

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KÜLTÜRE EDİLMİŞ AMNİOTİK HÜCRELERDE MEZANKİMAL
KÖK HÜCRE ÖZELLİKLERİNİN TAYİNİ:**

MORFOLOJİK TİPLENDİRME,
YÜZEY ANTİJEN EKSPRESYONU (İMMÜNFENOTİPLEME)
VE
OSTEOJENİK, ADİPOJENİK, KONDROJENİK FARKLILAŞMA

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem SEZER

Samsun – 2009

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KÜLTÜRE EDİLMİŞ AMNİOTİK HÜCRELERDE MEZANKİMAL
KÖK HÜCRE ÖZELLİKLERİNİN TAYİNİ:**

MORFOLOJİK TİPLENDİRME,
YÜZEY ANTİJEN EKSPRESYONU (İMMÜNFENOTİPLEME)
VE
OSTEOJENİK, ADİPOJENİK, KONDROJENİK FARKLILAŞMA

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özlem SEZER

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Gönül OĞUR

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım süresince, her aşamada bilgi ve deneyimleri ile yanımda olan, iyi bir Tıbbi Genetik hekimi olarak yetişmem için hem bilimsel hem de kişisel büyük katkıları bulunan, ekibinde çalışmaktan büyük zevk aldığım değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Gönül Oğur' a,

Eğitimimde katkıları bulunan, uzmanlık eğitim sürecinde birlikte çalışmaktan onur duyduğum, öncelikle sayın Prof. Dr. Gülsen Ökten başta olmak üzere tüm Tıbbi Biyoloji ekibine,

Tez çalışmamda, hücre çalışmalarına destek sağlayan tüm ailelere ve başta sayın Prof. Dr. Erdal Malatyahoğlu olmak üzere tüm Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Kendilerini tanımaktan ve aynı hastanede birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, tez çalışmalarım süresince büyük desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Hematoloji Ünitesinden sayın Prof. Dr. Feride Duru' ya,

Materyallerin patoloji bölümünde incelenmesinde titiz ve hoşgörülü yaklaşım göstererek desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Sancar Barış' a ve patoloji bölümü laboratuvar çalışanlarına,

Tez çalışmamda önemli katkıları olan, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinden sayın Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya ve biyolog Emine Kılıç' a,

Tez çalışmalarım sırasında manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşlarım, Berk Özyılmaz, Fatma Ekici ve Mehmet Türe' ye,

Bir ekip olarak çalışmaktan her zaman zevk aldığım ve gurur duyduğum kimyager Seda Özer, kimyager Özlem Deveci, biyolog Ayşin Papila, biyolog Semanur Fazla, teknisyen Meral Arslan, teknisyen Zeynep Ok, sekreter Serpil Sarı, Vicdan Aydoğan ve Nurdan Öztaşkın 'a, tez çalışmalarım sırasında büyük desteğini gördüğüm ve her zaman yanımda olan sayın Bülent Karakaş'a,

Bugünlere gelmem için bana tüm imkanları sunan canım annem Sebahat Türkeli, mesleğe atılmamda beni yönlendiren biricik babam İsfendiyar Türkeli ve kardeşim Serdar Türkeli' ye,

Bana verdikleri manevi ve maddi destek olmadan hiç bir şey yapamayacağım sevgili eşim Murat Sezer' e ve varlığıyla hayata daha sıkı tutunmamı sağlayan dünyalar tatlısı kızım Hira Sezer' e

sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	III
TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	X
ÖZET	XIII
ABSTRACT	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2. 1. Embriyonik gelişim	5
2. 2. Amnion kesesi ve Amnion sıvısı	9
2. 3. Amniosentez ve prenatal tanı (PNT)	13
2. 4. Kök hücreler	14
2. 4. 1. Kök hücre tanımı ve kriterleri	14
2. 4. 2. Plastisite	14
2. 4. 3. Kök hücre sınıflandırılması	14
2. 4. 3. 1. Embriyonik kök hücreler	15
2. 4. 3. 1. 1. Embriyonik kök hücre	15
2. 4. 3. 1. 2. Embriyonik germ hücreleri	16
2. 4. 3. 2. Erişkin kök hücreler	16
2. 4. 3. 3. Fetal kök hücreler ve amniotik kök hücreler	20
2. 5. Mezankimal kök hücrelerin biyolojik ve fonksiyonel tanımlanması	29
2. 5. 1. İmmünojenotipleme	29
2. 5. 1. 1. Mezankimal kök hücrelerde eksprese olan antijenik belirteçler	29

2. 5. 2. Kök hücre rezervuarları (NICHE)	32
2. 5. 3. Mezankimal kök hücrelerin kültür koşullarında büyüme ve çoğalması	33
2. 5. 4. Adezyon molekülleri	34
2. 5. 5. Kemokin ve kemokin reseptörleri	35
2. 5. 6. Farklılaşma	36
2. 6. Mezankimal kök hücrelerin hipoimmünojenik özelliği ve klinik kullanım alanları	43
3. MATERYAL VE METOD	56
3. 1. Amniotik sıvı kökenli kök hücre izolasyonu ve hücre kültürü	56
3. 1. 1. Hücre Kaynağı	56
3. 1. 2. Hücre kültürü	57
3. 1. 3. Hücre morfolojisi	57
3. 2. Karyotipleme	57
3. 3. İmmünofenotipleme	57
3. 4. Seçici (Selektif) Sub-kültür (SSC)	58
3. 5. SSC de İmmünofenotipleme	59
3. 6. Farklılaşma	59
3. 6. 1. Farklılaşma protokolü	59
3. 6. 1. 1. Osteojenik farklılaşma	59
3. 6. 1. 2. Adipojenik farklılaşma	60
3. 6. 1. 3. Kondrojenik farklılaşma	60
3. 6. 2. Histokimyasal Boyama	60
3. 6. 2. 1. Oilred O ve Alizarin Red-S Boyama	60
3. 6. 2. 2. “Alcian Blue” ve “Hematoksilen Eosin” ile Boyama	61
3. 6. 2. 2. 1. Alcian Blue (pH:1) Boyama	61
3. 6. 2. 2. 2. Mayer’ in Hematoksilen Eosin Boyama	61
4. BULGULAR	63
4. 1. Amniotik sıvı kökenli hücre izolasyonu ve hücre kültürü	63
4. 1. 1. Hücre Kaynağı	63
4. 1. 2. Hücre kültürü ve hücre morfolojisi	64
4. 2. Karyotipleme	67

