



Researches on Multidisciplinary Approaches

Multidiscipliner Akademik Yaklaşım Araştırmaları 2022, 2(2): 43-59

Yayına Geliş Tarihi / Article Arrival Date

13/09/2022

Yayımlanma Tarihi / The Publication Date

17/10/2022

Bir Kök Hücre Olarak Spermatogonyum

Derleme Makale

Şengül Şentürk/ Dr. Öğr. Üyesi 

Beykent Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Patoloji Laboratuvar Teknikleri Programı,
sengulozkasapsenturk@outlook.com

Mustafa Sandıkçı/ Prof. Dr. 

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı,
msandikci@adu.edu.tr

Özet

Kök hücreler sınırsız çoğalabilen, kendini yenileme özelliğine sahip, özelleşmiş hücelere farklılaşabilen, hasarlı dokuyu onarabilen ve *in vivo* veya uygun şartlar sağlandığında *in vitro* ortamda birçok farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Bu hücreler farklılaşma özellikleri ve elde edildikleri kaynaklara göre çeşitlilik gösterir. Spermatogonyal kök hücre kendini yenileme özelliğiyle birlikte olgun spermatozoon oluşumunda rol oynayan erişkin bir kök hücre türüdür. Bu hücreler aynı zamanda uygun laboratuvar koşullarında embriyo gelişiminin üç germ yaprağına farklılaşabilme yeteneği kazanarak pluripotent özellik göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde spermatogonyal kök hücreler hem kısırlık hem de rejeneratif tıp tedavisinde önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu derlemede kök hücrelerin özellikleri hakkında genel bilgi verilmiş, spermatogonyal kök hücrelerin kök hücreler arasındaki yeri, farklılaşma özellikleri ve tanımlanmaları açıklanmıştır. Ayrıca bu hücrelerin izolasyon, transplantasyon ve kültür protokolleri hakkında yapılan çalışmalar ele alınarak bu araştırmaların tedavideki rolü ve önemi tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Spermatogonyum, Spermatogonyal Kök Hücre, Spermatogenez, Kök Hücre, Multipotent

Spermatogonium as a Stem Cell

Abstract

Stem cells are undifferentiated cells that can proliferate unlimitedly, have the ability to self-renew, differentiate into specialized cells, repair damaged tissue, and transform into many different cell types *in vivo* or under suitable conditions *in vitro*. These cells vary in their differentiation characteristics and sources from which they are obtained. Along with its self-renewal feature spermatogonial stem cell is an adult stem cell type that also plays role in the formation of mature spermatozoon. These cells also show pluripotency by gaining the ability to differentiate into three germ layers of embryo development under appropriate laboratory conditions. Thanks to these properties, spermatogonial stem cells constitute an important potential in both infertility and regenerative medicine treatment. In this review, general information about the properties of stem cells is given, the place of spermatogonial stem cells among stem cells, their differentiation characteristics and distinguishing properties are explained. In addition, studies on isolation, transplantation and culture protocols of these cells are focussed and the role and importance of these studies in treatment are discussed.

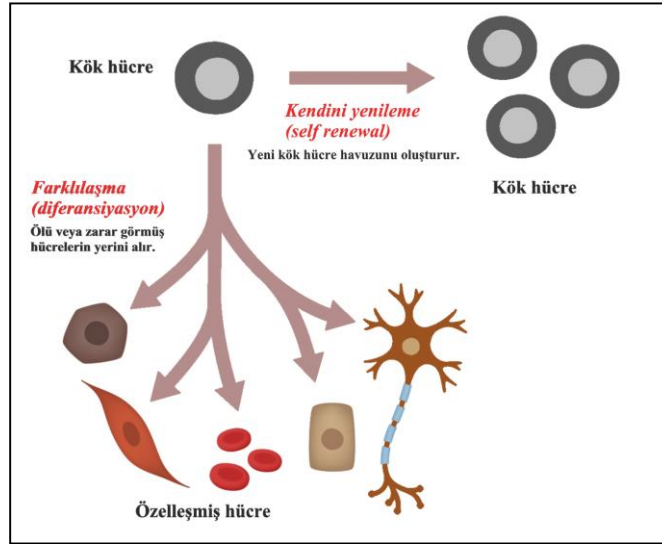
Keywords: Spermatogonium, Spermatogonial Stem Cell, Spermatogenesis, Stem Cell, Multipotent

GİRİŞ

Vücuttaki hücreler, bölünme ve büyüme kapasitelerinde inanılmaz bir farklılık gösterir. Nöronlar, kalp kası ve iskelet kası gibi “postmitotik hücreler” olarak tanımlanan hücreler farklılaşmış hücrelerdir ve genellikle bölünmez. Karaciğer hücreleri gibi hücreler ise uzun süre sessiz kalır ve uygun sinyaller aldığında bölünmek için uyarılır. Örneğin karaciğer hasar görürse, hücre bölünmesi kayıp hücrelerin eksikliğini gidermek için tetiklenebilir (Kierszenbaum, 2006^a). Kök hücre olarak adlandırılan hücreler ise mitoz bölünmeyle, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen ve daha fazla kök hücre üretmek için kendini yenileme yeteneğine sahip olan, bütün çok hücreli canlıların doku ve organlarını oluşturan ana hücre türleridir (örneğin deri ve sindirim kanalı gibi yüzeyleri döşeyen örtü epitel hücreleri ve kemik iliğindeki kan yapan hücreler) (Kierszenbaum, 2006^a).

Kök hücreyi diğer hücrelerden farklı kılan iki önemli özellik bulunmaktadır (Şekil 1).

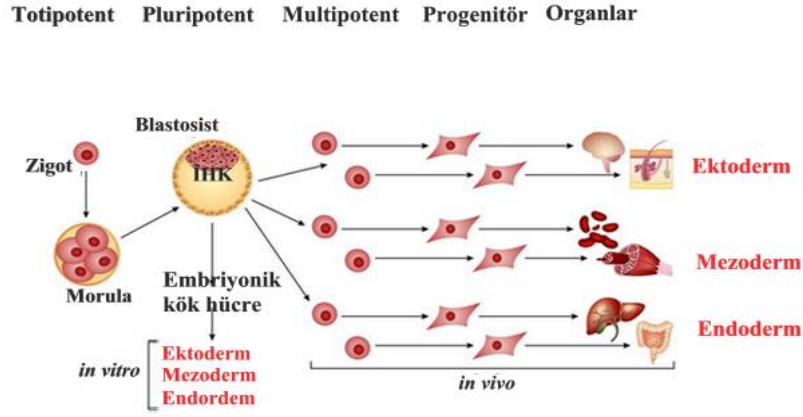
1. Kendini yenileme (*Self renewal*): Kendi kopyalarını oluştururlar.
2. Farklılaşma (*Diferansiyasyon*): Özelleşmiş vücut hücrelerine dönüşürler.



Şekil 1: Kök Hücrenin Özellikleri

Kaynak: www.yourgenome.org’ dan uyarlanmıştır.

Kök hücreler farklılaşma özellikleri ve elde edildikleri yere göre çeşitlilik gösterir. Farklılaşma özelliklerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücre; elde edildikleri yere göre ise embriyonal, erişkin ve fetus kök hücresi olmak üzere üçe ayrılırlar (Şekil 2).



**in vitro*: laboratuvar ortamında; *in vivo*: canlı içerisinde; İHK: iç hücre kütle; progenitör: öncül hücreler vücudun onarımında görev alıp, erişkin dokuları yenileyebilme yetisine sahip hücrelerdir.

Kaynak: www.quizlet.com'dan uyarlanmıştır.

Sperm ve oositin birleşmesiyle oluşan zigot, tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahip ilk embriyonik hücredir. Bu hücreye her şeyi yapabilen anlamına gelen “totipotent hücre” denir. Bu ifade erken embriyonik dönem olarak adlandırılan embriyonun morula aşamasına ulaştığı 4. gününe kadar olan tüm blastomerler için geçerlidir. Blastomerlerin her biri bir canlıyı oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşabilir. Plasenta ve amniyon kesesi gibi embriyo dışı dokulara da farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Totipotent hücreler gelişimin ileri evrelerinde pluripotent hücrelere dönüşebilirler (İnan ve Özbilgin, 2009).

Pluripotensi, embriyo gelişiminin üç germ yaprağına (ektoderm, mezoderm, endoderm) farklılaşma yeteğinde olan hücreyi ifade eder (Trusler ve ark, 2018). Bu hücreler fertilizasyondan sonra, pre-implantasyon dönemin 5. gününde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücrelerdir. Blastosist; trofoblastik hücreler, blastosöl ve iç hücre kütle olmak üzere 3 yapıdan oluşmuştur. Embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kütlelerinden elde edilen hücreler pluripotent kök hücreler olup, bu hücreler gerekli ortam sağlandığında yetişkin bir vücutta bulunan tüm somatik ve germ soylarındaki yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptirler. Fakat totipotent hücreler gibi tek başına bir organizmayı meydana getiremezler (Thomson ve ark, 1998; Hackett ve Surani, 2014).

