

Varikosel ile ilişkili infertilite patofizyolojisinde mikroRNA'ların rolü

Role of microRNAs in the pathophysiology of varicocele-related infertility

Neslihan Hekim[✉], Sercan Ergün[✉], Sezgin Güneş[✉]

ÖZ

Varikosel, erkek infertilitesinin en yaygın tedavi edilebilir nedeni olarak kabul edilir ve varikoselin fertilité üzerindeki etkisini açıklamak için olası patofizyolojik mekanizmalar önerilmiştir. Ancak, varikoselle ilişkili infertilitenin moleküler düzeyde etiyojisi hala belirsizliğini korumaktadır. MikroRNA'lar (miRNA'lar), hedef mRNA'larındaki tamamlayıcı baz dizileriyle eşleşerek genlerin ekspresyonlarını düzenleyen küçük kodlamayan RNA molekülleridir. Hücredeki fizyolojik işlevleri dışında, miRNA'ların ekspresyonlarındaki düzensizliğin birçok hastalığın gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir. Bu derlemede, varikoselle ilişkili infertilitede seminal, testiküler ve spermatozoal miRNA'ların olası rolleri incelenmiştir. Dokuya özgü miRNA'ların anormal ekspresyonunun, belirli erkek üreme sistemi bozukluklarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, bu tür miRNA'ların varikosel patofizyolojisindeki rolüne odaklanmak, varikoselle ilişkili erkek infertilitesinin moleküler mekanizmalarını aydınlatılabilir ve etkili biyobelirteçler ve terapötik ajanlar bulma potansiyeli yaratabilir.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteç, erkek infertilitesi, mikroRNA, varikosel

ABSTRACT

Varicocele is considered the most common treatable cause of male infertility, and possible pathophysiological mechanisms have been proposed to explain the effect of varicocele on fertility. However, the molecular etiology of infertility associated with varicocele is still unclear. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that regulate the expression of genes by binding complementary base sequences in target mRNAs. Apart from its function in many physiological cell processes, it has been reported that the irregularity of miRNAs expression plays a role in the development of many diseases. In this review, the possible roles of seminal, testicular, and spermatozoal miRNAs in varicocele-related infertility were discussed. Abnormal expression of tissue-specific miRNAs is associated with certain male reproductive system disorders. Thus, focusing on the role of such miRNAs in varicocele pathophysiology could illuminate the molecular mechanisms of varicocele-associated male infertility and create the potential to find effective biomarkers and therapeutic agents.

Keywords: Biomarker, male infertility, microRNA, varicocele

GENEL BİLGİ

Erkek infertilitesinin en yaygın nedenlerinden biri olan varikosel, internal spermatic damarlarda artan basınç ve anormal genişleme ile birlikte pampiniform pleksusun büyümesi olarak bilinmektedir.^[1] Varikosel prevalansı genel erkek popülasyonunda yaklaşık %15 ve primer ve sekonder infertil erkeklerde ise sırasıyla %25–40 ve %45–81'dir.^[2] Varikosel hastalarının yaklaşık %78–93'ünde tek taraflı sol varikosel, %1–7'sinde izole sağ varikosel görülürken, bilateral varikosel insidansı %2–20'dir.^[2] Primer varikoselde genişleme ve reflünün ortaya çıkışı için öne sürülen

bazı teoriler bulunmaktadır.^[3,4] Bunlardan ilki sol testiküler venin dikey bir şekilde sol renal vene akmasıdır. Bu durum, sol spermatic venin daha uzun bir drenaj yoluna sahip olduğunu göstermektedir ve sonuçta pampiniform pleksusa iletilen hidrostatik basıncın artmasına neden olur.^[3] İkinci olarak, venöz kapakçıkların yetersizliği ve internal spermatic ven drenajındaki varyasyonun, varikosel gelişimine katkıda bulunan bir faktör olduğu varsayılmaktadır.^[4] Son olarak, sol renal venin süperior mezenterik arter ile abdominal aort arasında sıkışmasının (nutcracker etkisi) sol testis veninden kan akışını kısmen engelleyebileceği ve pampiniform pleksus içindeki hidrostatik basıncı yükseltebileceği öne sürülmüştür.^[3] İlâveten tümör basısı, vasküler tümör embolisi veya ektopik damar basıncının artması sekonder varikosele neden olabilir.^[5]

Varikoselin hangi mekanizma ile infertiliteye yol açtığı kesin olarak bilinmemektedir. Ancak varikoselin patofizyolojisi konusunda çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Skrotal hipertermi, hormonal bozukluklar, oksidatif stres

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Yazışma Adresi/ Correspondence:

Dr. Neslihan Hekim

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kurupelit Kampüsü, Atakum 55420 Samsun, Türkiye