4. 3. İmmüfenotipleme	68
4. 4. Seçici (Selektif) Sub-kültür (SSC)	70
4. 5. SSC İmmüfenotipleme	74
4. 6. Farklılaşma	76
4. 6. 1 . Adipojenik ve Osteojenik farklılaşma	76
4. 6. 2. Kondrojenik farklılaşma	78
4. 6. 3. İstatistik analizler	83
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇLAR	105
7. KAYNAKLAR	107

TABLO LİSTESİ

		Sayfa No
Tablo-I	Üç germ tabakasından oluşan spesifik doku ve organlar	8
Tablo-II	Amniotik sıvıda bulunan hücre tipleri ve temel özellikleri	12
Tablo-III.	Kemik iliğinden kaynaklanan pluripotent erişkin kök hücrelerin karakteristik özellikleri	18
Tablo-IV	Dokulara göre MKH sayısı	20
Tablo- V	Telomer uzunlukları karşılaştırılması	23
Tablo-VI	“Doubling time” (ikilenme zamanı)	23
Tablo-VII	Amniotik sıvı kökenli MKH lerin özellikleri	27
Tablo-VIII	Amniotik sıvı kökenli MKH lerin avantajları	28
Tablo-IX	Amniotik sıvı kök hücrelerinde eksprese edilen belirteçlerin literatür karşılaştırmaları	30
Tablo-X	İkinci trimester amniotik sıvı kök hücrelerinden kaynaklanan MKH’ lerin hücre yüzey antijenlerinin immünofenotipik özellikleri	32
Tablo-XI	Amniotik sıvı ve plasentadan elde edilen hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ve özellikleri	39
Tablo-XII	AS MKH’ lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmasındaki özellikler	40
Tablo-XIII	İmmünofenotipleme protokolü	58
Tablo-XIV	Amniosentez olguları	63
Tablo-XV	Primer hücre kültürüne ait immünofenotipik özellikler	68
Tablo-XVI	Primer hücre kültürü (P0 ₂) “Dot-plot” IF sonuçları	69
Tablo-XVII	SSC yapılan kültürlerle ait bilgiler	71
Tablo-XVIII	Selektif sub-kültür yapılan hücrelere ait immünofenotipik özellikler	74
Tablo-XIX	SSC “Dot-Plot” IF sonuçları	74
Tablo-XX	Adipojenik ve osteojenik farklılaşmanın özeti	78
Tablo-XXI	Kondrojenik farklılaşma çalışmalarının özeti	79
Tablo-XXII	Primer hücre kültürlerinde, ilk hücre yapışmalarının ortaya çıkma günlerine göre sıklık ve yüzde değerleri	83
Tablo-XXIII	Primer hücre kültürlerinde, ilk kolonilerin ortaya çıkma günleri yüzde değerleri	84

Tablo-XXIV	Primer hücre kültürlerinde, ilk kolonilerin ortaya çıkma minumum ve maksimum değerleri, ortalama $\pm$ standart sapma değerleri	85
Tablo-XXV	Primer hücre kültürlerinde, FB-Tip1 ilk yapışmaların ortalama $\pm$ standart sapma, minimum ve maksimum değerleri	85
Tablo-XXVI	Primer hücre kültürlerinde, FB-Tip1 ilk yapışmaların ortaya çıkma günlerine göre sıklığı	86
Tablo-XXVII	Primer hücre kültürlerinde, yüzey antijenik belirteçlerin ortalama $\pm$ standart sapma, minimum ve maksimum değerleri	87
Tablo-XXVIII	Selektif sub-kültürlerde, yüzey antijenik belirteçlerin ortalama $\pm$ standart sapma, minimum ve maksimum değerleri	87
Tablo-XXIX	CD90 belirtecinin Kruskal-Wallis ve Dunn' s testi sonuçları	88
Tablo-XXX	Amnion sıvısı kökenli MKH lerin akım sitometri sonuçlarının literatürle Karşılaştırılması	96

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Zigotun segmentasyonu ve blastokist oluşumu	5
Şekil 2. Bilaminar embrionik germ disk oluşumu	6
Şekil 3. Amnion boşluğu oluşumu	6
Şekil 4. Trilaminar embrionik germ disk	7
Şekil 5. Mezoderm, endoderm ve ektoderm oluşumu	8
Şekil 6. Amniotik membranın (Amnion zarı) oluştuğu tabakalar	9
Şekil 7. Kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri	15
Şekil 8. Erişkin kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri	16
Şekil 9. AEH kültüründen elde edilen “Embriyoid Body” benzeri “sferoid” yapı	25
Şekil 10. MKH’ lerin farklılaşmasında rol aldığı düşünülen gen sayılarının şematik Görünümü	37
Şekil 11. AFMKH’ lerinin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmasında temel bilgiler	41
Şekil 12. AS MKH lerinin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma Görüntüleri	41
Şekil 13. AS MKH lerinin farklılaşma görüntüleri	43
Şekil 14. MKH’ lerin Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları	44
Şekil 15. Kök hücre tedavisi	44
Şekil 16. Gen tedavisi uygulamaları	51
Şekil 17. Materyal-Metodun şematik çizimi	56
Şekil 18. Amnion sıvı hücrelerinin kültürdeki ilk gün görünümü	64
Şekil 19. Kültür, ilk 24-48 saat, ilk hücre yapışmaları	64
Şekil 20. İlk 3-5 gün, FB2 tipi hücre yapışmaları (ilk koloniler)	65
Şekil 21. İlk 3-5 gün AF-tipi hücre yapışmaları (ilk koloniler)	65
Şekil 22. İlk 3-5 gün epiteloid tipte hücre yapışmaları (ilk koloniler)	65
Şekil 23. Amnion hücre kültüründe bulunan hücre tipleri	66
Şekil 24. Amnion hücre kültüründe bulunan hücre tipleri	67
Şekil 25. Primer hücre kültüründe (P0) fetal sitogenetik analiz	67
Şekil 26. Primer hücre kültürüne (P0 ₂) ait Örnek Dot-Plot	69
Şekil 27. Primer hücre kültürüne (P0 ₂) ait Örnek Histogram Grafiği	70

