



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin deneysel Asherman modeli üzerine antiapoptotik ve proliferatif etkisi

Antiapoptotic and proliferative effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental Asherman model

Şamil Öztürk¹, Pınar Kılıçaslan Sönmez², İlhan Özdemir³, Yunus Emre Topdağ⁴, Mehmet İbrahim Tuğlu²

1Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Çanakkale, Turkey

2Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Turkey

3Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, , Erzurum, Turkey

4Gaziantep Sanko Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Gaziantep, Turkey

Cukurova Medical Journal 2019;44(Suppl 1):434-446.

Abstract

Purpose: We investigated the effects of stem cell therapy as an alternative to surgical methods and medical treatments in endometrial injuries in Asherman syndrome (AS).

Materials and Methods: In this study, AS model was created chemically in rats. The bone marrow-derived mesenchymal stem cells isolated from the tibia and femoral bone of male individuals of the same species (BMDSC) were given to female rats with asherman syndrome and the changes in the endometrium were evaluated by histopathological parameters. Asherman + medium, Asherman + niche, Asherman + BMDSCs, Asherman + BMDSCs + niche were formed in four groups.

Results: It was observed that increased endometrial thickness, gland count and vascularization and decreased fibrous areas and apoptotic cell death with regeneration in epithelium and lamina propria in treatment groups. No histopathologic changes were observed in the right uterine horns, which were evaluated as control group. .

Conclusion: BMDSCs and Niche applications can contribute to the clinic by reducing the formation of adhesion within the mechanisms causing infertility. These positive results are promising in terms of transporting Asherman studies to the clinic. It has been shown that BMDSCs and Niche may contribute to the clinic by treatment with adhesion molecules in mechanisms that cause infertility.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Asherman syndrome, apoptosis, infertility, histoloji.

Öz

Amaç: Bu çalışmada Asherman sendromundaki (AS) endometriyal hasarlarda cerrahi yöntemlere ve medikal tedavilere alternatif olarak kök hücre tedavisinin etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada sıçanlarda AS modeli kimyasal olarak oluşturuldu. Aynı türün erkek bireylerinin tibia ve femur kemiğinden izole edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (KİMKH) AS oluşturulan dişi sıçanlara verilerek endometriyumda meydana gelen değişiklikler histopatolojik parametrelerle değerlendirildi. Asherman+ besiyeri, Asherman+ niş, Asherman+ KİMKH, Asherman+ KİMKH+ niş olmak üzere toplam dört grup oluşturuldu.

Bulgular: Tedavi gruplarında epitel ve lamina propriyadaki rejenerasyonla birlikte endometriyal kalınlığın, bez sayısının ve vaskülarizasyonun arttığı, fibröz alanların ve apoptotik hücre ölümünün azaldığı gözlenmiştir. Kontrol grubu olarak değerlendirilen sağ uterin hornlarda ise her hangi bir histopatolojik değişiklik görülmemiştir.

Sonuç: KİMKH ve Niş uygulamalarının, infertiliteye neden olan mekanizmaların içerisinde yer alan adezyon oluşumunu azaltarak tedavi ile kliniğe katkı sağlayabileceği gösterildi. Bu olumlu sonuçlar Asherman çalışmalarının kliniğe taşınabilmesi açısından ümit vericidir.

Anahtar kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Asherman sendromu, apoptozis, infertilite, histoloji

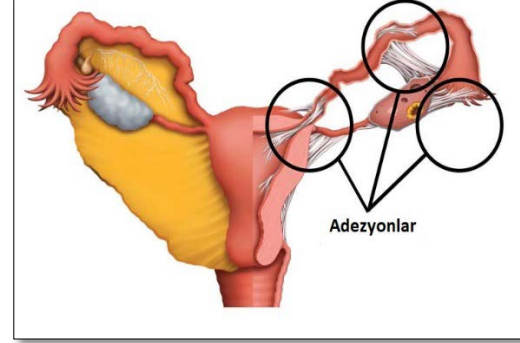
Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Şamil Öztürk, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Çanakkale, Turkey E-mail: samilozturk16@hotmail.com, samilozturk@comu.edu.tr
Geliş tarihi/Received: 31.05.2019 Kabul tarihi/Accepted: 09.08.2019 Çevrimiçi yayın/Published online: 27.09.2019

GİRİŞ

Asherman sendromu (AS) veya intrauterin adezyonlar (İUA), teşhis edilen vaka sayısının her geçen gün artması ile infertilite, amenore, abortus gibi problemlerin ortaya çıkmasına sebep olan bir durumdur. Bu durum sıklıkla rahim kürtajından sonra ortaya çıksa da herhangi bir rahim ameliyatı AS'a sebep olabilir. AS'lu birçok kadının amenore ya da hipomenoreası bulunmakta fakat bazılarının menstrüel düzeyi normal seyredebilmektedir. AS'lu kadınların çoğu menstrüel bozuklukların yanında infertilite veya tekrarlayan spontan düşük ile başvurlar¹. Son yıllardaki klinik uygulamalarda AS ve İUA'lar eşanlı olarak kullanılmaktadır. Fakat buna rağmen AS'u için menstrüel düzensizlik, normal olmayan plasantasyon ve pelvik ağrı şikâyetlerin olması da gerekir². AS, gebelik komplikasyonları veya pek çok jinekolojik ameliyatlardan sonra da meydana gelebilen uterin yapışıklık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsidansındaki artış nedeniyle alternatif tedavi arayışları sürmektedir³. İUA'ların gerçek insidansı geniş bir hasta grubunun olmasından dolayı bilinmemektedir. Tesadüfen tespit edilen vakalardan, doğum sonrası kürtaj yapılan vakalar ve diğer çok geniş spektrumlar değerlendirildiğinde, %0.3-21.5 arası insidans bildirilmiştir⁴. Bunlardan obstetrik tipi olmayan sebepleri içerisinde, küretaj, uterin septum rezeksiyonu, histeroskopik myomektomi, abdominal myomektomi geniş yer tutmaktadır^{2,5}.

AS tedavisinde tekrar adezyon oluşumları operasyon başarısını gölgeler ve lezyon ortaya çıkmasıyla direkt ilişkilidir. Adezyonlar çok farklı şekillerde ve uterusun ilişkili olduğu birçok farklı dokuyla ortaya çıkabilmektedir (Resim 1). Histeroskopik işlem sonrasında rahim içi araç (RİA), uterin yüzeylerin temasını engelleyen fiziksel engelleme yapar. RİA'lar adezyolizden sonra yeniden adezyon formasyonunu önlediğini bildiren çok sayıda makale olmasına rağmen birinci sınıf bir çalışma henüz bulunmamaktadır. RİA'nın kullanılan tipinin araştırmalarla önemi ortaya çıkarılmıştır. Copper T modelleri için uterusta inflamatuvar yanıtı tetikleyebilecekleri bildirilmiştir. Ayrıca küçük oldukları için uterin yüzeylerin temasını engelleyemedikleri ileri sürülmüştür^{2,4}. Küretaj sonrasında östrojen tedavisinin endometriyum üzerine olumlu etkisi gösterilmiş olmasına rağmen bu olumlu etkilerin gebelik ve tekrar adezyon oluşup oluşmadığını gösteren bir çalışma yoktur. İntaruterin adezyonlar için tedavi seçeneklerinin hem kısıtlı hem

de eksik olduğunu görüyoruz. Bu nedenle kök hücre teknolojisinden faydalanmak ve akut süreçte etkin bir tedavi seçeneği geliştirmenin AS tedavisi için önemli olduğunu düşündük. Bu amaçla son yıllarda üzerinde sayısız çalışmalar yapılan ve yakın geleceğin önemli klinik sorunlarını çözeceğini düşündüğümüz kök hücreleri kullandık.