Tel: +90 362 312 19 19

E-mail: gntkurt@gmail.com

Geliş/ Received: 24.05.2021

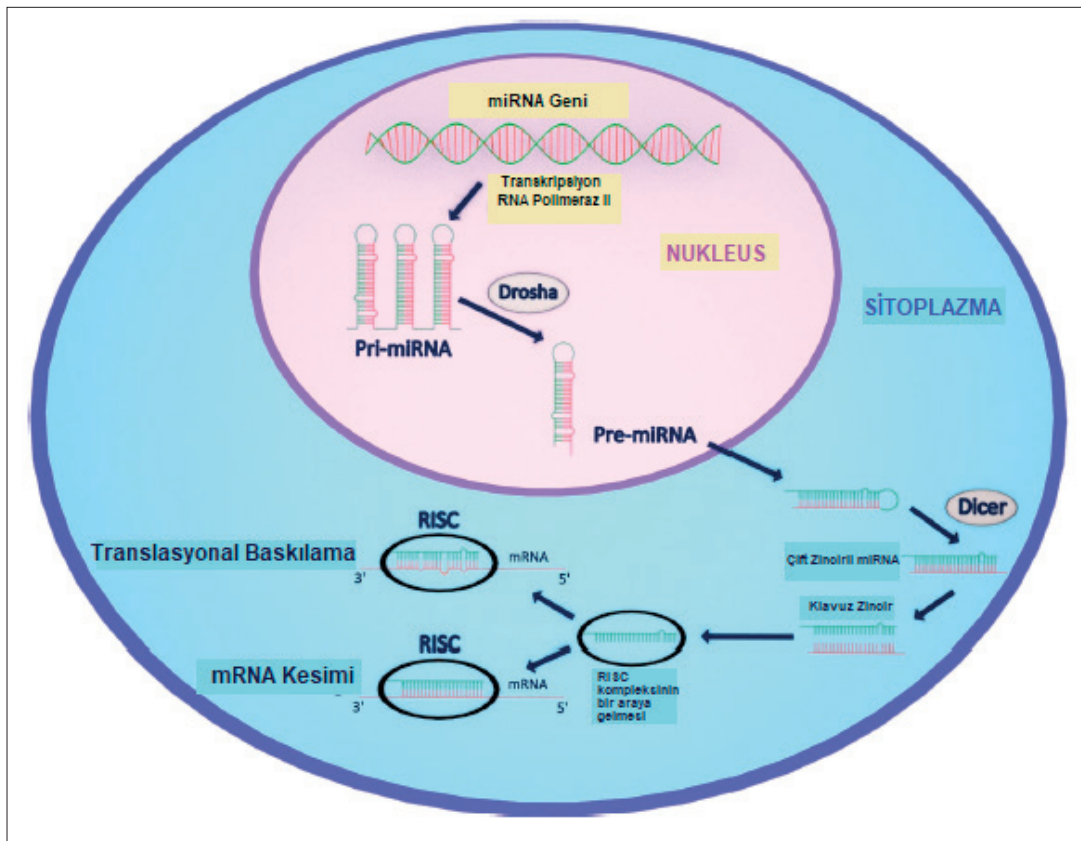
Kabul/ Accepted: 08.07.2021

(OS), testis hipoperfüzyonu ve hipoksinin yanı sıra toksik metabolitlerin geri akışı varikozel aracılı infertilite ile ilişkilidir.^[6] Türk Androloji Derneği Varikozel Klavuzuna göre, varikozelli infertil bir erkeğin temel değerlendirilmesi anamnez, fizik muayene ve Dünya Sağlık Örgütü 2010 kılavuzlarına^[7] göre değerlendirilen en az iki semen analizi ile yapılmaktadır.^[8] Ek olarak, reaktif oksijen türleri (ROS) ile semedeki antioksidanların ölçümü ve sperm DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi de infertilitede spermatozoanın fonksiyonunu belirlemede kullanılabilir. ^[2] Bununla birlikte tüm bu testler, varikozel hastalarında sperm üretimi, yapısı ve fonksiyonundaki bozulmayla ilişkili hücre içi moleküler değişiklikler hakkında yetersiz kalabilmektedir.^[9] Genetik ve epigenetik faktörler, varikozeli olan erkeklerde gözlenen fenotip çeşitliliğinde, hastalığın gelişimi ve şiddetinde muhtemelen önemli roller oynamaktadır.^[10-12]

MikroRNA'lar (miRNA'lar), 18–22 nükleotid uzunluğunda, endojen olarak sentezlenen ve kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar, mRNA'nın 3' ucunu ve/veya kodlama bölgesini hedefleyerek, gen ekspresyonunu hedef mRNA'nın protein sentezindeki etkinliğini ya da stabilitesini değiştirerek susturur ve tüm memeli genlerinin yaklaşık üçte birinin düzenlenmesinde rol oynar.^[13,14] miRNA biyogenezi, miRNA genlerinden RNA polimeraz II ile pri-miRNA'lar olarak adlandırılan büyük öncü

RNA moleküllerin transkripsiyonu ile başlar (Şekil 1). Pri-miRNA'lar daha sonra çekirdekte bir tip III RNaz olan Drosha tarafından pre-miRNA'lar haline getirilir. Daha sonra sitoplazmaya aktarılan pre-miRNA'lar burada Dicer adı verilen başka bir tip III RNaz tarafından çift sarmallı miRNA moleküllerine dönüştürülür.^[15] Oluşan iki zincirden sadece biri, RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) olarak adlandırılan bir multiprotein kompleksine dahil edilir. RISC, tamamlayıcı baz eşleştirme yoluyla hedef mRNA'ya bağlanmak için kılavuz zincirini kullanır. miRNA-mRNA arasında tam baz eşleşmesi meydana gelirse, mRNA bölünür ve ardından bozulur. miRNA-mRNA arasında çoğunlukla 3' çevrilmemiş bölgelerde tam olmayan eşleşme meydana gelirse, bu durum translasyonel baskılamaya yol açar.^[13,15]

miRNA'ların, hücre döngüsü ve hücre farklılaşması, metabolizma, hücre proliferasyonu, apoptoz, erkek ve kadın gametogenez ve embriyo gelişimi gibi birçok biyolojik süreçte önemli bir rol oynadıkları gösterilmiştir.^[16,17] Erkek üreme sisteminde miRNA ekspresyonlarındaki değişiklikler, testis boyutunun azalmasına, seminifer tübüllerin dejenerasyonuna, germ hücresi apoptozunda artışa ve sperm morfolojisi ve motilitesinde bozukluklara ve olgun spermatozoa sayısında azalmaya yol açabilmektedir.^[14] Eş zamanlı (RT)-PCR, mikroarray ve biyoinformatik analizler testis, seminal plazma ve spermatozoada farklı miRNA'ların



Şekil 1. miRNA biyogenezi (Güneş ve ark.(2016)'dan uyarlanmıştır).

eksprese olduklarını ortaya çıkarmıştır.^[17,18] Abu-Halima ve ark. (2020), hedef genleri üreme hücrelerinin çoğalması, gelişimi ve farklılaşması ile ilgili çok çeşitli biyolojik süreçlerde yer alan ve spermatozoa, seminal plazma ve testis dokusunda sırasıyla 123, 156 ve 133 adet miRNA'nın sürekli eksprese edildiğini, 64 adet miRNA'nın ise bu üç dokuda da eksprese edildiğini tespit etmişlerdir.^[18]

Bir molekülün biyobelirteç olabilmesi için özgün, duyarlı, tercihen invaziv olmayan ve kolayca erişilebilir olması gerekmektedir. Klinik alanda patolojik durumların tespiti veya prognozları için kullanılan biyobelirteçler çoğunlukla serum veya plazmada kolayca bulunan proteinlerdir. Ancak, proteinlerin duyarlılığının ve özgüllüğünün az olması ve ayrıca yüksek afiniteli saptama ajanlarının geliştirilmesindeki maliyet nedeniyle, proteinlerin tanınma değerleri azalabilir.^[19] Öte yandan, özellikle vücut sıvılarındaki miRNA'lar çok düşük konsantrasyonlarda bile kolayca saptanır ve proteinlerden çok daha erken ortaya çıkar. Böylece hastalığın erken saptanmasına olanak tanır ve ekspresyonları genellikle doku/biyolojik evreye özgüdür.^[20] Ayrıca, translasyon sonrası farklı modifikasyonlara sahip olabilen ve bu sebeple tespitleri daha da zor olan protein biyobelirteçlerinden farklı olarak, miRNA'lar genellikle homojen bir molekül popülasyonudur. Bununla birlikte dolaşımdaki

miRNA'ların endojen RNAz aktivitesinden korunuyor olması, biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini artırır.^[20] Tüm bu özellikler, miRNA'ların proteinlerden daha iyi biyobelirteçler olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte hastalıklarda potansiyel miRNA adaylarının ve hedeflerinin belirlenmesi zordur. Şu anda miRNA hedeflerini tespit etmenin en yaygın yolu, daha sonra deneysel olarak doğrulanan hesaplama algoritmalarını kullanmaktır. Bununla birlikte, bu yol, biyoinformatik veritabanlarındaki miRNA hedeflerinin giderek artan sayısı nedeniyle karmaşık hale gelebilmektedir.^[20] Bu derleme kapsamında varikoselde, seminal, testiküler ve spermatozoal miRNA'ların araştırıldığı çalışmaların bulgularına ve bu miRNA'ların varikoselle ilişkili infertilite patofizyolojisindeki olası rollerine değinilecektir. Varikoselde çalışılmış miRNA'lar Tablo 1'de özetlenmiştir.

