, interferon gama, fibroblast büyüme faktörü gibi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinleri salgıladığı belirlenmiştir. (FGF) ve interlökin IL-6, IL-8, IL-10 (67). Yapılan çalışmalarda, salgılanan büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin parakrin aktivitesi, MKH'lerin terapötik potansiyelini ortaya koymaktadır (68, 69). Araştırmalar, kök hücrelerin dejeneratif hastalıklardaki yararlı etkilerinin, trofik faktörleri salgılama yetenekleriyle hasarlı dokular üzerinde gösterilebileceğini göstermiştir. MKH'ler tarafından salınan faktörlerin, kök hücrelerin yokluğunda farklı koşullar altında dokuları yenileyebileceğini gösterilmiştir (70). Kök hücreler bu faktörleri kültürlendikleri ortama salgırlar ve bu ortama koşullu ortam denir. Örneğin, Sagaradze ve ekibi, kriptomidizm modelinin neden olduğu erkek kısırlığı için terapötik bir ajan olarak MKH şartlandırılmış ortamı kullandı. MKH ile şartlandırılmış besiyeri ile tedavi edilen grup ile tedavi edilmeyen grup karşılaştırıldığında, spermatogenezin restorasyonunda olumlu sonuçlar elde edildi (71). Bu nedenle, MKH'lerin ve MKH koşullu ortamın rejeneratif tıpta uygulanması, terapötik değerlerini artırır (64, 71).

## **2.1. MKH'lerin Germ Hücrelerine Farklılaşması**

Farklı hastalıklarda kök hücrelerin terapötik olarak kullanımı, infertilite tedavisine de farklı bir kapı açmıştır. Son zamanlarda farklı kaynak kökenli kök hücrelerden germ hücrelerinin elde edilmesi üzerine yapılan çalışmalar sayesinde infertilite artık umutsuz bir hastalık olmaktan çıkmıştır (72). Non-obstrüktif azospermi hastalarında in vitro olarak kök hücre farklılaşmasından elde edilen germ hücrelerinin gonadlara nakledilmesiyle infertilitenin tedavi edileceği düşünülmektedir (73). Yapılan çalışmalarda embriyonik kök hücrelerden (EKH'ler) germ hücreleri elde edilmiştir, fakat bu durum etik sorunlara neden olmaktadır. Ayrıca kısıtlı EKH kaynakları sebebiyle araştırmacılar farklı doku kaynaklarını araştırmaktadır (72, 74). Huang ve arkadaşları (75), insan göbek kordonu MKH'lerinin (İGKM-

KH) germ hücrelerine farklılaşma kapasitelerini araştırdığı çalışmada, retinoik asit (RA), testosteron ve testis hücresi koşullu besiyerindeki iGKMKH'ler, farklı sürelerde inkübe edilmiştir. Germ hücresine spesifik genlerin ekspresyonları (Oct-4, Ckit, CD49, Stella ve Vasa) belirlenmiştir. RA, A vitamininin bir türevidir. Ayrıca, spermatogonia çekirdeğindeki retinoid reseptörlerine bağlanarak spermatogoninin farklılaşması için gerekli olan tirozin kinaz ekspresyonunu arttıran bir moleküldür (76). Bu çalışmada iGKMKH'lerin germ hücrelerine farklılaşabildiği belirlenmiştir (75) Başka bir çalışmada, MKH'leri koyun illiğinden (KMKH) ve koç kemiği illiğinden (Kİ-MKH) erkek germ hücrelerine ayırmak için çeşitli ajanlar kullanıldı. MMKH'lerde 3 farklı RA konsantrasyonu kullandı. 10 µM RA'nın KMKH'lerin germ hücrelerine farklılaşmasında daha etkili olduğu bulunsa da, Dazl gibi germ hücre spesifik markörün RA uygulandıktan sonra eksprese edilmediği gözlemlendi (77). Bu çalışmanın yanı sıra, transforme büyüme faktörü beta 1 (TGFβ1), BMP4 ve BMP8'in KİMKH'lerin germ hücrelerine dönüşümü üzerindeki etkisi araştırılmıştır. KİMKH kültüründe TGFβ1'in kullanılmasından sonra spermatogonial kök hücreler (SKH) ve spermatogonia benzeri hücreler elde edilirken, BMP4 ve BMP8'nin KİMKH'lerde primordial germ hücre oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Böylece, TGFβ1'in spermatogenezini pozitif yönde etkilediği belirlenmiştir (78). Başka bir çalışmada, farklılaşma potansiyellerini karşılaştırmak için hem Kİ-MKH'lere hem de adipoz dokusundan türetilen MKH'lere (AD-MKH) RA ve BMP4 birlikte uygulanmıştır ve germ hücresine spesifik genlerin (Mvh, Dazl, Stra8 ve Scp3) ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Hem Kİ-MKH'lerde hem de AD-MKH'lerde bu genlerin ekspresyonunda bir artış olmasına rağmen, Kİ-MKH'lerdeki ekspresyon oranı AD-MKH'lerden daha yüksektir, bu da Kİ-MKH'lerin germ hücrelerine farklılaşma potansiyelinin olduğunu gösterir (72).

