

İnfertil erkeklerde kök hücre tedavisi

Prof. Dr. Kaan Aydos

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji AD

Çocuk sahibi olamayan erkeklerde en önemli sorun, testislerde germ hücre üretiminin hiç olmadığı ya da yetersiz olduğu primer gonadal yetmezlik olgularıdır. Bu yazıda, primer gonadal yetmezlikli erkeklerde embriyonik kök hücreler (EC), uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPS), ve diğer kök hücre kaynakları güncel gelişmeler literatür verileri altında incelenmiştir.

İnfertiliteye, evli çiftlerin yaklaşık %10–15’inde rastlanır. Bunların da yaklaşık %7’sinde azoospermi söz konusudur. Nonobstrüktif azoospermi (NOA)’de sorun, sıklıkla haploid özellikteki spermatid ya da spermatozoa seviyesi hücrelerin sayısı ve kalite bozukluğudur. Bunun da temelinde tek gen mutasyonları ya da kromozom defektleri şeklinde genetik faktörler yatar. Ancak yakın tarihli çalışmalar, eğer genetik bir anomali söz konusu değilse, kök hücre tedavisinin erkek faktörü infertilite tedavisinde bir umut olabileceğini vurgulamaktadır (1).

NOA olgularının büyük kısmında mikroTESE ile olgun sperm bulunamaz ve neticede immatür sperm serisi hücrelerinin kullanımına ihtiyaç ortaya çıkar. Son yıllarda böyle olguların tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Kök hücre tedavisi bu araştırmalarda önemli bir yer tutar.

Embriyonik kök hücre (embryonic stem cell; es) kaynaklı erkek germ serisi hücreleri

ES hücreler embriyonun blastosist aşamasında oluşan iç embriyo kitlesinden (inner cell mass; ICM) gelişen totipotent hücreler olup, endoderm, ektoderm ve mezoderm gibi üç ana dokuya farklılaşma yeteneği gösterirler. Bunlar arasında germ serisi hücreler de vardır. Embriyonik kök hücre serileri, somatik hücre çekirdek transferi yoluyla yetişkin hücrelerden elde edilebilir. Embriyo içine verildikleri zaman germ serisi yönünde gelişim göstererek normal sperm yapabilirler (2). Fare ve insan ES hücreleri kullanılarak germ hücresi elde edilmesi konusunda oldukça ümit verici sonuçlar alınmıştır.

ES uygulamalarında Embrioid Cisim (embryoid body; EB) kullanımı önemli bir yer tutar. EB, vücuttaki dokuları oluşturmak üzere yönelmiş, üç germ tabakasından kaynaklanan hücreleri içerir. EB üzerine BMP4 (bone morphogenic protein) kullanılarak stimülasyon yapıldığında farelerde ES hücrelerinin erkek germ serisi hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir (3). Burada önce MVH gen markırı ile işaretli ES hücreleri *in vitro* ortamda inkübe edilmiş ve EB hücreleri oluşturulmuştur. Daha sonra MVH-pozitif hücreler seçilerek BMP4 üreten hücreler ile birlikte muamele edilip fare testisine nakledilirler. Neticede, markır olarak ortama eklenmiş olan MVH taşıyan hücrelerin sperm geliştirdikleri gösterildi. Benzer şekilde retinoik asit (RA) kullanılan çalışmalarda da EB hücreleri seçilerek mayozunu tamamlamış germ serisi hücrelere dönüşebildikleri, hatta oositi fertilize edebildikleri bildirilmiştir (4). Bu yöntemle farelerde FE-J1, Dazl, Fragilis, MVH, Akrozin ve asetil alfa tubulin pozitif spermatogonium, spermatosit, spermatid ve olgun sperm benzeri hücre gelişimleri diğer çalışmalarda da başarılmıştır (5). İki bin altı yılında Nayernia ve ark, ilk kez fare ES hücrelerinin *in vitro* koşullarda haploid spermatidlere dönüştüklerini ve canlı doğumla sonuçlandığını bildirmiştir (6). Burada araştırmacılar, fare ES hücrelerini önce Stra8-EGFP geni ile transfekte ettiler ve RA içeren ortamda inkübasyona bıraktılar. Daha sonra Stra8 pozitif hücreler seçilerek Prm1-DsRed geni ile yeniden transfekte edildi ve bu markırı taşıyan hücreler ayrıştırılarak fare testisine enjekte edildi. Histolojik incelemelerde seminifer tubül formasyonu görüldü ve sperm hücrelerine farklılaştığı izlendi. Prm1 pozitif hücreler yumurtaya enjekte edildiğinde ise yavruları dünyaya geldi.