SEMİNAL VE TESTİKÜLER MikroRNA'lar

Spermatogenez sırasında protein kodlayan mRNA'ların yanı sıra çok sayıda kısa kodlamayan RNA'ların da ekspresyonu yapılmaktadır.^[21] miRNA profillemeye çalışmaları testis, epididimis, seminal plazma ve spermatozoaya özgü olduğu tespit edilen miRNA'lar tanımlanmıştır.^[17,18] Seminal miRNA'lar, testisin canlı hücrelerinden salındıkları, ekspresyonlarının stabil oluşu ve degradasyona

Tablo 1. Varikoselde miRNA'ları araştıran çalışmaların özeti

Eksprasyonu değişen miRNA'lar	Çalışma grubu	Çalışılan doku	Çalışma yöntemi	İlişkili olduğu hücresel olaylar	Kaynak
miR-210-3p	Sıçan ve insan	Epididimal sperm, testis dokusu, seminal plazma ve seminal ekzozom	Transkriptom dizileme, kantitatif PCR ve Western blot	Hipoksik stres altında koruyucu	[53-55]
miR-6316	Sıçan	Epididimal sperm ve testis dokusu	Transkriptom dizileme ve kantitatif PCR	Bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, doğal bağışıklık sistemi ve apoptotik sinyal yolu	[54]
miR-190a-5p	Sıçan	Epididimal sperm ve testis dokusu	Transkriptom dizileme ve kantitatif PCR	Hipoksi ve bağışıklık sistemi	[54]
miR-135b-5p	Sıçan	Epididimal sperm ve testis dokusu	Transkriptom dizileme ve kantitatif PCR	Apoptoz	[54]
miR-21	İnsan	Spermatozoa	Kantitatif PCR	Spermatogonial kök hücre homeostazı	[69]
miR-34a ve miR-34c	İnsan	Spermatozoa ve seminal plazma	Kantitatif PCR ve Western blot	Hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, sperm hareketliliği ve spermatogenez	[41,69]
miR-122a (miR-122)	İnsan	Spermatozoa ve seminal plazma	Kantitatif PCR ve Western blot	Spermatogenezde kromatinin yeniden düzenlenmesi ve apoptoz	[41,69]
miR-192a	İnsan	Seminal plazma ve testis dokusu	Kantitatif PCR	Apoptoz	[21]
miR-181a	İnsan	Seminal plazma	Kantitatif PCR ve Western blot	Apoptoz	[41]
miR-15a	İnsan	Spermatozoa	Kantitatif PCR ve Western blot	Stres cevabı düzenlenmesi	[62]

oldukça dirençli oldukları için varikoselli erkeklerde spermatogenezi takip etmede potansiyel bir biyobelirteç olabilirler.^[22,23] Varikoselli non-obstrüktif azospermi (NOA) hastalarıyla yapılan bir çalışmada, cerrahi tedavi sonrasında ejakulatta spermatozoa bulunmayan hastaların seminal plazma ve testis dokularındaki miR-192a düzeyleri araştırılmıştır.^[24] Bu hastalardaki miR-192a ekspresyon seviyelerinin, tedavi sonrasında ejakulatta spermatozoa bulunan hastalara ve fertil kontrollere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.^[24] İlginç şekilde tedavi sonrasında ejakulatta spermatozoa bulunan hastaların miR-192a ekspresyon düzeyleri açısından fertil kontrollerle farkı bulunmamıştır.^[24] İnfertil erkeklerle yapılan çalışmalar miR-192'nin ekspresyon seviyesinin, anormal semen analizi görülen erkeklerin sperm örneklerinde değiştiğini bildirmiştir.^[17,25,26] miR mimikleri ve inhibitörleri ile apoptoz ve proliferasyon deneyleri, miR-192a'nın kaspaz-3 (apoptozla ilişkili sistein peptidaz) proteininin aktivasyonu yoluyla GC2 hücre apoptozunu indüklediğini göstermiştir.^[24] Kaspaz-3, hücre apoptozunda merkezi bir rol oynayan sistein-aspartik asit proteaz ailesinin bir üyesidir ve kaspaz 6, 7 ve 9'u aktive eder.^[27] Varikoselli infertil bir erkeğin tedavisinde açık cerrahi altın standart olarak kabul edilmektedir.^[8] Varikosel tedavisinden sonra OS biyobelirteçlerinin seviyelerinde, sperm DNA fragmentasyonunda ve semen parametrelerinde iyileşme gözlenmektedir.^[28-30] Açık cerrahi genel olarak kolay ve düşük riskli bir cerrahi olarak kabul edilmektedir ancak varikoselin nüksü, arter yaralanması ve postoperatif hidrosel oluşumu gözlenebilecek yan etkilerin arasındadır.^[31-33] İnvaziv bir işlem olan varikoselektominin NOA'lı varikoselli erkekler için yararlı olup olmadığı araştırılmaya devam etmektedir. Bu hastaların bir kısmının postoperatif ejakulatlarında hiç spermatozoa gözlenmemektedir.^[34] Yukarıdaki çalışmanın sonuçlarından yola çıkıldığında, seminal miR-192a seviyesi, NOA ve varikoselli olan erkeklerde varikoselektomi sonrasında ejakule spermatozoa gözlenmesi için potansiyel bir belirteç gibi görünmektedir.