## **2.2. Testis Hasarlarında MKH Uygulaması**

Günümüzde kök hücre teknolojisinin gelişmesiyle hasarlı testis dokularında kök hücre tranplantasyonu uygulama çalışmaları artmıştır. Bu yüzden birçok araştırmacı tarafından farklı kaynak kökenli MKH'lerin germ hücrelerine farklılaşma potansiyelini ve testis hasarı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çakıcı ve arkadaşları (79), sıçan adipoz dokusundan ADMKH izole ederek bu hücrelerin 12 hafta sonra spermatojenik hücrelere farklılaştığını göstermişlerdir. Bromodeoksüridin etiketli insan GK-MKH'leri (GK-MKH'ler), azoospermili hayvanlara transplante edilmiş ve 120 gün sonra bile tübülde bu hücreler tespit edilmiştir. Bu hücrelerin yerleştiği, çoğaldığı ve germ hücrelerine farklılaştığı belirlenmiştir (80). Kök hücrelerin testis hasarı üzerindeki etkilerine ilişkin bir karşılaştırma çalışması da yapılmıştır.

Araştırmacılar, erkek infertilitesi tedavisi için farklı MKH kaynaklarına yönelmişlerdir. Örneğin, farklı bir MKH kaynağı olan ilk trimester insan göbük kordonu perivasküler hücreleri (FTM HUCPVC'ler) elde edilmiştir. FTM HUCPVC'lerin FGF2, GDNF, LIF ve BMP4 gibi testis hücre hattının önemli düzenleyicileri olarak bilinen faktörleri eksprese ettiği gösterilmiştir. FTM HUCPVC'nin mono-2-etilheksil ftalat (MEHP) tarafından indüklenen testis hasarına transplante edilmesinden sonra, bu hücrelerin Daz1 ve akrosin pozitif hücrelerin mevcudiyeti ile germ hücre rejenerasyonunu ve germ hücre tabakası rejenerasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Bu nedenle FTM HUCPVC'lerin testis hasarında insan testis nişini iyileştirebildikleri gösterilmiştir (81).

Torsiyon-Detorsiyon (T/D) modeli oluşturulan sıçanlara insan orbital ADM-KH 'yi testis içine lokal enjeksiyonla nakledilerek MKH'lerin oksidatif stres ve apoptoz mekanizmaları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. MKH'lerin T/D kaynaklı intrinsik apoptozu ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra T/D'nin sperm motilitesini, sperm içeriğini, spermdeki ATP içeriğini ve F-aktin ekspresyonunu azalttığını, testise transplante edilen MKH'lerin ise glikoliz dengesizliğini ve Akt/GSK3 yolunu düzenleyerek ATP üretimini arttırdığını saptamışlardır. T/D kaynaklı testis hasarlarında MKH'ler yardımıyla sperm hareketliliği ve enerjisi artırılarak sperm fonksiyonu tamir edilmiştir (82, 83).