Multipotent kök hücreler, embriyonik gelişimin daha ileri evresine ait hücreler olup, belirli bir hücre hattındaki tüm hücre tiplerine farklılaşma yetisine sahip hücrelerdir. Bu hücreler büyüme, doku onarımı ve savunmada başrolü üstlenirler. Multipotent kök hücreler omurilik zedelenmesi, kırıklar, otoimmün hastalıklar, romatoid artrit, hematopoetik rahatsızlıklar ve kısırılık gibi birçok rahatsızlığın tedavisinde uygulanmaktadır (Yagi ve ark, 2010; Weiss ve ark, 2011; Aponte ve ark, 2013; Guan ve ark, 2013; Sobhani ve ark, 2016). Multipotent hücreler doğumla birlikte kordon kanında ve erişkin vücudunda özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar (İnan ve Özbilgin, 2009).

Embriyonik kök hücreler (EKH), implantasyon öncesi blastosist aşamasındaki embriyoların iç hücre kütlelerinden elde edilen pluripotent hücrelerdir (Zakrzewski ve ark, 2019). Bu hücreler plasenta gibi ekstraembriyonik yapılar hariç, ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan birçok hücre tipine farklılaşabilirler (Trounsun, 2006; İnan ve Özbilgin, 2009). Farklı kaynaklardan elde edilen embriyonik kök hücrelerin (Tachibana ve ark, 2013; Daughtry ve ark, 2014; Main ve ark, 2020) iç hücre kütlelerindeki hücreler kültür ortamına alınır. Ortama çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler eklenerek, destek hücreleri ve gen aktarımı çalışmaları yardımıyla EKH'lerin farklılaşması sağlanır (Trounsun, 2006; Yao ve ark, 2006; Avcılar ve ark, 2018). Uygulanan bu işlemler neticesinde ortamda genellikle üç germ tabakasını içeren embriyoid cisim oluşur (Vatansever ve ark, 2009; Avcılar ve ark, 2018). Sox-2, Oct-4 ve Nanog, pluripotent embriyonik kök hücre fenotipinin devamlılığının sağlanmasında önemli transkripsiyon faktörleridir (Rodda ve ark, 2005). İnsan embriyonik kök hücreleriyle yapılan çalışmalar

etik ve dini sorunlar getirdiği için ülkemizde bu çalışmalar çeşitli tarihlerde güncellenen genelgelerle Sağlık Bakanlığı tarafından kontrol altına alınmaktadır (shgm.saglik.gov.tr).

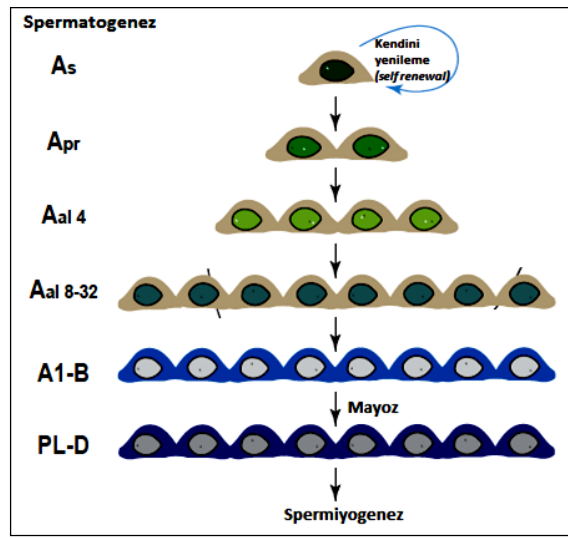
Embriyonik olmayan hücreler ise; embriyonik kök hücrelere göre gelişimin daha sonraki basamaklarında görülür ve organizmanın yaşamı boyunca daha sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini koruyarak erişkin dokulardaki öncü ve özelleşmiş hücrelere farklılaşırlar. Bu özellikleriyle hem doku homeostasisini sağlar hem de doku hasarı sonrası rejenerasyonda ölü veya zarar görmüş hücrelerin yerini alırlar. Bu hücreler multipotent kök hücreler olup buldukları dokuya farklılaşma özelliğine sahiptir. Organizma dışında embriyonik kök hücreler kadar uzun süre özelliklerini koruyarak çoğalma yetenekleri yoktur. Kişinin immun sistemine uyum gösterir, ancak tüm hücre tiplerine farklılaşamamaları nedeniyle kullanımları sınırlıdır. Günümüzde, erişkin kök hücrelerin diğer organ ve dokulara farklılaşması yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Organizmada ancak belirli birkaç hücre türüne farklılaşma yeteneği olan erişkin kök hücreleri, laboratuvar koşulları altında uygun faktör ve sinyaller sağlandığında birçok farklı hücre türüne farklılaşabilmektedirler. Bu hücrelerin, son yapılan çalışmalarla birçok farklı organ ve dokudan elde edilebildiği gösterilmiştir. Fötal kök hücrelerden, göbek kordonundan, plasentadan, kemik iliğinden elde edilen hematopoetik kök hücreler en iyi tanımlanmış embriyonik olmayan kök hücreler olmakla birlikte; aynı zamanda yağ dokudan, beyin, bağırsak, kas, deri/kıl follikülü, kalp, akciğer gibi birçok organda bulunan kök hücrelerden ve son yıllarda farklılaştırma ile herhangi bir hücrenin kök hücre haline dönüştürülmesiyle oluşan hücrelerden elde edilebilmektedirler. Bu hücreler hücre fenotipik yüzey belirteçleri ile ayırt edilmektedirler (Zuk ve ark, 2001; Li ve ark, 2006; Ross ve ark, 2006; Chen ve ark, 2007; Helder ve ark, 2007; Pansky ve ark, 2007; Yamada ve ark, 2007; İnan ve Özbilgin, 2009; Çerçi ve Erdost, 2019).

Germ hücreleri, bir bireyin genetik bilgisinin sonraki nesile aktarılmasından sorumludur ve bu süreç aracılığıyla bir türün devamlılığını sağlar. (Kubota ve Brinster, 2006). Erkek germ hücresi spermatozoon ve dişi germ hücresi oosit fertilizasyon yoluyla bu sürece katılan yegane hücrelerdir. Olgun spermatozoa oluşumunda rol oynayan spermatogonyal kök hücreler (SKH) testiste bulunan erişkin kök hücre türüdür. Kendini yenileme ve farklılaşma özelliğine sahip olan bu hücreler, laboratuvar ortamında indüklenmesi halinde her üç germ yaprağından oluşan dokulara dönüşebildiği için pluripotent özellik göstermekte ve multipotent erişkin germ hattı kök hücreleri (maGSC-multipotent adult germ line stem cells) olarak adlandırılmaktadır (Guan ve ark, 2006; Glaser ve ark, 2008; Yanar ve ark, 2017). Dişi germ soyundaki kök hücrelerin proliferasyonu doğumdan önce sona erdiği için, SKH yetişkindeki diğer kök hücreler arasında gelecek nesile genetik olarak katkı sağlayan tek germ hattı kök hücre çeşididir (Kubota ve Brinster, 2006). Bununla birlikte, SKH'in yardımcı üreme teknikleri ve kök hücre terapisindeki önemi ve potansiyel rolü hakkında kısıtlı bilgi mevcuttur. Bu, büyük ölçüde SKH'ların kesin olarak tanımlanmasının güç olması, farklılaşma özellikleri ve işlevlerinin in vitro olarak sürdürülmesinin karmaşıklığından kaynaklanmaktadır (Oatley&Brinster, 2012; Kubota&Brinster, 2018; Ibtisham&Honaromooz, 2020). Bu nedenle erkek germ hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, germ hücre soyunun sürekliliğinin önemini gösteren mekanizmaları inceleme ve germ hücre soyu modifikasyonu veya tedavisi için yeni teknikler geliştirme fırsatı sunar. Tüm bu sebeplerden dolayı SKH'lar ile yapılan araştırmalar, bu kök hücrelerin kısırlık ve rejeneratif tıp tedavisi için yeni bir klinik uygulama çağının merkezinde olma potansiyelini göstermektedir (Brinster ve Avarbock, 1994; Brinster ve Zimmermann, 1994; Kubota ve ark, 2004; Kubota ve Brinster, 2006; Abdelaal ve ark., 2021).