Skrotal hipertermi, metabolitlerin reflüsü, Leydig hücre disfonksiyonu, hipoksi ile testiküler arter perfüzyonunun ve kan-testis bariyerinin bozulması dahil olmak üzere varikoselde erkek fertilitésinin nasıl bozulduğunu açıklamaya çalışan çalışmalara ek olarak, varikosel ile ilişkili vakaların OS artışı ve apoptotik belirteçlere sahip olduğu gösterilmiştir.^[35,36] Testis dokusu varikoselle ilişkili olarak meydana gelen hücre stresine (ısı, adrenal ve renal metabolitlerin geri kaçıışı, venöz duvarlar üzerindeki basınç artışı gibi) yüksek miktarda ROS üreterek cevap verir.^[29,37] Testiste ROS seviyesi arttığında antioksidanlar başta

olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla yanıt oluşturulur. Bu mekanizmalar varikoseli olan erkeklerin bazılarında fertilitenin sürdürülmesinde etkili olabilmektedir ancak bu mekanizmaların başarısızlığı varikoseli olan erkeklerde gözlenen testis hasarı ve infertilitenin temelini oluşturabilir.^[38] Varikoselli infertil 118 erkeğin ve 76 sağlıklı gönüllünün semen örneklerinde benzer ROS'ların seviyelerini araştırılan dört çalışmayı değerlendiren bir meta-analiz yapılmıştır.^[39] Meta-analiz sonucunda varikoselli erkeklerde sağlıklı kontrollere kıyasla ROS konsantrasyonlarının daha yüksek ve toplam antioksidan kapasitesi seviyelerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.^[39] Aynı zamanda varikoseli olan infertil erkeklerin seminal plazmalarında, varikoseli olmayan infertil erkeklere göre ROS seviyelerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.^[40,41] Bu çalışmalar, varikoselli infertil erkeklerde yüksek ROS düzeylerinin nötralizasyon sürecinin etkisiz olduğunu düşündürmektedir. Çalışmalar, miRNA'ların varikosel ile ilişkili sperm disfonksiyonuna neden olan ısı ve OS yanıtlarının düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir.^[42,43] Seminal miR-122, miR-181a ve miR-34c5'in ekspresyon seviyelerinin varikosel derecesi ve bilateralliği ile korelasyonlu olarak, varikoselli infertil oligoastenotatozoospermik (OAT) erkeklerde azaldığı belirtilmiştir.^[44] Bu çalışmada ayrıca seminal miR-122, miR-181a ve miR-34c5 ekspresyonu semen parametreleri, seminal glutasyon peroksidaz, malondialdehit, BCL2 ve BAX seviyeleriyle korelasyon göstermiştir. Daha önceki çalışmalarda, miR-34c-5p, miR-122, miR-181a ekspresyon seviyelerinin normozoospermik erkeklerle karşılaştırıldığında astenozoospermik erkeklerin seminal plazmasında azaldığı belirtilmiştir.^[45] miR-34c pakiten spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde yüksek seviyelerde eksprese olur ve iyi bilinen antiapoptotik rolünün yanı sıra antiproliferatif bir işleve de sahip olan BCL2'yi hedefleyerek ekspresyonunu düzenler.^[46] Mikroarray çalışmaları miR-122'nin ekspresyonunun, normozoospermik fertil erkeklerin semenlerine kıyasla anormal semen analizine sahip infertil erkeklerde arttığını bildirmiştir.^[47] miR-181a ekspresyon düzeyi de fertil erkeklerin seminal plazmalarına kıyasla, azospermik erkeklerde düşük ve astenozoospermik erkeklerde ise daha yüksek olarak belirtilmiştir.^[23] Testiste germ hücreleri, normal spermatogenez sırasında dejenerasyona uğrar ve böylece olgunlaşmaları ve farklılaşmaları sırasında potansiyel olgun sperm hücrelerinin %25-75'inin apoptozuyla sonuçlanır.^[48,49] Varikosel ile ilişkili olarak sperm hücrelerinin ölümü, apoptozla ilişkili proteinlerin hücre içi varlığı veya yokluğu ile düzenlenebilen bir apoptoz süreciyle gerçekleşir.^[48] Bu nedenle, germ hücreleri için meydana gelen apoptoz sürecindeki miRNA aracılı değişiklikler varikosele bağlı infertilitede önemli olabilir.

Çalışmalar, testisteki hipoksik ortamın varikoselin neden olduğu infertilitenin en önemli nedenlerinden biri olduğunu göstermiştir.^[50] Hipoksik dokularda eksprese edilen miR-210, birçok tümör ve tümöral olmayan hastalık için erken bir biyobelirteç olarak görülmektedir.^[51,52] Son yıllarda, gittikçe daha fazla çalışma miR-210-3p'nin çeşitli erkek üreme sistemi ile ilgili hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir.^[53,54] *In vitro* deneyler, miR-210'un erkek infertilitesinde, hücre çoğalması, hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalma süreçlerinde yer alan ve testisin normal fonksiyonunda önemli rol oynayan insülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2)'yi hedefleyerek spermatogenez üzerinde etkili olabileceğini ortaya koymaktadır.^[55] Deneysel olarak sol varikozel oluşturulmuş sıçan modellerinde yapılan transkriptom dizileme ve kantitatif PCR çalışmaları, seminifer tübüller ve epididimide miR-210-3p'nin ekspresyonunun arttığını bildirmiştir.^[56,57] Ayrıca bu hayvanların Sertoli hücrelerinde *in vitro* hipoksi uygulamasına yanıt olarak miR-210-3p ekspresyonunda değişiklik olduğu gösterilmiştir.^[56] Varikoselde miR-210-3p'nin işlevi tam olarak bilinmemektedir ancak miR-210-3p'nin insan seminal plazmasında bulunduğu ve ekspresyonunun spermatogenez ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir.^[55] Varikoselde anormal semen parametreleri için potansiyel bir biyobelirteç olarak seminal miR-210-3p'nin ekspresyon değişikliklerini araştıran bir çalışma, varikozel hastalarında seminal miR-210-3p düzeyinin normozoospermik kontrol grubuna göre 2,18 kat fazla olduğunu göstermiştir.^[58] İlaveten farklı çalışmalarda, varikozel derecesi ile miR-210-3p ekspresyonunun korelasyonlu olduğu ve preoperatif değerler ile karşılaştırıldığında, seminal miR-210-3p ekspresyonunun ameliyattan 3 ay sonra anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir.^[56,58] Bu sene içinde yayınlanan bir çalışmada derece II ve III varikozeli olan hastalarda seminal ekzozomal miR-210-3p'nin ekspresyonunun subklinik ve derece I varikozelli erkeklere kıyasla anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir.^[56] Araştırmacılar seminal ekzozomal miR-210-3p'nin ekspresyonu ile sperm sayısının negatif korelasyon gösterdiğini ve miR-210-3p düzeyinin derece II ve III varikoselde artarken seminal inhibin-B seviyesinin ise yalnızca derece III varikoselde azaldığını belirtmişlerdir. Varikoselde Sertoli hücrelerinden salgılanan ve Sertoli hücrelerinin işlevini yansıtan inhibin-B gibi biyobelirteçlerin seviyelerinde değişiklikler olmaktadır.^[59,60] miR-210-3p'nin ekspresyonunun varikoselde daha erken evrelerde artış göstermesi, varikoselin neden olduğu Sertoli hücre hasarını izlemek ve incelemek için yeni ve invaziv olmayan bir stratejiyi temsil edebileceğini göstermektedir.