Diğer yandan, 2 basamaklı adherent hücre farklılaşması tekniği ile de fare ES hücrelerinden erkek germ serisi hücreler geliştirilmiştir (7). Burada ilk basamakta fare ES hücreleri Active A, bFGF ve KSR (knockout serum repla-

cement) ile uyarılarak epiblast-benzeri hücreler elde edildi ve arkasından BMP4, BMP8b, SCF (stem cell factor), LIF (leukemia inhibitory factor) ve EGF sitokinleri kullanılarak primordial germ hücresi-benzeri (PGCLCs) hücreler geliştirildi. Bunlar da seminifer tubüllerin içine enjekte edildi. Histolojik tetkiklerde spermatogenezin geliştiği izlendi. Oluşan spermatozoa ise yumurtaya enjekte edildiğinde fertilizasyon sağlandı ve normal yavrular dünyaya geldi.

İnsanda ise ES hücrelerinin kendiliğinden EB hücrelere farklılaşmaları ile erkek germ serisi hücreler elde edilmiştir (8). İnsan ES hücrelerinden gelişen EB hücreleri VASA, BOL, SCP1 ve SCP3 taşıyan, haploid germ serisi hücrelere dönüşebilmektedir. "Adherent cell differentiation" protokolü insanda da uygulanmış ve ES hücrelerinde germ serisi hücreler elde edilebilmiştir. Bunun dışında insan fotal gonad hücreleri ile yapılan co-culture tekniği de ES hücrelerden PGS hücre elde edilmesinde kullanılmıştır (9). Ama bunlarda mayoz ötesine bir gelişim gösterilememiştir. Yine de yakın tarihli çalışmalarda insanda herhangi bir genetik manipülasyon yapılmaksızın ES hücrelerinin doğrudan haploid hücre aşamasına gelebilecekleri ortaya konmuştur (10). Burada MEM, BSA, insülin, transferrin, putresin, L-glutamin, beta nerkaptoetanol, bFGF, GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor), sodyum selenit, linoleik asit, linolenik asit ve HEPES içeren fare SSC kültür ortamında insan ES hücreleri doğrudan mayozunu tamamlamış, spermatid benzeri erkek germ hücre serisine farklılaşmıştır. Ancak bunların fertilizasyon potansiyelleri hakkında bir bilginiz yok.

Netice olarak, erkek infertilitesinin tedavisinde ES hücrelerinin kullanılmasıyla erkek germ hücresi elde edilmesi ümit verici bir teknik olarak dikkat çekmektedir. Ancak bu hücrelerin genetik yapılarının hasta ile uyum problemi henüz çözülmemiştir. Etik olarak da sorunlar vardır. Özellikle ES hücrelerinin kaynağı burada soru işaretidir.

Uyarılmış pluripotent kök hücre (induced pluripotent stem cell; ips) kaynaklı erkek germ hücre eldesi

EB'nin yanı sıra, iPS hücreler kullanılarak da haploid aşamasında germ serisine erişilebilmiştir (11). Bu hücreler transkripsiyon faktörleri ile somatik hücrelerin yeniden programlanması yoluyla elde edilmekte olup, pluripotent kapasite taşıdıkları için programlandıkları yönde farklılaşma gösterirler. Germ hücre elde etmek amacıyla yapılan iPS tekniğinde, vücudun somatik hücrelerinden,

Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 ve Nanog gibi transkripsiyon faktörlerinden faydalanılarak iPS hücrelerinin elde edilmesine çalışılır (12). iPS hücrelerin bazı avantajları vardır. En başta bunların kullanımı etik bakımdan bir sorun oluşturmaz. Ayrıca, iPS hücrelerin elde edilebileceği kaynak çok geniştir. Bunun dışında, hastanın kendinden alınmaları nedeniyle genetik yapısı hakkında bilginiz de olur. Bu hücreler hastanın kendi somatik hücrelerinde elde edilebildiği için hastaya özgü çok sayıda hücre elde etmek mümkün olabilir.