Şekil 28. AF kaynaklı selektif sub-kültüre ait görüntü	71
Şekil 29. FB2 kaynaklı selektif sub-kültüre ait görüntü	72
Şekil 30. AF kaynaklı selektif sub-kültürlerin tripsinizasyon sonrası görüntüleri	72
Şekil 31. FB2 kaynaklı selektif sub-kültürlerin tripsinizasyon sonrası görüntüsü	73
Şekil 32. AF kaynaklı selektif sub-kültürler dejenere oldu	73
Şekil 33. SSC kültüre ait örnek Dot –plot	75
Şekil 34. SSC kültüre ait örnek histogram grafiği	75
Şekil 35. Osteojenik farklılaşmanın makroskopik izlenmesi	76
Şekil 36. Alizarin Red-S ile boyama görüntüleri	77
Şekil 37. Oil Red-O ile boyama görüntüleri	77
Şekil 38. Alcian Blue ile boyama görüntüleri	80
Şekil 39. Hematoksilen/Eosin ile boyama görüntüleri	81
Şekil 40. Çalışmanın ve bulguların özet verileri	82
Şekil 41. Primer hücre kültürlerinde, ilk hücre yapışmalarının ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği	83
Şekil 42. Primer hücre kültürlerinde, ilk hücre yapışmalarının ilk 3 gün ve 3 günden sonra ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği	84
Şekil 43. Primer hücre kültürlerinde, ilk kolonilerin ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği	85
Şekil 44. Primer hücre kültürlerinde, FB-Tip1 ilk yapışmaların ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği	86

KISALTMALAR

AEH	: Amniotik epitelyal hücre
AF-Tip	: Amniotik sıvı spesifik Tip
ALCAM	: “Aktivated Leukocyte” adezyon molekülü
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
aP2	: “a Fatty acid-binding protein”
AS	: Amniotik sıvı
AS MKH	: Amnion sıvısı kaynaklı mezankimal kök hücreler
BDGF	: Beyin dokusundan elde edilen büyüme faktörü
BMP	: Kemik morfogenetik protein
BMPR1B	: Kemik morfogenetik protein reseptör 1B
Ca ⁺²	: Kalsiyum
Cbfa	: “Core binding faktor α ”
CD	: “Cluster of Differentiation”(Farklılaşma kümeleri)
CDMP	: Kıkırdaktan kaynaklanan morfogenetik protein
CFU-F	: Koloni şekillendirici birim, “ Colony Forming Unit”
CK18	: Sitokeratin 18
DA	: Dopamin
Dkk1-	: “Dickkopf-1”
DMSO	: Dimetilsulfoksit
DMEM	: “ α -modified minimum essential medium”
“Doubling time”	: Hücre ikilenme zamanı
ECGF	: Endotelyal hücre büyüme faktörü
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
E-TİP	: Epiteloid Tip
FDS	: Fetal dana serumu
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FITC	: Floresein izotiyosiyanat
F –Tip	: Fibroblastik Tip
F-USG	: Fetal ultrasonografi
GAG	: Glikozaminoglikan
GATA	: GATA-Bağlayıcı Protein

GDNF	: “Glial derived neurotrophic factor”
GFAP	: Glial Fibriler Asidik Protein
GFP	: Yeşil floresan protein
GIRK	: “G-protein-gated” içeriden potasyum atan kapı
GİS	: Gastrointestinal sistem
GSK-3B	: Glikojen sentaz kinaz
GVHD	: “Graft Versus Host Disease”
HB-EGF	: Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü
HCAM1	: “Homing cell” adezyon molekülü
HER-	: Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü reseptörü
HKH	: Hematopoetik kök hücre
IBMX	: 3-isobutil-1-metilksatin
ICAM1	: “Intercellular cell” adezyon molekülü
IF	: Immünfenotipleme
IGF	: Insulin-benzeri büyüme faktörü
IL1R2	: Interlökin 1 tip 2 reseptörü
KI	: Kemik iliği
KH	: Kök hücre
LCA	: “Leukocyte common antigen”
LIF	: “Leukemia inhibitory factor”
LPL	: Lipoprotein lipaz
MAPC	: “Multipotent Adult progenitör Cells”
MCP-1	: “Monocyte chemoattractant protein-1”
MHC	: “Major histocompatibility complex”
MIAMI	: “Marrow-İsolated Adult Multilineage”
MKH	: Mezankimal kök hücre
MLD	: Metakromatik lökodistrofi
MPS-1H	: Mukopolisakkaridoz tip 1
NEBL	: “Nebulette”
NTRK3	: “Nörotropik tirozin kinaz reseptör 3”
OI	: Osteogenezis imperfekta
P0	: Primer hücre kültürleri

PBS	: Fosfat Buffer Salin
PDGF	: Plateletten kaynaklanan büyüme faktörü
PE	: Fikoeritrin
PER1	: “Period homolog 1”
PNT	: Prenatal tanı
PPAR- γ 2	: “Peroxisome proliferation-activated receptor-2”
PTHrP	: Paratiroid hormon ilişkili peptid
Runx 2	: “Runt homology domain transcription factor”
SCF	: “Stem cell factor”
SMA	: “smooth muscle actin”
SSEA-1	: “Stage Specific Embryonic Antigen”
SSC	: Selektif (seçici) sub-kültür
TIMP4	: Doku inhibitörü MMP4
TGF-B	: Transforme edici büyüme faktörü
TH	: Trozin hidroksilaz
VCAM1	: “Vascular cell” adezyon molekülü
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VLA	: “Very Late Activation”
ZNF145	: Çinko parmak protein145
Z0-1	: “Zona Occludens-1”

ÖZET

Kök hücreler, kendilerini sürekli yenileyebilen ve çeşitli dokulara farklılaşabilen hücrelerdir ve özgün koşullar altında mesodermal, ektodermal ve endodermal kaynaklı hücre tiplerine dönüşebilmektedirler. Köken aldıkları doku ile ilişkili olarak, embriyonik ve erişkin kök hücreler olmak üzere iki sınıfta incelenebilirler.

En güçlü kök hücre kaynağı olan embriyonik kök hücreler, embriyonun iç hücre kütesinden alınması nedeni ile etik sorun yaratmakta ve vericiye nakledildiklerinde tümör (teratom) oluşturma potansiyelleri, allojenik kullanımlarında immün “red” oluşturmaları ve elde edilmelerindeki teknik problemler bu hücrelerin klinik kullanım olanaklarını kısıtlamaktadır.