Resim 1. Asherman Sendromu (İntrauterin adezyon) şematik görünüm.

<http://planbwellness.com/adhesion>.

Kendini yenileme özelliğindeki kök hücreler (KH), vücutta ve laboratuvar ortamlarında, uygun uyarılarla, birçok özelleşmiş hücre tipine dönüşebilen hücreler olarak tanımlanmaktadır. Asıl önemli olan durum ise bu hücrelerin farklılaşmamış hücre formunda elde edilebilmeleridir. KH, "işlevsel olarak farklılaşmamış ve heterojen çoğalma potansiyeli olan" hücreler olarak tanımlanmaktadır⁶. KH, kendilerine destek sağlayan ve bu düzenleyici sinyallerin iletilmesine olanak sağlayan bir çevreye ihtiyaç duyarlar. "Niş" olarak adlandırılan bu mikroçevre, hücrelerin düzenlenmesi ve işlevlerinin kontrol edilebilmesi için gerekli hücre ve moleküler faktörleri içermektedir. Bazı dokularda bu mikroçevre hem KH'yi hem de bu hücrelerin öncüllerini düzenleyici etki göstermektedir⁷. KH, doku hasarı geliştiğinde mikroçevrelerinden ayrılarak hasarın geliştiği bölgeye göç etmektedir. Bu nedenle mikroçevredeki kök hücre sayısının dengelenmesi oldukça önemlidir^{8,9}. Mezenkimal kök hücreler (MKH) canlılarda en fazla bulunan ve insan KH'sinin en karakteristik özelliğini taşıyan hücrelerdir. Aynı zamanda MKH erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları sebebiyle genel olarak "destek hücresi" özelliği taşıdıkları için, bu hücrelerin tıbbın birçok alanında kullanılmasının temeli oluşturulmaktadır¹⁰. Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH'ler

için ana kaynak sayılmaktadır. Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök/projenitor hücreler bulunmaktadır. Kemik iliği dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Solid dokulardan hücre izolasyonunda enzimatik yöntemler kullanılmaktadır¹¹. Elde edilmesi ve çoğaltılması kolay olan KH, endometriyal restorasyon için son zamanlarda kenar tedavi olmaktan uzaklaşıp merkezi tedavi seçeneği olmaya başlamıştır. Özellikle kemik iliğinden elde edilen kök hücreler (KİMKH) en sık kullanılan kök hücre kaynağı haline gelmiştir.

Bu çalışmada sıçanlarda intrauterin adezyon oluşumunu tanımlayan AS modeli kimyasal olarak oluşturularak, aynı türün erkek sıçanlarının femur kemiğinden izole edilen KİMKH tedavi süreci takip edilmiş uterusu meydana gelen değişiklikler histopatolojik parametrelerle değerlendirilmiştir. Tedavi edici etkisi birçok çalışmada ortaya konulan kök hücrelerin AS üzerinde tedavi edici özelliklerinin olup olmadığı ortaya konulmuştur. AS sonrası endometriyum histolojisi, histokimyasal boyamalarla ve immünohistokimyasal olarak kök hücreler; Stro-1 (Mesenchymal stem cell marker antibody) ile hücre çoğalması; PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) ile ve apoptoz; TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) ile H-score üzerinden değerlendirilmiştir

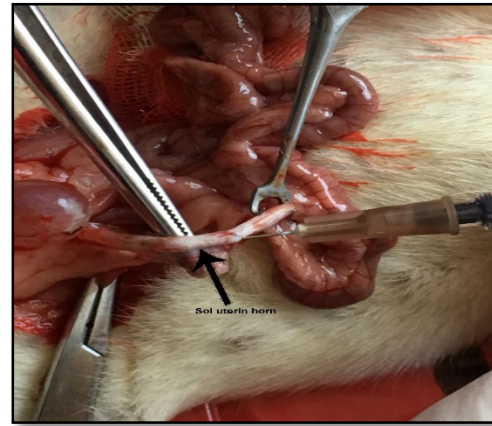
GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 01/03/2016 tarih ve 77637435-13 karar numaralı onayı ile yapılmıştır. Çalışma için herhangi bir kurum ya da şahıs desteği alınmamıştır.

Deney hayvanlarının temini ve bakımı

Çalışmada Manisa Celal Bayar Üniversitesi- Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden (MCBÜ-DEHAM) temin edilen ağırlıkları 200-300 gr civarında değişen erişkin 20 adet dişi ve 3 adet erkek Wistar albino cinsi sıçan olmak üzere toplam 23 adet sıçan kullanıldı. Kullanılacak deneklerin daha önce özellikle çiftleşmemiş ve herhangi bir çalışmada kullanılmamış olmasına dikkat edildi. Deneysel uygulamaları ve bakımları MCBÜ-DEHAM'de yapıldı. Deneklerin laboratuvar koşullarına adaptasyonunu sağlamaları için 22°C sıcaklıkta, 12 saatlik karanlık ve aydınlık periyodunda, yem ve musluk suyu serbest olarak (ad libitum) verildi.

Çalışmamızda, kimyasal yöntem kullanılarak trikloroasetik asitle AS modeli oluşturduğumuz deneklere, erkek sıçanların femur kemiklerinden elde edilen ve pasaj üç aşamasına kadar çoğaltılan KİMKH, deneysel model oluşturulduktan hemen sonra intraperitoneal (i.p) olarak enjeksiyonla transplante edilerek tedavi amacıyla 10 gün boyunca tekrarlayan şekilde verildi. Histokimyasal olarak Hematoksilen- Eozin (H&E) boyaması yapıldı ve endometriyumun histolojik yapısı, bez sayısı, inflamasyon oluşumu, endometriyal kalınlık ve fibrozis açısından değerlendirmesi yapıldı. İnflamasyon nötrofil (-) inflamasyon yok, (+) hafif inflamasyon, (++) orta inflamasyon, (+++) yoğun inflamasyon) yoğunluğuna göre semikantitatif olarak, fibrozisi ise (-) fibrozis yok, (+) hafif fibröz alan, (++) orta fibröz alan, (+++) yoğun fibröz alan) fibröz alanların yoğunluğuna göre semikantitatif olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyama olarak Stro-1 ve PCNA boyamaları yapılarak moleküler etkileşimler ortaya konulmaya çalışıldı. Ayrıca TUNEL metoduyla apoptotik süreç de değerlendirildi.



Resim 2. Trikloroasetik asitle sol uterin hornunda deneysel Asherman modelinin oluşturulması.

Deneysel Asherman modeli ve kök hücre uygulamaları

İmplantasyon başarısızlık modeli olarak AS kimyasal olarak trikloroasetik asitle dişi sıçanlarda uterusun tek hornunda oluşturuldu. Ketamin/ksilazin anestezisi altında orta hat insizyonu ile abdomen açılarak sağ ve sol uterin hornlar belirlendikten sonra sol uterin hornu 0.1 ml (Resim 2) trikloroasetik asit (IL 33, İstanbul İlaç Sanayi ve Ticaret AS, Ümraniye,

İstanbul, Türkiye) uygulanmasından bir gün sonra deney gruplarına göre tedavi uygulamaları gerçekleştirildi¹².

Gruplar

G1: Asherman +BY (n=5); sol uterin horna 0.1 ml trikloroasetik asit uygulandıktan sonra bir sonraki gün taze hazırlanan besiyeri (BY) 10 gün boyunca i.p olarak 1 ml verilen grup.