Bu açıklamalar ışığında bu derlemede spermatogonyal kök hücrelerin morfolojik yapısı, tanımlanması hakkında genel bilgi verilmiş, hem yardımcı üreme tekniklerinde hem de rejeneratif tıpta son dönemde yapılan çalışmalar ele alınmıştır.

Spermatogenez Süreci ve Spermatogonyal Kök Hücreler

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücrelerin olgun spermatozoaya dönüşerek erkek germ hücrelerinin gelişmesi olarak tanımlanır (Pang ve Rennert, 2013). Spermatogenez süreci mitoz, mayoz ve spermiyogenez fazlarından oluşur. Spermatogonyal kök hücreler olarak kabul edilen ‘A single’ (A_s)¹ spermatogonyumlar hem kendilerine farklılaşarak depo hücreler görevini görür; hem de mitotik olarak bölünerek ‘A paired’ (A_{pr})², ‘A aligned’ (A_{al}), A_{1-4} , ara (*intermediate*) ve B tip spermatogonyumları oluşturur (Hamra, 2015) (Şekil 3). Koyu A tip spermatogonyumlar 12 µm çapında, kubbe biçimli küçük hücrelerdir. Yassı, yoğun heterokromatinli oval çekirdekleri vardır. Soluk A tip spermatogonyumlar soluk bir görünüm veren çekirdeklerinin yoğun ökromatine sahip olması haricinde koyu A tip spermatogonyumlara benzer. Soluk A tip spermatogonyumlar birkaç tane organel; sınırlı Golgi kompleksi, birkaç tane ribozomlu endoplazmik retikulum (RER) ve çok sayıda serbest ribozom içerir. Bu hücreler testosteron tarafından uyarılarak mitoz bölünme ile diğer soluk A tip spermatogonyum ve B tip spermatogonyumları meydana getirirler (Ovalle ve Nahirney, 2007).



Şekil 3: Spermatogenez Süreci Ve Spermatogonyal Kök Hücreler

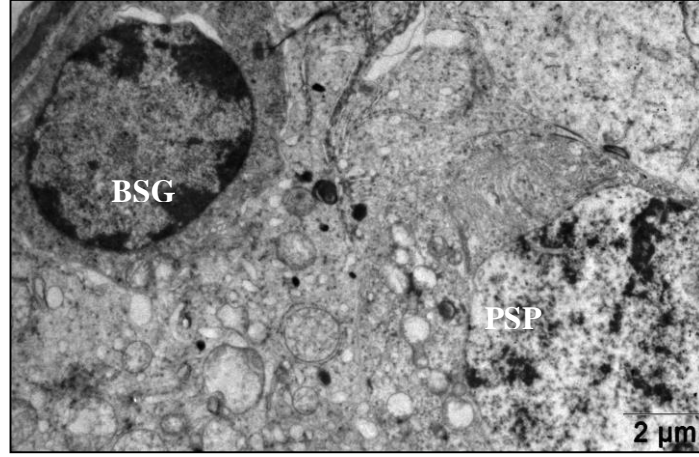
* A_s : A single spermatogonyum, A_{pr} : A paired spermatogonyum, A_{al} : A aligned spermatogonyum, A1-B: A1-B tip spermatogonyum, PL-D: preleptoten-leptoten spermatosit.

Kaynak: Hamra, 2015 çalışmasından uyarlanmıştır.

B tip spermatogonyumlar soluk A tip spermatogonyumlara benzer; fakat çekirdekleri yassıdan ziyade yuvarlaktır. B tip spermatogonyumlar primer spermatositleri oluşturmak üzere bölünür ve uzun bir mayotik profaza girer (Şekil 4). İki mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatositler ve hemen ardından yuvarlak spermatidler oluşur. Haploid yuvarlak spermatidler morfolojik değişikliğe uğrayarak uzayan ve uzamış spermatidlere dönüşür. Bu morfolojik değişikliklerin neticesinde ise son olarak seminifer tübüllere salıverilen olgun spermatozoonlar oluşur (Şekil 5), (Dym, 1994; Hecht, 1998; de Rooij ve ark, 2000; Cooke, 2002; Jan, 2012).

¹ Spermatogonyal kök hücre görevi gören “ A_s spermatogonyum”; birçok farklı kaynakta “koyu A tip spermatogonyum (A_{dark} spermatogonyum)” olarak isimlendirilmektedir (Russell, 1991; Kierszenbaum, 2006^b; Ovalle ve Nahirney, 2007; Golastaneh ve ark, 2009).

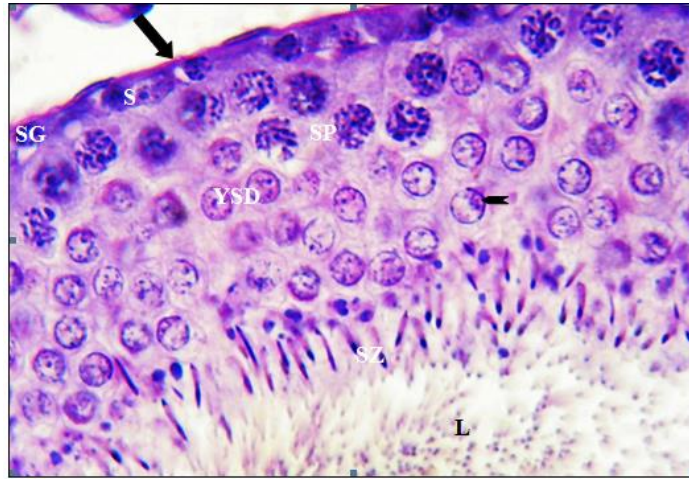
² A_s spermatogonyumların mitoz bölünmeden sonra oluşturdukları A tip spermatogonyumların genel adı birçok farklı kaynakta “açık A tip spermatogonyum (A_{pale} spermatogonyum)” olarak bahsedilmektedir (Russell, 1991; Kierszenbaum, 2006^b; Ovalle ve Nahirney, 2007; Golastaneh ve ark, 2009).



Şekil 4: Sıçan Testisine Ait Geçirimli Elektron Mikroskopik Görüntü

*BSG: B tip spermatogonyum, PSP: pakiten spermatosit.

Kaynak: Yazarın yayımlanmamış yüksek lisans tezinden alınmıştır (Özkasap, 2012).



Şekil 5: Gelişimin Farklı Aşamalarındaki Spermatogenetik Seri Hücrelerini Gösteren Sıçan Testisine Ait Işık Mikroskopik Fotoğraf

*S:Sertoli hücresi, SG: spermatogonyum, SP: spermatosit, YSD: yuvarlak spermatid, SZ: spermatozoon, L:lümen, ok başı: akrozom, kalın ok: bazal membran, Periyodik asit schiff reaksiyonu, x100.

Kaynak: Yazarın yayımlanmamış yüksek lisans tezinden alınmıştır (Özkasap, 2012).

Spermatogonyum Belirteçleri

Hücre bölünmesinde hücrenin kendini yenilemesi yaşam boyu sürmesine rağmen, spermatogonyumların kendilerini nasıl yenilediği ve bu süreci nasıl sürdürdüğü hakkında çok az şey bilinmektedir (Chen ve Liu, 2015). Spermatogonyal kök hücreler (A_{single}) ve öncül spermatogonyumlar olarak kabul edilen A_{paired} ve $A_{aligned}$ spermatogonyumlar farelerde morfolojik analizlere göre farklılaşmamış A tip spermatogonyum olarak tanımlanır (Clermont ve Bustos-Obregon, 1968). Spermatogonyal kök hücreler kendilerini yenileme yeteneklerine göre tanımlanırlar ve yalnızca morfolojilerine bakarak öncüllerinden ayırt edilmeleri zordur. Birçok belirteç spermatogonyal kök hücreleri ve diğer farklılaşmamış spermatogonyumları ayırtetmek için kullanılabilir. PLZF (Costoya ve ark, 2004) , SALL4 (Gassei ve Orwig, 2013), ve CDH1 (Tokuda ve ark, 2007) tüm evrelerde farklılaşmamış A tip spermatogonyumlarda eksprese edilmesine rağmen, GFRA1 (Grasso ve ark, 2012), LIN28 (Zheng ve ark, 2009), NANOS2 (Suzuki ve ark, 2009), ve NGN3 (Yoshida ve ark, 2004) başlıca farklılaşmamış A tip spermatogonyumların spesifik tiplerinde eksprese edilir. ID4 ve PAX7 ise A_s tip spermatogonyumlara özgüdür (Oatley ve ark, 2011; Aloisio ve ark, 2014). NANOS3 birçok farklılaşmamış A tip spermatogonyumlarda ve farklılaşmakta olan A_1 spermatogonyumlarda tespit edilebilir (Suzuki ve ark,

2009). KITL'nin tirozin kinaz reseptörü olan c-KIT, bazı A_{al} tip spermatogonyumlarda, farklılaşmakta olan spermatogonyumlarda ve erken preleptoten spermatositlerde eksprese edilir (Yoshinaga ve ark, 1991). Şu anki veriler ışığında, PAX7 insanlar da dahil birçok memelide spermatogonyal kök hücrelerde eksprese edildiği bilinen tek proteindir (Tablo 1).