Transkriptom dizileme çalışmaları deneysel varikozel oluşturulmuş ratların epididimis ve testislerinde

rno-miR-210-3p ile birlikte ekspresyonu artan rno-miR-6316, rno-miR-190a-5p ve rno-miR-135b-5p'yi de işaret etmektedir.^[57] rno-miR-210-3p, rno-miR-6316, rno-miR-190a-5p ve rno-miR-135b-5p hipoksi, bağışıklık sistemi sürecinin düzenlenmesi, doğal bağışıklık sistemi ve apoptotik sinyal yolunda rol oynamaktadır.^[57,61-63] miR-135b-5p, kanser gelişimi ile ilişkili olduğu ileri sürülen bir miRNA'dır ve miR-135b-5p'nin ekspresyon artışının kanser hücrelerinin apoptozunu baskılayabileceği ve çoğalmasını, göçünü, istilasını ve mitozunu önemli ölçüde artırabileceği gösterilmiştir.^[61] miR-190a-5p'nin ekspresyonu hipoksik koşullarda artar ve enfeksiyona karşı bağışıklık cevabını düzenlemede anahtar rol oynayan NF-κB yolağında görev alır.^[62,63]

SPERMATOZOAL MikroRNA'lar

Spermatogenez, farklılaşmamış spermatogonial kök hücrelerin, spermatozoa adı verilen olgun ve hareketli sperm hücrelerine dönüştüğü çok aşamalı bir süreçtir. Spermatogonial kök hücrelerin iki tür spermatogonia ile sonuçlanan mitotik bölünmesini takiben; tip B hücreler primer spermatositlere farklılaşır. Primer spermatositler, mayoz I ile iki sekonder spermatosite bölünür ve bu hücreler, mayoz II yoluyla dört haploid spermatid oluşturur. Spermiyogenez adı verilen son aşamada, spermatidler akrozom oluşumu, nükleer yoğunlaşma, flagellum gelişimi ve sitoplazmanın yeniden düzenlenmesi gibi çok sayıda morfolojik değişikliğe uğrar ve sonuçta spermatozoa meydana gelir.^[64] Spermatogenez ilerledikçe her hücre tipine özgü transkriptom profilleri meydana gelir. Mitotik spermatogonyada spesifik bir gen grubu indüklenirken, spermatositlerde mayozda görev alan genler indüklenir. Ayrıca haploid farklılaşma için gerekli birçok gen, yuvarlak spermatidlerde veya uzamış spermatidlerde eksprese edilir.^[65] Spermiyogenezin geç aşamalarındaki histon protamin geçişi, kromatinin sıkı bir şekilde paketlenmesine yol açtığından, bu hücrelerde transkripsiyon susturulur.^[13] Bu nedenle birçok protein için mRNA'lar daha erken aşamalarda sentezlenir ve sonraki aşamalarda ihtiyaç duyulana kadar geçici olarak depolanır. Tıpkı mRNA'lar gibi, miRNA'ların ekspresyonları da spermatogenez sırasında düzenlenir. miRNA'lar spermatogenez, erken embriyogenez ve hücrel farklılaşma gibi çeşitli gelişimsel ve fizyolojik süreçleri düzenler, aktiviteleri aşamaya bağlı olarak diğer proteinler veya kompleksler tarafından düzenlenir.^[13] Önceki araştırmalar, insan spermatozoasında, spermatogenezin tamamlanmasından sonra çeşitli RNA'ların (miRNA'lar dahil) korunduğunu göstermiştir; dahası, spermatozoal RNA'ların ekspresyonundaki değişiklikler erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiştir.^[16] Ayrıca, farklı spermatogenik bozuklukları

olan hastalarda ejakulattaki spermatozoanın miRNA ekspresyonlarındaki değişiklikler mikroarray çalışmaları ile gösterilmiştir.^[25]

Ji ve ark. (2014), ejakulat spermünde ısı ve OS ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonunu araştırmışlardır. Derece II veya III varikoseli olan hastalarda normozoospermik kontrollere kıyasla miR-15a ekspresyonunun azaldığını ve miR-15a'nın, stres yollarında rol oynayan ısı şok proteini HSPA1B'nin ekspresyonunu azalttığını bulmuşlardır.^[66] miR-15a/16-1 gen ailesi, B hücreli kronik lenfositik lösemi, miyeloma ve mantle hücreli lenfomada sıklıkla delesyona uğrayan bir genomik bölgede bulunur.^[67] Bu gen ailesi, memeli türleri arasında evrimsel olarak korunur ve miR-15a'nın ekspresyonu, kronik lenfositik lösemi hastalarında azalır.^[68,69] Son zamanlarda yapılan çalışmalar miR-15'in stres cevabının düzenlenmesinde rol oynadığını da göstermiştir. miR-15a'nın anti-apoptotik faktör BCL2'yi hedefleyerek apoptozu indüklediği ve primer fibroblast kültürlerinde OS sonucunda ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir.^[70] miR-15'in ekspresyonu interlökin-1 β ile uyarılan hücrelerde azalır, böylece enflamatuar hücre proliferasyonu inhibe edilirken ve enflamatuar hücre apoptozu indüklenir.^[71] miR-15 aile üyeleri, yaralanmaya cevaben kardiyomyositlerin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını düzenleyen stres sinyal yollarının aracılığı olarak hareket ederler.^[72] Bu çalışmalar varikoselde miR-15a ekspresyonundaki azalmanın, hücre sağkalımının desteklenmesinde önemli rol oynayan HSPA1B aracılığıyla spermatozoayı hipertermi veya OS hasarından koruyabileceğini ortaya koymaktadır.

Benzer bir çalışmada, Ashrafzade ve ark. (2020), fertil grup ile karşılaştırıldığında, derece III varikoselli ve normal spermatogenezli ve derece III varikoselli ve anormal spermatogenezli hastaların spermatozoalarında miR-21, miR-34a ve miR-122a ekspresyon düzeylerinin azaldığını gösterdi.^[73] miR-122a, germ hücre gelişiminde rol oynar ve spermatogenez sürecini takiben kromatinin yeniden şekillenmesinde yer alan ve testise özgü bir gen olan nükleer geçiş proteini 2'nin ekspresyonunu kontrol eder.^[74] Çalışmalar, miR-34a ailesinin (miR-34a/b/c), hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, sperm hareketliliği ve spermatogenezde de rol oynadığını göstermiştir.^[75] Diğer bir miRNA, spermatogonial kök hücre popülasyonunun homeostazında yer aldığı gösterilen miR-21'dir ve etkisinin bir mekanizması apoptoz regülasyonu yoluyla olup, miR-21'in düzenlenmesinde birden fazla transkripsiyon faktörünün rol oynayabileceğini gösterir.^[73,76]