G2: Asherman + Niş (n=5); sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0.1ml trikloroasetik asit uygulandı. Bir gün sonra 10 gün boyunca hücreleri uzaklaştırılmış 1ml 48 saatlik besiyeri (niş) i.p olarak uygulandı.

G3: Asherman + KİMKH (n=5); sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulandı. Bir sonraki gün KİMKH santrifüj edilerek yeni besiyerine eklenip 10 gün boyunca 1×10^6 /ml i.p olarak uygulandı.

G4: Asherman + KİMKH + Niş (n=5); sol uterin horna kimyasal olarak intrauterin 0,1ml trikloroasetik asit uygulandı. Bir gün sonra 48 saatlik besiyeride bekletilmiş KİMKH 10 gün boyunca 1×10^6 /ml ip olarak uygulandı.

KİMKH eldesi

Çalışmada KİMKH eldesi için erkek sıçanların femurundan alınan kemik iliği hücreleri ayrışmayı takiben 25cm²lik kültür kabında % 15 fetal buzağı serumu (FBS) (S0113, Biochrom, Berlin, Germany) ve α -MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Germany) kültür vasatında 37°C'de ve %5 CO₂'e ayarlanmış ortamdaki inkübatörde çoğaltıldı. Birincil kültür sıfıncı pasaj (P0) olarak kabul edilerek, birincil kültürden sonra her alt-kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 olarak belirlendi¹³. Thoma lamında ışık mikroskobu altında hücre sayımı gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler, uygun oranlarda besi ortamıyla seyreltilerek, 1×10^6 hücre yoğunluğunda 75 cm²lik kültür flasklarına (T-75 kültür kaplarına) ekimi yapıldı ve iki günde bir besi ortamı değiştirilerek kültür işlemine devam edildi¹⁴.

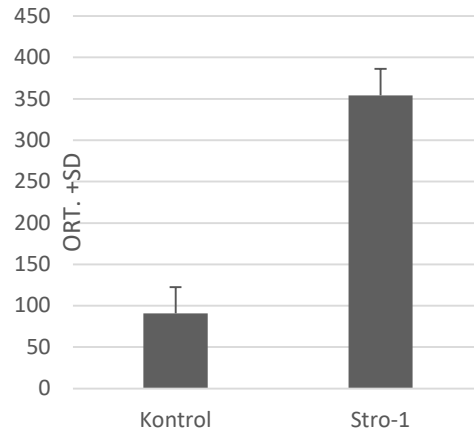
Kök hücre karakterizasyonu

KİMKH P3'e kadar çoğaltıldıktan sonra karakterizasyonu indirekt immunohistokimyasal yöntemle anti-Stro-1 (MAB4315, Millipore) antikoru kullanılarak gerçekleştirildi. Stro-1 (+) olan P3' teki hücreler, mezenkimal kök hücre olarak kabul edildi¹⁴.

İstatistiksel analiz

İmmunohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi; hücrelerin %1'den azında boyanma varsa 0; hücrelerin %1-10'unda boyanma varsa 1+; hücrelerin %11-50'sinde boyanma varsa 2+; hücrelerin %51-80'inde boyanma varsa 3+; hücrelerin %80'inden fazlasında boyanma varsa 4+ olarak değerlendirildi. Ayrıca boyanma şiddeti 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun olarak kör yöntemle belirlendi. Sonra "(1+boyanma şiddeti/3) x boyanma oranı" formülü ile toplam skor hesaplandı. Sonuçta elde edilen veriler One Way-ANOVA Tukey istatistik testiyle karşılaştırıldı ve p<0.05 sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi¹⁵.

KİMKH'de Stro-1 İmmünreaktivitesi



Şekil 1. KİMKH'in Stro-1 ile boyanma sonucunda H-skorlama ile analizinde tanımlamaları doğrulandı,

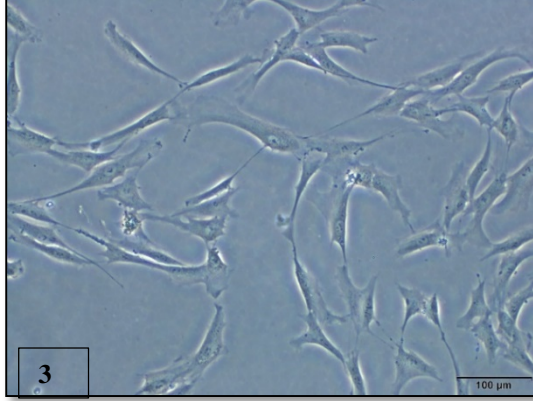
Kont: Boyama kontrolü, KİMKH: Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler.

BULGULAR

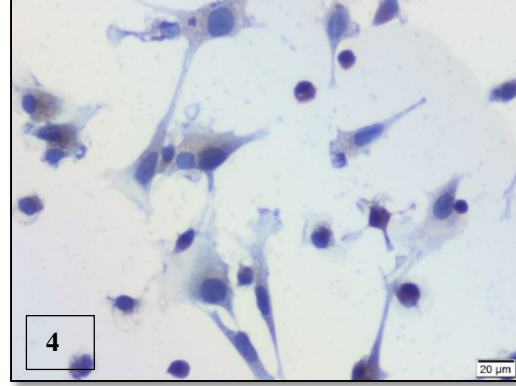
Hücre kültüründe sıçan femur bölgesinden toplanan KİMKH besiyeri içerisinde konfluent olana kadar kültürü yapıldı. Hücrelere üçüncü pasaja kadar pasajlama işlemi yapıldıktan sonra tedavi için yeterli hücre yoğunluğunun olduğu tespit edildi. İverted mikroskopta incelendiğinde hücrelerin fibroblast benzeri iğ şeklinde olduğu ve hücre çekirdeğinin ortada yerleşim gösterdiği görüldü (Resim 3). Hücre kültüründe dördüncü pasajdaki KİMKH kültürü

kabında konfluent olduğunda kök hücre belirteçleri olarak Stro-1 (Resim 4) aktivitesi pozitiflik açısından immunohistokimyasal olarak doğrulandı. Dördüncü pasajdaki KİMKH'in immunohistokimyasal

sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, Stro-1 immunoreaktivitesinin kontrol boyamaya göre anlamlı bir şekilde ($p<0.001$) arttığı tespit edildi (Şekil 1).



Resim 3. KİMKH'in kültür ortamında yerleşip çoğalmış 4. pasajdaki hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri. KİMKH: Kemik iliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler



Resim 4. KİMKH'in Stro-1 antikor ile boyanmış pozitif immunohistokimya görüntüsü.