Tablo 1: Memelilerde Spermatogonyal Kök Hücrelerin Tanımlanmış Protein Belirteçleri

PLZF	A _s , A _{pr} , A _{al}
SALL4	A _s , A _{pr} , A _{al}
CDH1	A _s , A _{pr} , A _{al}
GFRA1	Farklılaşmamış A tip spermatogonyumların spesifik tiplerinde
LIN28	Farklılaşmamış A tip spermatogonyumların spesifik tiplerinde
NANOS2	Farklılaşmamış A tip spermatogonyumların spesifik tiplerinde
NGN3	Farklılaşmamış A tip spermatogonyumların spesifik tiplerinde
ID4	A _s
PAX7	A _s
NANOS3	Birçok farklılaşmamış A tip spermatogonyumda ve farklılaşmakta olan A ₁ tip spermatogonyumda
c-KIT	Bazı A _{al} tip spermatogonyumlarda, farklılaşmakta olan spermatogonyumlarda ve erken preleptoten spermatositlerde

*A_s: A single spermatogonyum (spermatogonyal kök hücre), A_{pr}: A paired spermatogonyum, A_{al}: A aligned spermatogonyum; A_s, A_{pr}, A_{al}: Farklılaşmamış A tip spermatogonyum.

Kaynak: Yazarlar tarafından oluşturulmuştur.

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ise embriyonik kök hücrelerle OCT4, NANOG, SOX2, SSEA3, SSEA4, TRA-1-81 ve TRA-1-60'ı da içeren pluripotent belirteçlerini paylaşır. Spermatogonyal kök hücreler; embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler için transkripsiyon faktörleri olan OCT4 ve PLZF açısından pozitifdir; bu hücreler aynı zamanda yetişkin kök hücreler için belirteçler olan CD90, GPR125 ve GFRA1 gibi işaretleri de (*hallmark*) eksprese ederler (Hou ve ark, 2014).

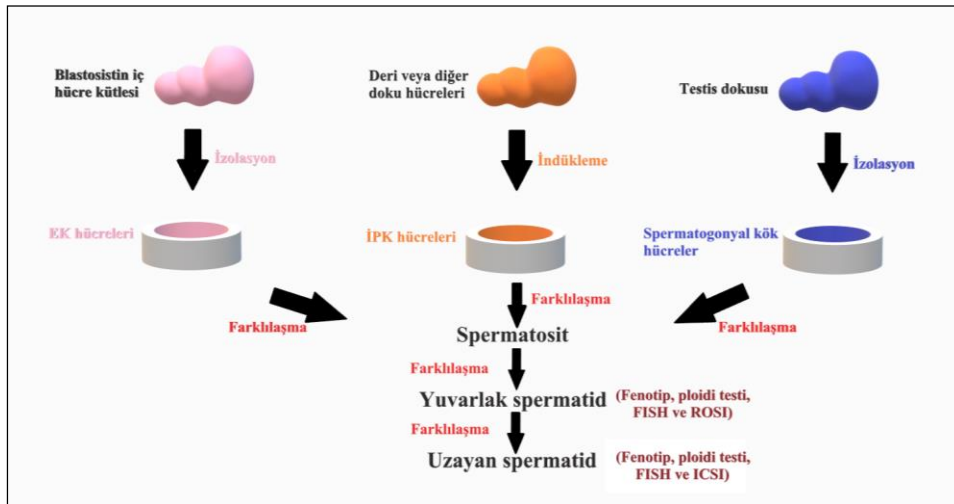
Seminifer tübüllerde tek somatik hücre tipi olan Sertoli hücreleri spesifik faktörlerin salınımı yoluyla, spermatogonyal kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını doğrudan kontrol ederler. Spermatositin mayoza girmesi, parakrin sinyal yoluyla kan-testis bariyerinin luminal bölgesi üzerinde Sertoli hücreleri tarafından düzenlenen spermatogenezin önemli bir adımıdır. ETS variant 5 (ERM=ETV5), nosiseptin, neurogulin 1 (NRG1) ve androjen reseptör (AR) gibi Sertoli hücre transkripsiyon faktörleriyle birlikte, Glial hücre yoluyla-üretilen nörotrofik faktör (GDNF=*glial cel-line derived neurotrophic factor*) ve fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) gibi Sertoli hücre büyüme faktörleri spermatogonyal kök hücre yenilenmesi ve spermatosit mayozunu düzenleyen en önemli faktörler olarak tanımlanmıştır. (Chen ve Liu, 2015).

İlerideki çalışmalarda insan spermatogonyal kök hücrelerinin ve diğer farklılaşmamış spermatogonyumların farklı belirteçlerinin tanımlanması gerekmektedir. Spermatogonyal transplantasyon teknikleri ve diğer işlevsel spermatogonyal kök hücre analizleri yoluyla spermatogonyal kök hücrelerin klasik çalışmalarını test etmek de önemlidir.

Spermatogonyal Kök Hücre Kaynakları

Kısırlılık, germ hücrelerinin hasarı ve kaybından kaynaklanan hastalık olarak tanımlanmaktadır. Çiftlerin %10-15'ini etkiler ve erkek faktörü vakaların yarısını oluşturur. İnsan erkek üreme hücrelerinden özellikle işlevsel spermatidleri elde etmek, erkek kısırlılığını tedavi etmek için gereklidir. Son dönemde, birçok kök hücre tipinden spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidleri de içeren erkek üreme hücrelerini elde etmek için çok sayıda ilerleme kaydedilmiştir (Hou ve ark, 2014).

Normal genetik yapıya sahip olan erkeklerde erkek gametlerini elde etmek için kök hücre terapisi umut veren bir tedavi stratejisi olarak görülmektedir. Farklılaşmış erkek üreme hücrelerini elde etmek için son dönemde üç temel kök hücre kaynağı vardır: embriyonik kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler ve spermatogonyal kök hücreler (Şekil 6). Bu kök hücreler içerisinde kökenlerine, potansiyellerine ve fenotiplerine bağlı olarak belli farklılıklar vardır: i) Embriyonik kök hücreler blastosistlerin iç hücre kitlesinden elde edilir ve üç germ tabakasının hücre hatlarına farklılaşabildiği için totipotenttir; ii) İndüklenmiş pluripotent kök hücreler somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla oluşur ve bu hücreler birçok hücre tiplerini oluşturdukları için pluripotenttir; iii) Spermatogonyal kök hücreler A tip spermatogonyumların altpopulasyonudur ve testislerde sadece sperm üretebildikleri için unipotent olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, spermatogonyal kök hücrelerin *in vitro* olarak embriyonik kök hücre benzeri hücrelere dönüşebildikleri (*pluripotency*) gösterilmiştir (Guan ve ark, 2006; Glaser ve ark, 2008; Hou ve ark, 2014).



Şekil 6: Farklı Kök Hücre Tipinden Farklılaşmış Erkek Germ Hücreleri

*EK hücreleri: embriyonik kök hücreler; FISH: floresan in situ hibridizasyon; ICSI: intrasitoplazmik sperm injeksiyonu; iPK hücreleri: indüklenmiş pluripotent kök hücreler; ROSI: yuvarlak spermatid injeksiyonu.

Kaynak: Hou ve ark, 2014 çalışmasından uyarlanmıştır.

Farelerde birçok araştırmacı erkek germ hücrelerini elde etmek için embryoid cisimcik (*embryoid body*) farklılaşma stratejisinden yararlanmıştır. Toyooka ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada kemik morfogenik proteinlerinin (BMP4) eklenmesiyle embryoid cisimcik oluşumunu kullanarak fare embriyonik kök hücrelerini erkek germ hücrelerine farklılaştırmıştır. Haberci gen olan endojenik vasa homologu (Mvh) fare embriyonik kök hücreleri lösemi inhibitör faktör (LIF) içermeyen medyumda kültüre edilmiş ve embryoid cisimcik oluşturmuştur. Mvh-pozitif hücreler saflaştırılmış ve daha sonra BMP4 üreten hücrelerle kokültür yoluyla BMP4'le uyarılmış ve sonrasında fare testislerine transplante edilmiştir. Embriyonik kök hücrelerden alınan Mvh-pozitif hücreler spermatogoneze katılmış ve sperm oluşturmuşlardır. Bununla birlikte, bu çalışmada spermın fertilizasyon kapasitesi hesaba katılmamıştır.