SONUÇ

Bu derlemede, erkek üreme sisteminde dokuya özgü miRNA'ların varikosel ile ilişkili infertilitenin üzerine etkileri

tartışılmıştır. Varikoselin patofizyolojisi konusunda çeşitli mekanizmalar öne sürülmesine rağmen infertiliteye neden olduğu mekanizmalar çoğunlukla açıklanamamıştır. miRNA'ların gen ekspresyonunu protein translasyonunu etkileyerek düzenlemesi, ekspresyonlarındaki herhangi bir hatanın infertilite gibi birçok hastalığa bağlanabilmesine yol açmaktadır.^[58] Önceki çalışmalar, bazı miRNA'ların, insan testislerinin ve spermatozoanın gelişiminde ve işlevinde önem kazandığını göstermiştir.^[18] Varikosel gelişiminin testis dokusunda spermatogenez disfonksiyona ve anormal semen parametrelerine yol açabileceği düşünüldüğünde, miRNA'lar bu mekanizmaların düzenlenmesinde yer alan moleküler yolların daha iyi anlaşılması için önemli bir araştırma hedefi olabilir. Bu bağlamda, varikosel durumu, hasta yaşı, fertilitesi veya sağlıkla ilgili diğer konularda değişiklik göstermeyen invaziv çalışma tasarımı hayvan modellerinin kullanılması, varikosel gelişimi sırasında erkek üreme sistemindeki miRNA'ların moleküler yollarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir. Benzer şekilde, varikosel gelişimi sırasında testis dokusundaki hasarın ve bazı varikoselli infertil erkeklerin neden cerrahi tedaviden fayda görmediğinin altında yatan olası miRNA'ların etkisinin araştırılması umut vericidir. İnvaziv ve pahalı bir işlem olan varikoselektomiden hangi hastaların en çok fayda gördüğünü gösterebilecek invaziv olmayan klinik belirteçler yararlı olabilir.^[24,58] Bu durumda cerrahi prosedür, sadece varikoselektomiden sonra ejakülatta spermatozoa elde etme şansı yüksek olan hastaları hedef alabilecektir. Yapılan çalışmalar miRNA'ların varikoselli erkeklerin spermatogenez durumu değerlendirmek için kullanılan seminal plazma biyobelirteçlerinin umut verici bir alternatif olduğunu ve hastalığın mevcut değerlendirme yöntemlerine ek olarak etkili bir tamamlayıcı olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte mevcut verilerin varikoselde miRNA'ların bağışıklık, stres cevabı, apoptoz gibi mekanizmaların kontrolüne dahil olduklarını göstermesine rağmen,^[24,44,56-58,73] varikosel patofizyolojisindeki miRNA yollarının tam olarak anlaşılması, varikoselli infertil hastalarda gelecekteki invaziv olmayan terapötik uygulamaları geliştirmek için çok önemlidir. Ayrıca miRNA ekspresyon değerlendirmeleri, varikosel aracılı infertilitenin altında yatan moleküler mekanizmaların karmaşıklığı, ölçüm yöntemi, düşük RNA miktarı, biyolojik materyal miktarı ile bir dereceye kadar ilişkili olabilir. Bu sebeple RNA dizileme gibi yüksek çıktılı biyokimyasal analiz teknikleri varikoseldeki miRNA-protein etkileşimlerini belirlemek için kullanılabilir. Bununla birlikte, belirlenen bu miRNA'ların ekspresyon değişikliklerinin ve hedeflerinin varikoselli hastalarda yorumlanması tek hücre yaklaşımli miRNA analizleri ile büyük ölçüde geliştirilecektir.

Hakem Değerlendirmesi

Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek

Herhangi bir mali destek alınmamıştır.

Peer-review

Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure

No financial support has been received.

KAYNAKLAR

1. Arab D, Doustmohammadi H, Ardestani Zadeh A. Dietary supplements in the management of varicocele-induced infertility: A review of potential mechanisms. *Andrologia* 2021;53:e13879. [CrossRef]
2. Panner Selvam MK, Baskaran S, Agarwal A, Henkel R. Protein profiling in unlocking the basis of varicocele-associated infertility. *Andrologia* 2021;53:e13645. [CrossRef]
3. Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nat Rev Urol* 2012;9:678–90. [CrossRef]
4. Clavijo RI, Carrasquillo R, Ramasamy R. Varicoceles: prevalence and pathogenesis in adult men. *Fertil Steril* 2017;108:364–9. [CrossRef]
5. Zhao X-D, Ma X, Ma P-C, Wang J-W. A network meta-analysis protocol of efficacy and safety evaluation of different surgery regimens for varicocele patients with infertility: A study protocol. *Medicine (Baltimore)* 2021;100:e21150. [CrossRef]
6. Jensen CFS, Ostergren P, Dupree JM, Ohl DA, Sonksen J, Fode M. Varicocele and male infertility. *Nat Rev Urol* 2017;14:523–33. [CrossRef]
7. World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 2010, World Health Organization: Geneva. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>
8. Kadioğlu A, Çayan S, Aydos K, Aşçı R, Alıcı B. Varikozel Klavuzu, Türk Androloji Derneği, 2005: İstanbul. <https://www.androloji.org.tr/androlojiDATA/tadYayinlari/Varikozel-Klavuzu.pdf>
9. Panner Selvam MK, Agarwal A. Sperm and Seminal Plasma Proteomics: Molecular Changes Associated with Varicocele-Mediated Male Infertility. *World J Mens Health* 2020;38:472–83. [CrossRef]
10. Santana VP, James ER, Miranda-Furtado CL, Souza MF, Pompeu CP, Esteves SC, et al. Differential DNA methylation pattern and sperm quality in men with varicocele. *Fertil Steril* 2020;114:770–8. [CrossRef]
11. Santana VP, Miranda-Furtado CL, de Oliveira-Gennaro FG, Dos Reis RM. Genetics and epigenetics of varicocele pathophysiology: an overview. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:839–47. [CrossRef]
12. Santana VP, Miranda-Furtado CL, Pedrosa DCC, Eiras MC, Vasconcelos MAC, Ramos ES, et al. The relationship among sperm global DNA methylation, telomere length, and DNA fragmentation in varicocele: a cross-sectional study of 20 cases. *Syst Biol Reprod Med* 2019;65:95–104. [CrossRef]
13. Gunes S, Arslan MA, Taskurt Hekim GN, Asci R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:553–69. [CrossRef]
14. Reza A, Choi Y-J, Han SG, Song H, Park C, Hong K, Kim J-H. Roles of microRNAs in mammalian reproduction: from the commitment of germ cells to peri-implantation embryos. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2019;94:415–38. [CrossRef]
15. Chen X, Li X, Gou J, Zhang P, Zeng W. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. *J Anim Sci Biotechnol* 2017;8:35. [CrossRef]
16. Khawar MB, Mehmood R, Roohi N. MicroRNAs: Recent insights towards their role in male infertility and reproductive cancers. *Bosn J Basic Med Sci* 2019;19:31–42. [CrossRef]
17. Salas-Huetos A, James ER, Aston KI, Carrell DT, Jenkins TG, Yeste M. The role of miRNAs in male human reproduction: a systematic review. *Andrology* 2020;8:7–26. [CrossRef]
18. Abu-Halima M, Galata V, Backes C, Keller A, Hammadeh M, Meese, E. MicroRNA signature in spermatozoa and seminal plasma of proven fertile men and in testicular tissue of men with obstructive azoospermia. *Andrologia* 2020;52:e13503. [CrossRef]
19. Pal MK, Jaiswar SP, Dwivedi VN, Tripathi AK, Dwivedi A, Sankhwar P. MicroRNA. a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Biol Med* 2015;12:328–41. [CrossRef]
20. Vashisht A, Gahlay GK. Using miRNAs as diagnostic biomarkers for male infertility: opportunities and challenges. *Mol Hum Reprod* 2020;26:199–214. [CrossRef]
21. Soumillon M, Necsulea A, Weier M, Brawand D, Zhang X, Gu H, et al. Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell Rep* 2013;3:2179–90. [CrossRef]
22. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:402. [CrossRef]
23. Forouhari S, Mahmoudi E, Safdarian E, Beygi Z, Gheibihayat SM. MicroRNA. A Potential Diagnosis for Male Infertility. *Mini Rev Med Chem* 2020;21:1226–36. [CrossRef]
24. Zhi EL, Liang G-Q, Li P, Chen H-X, Tian R-H, Xu P, Li Z. Seminal plasma miR-192a: a biomarker predicting successful resolution of nonobstructive azoospermia following varicocele repair. *Asian J Androl* 2018;20:396–9. [CrossRef]
25. Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, Backes C. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril* 2013;99:1249–55.e16. [CrossRef]
26. Gholami D, Amirmahani F, Yazdi RS, Hasheminia T, Teimori H. MiR-182-5p, MiR-192-5p, and MiR-493-5p Constitute a Regulatory Network with CRISP3 in Seminal Plasma Fluid of Teratozoospermia Patients. *Reprod Sci* 2021;28:2060–9. [CrossRef]
27. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:7320–6. [CrossRef]
28. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol* 2011;60:796–808. [CrossRef]
29. Esteves SC, Santi D, Simoni M. An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrology* 2020;8:53–81. [CrossRef]
30. Hurtado de Catalfo GE, Ranieri-Casilla A, Marra FA, de Alaniz MJ, Marra CA. Oxidative stress biomarkers and hormonal profile in human patients undergoing varicocelectomy. *Int J Androl* 2007;30:519–30. [CrossRef]