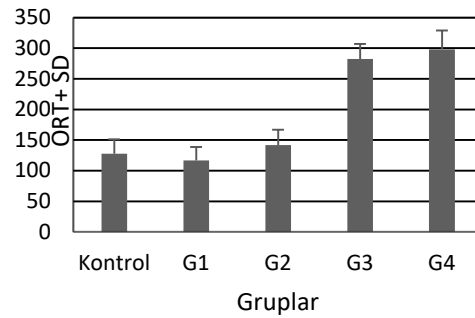
KİMKH: Kemik iliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Histokimyasal Bulgular

AS oluşturduğumuz deneysel modelimizin birinci gruplarında hem sağ ve sol uterin hornlar hem de gruplar kendi aralarında karşılaştırılarak değerlendirildi. Çalışmamızda sol uterin hornları asitle muamele edilerek hasar oluşturulan sıçanlara intraperitoenal olarak 10 gün boyunca farklı tedavi ajanları uyguladık ve 10 gün sonra endometriyumlarında meydana gelen değişiklikleri ışık mikroskop altında değerlendirdik. H&E boyalarıyla boyandılar ve uygulamalar sonunda dokularda meydana gelen histolojik ve fonksiyonel olarak endometriyum kalınlığı, stromadaki bez sayısı, inflamasyon ve fibrozis açısından değişiklikler incelendi. Besiyeri ve niş uygulanan (G1, G2) gruplarımızda endometriyumun ve epitelin yoğun bir şekilde dejenere olduğu, fibrozise bağlı sineşi alanlarının aşırı arttığı, bez sayısının sadece KİMKH ve KİMKH ile nişinin birlikte (G3 ve G4) uygulandığı gruplara göre anlamlı şekilde azaldığı ($p<0.001$) gözlemlenmiştir. Yine bu gruplarda bezlerin hem sayısında düşüş hem de bez epitelinin tübüler yapısının bozulduğu görülmüştür (Resim 5). Ayrıca inflamasyonun G1 ve G2 gruplarında yoğun olarak izlendiği, G3 ve G4 gruplarına göre istatistiksel olarak

da anlamlı farkların olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). İnflamasyon açısından G3 ve G4 grupları arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). G3 ve G4 gruplarında inflamasyon, fibrozis, bez sayısı ve endometriyal kalınlık açısından G1 ve G2 gruplarına göre önemli histopatolojik değişimler belirlenmiştir. İstatistiksel olarak $p<0.05$ anlamlılıklar tespit edilmiştir (Tablo 2).

PCNA immünreaktivitesi



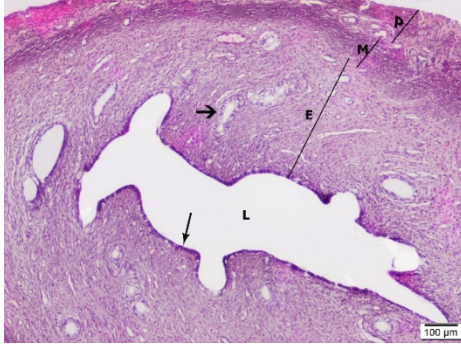
Şekil 2. Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki PCNA dağılımına etkisi

BY: Besiyeri, KİMKH: Kemik iliği kaynaklı kök hücreler.

DeneySEL Asherman modelinde meydana gelen adezyonları ortadan kaldırmak için KİMKH'ler kullanıldığı çalışmamızda uterus örnekleri PCNA pozitivitesi yönünden değerlendirildi ve rejenerasyon hakkında bulgular ortaya konuldu. DeneySEL modelin

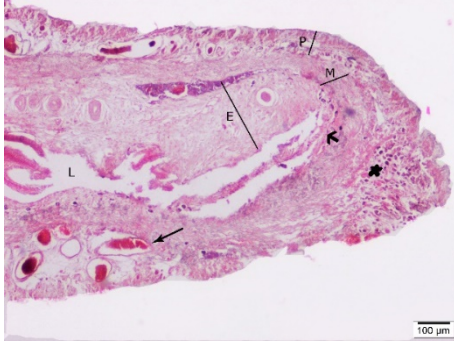
grupları (BY-G1, NİŞ-G2, KİMKH-G3, KİMKH+NİŞ-G4) 10 günlük tedaviden sonra sakrifiye edilerek kesitleri alındı ve PCNA boyamaları yapıldı (Resim 5)

Sağ Uterin Horn

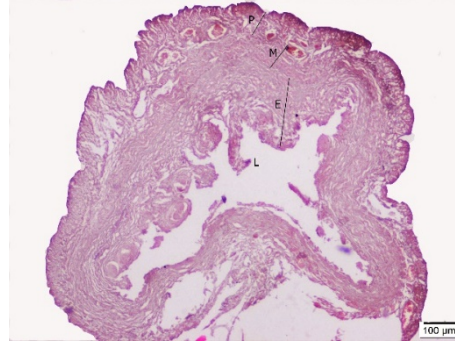


Sol Uterin Horn

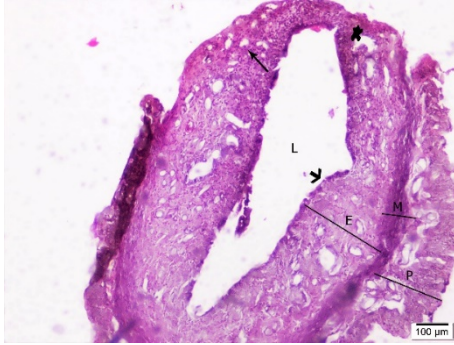
BY (G1-1)



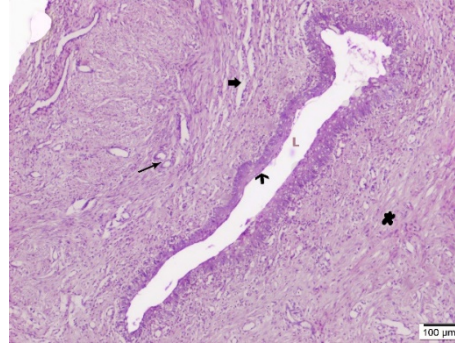
NİŞ (G2-1)



KİMKH (G3-1)



KİMKH+NİŞ (G4-1)



Resim 5. Deney gruplarının tedavi uygulaması sonrası endometriyum görüntüleri

(H&E: Hematoksilen- eozin, BY: Besiyeri, KİMKH: Kemik iliği kaynaklı kök hücreler).

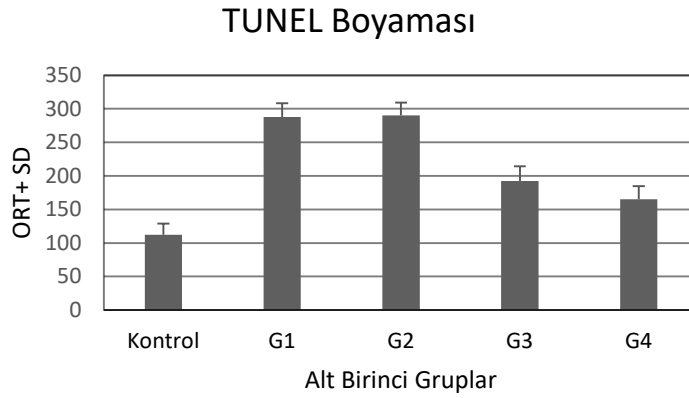
(E: Endometriyum, M: Miyometriyum, P: Perimetrium, L: Lümen, kısa ok: sineşi, uzun ok: kan damarı, yıldız: inflamasyon)

Rejenerasyon belirteci olan PCNA immünohistokimyasal boyamasında gruplar arasında istatistiksel anlamlılık belirlenmiştir (Şekil 2). PCNA

immünreaktivitesi KİMKH (G3) ve KİMKH+NİŞ (G4) gruplarında uterus yüzey epiteli başta olmak üzere, endometriyal bezlerde ve miyometriyumda

kaslar arasında yoğun olarak pozitivite gösterdiği gözlemlendi. BY (G1) ve NİŞ (G2) gruplarında boyanmalar daha çok endometriyal bez hücrelerinde görüldüğü fakat immünreaktivitesinin soluk olduğu tespit edilmiştir. Gruplar arasında en fazla anlamlılığın G1 ile G3 ve G4 arasında **** $p<0.0001$ olduğu tespit edildi. En düşük anlamlılık ise G3 ile G4 arasında ** $p<0.01$ gözlenmiştir. Kontrol olarak tutulan sağ horn örnekleri tedavi grubundan G4 ile

istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlılığın **** $p<0.0001$ olduğu görülmüştür. Bu veriler esasında şu anlama geliyor ki kök hücreler hasarlı bölgeye bir şekilde ulaşarak ortamın çevresini değiştirerek veya salgıladığı faktörlerle sağlıklı hücreleri bölünmeye teşvik ederek proliferasyonun artmasına katkı sağlamaktadır. Böylece hasarlı bölge daha hızlı bir şekilde reaksiyon göstererek doku tamirata yapılmaya başlamaktadır.