Zhu ve ark. 2012 yılında farelerde indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinden spermatogonyal kök hücreleri ve geç evre erkek germ hücrelerini farklılaştırmıştır. Bu çalışmada yine embryoid cisimcik

farklılaştırma stratejisi kullanılarak retinoik asit (RA) ilavesi veya retinoik asit yoluyla ya da embriyoid cisimciğin testosteron girişi yaklaşımından yararlanılmıştır (Li ve ark, 2013). Bununla birlikte, retinoik asit muamele edilmiş fare indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinde spermatositlerin bir işareti olan SCF3 (*Stem Cell Factor*) ekspresyonunda bir artış görülmemiştir. Bu durum ise indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin spermatositlere *in vitro* olarak farklılaşamadığını ileri sürmektedir.

Diğer kök hücrelerden farklı olarak, spermatogonyal kök hücreler genetik bilgiyi gelecek nesillere aktaran tek kök hücre tipidir. Spermatositlerden spermatid eldesi birçok çalışmada *in vitro* olarak gösterilmiştir. Kemirgenlerde, sıçan testiküler hücre karışımı 4 hafta boyunca kültüre edilmiş ve spermatositlere, en sonunda spermatidlere *in vitro* farklılaşmıştır. Bu durum ise morfolojik ve biyokimyasal analizlerle desteklenmiştir (Staub ve ark., 2000).

Son dönemde yapılan çalışmalarda, erişkin erkek germ hücrelerinden embriyonik kök hücre benzeri hücre kaynağı olan spermatogonyal kök hücreler tanımlanmıştır (Glaser ve ark, 2008). Uygun kültür koşulları altında SKH'ler kararlı multipotent hücre hatlarının özelliklerini kazanabilme yeteneğine sahiptir (Guan ve ark, 2006). Bu multipotent erişkin germ hattı kök hücrelerinin *in vitro* (*maGSC-multipotent adult germ line stem cells*) pluripotensi belirteçlerini (Oct4, Nanog, SSEA-1, alkalın fosfataz) ekprese ettiği tespit edilmiş ve bu hücrelerin *in vivo* koşullar altında pluripotensi özelliğini kanıtlamak için şiddetli karma immun yetersiz/bej farelere hücrelerin deri altı enjeksiyonu yapılmıştır. Transplantasyon sonrası her farede üç embriyonik germ yaprağı içeren teratom oluşumu görülmüştür. Hem spermatogonyal öncül hücrelerde hem de bu hücrelerden uzun dönem kültürü yapılarak üretilmiş multipotent erişkin germ hattı kök hücrelerinde GPR125 eksprese edildiği için spermatogonyal öncül hücreler GPR125'in ekspresyonuna bakılarak da izole edilmiştir (Seandel ve ark, 2007). Bu çalışmanın sonuçlarına göre GPR+ multipotent erişkin germ hattı kök hücrelerinin üç germ yaprağına farklılaşabildiği sonrasında kimerik embriyo oluşumunda rol aldığı; ayrıca *in vitro* olarak kontraktıl kardiyak dokuya dönüştüğü ve *in vivo* olarak işlevsel kan damarlarını oluşturduğu görülmüştür. Bununla birlikte, germ hattı kök hücreleri ve progenitör hücreler, yetişkin somatik hücrelere kıyasla belirli genlerde genomik damgalamada (*genomic imprinting*) değişikliklere sahip olabileceğinden (Kanatsu ve ark, 2004), bu hücrelerin tedavi amaçlı kullanımı dikkatli ve kapsamlı klinik öncesi deneylerle ilerlemelidir.

Spermatogonyal Kök Hücre Transplantasyonu

Spermatogonezin tüm aşamalarındaki problemler insanlarda kısırlığa yol açabilir, fakat *in vitro* veya hücre kültüründe bu problemlerden bazıları modellenilebilirler. Farelerde hedeflenmiş mutagenез bu adımları analiz etmeyi sağlamış ve erkeklerde kısırlığın kökenine yeni bakış açıları kazandırmıştır (Cooke ve Saunders, 2002). Fare modellerinin kullanılmasını çekici kılan ilk heyecanlandırıcı gelişme testis kök hücre transplantasyonu için metodun gelişmesidir (Brinster ve Zimmermann, 1994). Takip eden yıllarda spermatogonyal kök hücre transplantasyonu domuz (Honaramooz ve ark, 2002), sığır (Herrid ve ark, 2006), keçi (Kaul ve ark, 2010), koyun (Rodriguez-Sosa ve ark, 2006), maymun (Shetty ve ark, 2020), köpek ve (Harkey ve ark, 2013), deve (Herrid ve ark, 2019) gibi birçok hayvan türlerine uygulanmıştır.

Bu yöntemde testis hücreleri alıcı testise enjekte edilir ve daha sonra sperm üretmek için tübüller kolonize olur. Örneğin, spermatogonyal kök hücrelerin transplantasyonu, c-kit ve onun ligandının olmadığı birçok infertil mutant farelerde hücreye özgü hasarları tanımlamayı sağlamıştır (Ohta H ve ark, 2000).

Spermatogonyal kök hücrelerin testise enjeksiyonunda, spermatogonyal kök hücrelerin seminifer tübüllere, rete testise veya götürücü kanala mikroenjeksiyonuyla da bir fare modeli mümkündür (Ogawa ve ark, 1997). Bununla birlikte, büyük hayvanlarda ve insan kadavrasında SKH'ların seminifer tübüllere veya götürücü kanala enjeksiyonunun sınırlı sayıda çalışmada verimli olduğu gösterilmiştir (Schlatt ve ark, 1999, Xin ve ark, 2021). Bu durum büyük hayvanlarda lamina propriadaki yüksek direnç ve sarılı seminifer tübüllerden kaynaklanmaktadır. Spermatogonyal kök hücrenin testise enjeksiyonunda en çok umut vaad eden model rete testise ultrason-eşliğinde (*ultrasound-guided*) enjeksiyondur (Schlatt ve ark, 1999; Faes ve ark, 2013). Fare (GFP⁺ F1 hibrit. N=10) yeşil floresan proteini (GFP)-pozitif testis hücreleri

^{99m}technetium ve mikroköpüklerle işaretlenmiş; bu işaretlenen hücreler ultrason eşliğinde kadavra insan testisinin (n=18) rete testisine enjekte edilmiştir. Üç farklı durum test edilmiştir: 1) 20 milyon hücre/ml suspansiyonun 800 µl'si, 2) 10 milyon hücre/µl suspansiyonun 800 µl'si, 3) 10 milyon hücre/ml suspansiyonun 1.400 µl'si. Enjeksiyondan sonra insan kadavra testisi tek-foton-yayınımı bilgisayarlı tomografiyle (*single-photon-emission computerized tomography-SPECT*) görüntülenmiş ve tomografisi yapılmıştır (Faes ve ark, 2013). Bu çalışmanın sonuçlarına göre tüm deney gruplarında GFP-pozitif hücreler seminifer tübüllerde, rete testisin yanında ve yakınında ve interstisyumda görülmüştür; insan kadavra testisine hücre enjeksiyonu mümkündür fakat daha çok optimizasyon gereklidir.

Spermatogonyal kök hücre izolasyon metotları iki adımlı enzimatik sindirime (*enzymatic digestion*) dayanır (van Pelt ve ark, 1996). Araştırmacılar GFRA1⁺ (Gassei ve ark, 2009), GPR125⁺ (He Z ve ark, 2009), SSA4⁺ (Izadyar F ve ark, 2011) ve HLA-ABC⁺/CD9⁺ (Zohni K ve ark, 2012) gibi belirteçlerle manyetik olarak aktive edilmiş hücre sınıflandırmasıyla (*magnetic activated cell sorting- MACS*) veya floresan-aktif edilmiş hücre sınıflandırmasını (*fluorescence-activated cell sorting-FACS*) kullanarak EpCAM⁺/HLA-ABC⁺/CD49⁻ hücrelerini (Dovey SL ve ark, 2013) izole ederek insan spermatogonyal kök hücrelerini zenginleştirmişlerdir.