## **SONUÇ**

Erkek infertilitesi ciddi bir sorundur ve tedavisi için farklı yollar araştırılmaktadır. Günümüzde çocuk sahibi olamayan çiftler için YÜT yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bazı durumlarda YÜT yetersiz kalabilmektedir. Örneğin kriptorşidizmi olan veya çocukluk çağında kemoterapi ve/veya radyoterapi alan hastalarda azospermi ile karşılaşılabilir. Araştırmalar rejeneratif tıp üzerine odaklanmış ve kök hücre teknolojisinin gelişimi de kısırlık için bir umut olmuştur. Birçok kaynaktan gelen MKH'ler, hem çoğalma hem de farklılaşma için yüksek potansiyelleri nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bu nedenle, MKH'lerin germ hücrelerindeki farklılaşma potansiyelleri in vitro çalışmalarda araştırılmış ve hatta MKH'lerin farklılaşma potansiyellerini arttırmak için farklı ajanlar kullanılmıştır. Bazı çalışmalar, in vitro olarak germ hücrelerine farklılaşan MKH'lerin deney hayvanlarına nakledildiğini ve testis hasarını iyileştirdiğini gösterirken, diğer çalışmalar, MKH'lerin testis nişindeki germ hücrelerine farklılaşabildiğini göstermiştir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen kök hücreler MKH olarak tanımlansa da germ hücrelerine farklılaşma potansiyellerinin farklı olduğu bildirilmiştir. Testis dokusunda farklı kaynaklardan MKH'lerin farklılaşma potansiyellerini karşılaştıran çalışmalar sınırlıdır. MKH'lerin testis hasarını iyileştirebileceği bildirilmiştir.



Ayrıca, MKH'lerin azospermi üzerindeki etkilerini belirlemek için mitokondriyal, apoptoz, proliferasyon ve glikoliz yolları araştırılmıştır ancak çalışmalar sınırlıdır. MKH'lerin hasarlı bölgede çoğalmasına ek olarak, MKH'lerin parakrin özellikleri de hasarlı dokuyu iyileştirebilir. MKH'ler kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri gibi salgırlar ve bu faktörler testis nişini etkileyebilir ve spermatogenez sürecini geri döndürebilir. Sonuç olarak, MKH'ler, erkek infertilitesinin tedavisine yeni bir bakış açısı getirmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Inhorn, M.C. and P. Patrizio, Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, 2015. **21**(4): p. 411-426.
2. Chehab, M., A. Madala, and J.C. Trussell, On-label and off-label drugs used in the treatment of male infertility. *Fertility and Sterility*, 2015. **103**(3): p. 595-604.
3. Ring, J.D., A.A. Lwin, and T.S. Kohler, Current medical management of endocrine-related male infertility. *Asian J Androl*, 2016.
4. Cocuzza, M. and A. Agarwal, Nonsurgical treatment of male infertility: specific and empiric therapy. *Biologics*, 2007. **1**(3): p. 259-69.
5. Miyamoto, T., et al., Male infertility and its causes in human. *Adv Urol*, 2012. **2012**: p. 384520.
6. Organization, W.H., WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
7. Cocuzza, M., C. Alvarenga, and R. Pagani, The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013. **68 Suppl 1**: p. 15-26.
8. Sansone, A., et al., Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018. **16**(1): p. 3.
9. Hirsh, A., Male subfertility. *BMJ*, 2003. **327**(7416): p. 669-72.
10. Agarwal, A., et al., Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*, 2014. **32**(1): p. 1-17.
11. Khourdaji, I., H. Lee, and R.P. Smith, Frontiers in hormone therapy for male infertility. *Translational Andrology and Urology*, 2018. **7**: p. S353-S366.
12. Host, E., S. Lindenberg, and S. Smidt-Jensen, The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2000. **79**(7): p. 559-63.
13. Fang, F., et al., Human induced pluripotent stem cells and male infertility: an overview of current progress and perspectives. *Hum Reprod*, 2018. **33**(2): p. 188-195.
14. Volarevic, V., et al., Stem cells as new agents for the treatment of infertility: current and future perspectives and challenges. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 507234.
15. Lindroos, B., R. Suuronen, and S. Miettinen, The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep*, 2011. **7**(2): p. 269-91.
16. Castillo, M., et al., The immune properties of mesenchymal stem cells. *Int J Biomed Sci*, 2007. **3**(2): p. 76-80.
17. Harlev, A., et al., Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. *World J Mens Health*, 2015. **33**(3): p. 143-60.
18. Dai, J.B., Z.X. Wang, and Z.D. Qiao, The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian J Androl*, 2015. **17**(6): p. 954-60.
19. Ramlau-Hansen, C.H., et al., Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod*, 2007. **22**(1): p. 188-96.
20. Zavos, P.M., et al., An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril*, 1998. **69**(3): p. 430-4.