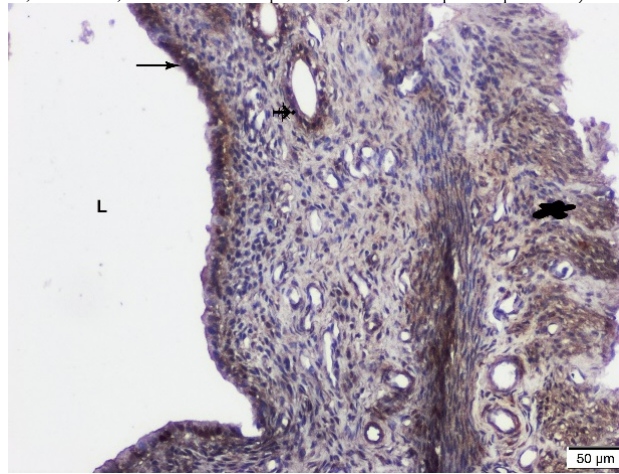


Şekil 3. Asherman modelinde tedavi gruplarının endometriyumdaki TUNEL dağılımına etkisi

BY: Besiyeri, KİMKH: Kemik iliği kaynaklı kök hücreler

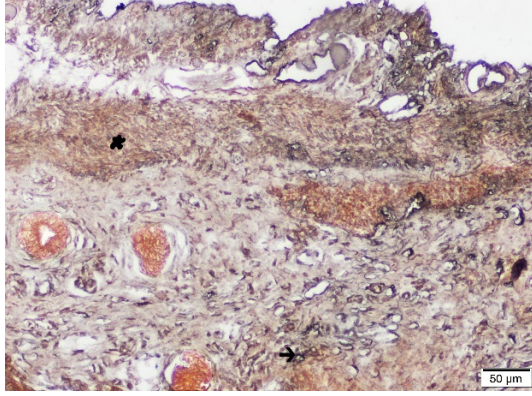
Sağ Uterin Horn (Kontrol)

(Yıldız: PCNA pozitif hücreler, L: Lümen, kısa ok: bezlerde pozitivite, uzun ok: epitelde pozitivite)

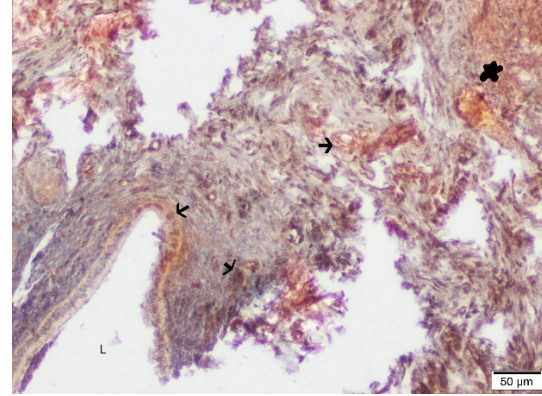


Sol Uterin Horn**BY (G1-1)**

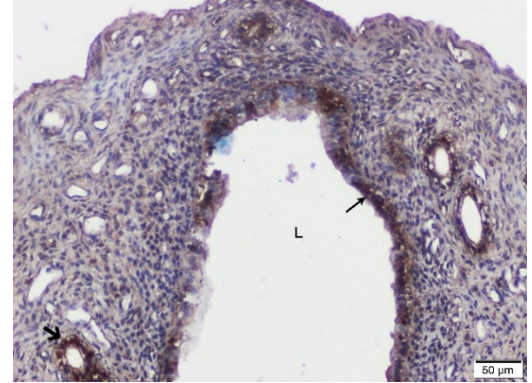
(Yıldız: PCNA soluk pozitif alan, kısa ok: PCNA pozitif hücreler)

**NİŞ (G2-1)**

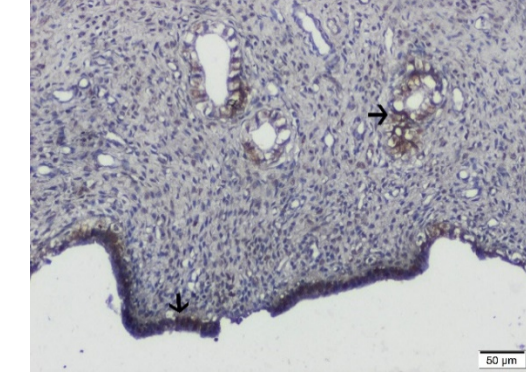
(Yıldız: PCNA soluk pozitif alan, kısa ok: pozitif hücreler)

**KİMKH (G3-1)**

(L: Lümen, uzun ok: epitelde pozitivite, kısa ok: bezde pozitivite)

**KİMKH+NİŞ (G4-1)**

(Ok: endometriyal bez ve epitelde PCNA pozitif hücreler)

**Resim 6. Deney gruplarının endometriyumda PCNA boyanma görüntüleri**

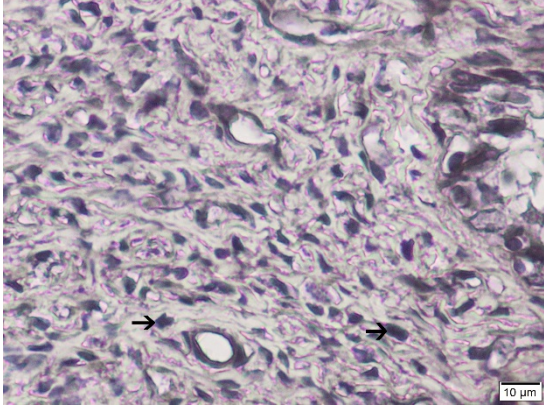
BY: Besiyeri, KİMKH: Kemik iliği kaynaklı kök hücreler

TUNEL Assay

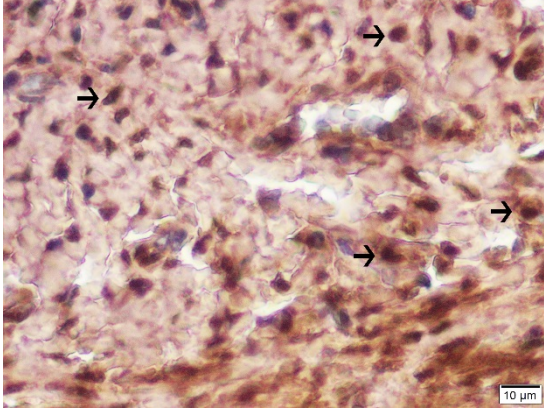
Programlı hücre ölümü mekanizması genellikle embriyonik dokularda meydana gelirken, erişkin dokuda da oksidan antioksidan dengenin bozulması ve dokudaki dejenerasyon apoptozutetikleyen önemli süreçlerdendir. Endometriyal hasarda özellikle epiteldeki hasar lamina propriyadaki bezlerin oluşumunu engelleyerek fonksiyonel tabakanın oluşumunu durdurur. Dokudaki fonksiyonel işlemlerin aksaklığı apoptoz için önemli tetikleyici durumlardan biridir. Asherman modelinde adezyon oluşumu ile devam eden süreçte apoptozutetiklendiği ve dokuda apoptotik hücrelerin arttığı gözlemlenmiştir (Resim 6). Apoptotik süreç tedavi amaçlı kullanılan ajanlardan G1 ve G2 gruplarında en yüksek seviyede