31. Cayan S, Kadioglu TC, Tefekli A, Kadioglu A, Tellaloglu S. Comparison of results and complications of high ligation surgery and microsurgical high inguinal varicocelectomy in the treatment of varicocele. *Urology* 2000;55:750–4. [\[CrossRef\]](#)
32. Chan PT, Wright EJ, Goldstein M. Incidence and postoperative outcomes of accidental ligation of the testicular artery during microsurgical varicocelectomy. *J Urol* 2005;173:482–4. [\[CrossRef\]](#)
33. Süer E, Yaman Ö. Varikoselin Tedavi Endikasyonları, Tedavi Yöntemleri, Prognostik Faktörler ve Komplikasyonları. İçinde: Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioglu O, Kadioğlu A, editörler. *Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2013. p.601–14. <https://www.androloji.org.tr/androlojiDATA/tadYayinlari/Erkek-Ureme-Sistemi-Hastaliklari-ve-Tedavisi.pdf>
34. Esteves SC, Miyaoka R, Roque M, Agarwal A. Outcome of varicocele repair in men with nonobstructive azoospermia: systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl* 2016;18:246–53. [\[CrossRef\]](#)
35. Hassan A, el-Nashar EM, Mostafa T. Programmed cell death in varicocele-bearing testes. *Andrologia* 2009;41:39–45. [\[CrossRef\]](#)
36. Tawadrous GA, Aziz AA, Mostafa T. Seminal soluble fas relationship with oxidative stress in infertile men with varicocele. *Urology* 2013;82:820–3. [\[CrossRef\]](#)
37. Krzysciak W, Kozka M. Generation of reactive oxygen species by a sufficient, insufficient and varicose vein wall. *Acta Biochim Pol* 2011;58:89–94. [\[CrossRef\]](#)
38. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2. *Nat Rev Urol* 2013;10:26–37. [\[CrossRef\]](#)
39. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SSSR. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2006;12:630–3. [\[CrossRef\]](#)
40. Sakamoto Y, Ishikawa T, Kondo Y, Yamaguchi K, Fujisawa M. The assessment of oxidative stress in infertile patients with varicocele. *BJU Int* 2008;101:1547–52. [\[CrossRef\]](#)
41. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003;80:1431–6. [\[CrossRef\]](#)
42. Zhang R, Zuo Y, Cao S. Upregulated microRNA-423–5p promotes oxidative stress through targeting glutathione S-transferase mu 1 in asthenozoospermia. *Mol Reprod Dev* 2021;88:158–66. [\[CrossRef\]](#)
43. Alves MBR, de Arruda RP, Batissaco L, Garcia-Oliveros LN, Gonzaga VH, Nogueira VJM, et al. Changes in miRNA levels of sperm and small extracellular vesicles of seminal plasma are associated with transient scrotal heat stress in bulls. *Theriogenology* 2021;161:26–40. [\[CrossRef\]](#)
44. Mostafa T, Rashed LA, Nabil NI, Osman I, Mostafa R, Farag M. Seminal miRNA Relationship with Apoptotic Markers and Oxidative Stress in Infertile Men with Varicocele. *Biomed Res Int* 2016;2016:4302754. [\[CrossRef\]](#)
45. Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem* 2011;57:1722–31. [\[CrossRef\]](#)
46. Liu WM, Pang RT, Chiu PC, Wong BP, Lao K, Lee KF, Yeung WS. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:490–4. [\[CrossRef\]](#)
47. Liu T, Cheng W, Gao Y, Wang H, Liu Z. Microarray analysis of microRNA expression patterns in the semen of infertile men with semen abnormalities. *Mol Med Rep* 2012;6:535–42. [\[CrossRef\]](#)
48. Ning JZ, Rao T, Cheng F, Yu WM, Ruan Y, Yuan R, et al. Effect of varicocelectomy treatment on spermatogenesis and apoptosis via the induction of heat shock protein 70 in varicocele-induced rats. *Mol Med Rep* 2017;16:5406–12. [\[CrossRef\]](#)
49. Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2015;31:309–19. [\[CrossRef\]](#)
50. Razi M, Tavalae M, Sarrafzadeh-Rezaei F, Moazamian A, Gharagozloo P, Drevet JR, Nasr-Eshafani MH. Varicocele and oxidative stress: New perspectives from animal and human studies. *Andrology* 2021;9:546–58. [\[CrossRef\]](#)
51. Wu T-Y, Leng Q, Tian L-Q. The microRNA-210/Casp8ap2 Axis Alleviates Hypoxia-Induced Myocardial Injury by Regulating Apoptosis and Autophagy. *Cytogenet Genome Res* 2021;161:132–42. [\[CrossRef\]](#)
52. Hino Y, Rahman MM, Lai Y-C, Husna AA, Chen H-W, Hasan N, et al. Hypoxic miRNAs expression are different between primary and metastatic melanoma cells. *Gene* 2021;782:145552. [\[CrossRef\]](#)
53. Xu Y-W, Ou N-J, Song Y-X, Wang X-H, Kang J-Q, Yang Y-J, et al. Seminal plasma miR-210–3p induces spermatogenic cell apoptosis by activating caspase-3 in patients with varicocele. *Asian J Androl* 2020;22:513–8. [\[CrossRef\]](#)
54. Duan Z, Huang H, Sun F. The functional and predictive roles of miR-210 in cryptorchidism. *Sci Rep* 2016;6:32265. [\[CrossRef\]](#)
55. Tang D, Huang Y, Liu W, Zhang X. Up-Regulation of microRNA-210 is Associated with Spermatogenesis by Targeting IGF2 in Male Infertility. *Med Sci Monit* 2016;22:2905–10. [\[CrossRef\]](#)
56. Ma Y, Zhou Y, Xiao Q, Zou SS, Zhu YC, Ping P, Chen XF. Seminal exosomal miR-210–3p as a potential marker of Sertoli cell damage in Varicocele. *Andrology* 2021;9:451–9. [\[CrossRef\]](#)
57. Ou N, Song Y, Xu Y, Yang Y, Liu X. Identification and verification of hub microRNAs in varicocele rats through high-throughput sequencing and bioinformatics analysis. *Reprod Toxicol* 2020;98:189–99. [\[CrossRef\]](#)
58. Xu Y, Zhang Y, Yang Y, Liu X, Chen Y. Seminal plasma miR-210–3p is a biomarker for screening dyszoospermia caused by varicocele. *Andrologia* 2019;51:e13244. [\[CrossRef\]](#)
59. Trigo RV, Bergada I, Rey R, Ballerini MG, Bedecarras P, Bergada C, et al. Altered serum profile of inhibin B, Pro-alphaC and anti-Mullerian hormone in prepubertal and pubertal boys with varicocele. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:758–64. [\[CrossRef\]](#)
60. Van Batavia JB, Lawton E, Frazier JR, Zderic SA, Zaontz MR, Shukla AR, et al. Total Motile Sperm Count in Adolescent Boys with Varicocele is Associated with Hormone Levels and Total Testicular Volume. *J Urol* 2021;205:888–94. [\[CrossRef\]](#)
61. Chen Z, Gao Y, Gao S, Song D, Feng Y. MiR-135b–5p promotes viability, proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting Kruppel-like factor 4(KLF4). *Arch Med Sci* 2020;16:167–76. [\[CrossRef\]](#)
62. Jiang J, Xia Y, Liang Y, Yang M, Zeng W, Zeng X. miR-190a–5p participates in the regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by targeting KLF15 and can serve as a biomarker of diagnosis and prognosis in chronic obstructive pulmonary disease complicated with pulmonary hypertension. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2018;13:3777–90. [\[CrossRef\]](#)
63. Yu Y, Zhang D, Huang H, Li J, Zhang M, Wan Y, et al. NF-kappaB1 p50 promotes p53 protein translation through miR-190 downregulation of PHLPP1. *Oncogene* 2014;33:996–1005. [\[CrossRef\]](#)
64. Ibtisham F, Wu J, Xiao M, An L, Banker Z, Nawab A, et al. Progress and future prospect of in vitro spermatogenesis. *Oncotarget* 2017;8:66709–27. [\[CrossRef\]](#)