Kemik iliği mezankimal kök hücreleri (MKH), halen klinikte en yaygın kullanılan erişkin kök hücre kaynağıdır; ancak kemik iliği kaynaklı MKH sıklığının göreceli düşük olması, hücrelerin invazif bir işlemle elde edilmesi, kültür sürecinde hücre oranı ve farklılaşma kapasitesinin azalması nedeni ile halen klinik kullanım olanakları sınırlıdır.

Kök hücrelerle ilgili araştırmaların tıpta uygulama alanlarının giderek artması nedeniyle, insan uygulamalarında kullanılabilir başka kök hücre kaynakları aranması gereksinimi doğmuştur. Fetal mezankimal kök hücreler, bu araştırmalar sonucunda belirlenen kaynaklardandır. Amniotik hücreler, genetik hastalıkların tanısı için uzun yıllardır rutin olarak kullanılan fetal hücrelerdir; son yayınlar, biyolojik ve genetik özellikleri nedeni ile amniotik sıvı kökenli MKH lerini, hücre tedavi yaklaşımlarında belirli avantajlara sahip güçlü aday hücreler olarak tanımlamaktadır.

Çalışmamızda, amniotik sıvı hücrelerinin mezankimal kök hücre potansiyelinin araştırılması hedeflenmiş, bu temelde hücrelerin kültür sürecindeki morfolojik özellikleri, immünofenotipik özellikleri, ve osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasiteleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla genetik analizi tamamlanmış, “atık” konumdaki amniosentez materyalleri kullanılmıştır.

Primer kültür ve sub-kültür (P0₂-P1_{3a}) hücreleri rutin prenatal tanı protokolleri ile gerçekleştirilmiş ve hücrelerin MKH temelinde immünofenotipik değerlendirilmesi, akım sitometri cihazında gerçekleştirilmiştir. İmmünofenotiplemede, CD90, CD73, CD166, CD49e, CD44, CD29, HLA-ABC yüzey antijenleri pozitif, CD34, CD45, HLA-

DR ise negatif saptanmıştır. MKH immünohistokimyasal belirteçleri gösterilen hücrelerde histokimyasal boyamalar temelinde osteojenik ve kondrojenik farklılaşma da gösterilmiş, adipojenik farklılaşma ise gerçekleştirilememiştir.

Morfolojik değerlendirmeler sonucunda amniotik sıvı hücreleri, (1) Amniotik sıvı spesifik hücre tipi (**AF**), (2) Fibroblastoid hücre tipi (**FB1, FB2**) ve (3) Epiteloid hücre tipi (**E**) olarak üç sınıfta değerlendirilmiştir. Fibroblastoid-tip (FB1 ve FB2), birbirine paralel iğ şeklindeki hücreler olarak belirlenmiştir; FB1 hücrelerinin uzun ve ince bir yapılarının olduğu ve FB2 hücrelerine göre çok daha homojen olduğu gözlemlenmiştir. AF-tip hücreler, sıkı bağlantısı olmayan, yuvarlak şekilli ve poligonal hücreler olarak, epiteloid-tip hücreler ise oldukça sıkı bağlantılı, küçük koloniler oluşturan, yuvarlak ve keskin kenarlı, adacıklar oluşturan hücreler olduğu saptanmıştır. Morfolojik değerlendirme verileri MKH immünohistokimyasal ile ilişkilendirildiğinde, amniotik sıvı mezankimal kök hücrelerinin, amniotik sıvının heterojen hücre popülasyonu içinde özgün bir hücre grubundan (FB2 tip hücreler) kaynaklandığını düşündürmektedir.

Çalışmamızın sonucunda, laboratuvarımız koşullarında temel çalışmaları tamamlanmış olan amniotik sıvı kökenli MKH lerin kullanılabileceği hücre tedavisi temelli (cell therapy), gelecek vaadeden pre-klinik/klinik araştırmalara da olanak sağlayabileceği inancındayız.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Amniosentez, Mezankimal kök hücre, Hücre morfolojisi, Akım sitometri, Farklılaşma.

ABSTRACT

Stem cells are the cells that are thought to be able to proliferate indefinitely and differentiate into many different tissues. Under the right conditions, they have remarkable potential to develop into many different cell types derived from mesoderm, ectoderm and endoderm. They can be analysed in two groups in relation with the tissue they derived from; embryonic stem cells and adult stem cells.

The clinical use of embryonic stem cells is limited by its tumour and immune rejection development potential and difficulties in obtaining and ethical considerations.

Clinical use of MSC is relatively limited by some reasons such as low frequency of MSC s derived from bone marrow or decrease in ratio of cells and capacity of differentiation in culture. The need for finding new stem cell sources result from researches on implementation of stem cells in medicine. Fetal mesenchymal stem cells are the new sources. Amniotic cells which been used for the diagnosis of genetic disorders for many years, have lately been identified as having MSC derived from amniotic cell population. They have significant advantages by their biological and genetic characteristics in cell therapy approaches.

In our study, we aimed to examine heterogeneous amniotic fluid cells for their MSC potency. On this basis, the morphological and the immunphenotypic characteristics and osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation capacity of the cells were analysed. By this purpose, genetically analysed amniocentesis materials were used.

Primary culture and sub-cultures were examined by routine prenatal diagnosis protocols. On the basis of MSC, cells were analysed by flow cytometry for immunophenotyping; CD90, CD73, CD166, CD49e, CD44, CD29, HLA-ABC' s surface antigens yielded positive result whereas CD34, CD45, HLA-DR' s surface antigens were observed to be negative. Histochemical staining, for osteogenic and chondrogenic differentiation achieved tissue differentiation specific for osteocytes and chondrocytes but adipogenic differentiation was not materialized.

In the light of morphologic evaluations, amniotic fluid cells were analysed in three groups; (1) amniotic fluid specific cell type (AF), (2) fibroblastoid cell type (FB1, FB2) and (3) epitheloid – type (E). Fibroblastoid cell type (FB1, FB2) was identified as

spindle shaped cells parallel to each other. FB1 cells were observed to have long and thin and homogenous structures when compared with FB2 cells. AF cells had loose network and they were observed round and polygonal shaped cells; epitheloid-type cells had tight network and they were observed colonized, round sharp edged and clustered. When morphological assessment data were associated with MSC immunophenotype, amniotic fluid mesenchymal stem cells were suggested to be derived from a specific cell group (FB2) in a heterogeneous cell population.