21. Zalata, A.A., et al., Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl*, 2004. **6**(4): p. 313-8.
22. Shenker, N.S., et al., DNA methylation as a long-term biomarker of exposure to tobacco smoke. *Epidemiology*, 2013. **24**(5): p. 712-6.
23. Ghaffari, M.A. and M. Rostami, The effect of cigarette smoking on human sperm creatine kinase activity: as an ATP buffering system in sperm. *Int J Fertil Steril*, 2013. **6**(4): p. 258-65.
24. Sobinoff, A.P., et al., Damaging legacy: maternal cigarette smoking has long-term consequences for male offspring fertility. *Hum Reprod*, 2014. **29**(12): p. 2719-35.
25. Jana, K., et al., Ethanol induces mouse spermatogenic cell apoptosis in vivo through over-expression of Fas/Fas-L, p53, and caspase-3 along with cytochrome c translocation and glutathione depletion. *Mol Reprod Dev*, 2010. **77**(9): p. 820-33.
26. Ramlau-Hansen, C.H., et al., Maternal alcohol consumption during pregnancy and semen quality in the male offspring: two decades of follow-up. *Hum Reprod*, 2010. **25**(9): p. 2340-5.
27. Ferlin, A., et al., Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(3): p. 762-70.
28. Vogt, P.H., et al., Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different sub-regions in Yq11. *Hum Mol Genet*, 1996. **5**(7): p. 933-43.
29. Reijo, R., et al., Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet*, 1995. **10**(4): p. 383-93.
30. Elliott, D.J., et al., Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(8): p. 3848-53.
31. Aitken, R.J. and M.A. Baker, Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. **250**(1-2): p. 66-9.
32. Makker, K., A. Agarwal, and R. Sharma, Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res*, 2009. **129**(4): p. 357-67.
33. Koksai, I.T., et al., Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl*, 2003. **5**(2): p. 95-9.
34. Kumar, M., et al., Radioprotective effect of Panax ginseng on the phosphatases and lipid peroxidation level in testes of Swiss albino mice. *Biol Pharm Bull*, 2003. **26**(3): p. 308-12.
35. Agarwal, A., R.A. Saleh, and M.A. Bedaiwy, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 2003. **79**(4): p. 829-43.
36. Novotny, J., et al., The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2003. **147**(2): p. 173-6.
37. Sikka, S.C., Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem*, 2001. **8**(7): p. 851-62.
38. Agarwal, A. and S.A. Prabakaran, Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*, 2005. **43**(11): p. 963-74.
39. Moustafa, M.H., et al., Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*, 2004. **19**(1): p. 129-38.
40. Agarwal, A. and T.M. Said, Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*, 2003. **9**(4): p. 331-45.
41. Carroll, P.R., et al., Endocrine and exocrine profiles of men with testicular tumors before orchiectomy. *J Urol*, 1987. **137**(3): p. 420-3.
42. Hansen, P.V., et al., Germ cell function and hormonal status in patients with testicular cancer. *Cancer*, 1989. **64**(4): p. 956-61.
43. Oeffinger, K.C., P.C. Nathan, and L.C.M. Kremer, Challenges after curative treatment for childhood cancer and long-term follow up of survivors. *Pediatric Clinics of North America*, 2008. **55**(1): p. 251-+.
44. Coward, R.M., et al., Fertility Preservation in Young Men Treated for Malignancies: Options for Precancer Treatment. *Sex Med Rev*, 2013. **1**(3): p. 123-134.
45. Howell, S. and S. Shalet, Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998. **27**(4): p. 927-43.