seyrederken, G3 ve G4 gruplarında daha düşük seviyelerde seyrettiği gözlemlenmiştir. Bu da demek oluyor ki KİMKH Asherman gibi dejeneratif hastalıklarda oluşan apoptotik mekanizmayı önemli derecede azaltabilmektedir. İstatistiksel karşılaştırmalarda da bu olumlu tablo anlamlılıklarla teyit edilmiştir. TUNEL pozitifliğinde gruplar arasındaki en fazla anlamlılık G1 ile G3 ve G4 grupları arasında gözlemlenmiştir (***p<0.0001). G3 ve G4 Grupları arasında en az anlamlılık görülürken (*p<0.05), G1 ile G2 grupları arasında da p>0.05 olarak istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir. G3 ile G4 grupları arasında anlamlılık ***p<0.001 şeklinde tespit edilmiştir. Aynı zamanda kontrol grubu olarak tutulan sağ uterin hornlarda ise G4 grubuyla kıyaslama yapılarak **p<0.01 anlamlılık gözlemlendi (Şekil 3).

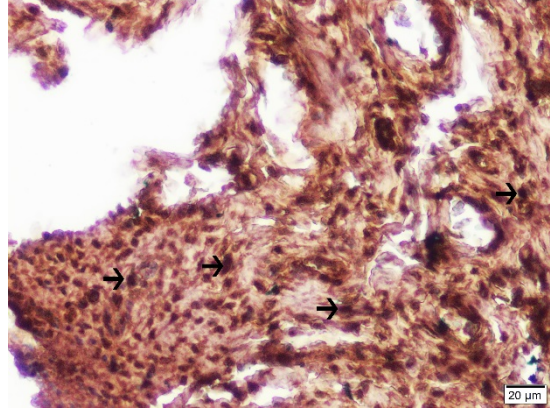
Sağ Uterin Horn



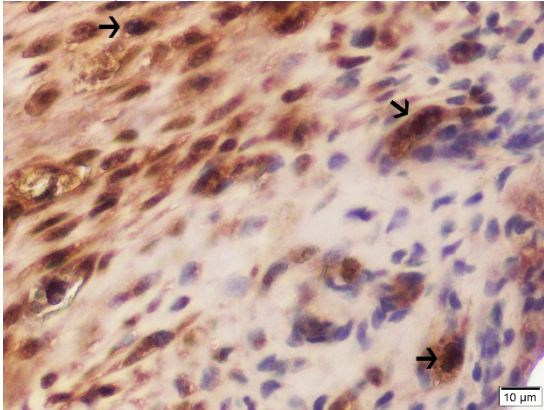
**Sol Uterin Horn
BY (G1-1)**



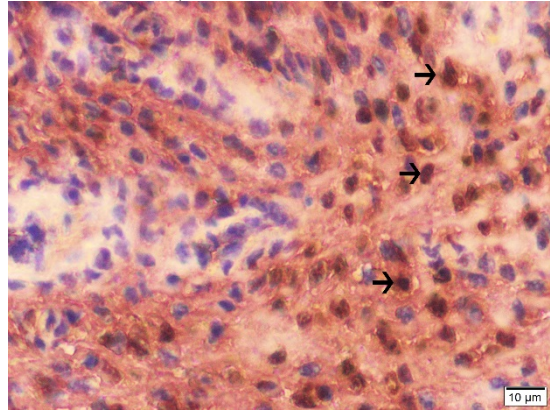
NİŞ (G2-1)



KİMKH (G3-1)



KİMKH+NİŞ (G4-1)



Resim 7. Deney gruplarının endometriyumda TUNEL boyanma görüntüleri

Ok: TUNEL pozitif hücreler

TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada; AS oluşturduğumuz sıçan uterusunda tedavi uyguladığımız BY, Niş, KİMKH ve KİMKH+ Niş gruplarının uteruslarında oluşan değişiklikler histolojik olarak değerlendirildi. Taze hazırlanmış besiyeri, 48 saatlik KİMKH ve hücrelerinden arındırılmış nişinin AS'nun neden olduğu adezyonlardaki rolü araştırıldı. Hücrelerdeki rejenerasyonun KİMKH ve nişi ile tedavi edilen gruplarda ilerlediği ve bezlerin daha belirgin hale geldiği, AS patolojisinde kaçınılmaz olarak oluşan fibrozis ve inflamasyonun azaldığı, endometriyal kalınlığın arttığını gösteren histolojik bulgular elde edildi. Buna karşılık kök hücrelerin sebep olduğu hiçbir olumsuz patolojik bulguya rastlanılmadı.

İUA'lara bağlı amenore gelişimi 20. yüzyılın başında ilk defa tanımlansa da, daha sonra Asherman tarafından 1948 yılında bir hastalık olarak tanımlanmıştır ve bu nedenle Asherman Sendromu olarak da adlandırılır. Bu sendromun patolojisini ortaya çıkarmak için gerçekleştirilen incelemelerde glandüler dokunun da eşlik edebildiği avasküler fibröz bağ doku bantlarının yoğun olarak izlendiği, genellikle elektif gebelik sonlandırılmasındaki intrauterin adezyon riskinin düşük olduğu bildirilmiştir. Doğum veya düşükten sonra ilk dört haftada, endometriyumun bazalis tabakası hasarlanmaya çok uygundur, bu sebeple gerekli olmadıkça bu dönemde küretaj işlemi yapılmamalıdır. AS insidansı son yıllarda artan sezeryan ve uterin cerrahiler sebebiyle yükselmesinin yanı sıra bu konuyla alakalı ayrıntılı tanı yaklaşımlarının belirlenmesi için farkındalığın da arttığı görülmektedir¹. Böylece bu sendromun tedavisindeki gelişmelerin toplanıp daha etkili bir yöntemin belirlenmesi oldukça önemli hale geldi. Bizde yaptığımız çalışmamızla son yıllarda popülaritesi oldukça artmış olan kök hücreleri kliniğe sokabilecek deneysel modelleme üzerinden yola çıkmak istedik. Elde ettiğimiz sonuçların ve gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmelerin literatüre kazandırılmasıyla mezenkimal kök hücrelerin, tedavisi mümkün olmayan veya olumlu yanıtın geç alındığı klinik tablolarda alternatif tedavi seçenekleri arasında yerini almasını kolaylaştıracaktır.

Rahim dokusu ameliyatla restore edilmesine rağmen, adezyonların yeniden oluşumu ve uterin ameliyatların komplikasyon riski, yeni tedavi seçeneklerine olan ihtiyacı ortaya çıkarmıştır. Sineşi gibi intrauterin oluşumların tedavisi için; seri esnek histeroskopiler¹⁶, intrauterin adezyon bariyer sistemleri¹⁷, taze

amniyon grefti¹⁸, seprafilm'in intrauterin insersiyonu¹⁹, histeroskopik cerrahi²⁰ ve hyalüranik asit jelleri²¹ gibi çeşitli girişimler bulunmaktadır. İntrauterin dolgu maddeleri ile ilgili temel problemlerden biri, uterusu yabancı bir cisim bulduğundan eşzamanlı antibiyotiklerin kullanılmasına duyulan ihtiyaçtır. Vajina ile temas halinde klinik veya subklinik pelvik enfeksiyonlar sekonder infertiliteyi artırabilmektedir.