Our study provided contributions to promising cell therapy-based pre-clinic/clinic studies in which amniotic fluid derived MSC s can be used.

KEY WORDS: Amniocentesis, Mesenchymal stem cell, Cell Morphology, Flow cytometry, Differentiation.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler, kendilerini sürekli yenileyebilen ve çeşitli dokulara farklılaşabilen hücrelerdir (26). Özgün koşullar altında mesodermal, ektodermal ve endodermal kaynaklı hücre tiplerine dönüşebilmektedirler (26). Köken aldıkları doku ile ilişkili olarak, embriyonik ve erişkin kök hücreler olmak üzere iki sınıfta incelenebilirler (26, 124,92)

Embriyonik kök hücreler, blastokistin iç hücre kitlesinden köken alan, sınırsız bölünme özelliği olan ve her üç germ yaprağına (mesoderm, ektoderm, endoderm) ait hücre tiplerine farklılaşabilen pluripotent hücrelerdir (124,118). Ancak hücre kaynağı olarak, implantasyon öncesi embriyoların kullanılması nedeniyle embriyoların kök hücre araştırmalarında kullanılmaları etik sorunlara neden olmaktadır (42). Ayrıca, tümör oluşturma potansiyelleri, immün red ve teknik yetersizlik gibi bazı problemler, elde edilirken fare besleyici tabakalarının kullanılması ve bunların insanla teması (26) bu hücrelerin klinik uygulamalarındaki diğer dezavantajlarıdır (30,124,118).

Erişkin doku kaynaklı ilk kök hücreler kemik iliğinden elde edilen hematopoetik kök hücrelerdir (HKH) (124). HKH ler, kan hücrelerine farklılaşabilmekte (124,26) bu nedenle yıllardır lösemi başta olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde, kemik iliği nakline alternatif olarak başarı ile kullanılmaktadırlar. Periferik kan kök hücre nakli olarak adlandırılan bu yaklaşımlar, lösemiler, immün yetmezlik sendromları ve kimi kalıtsal hastalıklarda hayat kurtarıcı rol üstlenmişlerdir.

İlk defa Friedenstein ve ark., (1976) ları tarafından tanımlanan, kemik iliğindeki hematopoetik olmayan stromal hücrelerden elde edilen **mezankimal kök hücreler (MKH)**, fibroblast-benzeri hücreler olup kemik iliğinde yer alan HKH' lerden farklı bir grup hücredir (27).

Mezankimal kök hücreler, günümüzde vücudun farklı doku ve organlarından izole edilebilen, farklılaşma potansiyelleri embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlı olan hücrelerdir (79,12,50). MKH' ler uygun kültür koşulları altında başlıca kemik, yağ, kıkırdak, kas ve endotel hücrelerine farklılaşabilmektedir (89,79). İmmünsupresif özelliklere sahip bu hücreler, etik sorun yaratmamaları, otolog ya da allograft olarak elde edilebilir ve kullanılabilir olmaları nedeniyle özellikle doku mühendisliği ile birçok hastalığın tedavisinde kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (123,4).

Mezankimal kök hücreler, hücre yüzey işaretleri açısından HKH' lerden farklı olarak CD14, CD34, CD38 ve CD45 negatiftir (50,7,12,89). Akım sitometrik analizlerle, CD11, CD14, CD34, CD38, CD40, CD80, CD86, CD45 ve HLA-DR negatif olan bu MKH popülasyonlarının, SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD106, CD120a, CD124, CD73, CD90, CD105, CD166, Stro-1 ve HLA-ABC gibi hücre yüzey antijenleri için pozitif oldukları gösterilmiştir (50,7,12,89,125).

Mezankimal kök hücrelerin, klinik uygulamalarında sıklıkla karşılaşılan sorunlardan biri yeteri kadar hücre elde etmekteki güçlüğüdür. Kemik iliği kaynaklı toplam hücrenin yaklaşık % 0.001-% 0.01 kadarının MKH olması (89,7,50), yeterli hücre elde edilmesi için tekrarlayan aspirasyonlar gerektirmesi, hücrelerin farklılaşma ve kendilerini yenileme kapasitelerinin sınırlı olması (89,134), sayılarının yaşa ve alındığı dokuya bağlı olarak azalmaları (106,47,48,49,125,10), invaziv bir teknikle elde edilmeleri ve kök hücrelerle ilgili araştırmaların tıpta uygulama alanlarının giderek artması nedeniyle, yeni kök hücre kaynaklarının aranması gereksinimini doğurmuştur (8,121).

Takip eden çalışmalarla, fetal kan ve karaciğer, akciğer, dalak, plasenta, kemik iliği ve term kordon kanı ve periferik kanda da MKH' lerin bulunduğu gösterilmiştir (47,134,9,45,104). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, amnion sıvısının da zengin bir MKH veya multipotent kök hücre kaynağı olduğu gösterilmiştir (8,59,89,112,113,120,121,49,92,55,56,18,64,79,20,95,96,97).

Amniotik hücreler, genetik hastalıkların tanısı için uzun yıllar rutin olarak kullanılan fetal hücrelerdir. Başlıca, fetal deri, ürogenital sistem, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, umbilikal korda ait epitel hücreleri, amniotik membran epitel ve trofoblastların üst tabakasındaki hücrelerden kaynaklanır (31,78,20,65).

Araştırmalar, amniotik hücrelerin embriyonik kök hücrelere benzer şekilde Oct-4 pozitif olduklarını (97,8,59), Rex-1, Runx-1, SCF, GATA-4, TRA1-60, SSEA3-SSEA 4 gibi embriyonik kök hücre belirteçlerini eksprese ettiklerini göstermiştir (8,59).