İnsanlarda ilk başarılı spermatogonyal kök hücre izolasyonu 2002 yılında 6 infertil erkek üzerinde yapılan çalışmada rapor edilmiştir (Nagano ve ark, 2002). Bu çalışmada izole edilen insan spermatogonyal kök hücreleri dondurma-çözme prosedüründen sonra bile kolonize olabilmiş ve alıcı fare testisinde 6 ay yaşayabilmiştir. Fare seminifer tübüllerinde kolonize olan kök hücre sayıları 6 aya kadar hesaplanmıştır. İnsan spermatogonyal kök hücre kümelerinin transplantasyondan sonra 1 ay kadar gözlemlenmesi fare testisinde bu hücrelerin proliferasyonunu ileri sürmüştür. İnsan spermatogonyal kök hücrelerinin fare testisinde 6 aya kadar kaldığı, fakat sayılarının transplantasyondan 2 ay sonra belirgin olarak düştüğü bilinmektedir. Ergenlik öncesi 10 yaşındaki erkek çocuklar üzerinde yapılan bir çalışmada, spermatogonyal kök hücreler izole edilmiş ve bağışıklığı yetersiz (*immunodeficient nude*) fare testislerine transplante edilmiştir. Transplantasyon sonrası SKH kolonileri görülmüş fakat farklılaşma ve spermatogenez gözlenmemiştir (Wu ve ark, 2009). Spermatogonyumun kendini yenilemesinde önemli bir faktör olan GDNF'nin (glial hücre hattı türevi nörotrofik faktör-*glial cell line-derived neurotrophic factor*) hem insanda hem de farede mikroarray analizlerinde pozitif olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular da transplantasyon sonrası SKH proliferasyonunu doğrulamaktadır.

Izadyar ve ark, 2002 yılında boğa testisleri üzerinde yaptıkları çalışmada, A tip spermatogonyumların izolasyonu, saflaştırılması, ayrıca bu hücrelerin morfolojik, fizyolojik karakterlerinin incelenmesi ve kök hücre potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. 5-7 aylık buzağuların testisleri 2 adımlı enzimatik sindirim yoluyla izole edilmiştir. İzolasyon ve saflaştırma adımları sırasında canlı/ölü boyaması kullanılarak hücrelerin yaşayabilirliği tespit edilmiştir. İzolasyon ve saflaştırma sırasında A tip spermatogonyumların tanımlanması Nomarski lensi kullanılarak ışık mikroskopunda belirlenmiştir. İzole edilmiş hücreler *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) ve c-kit içeren A tip spermatogonyumlar için spesifik belirteçler kullanılarak tanımlanmıştır. Hücre suspansiyonu bağışıklığı yetersiz (*immunodeficient*) alıcı fare testisine transplante edilmiş ve transplantasyondan 1-3 hafta sonra izole edilen hücreler içerisinde kök hücre popülasyonunu değerlendirmek için kolonizasyon değerlendirilmiştir. İzolasyondan sonra, hücre suspansiyonunun yaklaşık %25'i A tip spermatogonyadan oluştuğu görülmüştür. Bu suspansiyon daha sonra Percoll gradient yöntemi ile zenginleştirilmiş ve sonuç olarak, %65-87 oranında saf A tip spermatogonya içeren katmanlar elde edilmiştir. Farklı sayı ve boyutlarda çekirdek içeren büyük ve küçük A tip spermatogonyumlar bulunmuştur. DBA boyalı büyük ve küçük A tip spermatogonyumlar ve FACS ayırma yönteminin uygulanması Nomarski lensi kullanılarak ışık mikroskopu altında bu hücrelerin morfolojik olarak incelenmesine ve yüzdelerinin yapılmasına olanak sağlamıştır. Neredeyse tüm büyük A tip spermatogonyumların güçlü c-kit immunreaktivitesi gösterdiği saptanmıştır, bu durum da bu hücrelerin farklılaşmaya girdiğini göstermektedir. Yaklaşık olarak küçük A tip spermatogonyumların yarısının c-kit negatif olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular da bu popülasyonda SKH'ların varlığını göstermektedir. Transplantasyondan 3 hafta sonra, sığır A tip spermatogonyum grupları, izole edilen hücreler içerisinde

spermatogonyal kök hücre varlığını gösteren alıcı fare testisinin birçok tübül kesitinde görülmüştür. Bu çalışmada, 5 aylık buzağuların testislerinde yüksek oranda saflaştırılmış A tip spermatogonyumların elde edilebileceği bir prosedür geliştirilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, SKH içeren A tip spermatogonyumların büyük, saf popülasyonlarının bu hücrelerde gen ekspresyonu çalışmak için kullanılabileceği ve spermatogonyumlar için bir kültür metodu geliştirilebileceği gösterilmiştir.

Kriyoprezervasyon ve Spermatogonyal Kök Hücre Kültürü

Spermatogonyal kök hücreler dondurmadan sonra alıcı testiste tekrar spermatogoneze girer; bununla birlikte optimal bir kriyoprezervasyon protokolü için araştırmalar devam etmektedir. Lee ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada geçirgen kriyoprotektan ajanlarını (*permeable cryoprotectant agents-PCAs*) ve katkılı kriyoprotektan ajanlarını (*additive cryoprotectant agents-ACAs*) kullanarak verimli bir kriyoprezervasyon metodu geliştirmeyi amaçlamışlardır. Verimli bir kriyoprezervasyon metodu tanımlamak için, spermatogonyal kök hücreler bakımından zengin fare testis hücrelerinin popülasyonları kültüre edilmiş ve çeşitli PCA veya ACA içeren konvansiyonel dondurma medyumlarıyla 1 hafta veya 1, 3, 6, 12, veya 24 ay boyunca dondurulmuştur. Ayrıca, bir ACA olan polietilen glikolün (PEG) çeşitli moleküler ağırlıkları ve konsantrasyonları hesaplanmıştır. İyileşme oranı, kültür edilme potansiyeli ve kök hücre aktivitesi diğer tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında 1000 moleküler ağırlıklı %2,5'luk PEG içerisinde belirgin şekilde daha fazla görülmüştür. Bu hücrelerin ayrıca alıcı testisinde kolonize olma yeteneğini kaybetmediği, normal spermatogonezi sürdürdüğü ve yaşayan döller oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmadaki birçok kriyoprotektan ajanının sistematik analizi, %2,5'luk (moleküler ağırlık 1000) polietilen glikolün verimli bir spermatogonyal kök hücre kriyoprezervasyonu için en etkili ajan olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada geliştirilen yöntemlerin memeli SKH'larının uzun vadeli korunması için temel teşkil ettiği gösterilmiştir.

Bilim insanları, kanser tedavisi sonrası ortaya çıkan kısırlık problemlerini çözmek için insan spermatogonyal kök hücrelerini izole etmiş, zenginleştirmiş medyumda kültüre etmişlerdir. Gahorbakhsh ve ark, 2012 yılında yaptıkları çalışmada en az 500.000 en çok 2.000.000 hücre içeren insan testis biyopsilerinden spermatogonyal kök hücreleri izole etmiş ve saflaştırmışlardır. Bu çalışmada da iki adımlı enzimatik sindirim yöntemi kullanılmıştır. Zenginleştirme metodları, farklılaştırma tabakaları ve insan GDNF, bFGF, EGF ve LIF gibi büyüme faktörlerini içeren serumdan yoksun medyum içerisinde spesifik bir kültür uygulamışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre spermatogonyal kök hücre kümeleri spesifik kültür içerisinde 7-10 gün sonra gözlenmiştir. Elli iki gün boyunca birçok pasaj ve başarılı proliferasyondan sonra, hücreler insan spermatogonyal kök hücrelerin bir yüzey belirteci olan GPR125 proteinini boyamak için üç tabakalı immunositokimya testiyle (LSAB) değerlendirilmiştir. Bu çalışma FACS ve MACS metodları gibi diğer alışılmış izolasyon metodlarıyla karşılaştırıldığında en az manipülasyonla insan spermatogonyal kök hücreleri izole edilmiş ve büyütülmüş bir çalışmadır. Diğer spermatogonyal kök hücre izolasyonu ile kültür metodlarının ve çok hacimli hücre içeren testis örneklerinin aksine bu sistem testis biyopsilerine dayanmaktadır; bu durum da bu çalışmada öne sürülen metodun gelecekte klinik kullanıma daha yakın olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte spermatogonyal kök hücrelerin klinik öncesi kullanımından daha önce, spermatogonyal kök hücrelerden kanser hücrelerinin izole edilmesi için daha fazla araştırma gereklidir. Ayrıca daha iyi dondurma metodlarının geliştirilmesi SKH'ların uzun süre saklanması için önemlidir.