Son yıllarda, fotal ve erişkin somatik hücrelerin yeniden programlanmasını takiben iPS hücrelerinden PGS hücreler elde edilebileceği yönünde çok sayıda çalışma bildirilmiştir. iPS hücrelerinin BMP4 eklenen ortamda epiblast benzeri hücrelere dönüşebileceği ve bunlardan da primordial germ hücrelerinin elde edilebileceği hatta yavru dünyaya gelebileceği gösterildi (13). Araştırmacılar her ne kadar bu tekniği tekrarladıklarında benzer sonuçlar elde etmiş olsalar da, bazı hayvanlarda tümör gelişmesi, daha fazla araştırma yapılması gerektiğini ortaya koymakta. Daha yeni çalışmalarda insanda iPS hücrelerinin, insan fotal gonadal stromal hücreleri ile kültüre edilmeleri durumunda PGC benzeri hücrelere farklılaştıkları ortaya konmuştur (9). İnsanda iPS hücrelerinin PGC hücrelerine farklılaşmasında BMP'nin etkili olabileceği gösterilmiştir (14).

Bu tekniğin temelinde, gen ekspresyonu manipüle edilerek iPS hücrelerinin istenilen hücre hattına farklılaşmalarının belirlenmesi vardır. VASA ve DAZL gibi RNA'ya bağlanan proteinlerin insanda iPS hücrelerinden gelişen germ serisi hücrelerin mayoz girme potansiyellerini *in vitro* şartlarda artırdığı anlaşılmıştır. Diğer yandan, RA kullanılarak 3 hafta içerisinde insan ES hücrelerinden haploid karakterde iPS hücreleri de oluşturulabilmiştir (10). Ayrıca, Forskolin, insan rekombinan LIF, bFGF ve CYP26 inhibitör R115866 içeren kültür ortamında insan iPS hücrelerinin, spermatogonium, premayotik spermatosit, postmayotik spermatosit ve yuvarlak spermatid markırlarını gösteren daha ileri erkek germ hücre serilerine farklılaşmaları da sağlanmıştır (10). Ancak, iPS hücrelerden elde edilen yuvarlak spermatidlerin oositi fertilize etme ve embriyo oluşturma kapasiteleri hakkında bir fikrimiz henüz bulunmamakta. Yine de insanda iPS hücrelerinden elde edilen germ hücrelerinin genetik instabilite ve tümör oluşturma riskleri bunların klinik uygulamalarını kısıtlamaktadır.

Spermatogonial kök hücre (spermatogonial stem cell; SSCs)

Spermatogonial kök hücrelerin en önemli özelliği, genetik malzemeyi sonraki kuşaklara taşıyan tek hücre grubu olmasıdır. Bunlar, Sertoli hücreleri, ekstrasellüler matriks ve peritübüler miyoid hücre desteği altında kendi kendilerine çoğalabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Yakın tarihli çalışmalarda testis dokusu laboratuvar ortamında inkübe edildikten sonra yeniden testise nakledildiğinde, ratlarda spermatogenezin sürdürülebileceği de gösterildi (15).

Bu anlamda, *in vitro* ortamda spermatositlerden mayozunu tamamlamış spermatidler elde edilebilmiştir. Gerçekten de sıçan testis hücre süspansiyonu 4 gün inkübe edildiğinde spermatosit ve arkasından da spermatide dönüşebildiği, morfolojik ve biyokimyasal olarak gösterilmiştir (16). Farelerde de spermatogoniumlar izole edilip TERT ile işlem gördükten sonra SCF ortamında yuvarlak spermatidlere kadar farklılaşabilmektedir. Ancak burada sorun, spermatogoniumlardan gelişen spermatidlerin fonksiyonel yönden sonuç verip vermeyecekleridir. Yakın tarihte *in vitro* şartlarda seminifer tübüller içerisinde haploid hücreleri besleyebilecek bir mikro çevre ya da niş oluşturmak amacıyla 3D hücre kültür sistemleri düzenlenmesi üzerinde çalışmalar başlamıştır (17). Gerçekten de, 7 günlük immatür farelerin testislerinden alınan hücreler 3D soft agar ortamında bekletildiklerinde postmayotik, morfolojik olarak olgun hücrelere benzeyen spermler elde edilebildi ve diğer çalışmalarda da onaylandı (18). Eğer kanser tedavisi öncesi testis dokusu saklanıyorsa, bunların transplantasyonunu takiben malignitenin de taşınma olasılığına karşın, FACS (fluorescence activated cell sorter) ve markır taramaları yapılarak bu riskin elimine edilmesi önemlidir.