Ayrıca, amniotik sıvı kaynaklı MKH ler, erişkin kemik iliği MKH' lerine benzer biçimde CD11a, CD14, CD25, CD31, CD34, CD40, CD45, CD50, CD62, CD80, CD86, CD106, CD120a, CD127 ve HLA-DR hücre yüzey antijenleri için negatif, CD29, CD44, CD49e, CD54, CD58, CD71, CD73, CD90, CD105, CD123, CD166 ve HLA-ABC hücre yüzey antijenleri için pozitifdir (92,121,18,47,49). Erişkin kemik iliği

MKH lerine benzer biçimde hipoiimmünojenik ve immunomodülatör özellikleri bulunmaktadır. Kimi araştırmalar, bu hücrelerin allojenik olarak reddedilmediklerini ve allojenik hücre naklinde immünsupresyona ihtiyaç duyulmadığını (12,34) göstermektedir.

Kültürde çoğaltılan amniotik sıvı kaynaklı MKH lerin farklılaşma kapasiteleri de incelenmiş ve ilk veriler bu hücrelerin özgün besiyerleri etkisi altında, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma gösterebildiklerini kanıtlamıştır (8,120,121,18, 59,48,56). Takip eden çalışmalarla, myojenik, endotelial, nöronal (120, 121, 59, 8) ve hepatik hücreler gibi her bir embriyonik germ yaprağından kaynaklanan hücre tiplerine farklılaşma kapasitesi olduğu (18,20), myofibroblast/fibroblast hücrelerine farklılaşabildiği (55,56) ve in vitro renal farklılaşmanın (87) elde edilebildiği belirtilmiştir.

Amniotik sıvı MKH leri, hücre tedavisinde, erişkin kök hücrelere benzer biçimde güçlü adaylar olarak gösterilmektedirler. Kimi özellikleri nedeniyle de tercih edilebilir konumda oldukları düşünülmektedir. Örneğin, bu hücreler embriyonik KH özellikleri yansıttıkları halde tümör oluşturma riski taşımamaktadırlar, erişkin MKH lere göre hücre naklinde ret olayları görülmemekte ya da daha hafif seyretmektedir (55,56,18,92).

Pek çok kalıtsal genetik hastalığın hücre tedavisi hedeflendiğinde, zaten hasarlı durumda bulunan otolog doku kaynaklı kök hücre kullanımı, doğal olarak yarar sağlamayacaktır. Bu hastalarda kök hücre nakli, ya allograft hücrelerin kullanılmasıyla ya da red olmazsa “mis-match” fetal kök hücre kullanımı ile gerçekleştirilebilir. Hipoiimmünojenik özellikleri erişkin MKH kıyasla daha ön planda olan fetal kök hücrelerin, bu açıdan potansiyel bir hücre tedavi kaynağı olduğunu düşünülmektedir.

Bilgilerimiz dahilinde ülkemizde fetal kök hücre ile ilgili yayınlar son derece az sayıdadır (54); amniotik hücrelerin mezankimal kök hücre potansiyeli, farklılaşma özellikleri ve morfolojik yapılanma ilişkileri ile ilgili bir araştırma ise henüz yayınlanmamıştır.

Çalışmamızda, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Prenatal Tanı Ünitesi Doku kültürü ve sitogenetik laboratuvarımızda, yüksek riskli gebelik endikasyonu ile amniosentez uygulanan ve amnion sıvısı alınan bireylerin genetik analizleri tamamlanmış olan kültüre edilmiş “atık” konumdaki

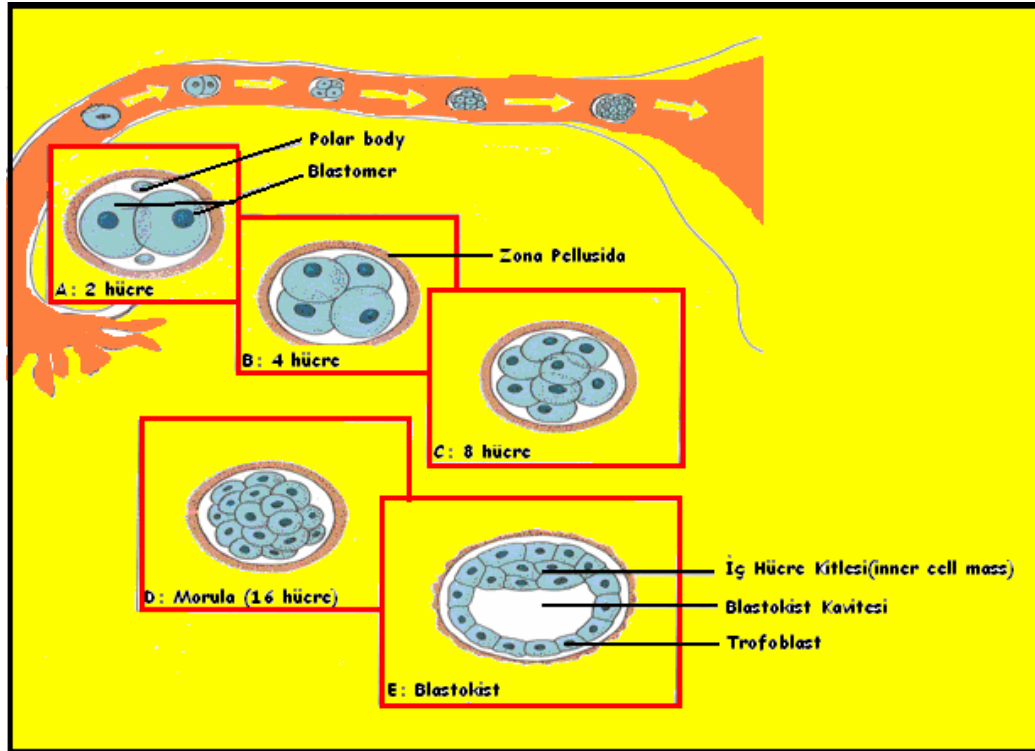
amnion hücrelerinin, kendi laboratuvar koşullarımızda mezankimal kök hücre potansiyelinin araştırılması hedeflenmiş, hücrelerin kültür sürecindeki morfolojik özellikleri, mezankimal kök hücre temelinde, immünofenotipik özellikleri, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasiteleri değerlendirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2. 1. Embriyonik gelişim

Oosit ve spermiumun fertilizasyonu ile oluşan zigot, bir seri mitoz bölünme geçirerek yaklaşık 4 gün sonra uterusu ulaşır. 12-16 blastomerden oluşan morula, uterusu ulaştığında, endometrial bezlerin salgıları zona pellusidayı geçerek morula kitlesinin içine sızar ve blastomerlerin ortasında, “blastosöl” adı verilen boşluğu oluşturur. Yaklaşık 100 hücreden oluşan bu yapıya “blastokist” denir. Bu dönemde, blastomerlerin bir kısmı yassılaşıp bir kenara itilirken (trofoblast/outer cell mass), diğerleri de bir kitle (embriyoblast/iç hücre kitlesi/inner cell mass) halinde kalır (65,66) (Şekil-1).