Sonuç

Spermatogonyal kök hücreler gelecek kuşaklara genetik aktarım sağlayan tek kök hücre türüdür. SKH'ın erişkin kök hücre türü olması ve birçok farklı kaynaktan elde edilmesiyle birlikte laboratuvar koşullarında pluripotent yetenek kazanabilmesi, bu hücreleri gerek yardımcı üreme tekniklerinde gerekse rejeneratif tıpta ilgi odağı haline getirmiştir. Bu hücreler üzerinde yapılan birçok başarılı çalışma mevcuttur. Bu çalışmalara rağmen, bu hücrelerin tedavi amaçlı kullanımında SKH izolasyonu, kültürü, transplantasyonu için türlere özgü optimal protokollere ve klinik öncesi daha kapsamlı deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynakça

- Abdelaal, N.E., Tanga B.M., Abdelgawad, M., Allam, S., Fathi, M., Saadeldin, I.M., Bang S. Ve ark. (2021). Cellular Therapy via Spermatogonial Stem Cells for Treating Impaired Spermatogenesis, Non-Obstructive Azoospermia, *Cells*, 10, 1779. <https://doi.org/10.3390/cells10071779>.
- Aloisio, G.M., Nakada, Y., Saatçioğlu, H.D., Pena, C.G., Baker M.D., Pena, C.G., Baker, M.D., Tarnawa, E.D., Mukherjee, J., Manjunath, H., Bugde, A., Sengupta, A.L. ve ark. (2014). PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis, *Journal of Clinical Investigation*, 124:3929-3944.
- Aponte, P.M., Schlatt, S., Franca, L.R. (2013). Biotechnological approaches to the treatment of aspermatogenic men, *Clinics*, 68:157-67.
- Avcılar, H., Saraymen, B., Özturan, O.Ö., Köker, M.Y. (2018). Embriyonik Kök Hücreler ve İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler, *Asthma Allergy Immunol*, 16:1-10. doi: 10.21911/aa.22.
- Brinster, R.L., & Avarbock, M.R. (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 11303–11307.
- Brinster, R. & Zimmermann, J. (1994). Spermatogenesis following germ cell transplantation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:11298-11302.
- Brinster, R.L. (2015). Male germline stem cells: from mice to men, *Science*, 316, 404-405.
- Chen, S.R. & Liu, Y.X. (2015). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling, *Reproduction*, 149:159-167.
- Chen, Z.X., Chang, M., Peng, Y.L., Zhao, L., Zhan, Y.R., Wang, L.J., Wang, R. (2007). Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes, *Regul Pept.*, 142(1-2):16-23.
- Clermont, Y. & Bustos-Obregon, E. (1968). Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted 'in toto', *American Journal of Anatomy*, 1968, 122:237-247.
- Cooke, H.J. & Sounders, P.T. (2002). Mouse models of male infertility, *Nat Rev Genet.*, 3:790-801.
- Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., Pandolfi, P.P. (2004) Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells, *Nature Genetics.*, 36:653-659.
- Çerçi, E.& Erdost, H.(2019) Kök Hücre, *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 14(2): 221-228. DOI: 10.17094/ataunivbd.483253
- de Rooij, D.G. & Russell L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but we afraid to ask, *J Androl.*, 21(6):776-798.

- Daughtry, B., Mitalipov, S. (2014). Concise review: Parthenote stem cells for regenerative medicine: Genetic, epigenetic, and developmental features. *Stem Cells Transl*, 3:290-8.
- Dovey, S.L., Valli, H., Hermann, B.P., Sukhwani, M., Donohue, J., Castro, C.A., Chu, T., Sanflippo, J.S., Orwig, K.E. (2013). Eliminating malignant contamination from therapeutic human spermatogonial stem cells, *J Clin Invest.*, 123:1833-1843.
- Dym, M. (1994). Spermatogonial stem cells of the testis, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 91:11287-11289.
- Faes, K., Tournaye, H., Goethals, L., Lahoutte, T., Hoorens, A., Goossens, E. (2013). Testicular cell transplantation into human testes, *Fertil Steril.*, 100:981-988.
- Gahorbakhsh, L., Mohazzab, A., Salehkhoulou, S., Heidari, M., Zarnani, A.H., Parivar, K., Akhondi, M.M. (2013). Isolation and culture of human spermatogonial stem cells derived from testis biopsy, *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 5(1): 54-61.
- Gassei, K. & Orwig, K.E. (2013). SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes, *PLoS ONE*, 8:53976.
- Gassei, K., Echmcke, J., Schlatt, S. (2009). Efficient enrichment of undifferentiated GFR alpha 1+ spermatogonia from immature rat testis by magnetic activated cell sorting, *Cell Tissue Research*, 337:177-183.
- Glaser, T., Opitz, T., Kischlat, T., et al. (2008). Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia, *Stem Cells*, 26:2434-43.
- Grasso, M., Fusco, A., Dovey, L., de Rooij, D.G., Stefanni, M., Boitani, C., Vicini, E. (2012). Distribution of GFRA1-expressing spermatogonia in adult mouse testis, *Reproduction*, 143:325-332.
- Golastaneh, N., Wu, M., Pant, D., Jiang, J., DeStefano, D., Fernandez Bueno, C., Rone, J.D., Haddad, B.D., Gallicano, G.I., Dym, M. (2009). Pluripotent stem cells derived from adult human testes, *Stem Cells and Development*, 18(8): 1115-26.
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., et al. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis, *Nature*, 440:1199-203.
- Guan, X.J., Song, L., Han, F.F., Cui, Z.L., Chen, X., Guo, X.J., et al. (2013). Mesenchymal stem cells protect cigarette smoke- damaged lung and pulmonary function partly via VEGF- VEGF receptors. *J Cell Biochem*, 114:323-35.
- Hackett, J.A., Surani, M.A. (2014). Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up, *Cell Stem Cell*, 15:416-430. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.015>.
- Hamra FK. (2015). Diagnosing Spermatogonial Stemness, *Biol Reprod.*, 92(5):119. doi: 10.1095/biolreprod.115.129890.
- Harkey, M.A., Asano, A., Zoulas, M.E., Torok-Storb, B., Nagashima, J., Travis, A. (2013). Isolation, genetic manipulation, and transplantation of canine spermatogonial stem cells: Progress toward transgenesis through the male germ-line, *Reproduction*, 146, 75-90
- He, Z., Kokkinaki, M., Jiang, J., Dobrinski, I., Dym, M. (2010). Isolation, characterization and culture of human spermatogonia, *Biol Reprod*, 82:363-372.
- Hecht, N.B. (1998). Molecular mechanisms of male germ cell differentiation, *Bioessays*, 20:555-561.
- Helder, M.N., Knippenberg, M., Klein-Nulend, J., Wuisman, P.I. (2007). Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine, *Tissue Eng.*, 13(8): 1799-1808.

- Herrid, M., Vignarajan, S., Davey, R., Dobrinski, I., Hill, J.R. (2006). Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients, *Reproduction*, 132, 617–624.
- Herrid, M., Nagy, P., Juhasz, J., Morrell, J.M., Billah, M., Khazanehdari, K., Skidmore, J.A. (2019). Donor sperm production in heterologous recipients by testis germ cell transplantation in the dromedary camel, *Reprod. Fertil. Dev.*, 31, 538–546.
- Honaramooz, A., Megee, S.O., Dobrinski, I. (2002). Germ cell transplantation in pigs, *Biol. Reprod.*, 66, 21–28.
- Hou, J., Yang, S., Yang, H., Liu, Y., Liu, Y., Hai, Y., Chen, Z., Guo, Y., Gong, Y., Gao, W.Q., Li, Z., He, Z. (2014). Generation of male differentiated germ cells from various types of stem cells, *Reproduction*, 147:179-188.
- Ibtisham, F., Honaramooz A. (2020). Spermatogonial stem cells for in vitro spermatogenesis and in vivo restoration of fertility, *Cells*, 9, 745; doi:10.3390/cells9030745.
- Izadyar, F., Spierenberg, G.T., Creemers, L.B., Ouden, K., Rooij, D.G. (2002). Isolation and purification of type A spermatogonia from bovine testis, *Reproduction*, 124: 85-94.
- Izadyar, F., Wong, J., Maki, C., Pacchiarotti, J., Ramos, T., Howerton, K., Yuen, C., Copperman, A. (2011). Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis, *Hum Reprod.*, 26:1296-1306.
- İnan, S., Özbilgin, K. (2009). Kök hücre Biyolojisi, *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1(5):11-23.
- Jan, S.Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M., ve ark. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis, *Biochim Biophys Acta.*, 1822:1838-1850.
- Kanatsu-Shinohara, M., ve ark. (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119, 1001–1012.
- Kaul, G., Kaur, J., Rafeeqi, T.A. (2010). Ultrasound guided transplantation of enriched and cryopreserved spermatogonial cell suspension in goats. *Reprod. Domest. Anim.*, 45, e249–e254.
- Kierszenbaum, A.L. (2006)^a *Histology and Cell Biology*. Çeviri editörü: Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi içinde Kök hücreleri, multipotent hücre popülasyonu sy: 87. Palme Yayıncılık.
- Kierszenbaum, A.L. (2006)^b *Histology and Cell Biology*. Çeviri editörü: Demir R. Histoloji ve Organ Sistemleri:Üreme Sistemi içinde Spermatogenez, Spermatogonyumlar, sy: 535. Palme Yayıncılık.
- Kubota, H., ve ark. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 16489–16494.
- Kubota, H., Brinster, R.L. (2006). Technology Insight: in vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses, *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.*, 2:99-108.
- Kubota, H.& Brinster, R.L.(2018) Spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.*, 99, 52–74.
- Lee, Y.A., Kim, Y.H., Kim, B.J., Jung, M.S., Auh, J.H., Seo, J.T., Park, Y.S., Lee, S.H., Ryu, B.Y. (2013). Cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells in dimethylsulfoxide and polyethylene glycol, *Biology of Reproduction*, 89(5): 109: 1-9.
- Li, Z., Li, L. (2006). Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments, *Trends Biochem Sci.*, 31(10): 589-595.
- Li P, Hu H, Yang S, Tian R, Zhang Z, Zhang W, Ma M, Zhu Y, Guo X, Huang Y, He Z, Li Z. (2013). Differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells in vitro

through embryoid body formation and retinoic acid or testosterone induction, *Biomed Res Int.*, 2013:608728. doi: 10.1155/2013/608728.