Daha yakın çalışmalarda ise spermatogenez baştan sona destekleyebilen yeni bir organ kültür sistemi geliştirilerek, yeni doğan fare testis dokusunda serumsuz besiyerinde spermatid seviyesine kadar geliştirilmiş ve ROSI/ICSI ile başarılı fertilizasyon denemeleri yapılmış, hatta yavru doğurtulabilmiştir (15). İnsan spermatogonial kök hücrelerinin (SSCs) laboratuvar şartlarında olgunlaştırılarak, oositi fertilize edebilecekleri, ancak son yıllarda gösterildi (19). İnmemiş testisli bir grup erkekte testislerden alınan spermatogoniumlar, retinoik asit ve SCF (stem cell factor) içeren ortamda inkübe edildiğinde, mayoz bölünmeyi tamamlamış spermatidlere kadar gelişim sağlandı.

Mayozun tamamlandığı, kültür ortamında SCP3-, MLH1-, and CREST pozitif hücre artışı ile ortaya konuldu. Bu hücreler fare oositleri içerisine enjekte edildiğinde, 2 hücreli embriyo aşamasına geldiği görüldü. *In vivo* şartlarda SSCs'lerin fertilizasyon kapasite kazanmış olmaları, NOA'li hastaların ileriye yönelik tedavi umutlarını artırmaktadır. Erken evre germ hücrelerinin kullanılması ile insanda klinik olarak gebelik sağlanan tedavilere en son örnek, sperm FISH boyaması ile haploid karakterde oldukları belirlenen spermatidlerin kullanıldığı ROSI uygulanması ile sağlıklı çocukların dünyaya gelmiş olmasıdır. Gerçekten de bu yolla 14 sağlıklı doğum olgusu bildirilmiştir (20). Her ne olursa olsun, bu güne kadar SSC hücrelerinin *in vitro* şartlarda olgun erkek germ hücrelerine farklılaşmaları konusu yüksek bir etkinliğe ve pratik uygulama kolaylığına erişememiştir.

In vitro şartlarda ve 3D kültür ortamında SSC hücrelerinin desteklenmesinin yanı sıra, SSC hücrelerinin ya da testis hücrelerinin transplantasyonu ile *in vivo* koşullarda germ hücre gelişiminin sağlanması daha başarılı bir klinik uygulama alanı bulmuştur (21). Bu uygulamada asıl sorun ise saf spermatogonium elde edebilmektir. Genelde saf spermatogonium tip A elde oranları, değişik teknik ve çalışma şartları göz önüne alındığında %0.3 ile %30 arasında kalmaktadır.

SSC transplanasyonu yerine testis dokusunun ya da kültür ortamında işlem görmüş doku örneklerinin nakli daha umut verici olabilir. Çünkü bu şekilde, sperm hücrelerinin içinde geliştiği destek hücreleri de kullanılabilir. Yenidoğan fare, domuz ve keçilerden elde edilen testis doku örnekleri deri altına nakledildiklerinde spermatogenez tamamlanabilmekte ve hatta sağlıklı yavrular dünyaya gelebilmektedir (22). Ancak erişkin testis doku greftleri daha az gelişim göstermektedirler. Bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç var.

Acaba insanda testis dokusu diğer tür hayvanların testisine nakledilse, benzer spermatogenez aşamaları sağlanabilir mi sorusu üzerine yapılan fare çalışmalarında haploid hücre serilerine kadar ilerleme sağlanabilmişti. Bu şekilde, prepubertal erkek testis dokularının ksenograft nakilleri 4–12 ay süreyle spermatogenezin devam edebileceği yönündedir (23). Ancak bunlarda sadece spermatosit evresine kadar gelinebildiği de bilinmelidir. Ayrıca, erişkin insan testis dokuları bu yöntemle fare testisine nakledildiğinde, sonuçlar iç açıcı olmamakta. Dolayısıyla,

otolog transplantasyon daha umut verici olmakta.

Diğer yandan, nonobstrüktif azospermisi bulunan erkeklerde testis biyopsisi ile alınan doku örnekleri, içinde FSH ya da FSH ve Testosteron bulunan Vero hücre kültürü içinde bekletilmeleri durumunda geç evre spermatid elde edilebilmiştir (24). Benzer şekilde, azospermik hastalarda testis dokusundan CD49f pozitif hücreler izole edilerek, *in vivo* ortamda benzer şekilde Sertoli hücreleri ile kültüre edilmiş ve haploid hücreler gelişmektedir (25).