Çalışmamızda alternatif yöntemlere katkı sağlayacak ve önümüzde ki yüzyılın belki de en önemli tedavi aracı olacak kök hücreleri kullanarak intrauterin adezyonlar ortadan kaldırılmaya ve önemli bir infertilite problemi olan endometriyal sineşilerin üstesinden gelinmeye çalışıldı. Mikroskopik olarak doku takibi sonucu elde edilen histopatolojik bulgular bunu kanıtlar nitelikte olmuştur. İmmünohistokimyasal bulgularımızda PCNA immünreaktivitesinin anlamlı artışlar gösterdiği gözlemlenmiştir. Proliferasyonun tetiklendiği ve vaskülaritenin artışının gerçekleştiği görülmüştür. PCNA, Ki-67 (Antijen KI-67) ve VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) pozitivitesi, yapılan diğer çalışmalarda ki bulgularla kıyaslandığında anlamlılık derecesi benzerlik göstermiştir¹². Yine mezenkimal kök hücre karakterizasyonunda kök hücre markerlarından anti-stro-1 antikolarıyla tespit edilmiştir. Eksperimental AS modelinde kullanılan adiöz kaynaklı mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için CD (Cluster of differentiation) (90+), CD (45+) ve CD (49+) markerlarıyla belirlendiği rapor edilmiştir¹².

Endometriyal restorasyon için kök hücre tedavisi son zamanlarda kenar tedavi olmaktan uzaklaşıp merkezi tedavi seçeneği olmaya başlamıştır. Özellikle kemik iliğinden elde edilen kök hücreler en sık kullanılan kök hücre kaynağı haline gelmiştir. Bu hücreler aspirasyon yoluyla direkt olarak kemik iliğinden izole edilirler. KİMKH kapsamlı göç ve pluripotent potansiyeli nedeniyle hem insan hem de kemirgenlerden rahatlıkla elde edilebilirler. Endometriyal rejenerasyon ve anjiyogenez etkileri olan kök hücreler immüno-manyetik izolasyonu ile kemik iliğinden arındırılırlar²². Sonuçta endometriyumu implantasyona hazır hale getirirler. Kök hücrelerin uterusu hareketi, menstrüasyonla kaybedilen endometriyal hücrelerin yerine konulmasından ziyade yaralanma veya gebeliğe karşı onarıcı bir mekanizma olabilir. Aslında yeni bir çalışmada, bütün bu bahsedilenler için erkek kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin hiç katkıda bulunmayabileceğini

düşündürmektedir²³. Uterusa tutunan KİMKH sayısı düşüktür ve bu hücreler tüm endometriyumun yerini almak üzere klonal genişlemeye maruz kalmaz; daha çok, uterus onarımı ve rejenerasyonuna yardımcı olan trofik faktörleri salgırlar^{24,25}.

Son zamanlarda, endometriyum epitelyal ve stromal MKH, insan endometriyumundaki bazal tabakasında yetişkin MKH'ye benzeyen popülasyonları çok nadir tanımlanmıştır²⁶. Endometriyal kök hücrelerin kaynağı henüz belirsizliğini koruyor. Fakat KİMKH, menstürel kan kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve adipoz kök hücreler dahil olmak üzere birçok kaynak içerdiği kabul edilmiştir²⁷. Bunların hepsi endometriyal yaralanmalardan sonra meydana gelen doku hasarını iyileştirmek için güçlü bir eğilim gösterir. Bu üç tip kök hücre arasında insan çalışmalarında kök hücre kaynağı olarak en yaygın kullanımları KİMKH'dir.

AS'da klasik tedavilerle incelenmiş endometriyumun düzeltilmesi mümkün olmamakta ve MKH uygulaması ile başarı sağlanacağı düşünülmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada dişi sıçanlara kemik iliği stromal kök hücre 50.000 hücre/mikrolitre olacak şekilde introyenöz infüzyonu yapılmış ve üçüncü östruslarında uterusları alınarak histolojik olarak incelenmiştir. Kök hücre uygulaması sonrasında endometriyal kalınlığın arttığı, bez ve kapillerin çoğaldığı görülmüştür. Sitokeratin, integrin β -3 ve LIF (Leukemia inhibitory factor) ekspresyonlarının özellikle endometriyal epitel sitoplazmasında, vimentinin ise endometriyal stromal hücrelerin sitoplazmasında pozitif olduğu görülmüştür. Kök hücre uygulaması ile daha güçlü bir boyanmanın olduğu saptanmıştır. İntroyenöz yolla verilen 10^7 kök hücrenin erkek donörlerden alınması yoluyla alıcı uterusu Y kromozomunun gösterilmesi mümkün olmuştur. Ayrıca Bromodeoxyuridine (BrdU) boyaması ile hücrelerin üçüncü siklusa orada oldukları özellikle de damar çevresinde yerleştikleri saptanmıştır. Kök hücre uygulamasından sonra TNF- α (Tumor necrosis factor), IL-1 (İnterleukin) ve IL-6 mRNA'larında da önemli bir azalma bulunarak kök hücrenin etkisini inflamatuvar sitokinler üzerinden gösterdiği ortaya konulmuştur²⁸.

Başlangıçta endometriyumun yenilenmesi için üç yöntem önerilmiştir. Birincisi, doku mühendisliğinin endometriyal tamir için alternatif bir seçenek sağlamasıdır. Uterusun eşsiz fiziksel özellikleri ve komplike hormonal ortamı nedeniyle, uterus rekonstrüksiyonuna yönelik raporlar nadir olmuştur^{21,29}. İkincisi, skar oluşumunu önlemek için

endometriyal epitelyal hücre infüzyonlarının epitel onarım teknikleri için kullanılmasıdır. Bununla birlikte, endometriyal epitelyal hücrelerin toplanması, bu hücrelerin son derece sınırlı in vitro proliferasyon kapasitesi ve oldukça invaziv toplama prosedürleri nedeniyle basit bir işlem olmamasıdır³⁰. Üçüncüsü, kök hücre tedavisi, hasarlı dokunun onarımı ve / veya yenilenmesi için büyük umut vaad etmesi olmuştur²³. Çalışmamızda üçüncü tedavi önerisi olan kök hücreleri deneysel olarak oluşturulan gruplarımızda kullanarak hücreleri transplante ettiğimiz gruplarda infertilite açısından yeni çözüm yolları bulmayı amaçladık. Tedavi uygulamalarından 10 gün sonra uterus örnekleri alınarak endometriyum kalınlığı, stromadaki bez sayısı, infalasyon ve fibrozis açısından sonuçları incelendi. Besiyeri ve niş uygulanan (G1, G2) gruplarımızda endometriyumun yoğun bir şekilde dejenera olduğu, sineşi alanlarının aşırı arttığı, bez sayısının KİMKH ve KİMKH+NİŞ (G3, G4) göre anlamlı şekilde azaldığı ($p<0.001$) gözlemlenmiştir. G1 gruplarına ait örneklerde epitelinin ortadan kalktığı, lamina propriyasını ise yoğun fibroz alanların oluşturduğu izlenmiştir. Bezlerin hem sayısında düşüş hem de bez epitelinin tübüler yapısının bozulduğu görülmüştür (Resim 5). İnflamasyon açısından gruplar arasındaki istatistiksel (Şekil 2) olarak en çok anlamlılık G1 ile G4 arasında ($***p<0.0001$), sonrasında G3 ile G4 ve G1 ile G3 arasında ($**p<0.001$) olarak belirlenmiştir. G2 ile G3 arasında inflamasyon yönünden anlamlılık $*p<0.05$ olarak tespit edilmiştir. G3 ile G4 grupları arasında inflamasyon yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Asherman deneysel modellerinde epitel dokudaki yapışıklıklar sonucunda lamina propriyadaki fibroblastların aşırı kollajen sentezlemesi sonucu fibröz bir yapıya dönüştüğü bildirilmektedir³⁰. Çalışmamızda tedavi grupları arasında fibrozis açısından farklılıklar olduğunu gözlemledik. Özellikle besiyeri (G1) ve niş (G2) gruplarında fibrozisin en fazla arttığı, KİMKH (G3) grubunda biraz daha azaldığı ve KİMKH +NİŞ (G4) grubunda kontrol olarak tutulan sağ uterin dokudaki fibröz alanlarına yaklaştığı görülmüştür.