Main, H., Hedenskog, M., Acharya, G., Hovatta O., Lanner, F. (2020). Karolinska Institutet Human Embryonic Stem Cell Bank, *Stem Cell Research*, 45:101810.

Nagamo, M., Patrizio, P., Brinster, R.L. (2002). Long term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes, *Fertil Steril.*, 78:1225-1233.

Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Racicot, K.E., Oatley, J.M. (2011). Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice, *Biology of Reproduction*, 85:347-356.

Oatley, J.M., Brinster, R.L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol. Rev.*, 92, 577–595.

Ogawa, T., Arechaga, J.M., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. (1997). Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules, *Int J Dev Biol.*, 41:111-122.

Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K., Nishimune Y. (2000). Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF, *Development*, 127(10):2125-2131.

Ovalle, W.K., Nahirney, P.C. (2007). *Netter's Essential Histology*. Saunders Elsevier PA, 2009. Çev. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. Erkek Üreme Sistemi. In: Netter Temel Histoloji (1. Baskı), s:378-379, Güneş Tıp Kitabevleri.

Özkasap, Ş (2012). Sıçanlarda spermatogenetik seriye ait hücreler üzerine retinoik asidin etkilerinin incelenmesi, Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Pang, A.L.Y. & Rennert, O.M. (2013). Protein acetylation and spermatogenesis, *Reprod Syst Sex Disord.*, 3:1-5. doi: 10.4172/2161-038x.s1-005.

Pansky, A., Roitzheim, B., Tobiasch, E. (2007). Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells, *Clin Lab.*, 53(1-2): 81-84.

Rodda, D.J., Chew, J.L., Lim, L.H., Loh, Y.H., Wang, B., Ng, H.H., Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2, *J Biol Chem.*, 280(26): 24731-24737.

Rodriguez-Sosa, J.R., Dobson, H., Hahnel, A. (2006). Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology*, 66, 2091–2103.

Ross, J. & Li, L. (2006). Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate, *Curr Opin Hematol.*, 13(4): 237-242.

Russell, L.D., Ettl, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D. (1991). *Staging for the rat. In: Histological and Histopathological Evaluation Of The Testis (1st edition)*, 286, s: 63-118 Cache River Press, US.

Seandel M, James D, Shmelkov SV et al. (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors, *Nature*, 449:346–350.

Schlatt, S., Rosiepen, G., Weinbouer, G.F., Rolf, C., Brook, P.F., Nieschlag, E. (1999). Germ cell transfer into rat, bovinemonkey and human testis, *Hum Reprod.*, 14:144-150.

Shetty, G., Mitchell, JM, Meyer, JM, Wu, Z., Lam, TNA, Phan, TT, Zhang, J., Hill, L., Taylor, R.C., Peters, K.A. ve ark. (2020). Restoration of functional sperm production in irradiated pubertal rhesus monkeys by spermatogonial stem cell transplantation, *Andrology*, 8, 1428–1441.

- Sobhani, A., Kanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadani S., Aval, F.S. (2016). Multipotent stem cell and current applicaiton, *Acta Med Iran*, 55(1):6-23.
- Staub, C., Hue, D., Nicolle, J.C., Perrard-Sapori, M.H., Segretai, D. & Durand, P. (2000). The whole meiotic process can occur in vitro in untransformed rat spermatogenic cells, *Experimental Cell Research*, 260: 85-95.
- Suzuki, H., Sada, A., Yoshida, S., Saga, Y. (2009). The heterogenity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell specific proteins Nanos2 and Nanos3, *Developmental Biology*, 336:222-231.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner Hedges, R., Ma, H., ve ark. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer, *Cell*, 153:1228-38.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282 (5391):1145-1147.
- Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., Morunouchi, T. (2007). CDH1 is a spesific marker for undifferentiated spermatogonia in Mouse testes, *Biology of Reproduction*, 76:130-141.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R., Noce T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro, *PNAS*, 100(20): 11457-62.
- Trounson, A.(2006). The production and directed differentiation of human embryonic stem cells, *Endocr Rev.*, 27(2): 208-219.
- Trusler, O., Huang Z., Goodwin, J., Laslett, A.L. (2018). Cell surface markers fort he identification and study of human naive pluripotent stem cells, *Stem Cell Research*, 26:36-43. Doi: 10.1016/j.scr.2017.11.017.
- van Pelt, A.M., Morena, A.R., van Dissel-Emiliani, F.M., Boitani, C., Gaerners, I.C., de Rooij, D.G., Stefanini, M. (1996). Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes, *Biol Reprod.*, 55:439-444.
- Vatansever HS. (2009). Embriyonik kök hücreler. *Sağlıkta Birikim*,1:25-44.
- Weiss, D.J., Bertoncello, I., Borok, Z., Kim, C., Panoskaltis Mortari, A., Reynolds, S. Ve ark. (2011). Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thoracic Soc*, 8:223-72.
- Wu, X., Schmidt, J.A., Avarbock, M.R., Tobias, J.W., Carlson, C.A., Kolon, T.F., Gingsberg, J.P., Brinster, R.L. (2009). Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:21672-21677.
- Xin, Z., Wan, W., Zang, Xianyu., Wu, Z., Yang, H. (2021). Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Large Animals, *Animals*, 11, 918.
- Yamada, Y., Yokoyama, S.I., Wang, X.D., Fukuda, N., Takakura, N. (2007). Cardiac stem cells in Brown adipose tissue express CD133 and induce bone marrow non-hematopoietic cells to differentiate into cardiomyocytes, *Stem Cells*, 25(5): 1326 -1333.
- Yanar, S., Açıkgöz, Ş., Şahin, E., Sarıkaya A. (2017). Spermatogonyal Kök Hücre, *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi*, 4(1):37-44.
- Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Kitagawa, Y., Tilles, A.W., Tompkins, A.G., Yarmush, M.L. (2010). Bone marrow mesenchymal stromal cells attenuate organ injury induced by LPS and burn. *Cell Transplant*,19:823-30.

Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G.M., Hayek, A., Ding, S. (2006). Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(18) : 6907-6912.

Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Suda, T., Nabeshima, Y. (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis, *Developmental Biology*, 269:447-458.

Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Fujimoto, T. (1991). Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function, *Development*, 113:689-699.

Zakrzewski, W., Dobrzynski, M., Szymonowicz, M., Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present and future, *Stem Cell Research and Therapy*, 10:68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.

Zheng, K., Wu, X., Kaestner, K.H., Wang, P.J. (2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in Mouse, *BMC Developmental Biology*, 29:9-38. doi: 10.1186/1471-213X-9-38.

Zhu, Y., Hu, H.L., Li, P., Yang S., ve ark. (2012). Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells): an in vitro and in vivo study, *Asian J Androl*, 14(4):574-9.

Zohni, K., Zhang, X., Tan, S.L., Chan, P., Nagano, M. (2012). CD9 is expressed on human male germ cells that have a long-term repopulation potential after transplantation into mouse testes, *Biol Reprod.*, 87(2):27. doi: 10.1095/biolreprod.112.098913.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.*, 7(2): 211-228.

<https://www.quizlet.com/82934472/roycemd-embryology-flash-cards> Erişim tarihi: 16.10.2022.

<https://www.shgm.saglik.gov.tr/TR,34788/201810-kok-hucre-calismalari-hakkinda-genelge.html>. Erişim tarihi: 07.12.2021.

<https://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-stem-cell>. Erişim tarihi: 01.12.2021.