65. Zhu Z, Li C, Yang S, Tian R, Wang J, Yuan Q, et al. Dynamics of the Transcriptome during Human Spermatogenesis: Predicting the Potential Key Genes Regulating Male Gametes Generation. *Sci Rep* 2016;6:19069. [CrossRef]
66. Ji Z, Lu R, Mou L, Duan YG, Zhang Q, Wang Y, et al. Expressions of miR-15a and its target gene HSPA1B in the spermatozoa of patients with varicocele. *Reproduction* 2014;147:693–701. [CrossRef]
67. Lerner M, Harada M, Loven J, Castro J, Davis Z, Oscier D, et al. DLEU2, frequently deleted in malignancy, functions as a critical host gene of the cell cycle inhibitory microRNAs miR-15a and miR-16-1. *Exp Cell Res* 2009;315:2941–52. [CrossRef]
68. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5166–71. [CrossRef]
69. Yue J, Tigyi G. Conservation of miR-15a/16-1 and miR-15b/16-2 clusters. *Mamm Genome* 2010;21:88–94. [CrossRef]
70. Li G, Luna C, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence. *Mech Ageing Dev* 2009;130:731–41. [CrossRef]
71. Li G, Qiu Z. Deletion of miR-15 Protects Against Rheumatoid Arthritis via Deregulating its Target Gene BCL2L2 and Repressing NF-kappaB Pathway. *Ann Clin Lab Sci* 2019;49:581–9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31611200/>
72. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012;148:1172–87. [CrossRef]
73. Ashrafzade AM, Sadighi Gilani MA, Topraggaleh TR, Khojasteh M, Sepidarkish M, Borjian Boroujeni P, Zamanian MR. Oxidative stress-related miRNAs in spermatozoa may reveal the severity of damage in grade III varicocele. *Andrologia* 2020;52:e13598. [CrossRef]
74. Yu Z, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2(Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol Reprod* 2005;73:427–33. [CrossRef]
75. Guo W, Xie B, Xiong S, Liang X, Gui JF, Mei J. miR-34a Regulates Sperm Motility in Zebrafish. *Int J Mol Sci* 2017;18:2676. [CrossRef]
76. Sharma A, Lagah SV, Nagoorvali D, Kumar BSB, Singh MK, Singla SK, et al. Supplementation of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor, Fibroblast Growth Factor 2, and Epidermal Growth Factor Promotes Self-Renewal of Putative Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatogonial Stem Cells by Upregulating the Expression of miR-20b, miR-21, and miR-106a. *Cell Reprogram* 2019;21:11–7. [CrossRef]