46. Rowley, M.J., et al., Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiat Res*, 1974. **59**(3): p. 665-78.
47. Howell, S.J. and S.M. Shalet, Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2005(34): p. 12-7.
48. Brennemann, W., et al., Attempted protection of spermatogenesis from irradiation in patients with seminoma by D-Tryptophan-6 luteinizing hormone releasing hormone. *Clin Investig*, 1994. **72**(11): p. 838-42.
49. Lee, S.J., et al., American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(18): p. 2917-31.
50. Mansky, P., et al., Treatment late effects in long-term survivors of pediatric sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 2007. **48**(2): p. 192-9.
51. van Beek, R.D., et al., Inhibin B is superior to FSH as a serum marker for spermatogenesis in men treated for Hodgkin's lymphoma with chemotherapy during childhood. *Hum Reprod*, 2007. **22**(12): p. 3215-22.
52. Whitehead, E., et al., The effects of Hodgkin's disease and combination chemotherapy on gonadal function in the adult male. *Cancer*, 1982. **49**(3): p. 418-22.
53. Turner, T.T. and K.J. Brown, Spermatid cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol Reprod*, 1993. **49**(2): p. 401-7.
54. Mansbach, J.M., P. Forbes, and C. Peters, Testicular torsion and risk factors for orchiectomy. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2005. **159**(12): p. 1167-71.
55. Serakinci, N. and W.N. Keith, Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur J Cancer*, 2006. **42**(9): p. 1243-6.
56. Can, A. (2009) Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. 1. Baskı ed., Ankara: Tüba.
57. Liu, Z.J., Y. Zhuge, and O.C. Velazquez, Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 2009. **106**(6): p. 984-91.
58. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
59. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(4): p. 313-9.
60. Zuk, P.A., et al., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
61. Wagner, W., et al., Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, 2005. **33**(11): p. 1402-16.
62. Friedman, R., et al., Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007. **13**(12): p. 1477-86.
63. Barry, F.P. and J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(4): p. 568-84.
64. Minguell, J.J., A. Erices, and P. Conget, Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. **226**(6): p. 507-20.
65. Kinnaird, T., et al., Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*, 2004. **94**(5): p. 678-85.
66. da Silva Meirelles, L., A.I. Caplan, and N.B. Nardi, In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2008. **26**(9): p. 2287-99.
67. Pawitan, J.A., Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 965849.
68. Baglio, S.R., D.M. Pegtel, and N. Baldini, Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 359.
69. Makridakis, M., M.G. Roubelakis, and A. Vlahou, Stem cells: insights into the secretome. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1834**(11): p. 2380-4.
70. Yang, D., 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): p. e59020.

71. Sagaradze, G.D., et al., Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential. *Biomed Pharmacother*, 2019. **109**: p. 1428-1436.
72. Shirzeyli, M.H., et al., Bones Morphogenic Protein-4 and retinoic acid combined treatment comparative analysis for in vitro differentiation potential of murine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue into germ cells. *Microsc Res Tech*, 2017. **80**(11): p. 1151-1160.
73. Newson, A.J. and A.C. Smajdor, Artificial gametes: new paths to parenthood? *J Med Ethics*, 2005. **31**(3): p. 184-6.
74. Chen, W., et al., Retinoic acid regulates germ cell differentiation in mouse embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 2012. **418**(3): p. 571-577.
75. Huang, P., et al., Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry*, 2010. **109**(4): p. 747-754.
76. Gely-Pernot, A., et al., Retinoic Acid Receptors Control Spermatogonia Cell-Fate and Induce Expression of the SALL4A Transcription Factor. *PLoS Genet*, 2015. **11**(10): p. e1005501.
77. Ghasemzadeh-Hasankolaei, M., et al., Comparison of the efficacy of three concentrations of retinoic acid for transdifferentiation induction in sheep marrow-derived mesenchymal stem cells into male germ cells. *Andrologia*, 2014. **46**(1): p. 24-35.
78. Ghasemzadeh-Hasankolaei, M., M.A. Sedighi-Gilani, and M.B. Eslaminejad, Induction of ram bone marrow mesenchymal stem cells into germ cell lineage using transforming growth factor-beta superfamily growth factors. *Reprod Domest Anim*, 2014. **49**(4): p. 588-598.
79. Cakici, C., et al., Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 529589.
80. Chen, H., et al., Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(1): p. 819-28.
81. Maghen, L., et al., Human umbilical perivascular cells: a novel source of MSCs to support testicular niche regeneration. *Reproduction*, 2016.
82. Hsiao, C.H., et al., Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Res Ther*, 2015. **6**: p. 113.
83. Hsiao, C.H., et al., Mesenchymal stem cells restore the sperm motility from testicular torsion-detorsion injury by regulation of glucose metabolism in sperm. *Stem Cell Res Ther*, 2019. **10**(1): p. 270.