Spermatogonium kök hücre popülasyonunun günümüzde önemli bir uygulama alanı, kemoterapi ya da radyoterapi öncesi fertilitenin korunmasıdır. Değişik neden-

lere bağlı kanser olgularında erkeklerde en büyük sorun, tedavinin testislerde sperm üretimini bozmasıdır. Genç yaşta tedavi almak zorunda kalan hastalarda primer hastalık tamamen iyileşse bile, ileride azospermisi gelişmesi bunların doğal yolla çocuk sahibi olmalarını engeller. Gerçekten de kemoterapi ya da radyoterapi hastaların %80'inde sperm üretimini tamamen ortadan kaldırmakta. Her ne kadar büyük kısmı 4 yıl içinde az da olsa sperm yapmaya başlasa da, geri kalanlarında sorun devam edebilir. Yakın tarihte bir grup araştırmacı hayvanlarda yaptıkları bir çalışmada bu konuda umut veren önemli sonuçlar elde ettiler (26).

Kaynaklar

- Hou J, Yang S, Yang H, Liu Y, Liu Y, Hai Y, et al. Generation of male differentiated germ cells from various types of stem cells. *Reproduction*. 2014;147(6):R179–R188.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germline chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984;309(5965):255–6.
- Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(20):11457–62.
- West JA, Park IH, Daley GQ, Geijsen N. *In vitro* generation of germ cells from murine embryonic stem cells. *Nat Protoc*. 2006;1(4):2026–36.
- Kerkis A, Fonseca SA, Serafim RC, Lavagnoli TM, Abdelmassih S, Abdelmassih R, Kerkis I. *In vitro* differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells*. 2007;9(4):535–48.
- Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathack K, Drusenheimer N, et al. *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell*. 2006;11(1):125–32.
- Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. 2011;146(4):519–32.
- Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RA. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum Mol Genet*. 2004;13(7):727–39.
- Park TS, Galic Z, Conway AE, Lindgren A, van Handel BJ, Magnusson M, et al. Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells*. 2009;27(4):783–95.
- Eguizabal C, Montserrat N, Vassena R, Barragan M, Garreta E, Garcia-Quevedo L, et al. Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2011;29(8):1186–95.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(7151):313–7.
- Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. 2011;146(4):519–32.
- Panula S, Medrano JV, Kee K, Bergström R, Nguyen HN, Byers B, et al. Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2011;20(4):752–62.
- Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, et al. *In vitro* production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun*. 2011;2:472.
- Staub C, Hue D, Nicolle JC, Perrard-Sapori MH, Segretain D, Durand P. The whole meiotic process can occur *in vitro* in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp Cell Res*. 2000;260(1):85–95.
- Lee JH, Kim HJ, Kim H, Lee SJ, Gye MC. *In vitro* spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials*. 2006;27(14):2845–53.
- Legendre A, Froment P, Desmots S, Lecomte A, Habert R, Lemazurier E. An engineered 3D blood-testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential. *Biomaterials*. 2010;31(16):4492–505.
- Yang S, Ping P, Ma M, Li P, Tian R, et al. Generation of Haploid Spermatids with Fertilization and Development Capacity from Human Spermatogonial Stem Cells of Cryptorchid Patients. *Stem Cell Reports*. 2014;3: 663–675.
- Tanaka A, Nagayoshi M, Takemoto Y, Tanaka I, Kusunoki H, et al. Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(47): 14629–34.
- Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(24):11298–302.
- Schlatt S, Honaramooz A, Boiani M, Scholer HR, Dobrinski I. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. *Biol Reprod* 2003;68:2331–5.
- Geens M, De Block G, Goossens E, Frederickx V, Van Steirteghem A, Tournaye H. permatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice. *Hum Reprod* 2006;21:390–6.
- Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Barros A. Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. *Hum Reprod*. 2002;17(1):161–72.
- Riboldi M, Rubio C, Pellicer A, Gil-Salom M, Simón C. *In vitro* production of haploid cells after coculture of CD49f+ with Sertoli cells from testicular sperm extraction in nonobstructive azospermic patients. *Fertil Steril*. 2012;98(3):580–590.
- Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pasarella JN, Peters KA, Sheng Y, et al. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes re-generates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell*. 2012;11(5):715–26.