İmmünohistokimyasal bulgularımızla tutarlı olarak, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin de endometriyal proliferasyonun desteklenmesinde östrojen kadar etkili olduğunu gösterdik. Özellikle fibrozisin giderilmesi ve proliferasyonun artırılmasında oldukça etkili olduklarını gözlemledik. Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin, herhangi bir cerrahi adezyonlara sebep olmadan endometriyal dokunun rejenerasyonu üzerindeki restoratif etkileri görüldü. Biz biliyoruz ki,

cerrahi operasyonlar sadece kavite içindeki adezyonları bölmeye hizmet eder, ancak endometriyal rejenerasyon ve adezyon nüksü hakkında çok az şey yapılabilir. Yani Asherman sendromlu kadınlar optimal klinik sonuçlar sağlamak için birden fazla yaklaşım gerektirir. Kök hücreler hala araştırma aşamasında olmasına rağmen, bu alandaki yeni ilerleyen keşifler her gün yeni terapötik stratejilere yol açmaktadır. Bu çalışmadaki bulguların üreme tıbbında kök hücre uygulamalarına ışık tutacağını umuyoruz.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: MİT, ŞÖ; Veri toplama: ŞÖ, PKS, İÖ, YET; Veri analizi ve yorumlama: ŞÖ, MİT; Yazı taslağı: ŞÖ; İçeriğin eleştirel incelenmesi: MİT, PKS, İÖ; Son onay ve sorumluluk: ŞÖ, PKS, İÖ, YET, MİT; Teknik ve malzeme desteği: MİT, ŞÖ, PKS; Süpervizyon: MİT, ŞÖ; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Author Contributions: Concept/Design : MİT, ŞÖ; Data acquisition: ŞÖ, PKS, İÖ, YET; Data analysis and interpretation: ŞÖ, MİT; Drafting manuscript: ŞÖ; Critical revision of manuscript: MİT, PKS, İÖ; Final approval and accountability: ŞÖ, PKS, İÖ, YET, MİT; Technical or material support: MİT, ŞÖ, PKS; Supervision: MİT, ŞÖ; Securing funding (if available): n/a.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

KAYNAKLAR

1. March CM. Management of Asherman's syndrome. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010;23:63–76.
2. Deans R, Abbott J. Review of intrauterine adhesions. *J.Minim inv.surg*. 2010;17:555-69.
3. Yuksel B, Kilic S, Boztok B, Albayrak A. An Experimental Asherman Syndrome, Rat Model. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst*. 2014;24:195-7.
4. Yu D, Wong YM, Cheong Y, Xia E, Li TC. Asherman syndrome-one century later. *Fertil Steril*. 2008;89:759-79.
5. Roman H, Sentilhes L, Cingotti M, Marpeau L. Uterine devascularization and subsequent major intrauterine synechiae and ovarian failure. *Fertil Steril*. 2005;83:755–7.
6. Weissman IL. Stem cells:units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100:157-168.
7. Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem*. 2008; 283:9499-503.
8. Conway A, Schaffer DV. Biophysical regulation of stem cell behavior within the niche. *Stem Cell Res Ther*. 2012; 3:50.
9. Krause DS, Scadden DT, Preffer FI. The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom*. 2013;84:7-20.
10. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol*. 1999;181:67-73.
11. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem. Cells and Dev*. 2004;13:436-448.
12. Kilic S, Yuksel B, Pinarli F, Albayrak A, Bozot B, Delibas T. Effect of stem cell application on Asherman syndrome, an experimental rat model. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31:975–982.
13. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adiposetissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and theinfluence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2010;31:3572-9.
14. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*. 2009;132:533-46.
15. Gürpınar T, Ekerbiçer N, Uysal N, Barut T, Tarakçı F, Tuğlu Mİ. The effects of the melatonin treatment on the oxidative stress and apoptosis in diabetic eye and brain. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:498489.
16. Robinson JK, Colimon LM, Isaacson KB. Postoperative adhesiolysis therapy for intrauterine adhesions (Asherman's syndrome). *Fertil Steril*. 2008;90:409–14.
17. Abbott J, Thomson A, Vancaillie T. SprayGel following surgery for Asherman's syndrome may improve pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol*. 2004;24:710–1.
18. Amer MI, Abd-El-Maeboud KH. Amnion graft following hysteroscopic lysis of intrauterine adhesions. *J Obstet Gynaecol Res*. 2006;32:559–66.
19. Tsapanos VS, Stathopoulou LP, Papanthanasopoulou VS, Tzingounis VA. The role of Seprafilm bioresorbable membrane in the prevention and therapy of endometrial synechiae. *J Biomed Mater Res*. 2002;63: 10–4.
20. Orhue AA, Aziken ME, Igbefoh JO. A comparison of two adjunctive treatments for intrauterine adhesions following lysis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003;82:49–56.
21. Lin X, Wei M, Li TC, Huang Q, Huang D, Zhou F et al. A comparison of intrauterine balloon, intrauterine contraceptive device and hyaluronic acid gel in the prevention of adhesion reformation following hysteroscopic surgery for Asherman syndrome: a cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;S0301-2115: 00325–4.
22. Nagori CB, Panchal SY, Patel H. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci*. 2011;4:43–8.
23. Cervello I, Gil-Sanchis C, Mas A, Faus A, Sanz J, Moscardó F et al. Bone marrowderived cells from male donors do not contribute to the endometrial side population of the recipient. *PLoS One*. 2012;7(1):e30260.
24. Curley GF, Hayes M, Ansari B, Shaw G, Ryan A, Barry F et al. Mesenchymal stem cells enhance

- recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat. *Thorax*. 2012;67:496–501.
25. Wang N, Li Q, Zhang L, Hongli Lin, Jie Hu, Diangeng Li et al. Mesenchymal stem cells attenuate peritoneal injury through secretion of TSG-6. *PLoS One*. 2012;7:e43768.
 26. Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod*. 2016;22:137–63.
 27. Tan J, Li P, Wang Q, Li Y, Li X, Zhao D et al. Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome. *Hum Reprod*. 2016;31:2723–9.
 28. Jing Z, Qiong Z, Yonggang W, Yanping L. Rat bone marrow mesenchymal stem cells improve regeneration of thin endometriyum in rat. *Fertil Steril*. 2014;101:587-94.
 29. Kuramoto G, Takagi S, Ishitani K, Shimizu T, Okano T, Matsui H. Preventive effect of oral mucosal epithelial cell sheets on intrauterine adhesions. *Hum Reprod*. 2015;30:406–16.
 30. Song T, Zhao X, Sun H, Hou X, Wang J, Zhou B et al. Regeneration of uterine horns in rats using collagen scaffolds loaded with human embryonic stem cell-derived endometrium-like cells. *Tissue Eng Part A*. 2015;21:353–61.
 31. Asherman sendromu şematik görünüm. <http://planbwellness.com/adhesion>. (Erişim; 20.05.2019).