Embriyo, esas olarak embriyoblast kitlesinden oluşur. Trofoblasttan ise fetal zarlar ve plasenta gelişir (65,66).

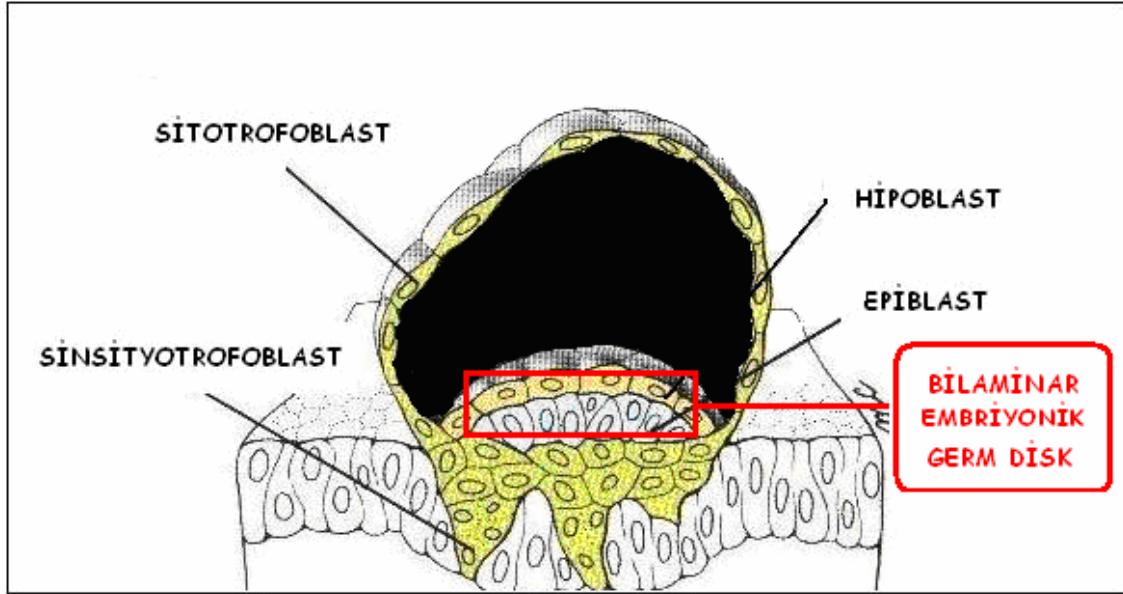


Şekil-1: Zigotun segmentasyonu ve blastokist oluşumu

Fertilizasyondan 6-7 gün sonra zona pellusidanın da dejenere olmasıyla, embriyoblast endometriuma implante olur. Bu dönemde, trofoblastlar hızla çoğalarak, sitotrofoblast (tek çekirdekli hücrelerden oluşan iç tabaka) ve sinsityotrofoblast (hücre

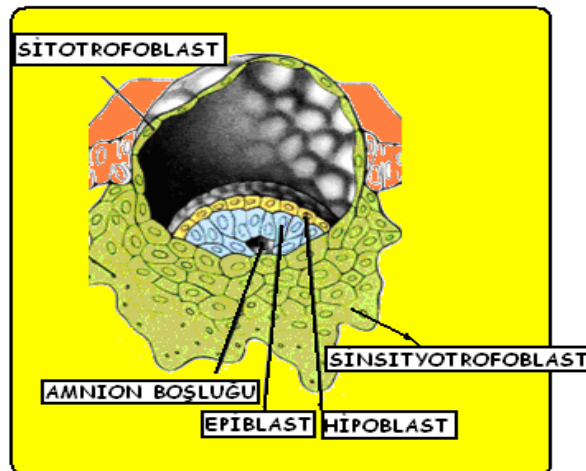
sınırları belirgin olmayan, çok çekirdekli hücrelerden oluşan dış tabaka) olmak üzere iki tabakaya farklılaşır (66).

Aynı dönemde, iç hücre kütlesi de (embriyoblast), altta, blastokist boşluğuna bitişik küçük kübik hücrelerden oluşan hipoblasta (primer endoderm) ve üstte, amnion boşluğuna bitişik yüksek silindirik hücrelerden oluşan epiblasta (primer ektoderm) ayrılır. Bu yapıya, “bilaminar embriyonik germ disk” denir (66) (Şekil-2).



Şekil-2: Bilaminar embriyonik germ disk oluşumu

8. günde, epiblast tabakası üzerinde, küçük bir yarık halinde, amnion boşluğu oluşmaya başlar. Epiblasttan köken alan amnioblastlar, bu boşluğu “amnion” adı verilen bir zar ile çevreler. Amnion boşluğu, üstte amnion zarı ve altta epiblastlar tarafından çevrilmiştir (66) (Şekil-3).



Şekil-3: Amnion boşluğu oluşumu

9.günde, embriyo, tamamen endometriuma gömülmüştür; endometrium epitelinin dejenere olduğu bölgede de fibrin bir tıkaç oluşmuştur. Bu dönemde, hipoblast hücreleri, blastokist boşluğunu çevreleyerek ekstraembriyonik endodermi (primitif endoderm, ekzoçöломik membran, “heuser’s membran” ı) oluşturur (66).

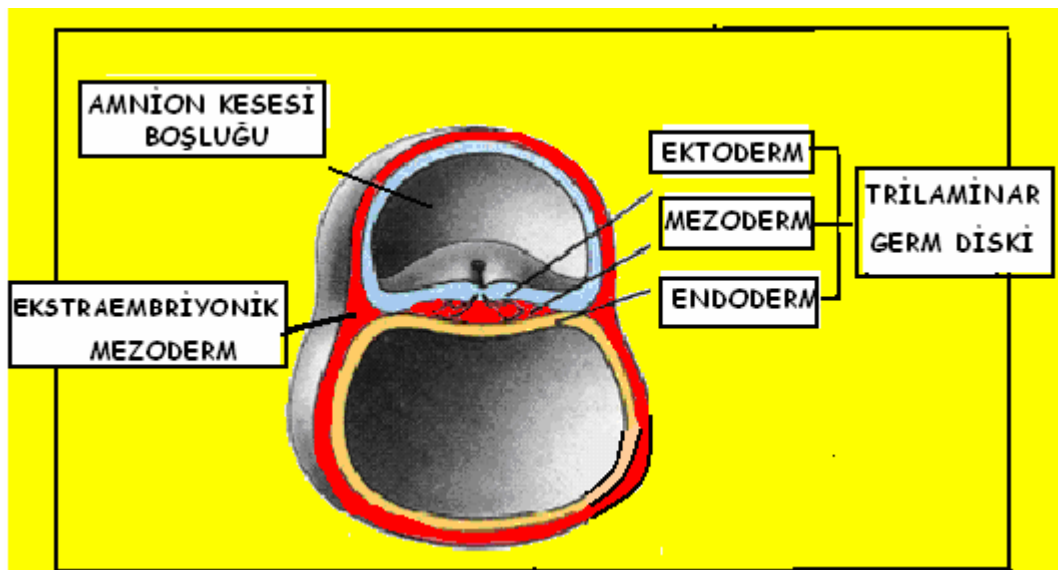
Ekstraembriyonik endoderm, içindeki boşlukla birlikte “primitif yolk kesesini” (ekzoçöломik boşluğu) oluştururken, sinsityotrofoblastlar da embriyoyu tamamen çevrelemiştir (66).

10-11 günde, sitotrofoblast tabakası ile ekstraembriyonik endoderm arasında ekstraembriyonik retikulum oluşur (66).

11-12günde, amnion zarı ve primitif yolk kesesinin dışında ekstraembriyonik mezoderm adı verilen gevşek bir bağ dokusu bulunmaktadır (Şekil-4). Ekstraembriyonik retikulum, ekstraembriyonik mezoderm tarafından hızla invaze edilir. Bu yapı, sitotrofoblastın iç yüzeyi ile ekstraembriyonik endodermin dış yüzü ile komşudur (66).

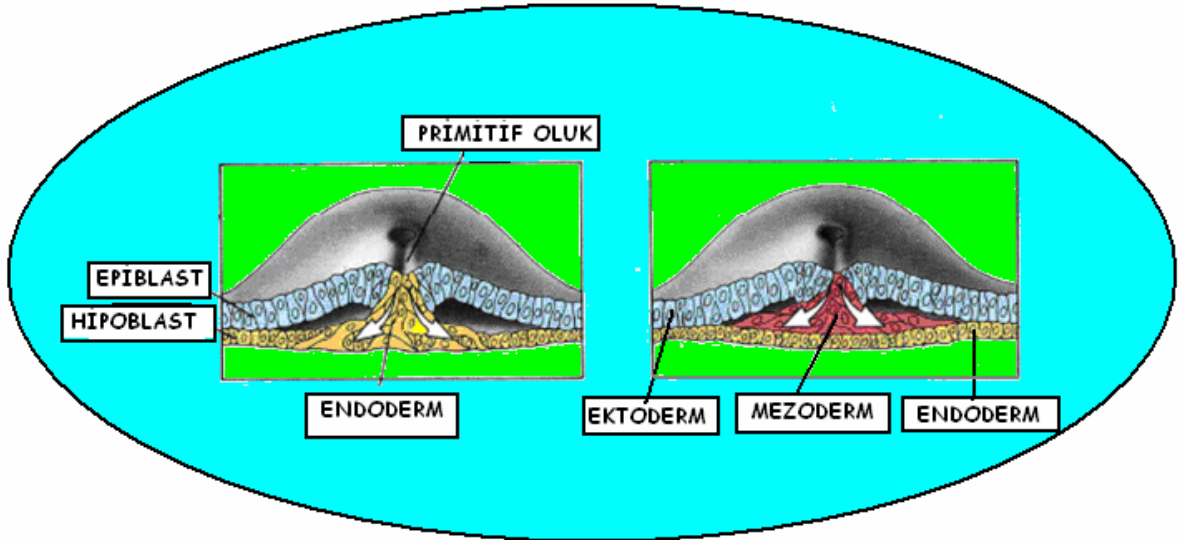
12-13günde, ekstraembriyonik mezoderm içinde oluşan boşluklar birleşerek ekstraembriyonik çöloomu (koryon boşluğu) meydana getirir (66).

16.günde, epiblastın yüzeyinde primitif çizginin oluşmasıyla gastrulasyon başlar (66). Gastrulasyon (Şekil-4,5), bilaminar embriyonik diskin trilaminar embriyonik diske dönüştüğü, üç germ yaprağına farklılaştığı, orta hat, kraniokaudal, sağ-sol, dorsal-ventral vücut akslarının oluştuğu ve epiblasttan köken alan bir süreçtir (86).



Şekil-4: Trilaminar embriyonik germ disk

Bu dönemde, iki yanında uzanan daha kabarık bölgelerle fark edilen primitif oluk bölgesinde, epiblast hücrelerinin bir kısmı, epiblast ve hipoblast arasında uzanır. Bu hücrelerin bir kısmı, hipoblast hücrelerinin yerini alarak embriyonik endodermi oluştururken, bir kısmı da epiblast ile embriyonik endodermin arasına girerek embriyonik mezodermi yapar. Epiblasttan kaynaklanan diğer hücreler ise embriyonik ektodermi oluşturur (66) (Şekil-5).



Şekil-5: Mezoderm, endoderm ve ektoderm oluşumu

Üç germ tabakasının her birinden (ektoderm, mezoderm, endoderm) spesifik doku ve organlar gelişir (86) (Tablo I).

Tablo I: Üç germ tabakasından oluşan spesifik doku ve organlar

Ektoderm	Endoderm	Mezoderm
Beyin	Solunum sistemi	Kemik iliği
Omurga	Gastrointestinal sistem' i döşeyen epitel	Bağ dokusu
Sinir dokusu	Gastrointestinal sistem' e açılan bezler	Kıkırdak dokusu
Deri	Karaciğer	Kemik dokusu
Tırnaklar	Pankreas	Yağ dokusu
Saç		Çizgili ve düz kas dokusu
		Kalp
		Kan
		Lenf damarları
		Ürogenital sistem

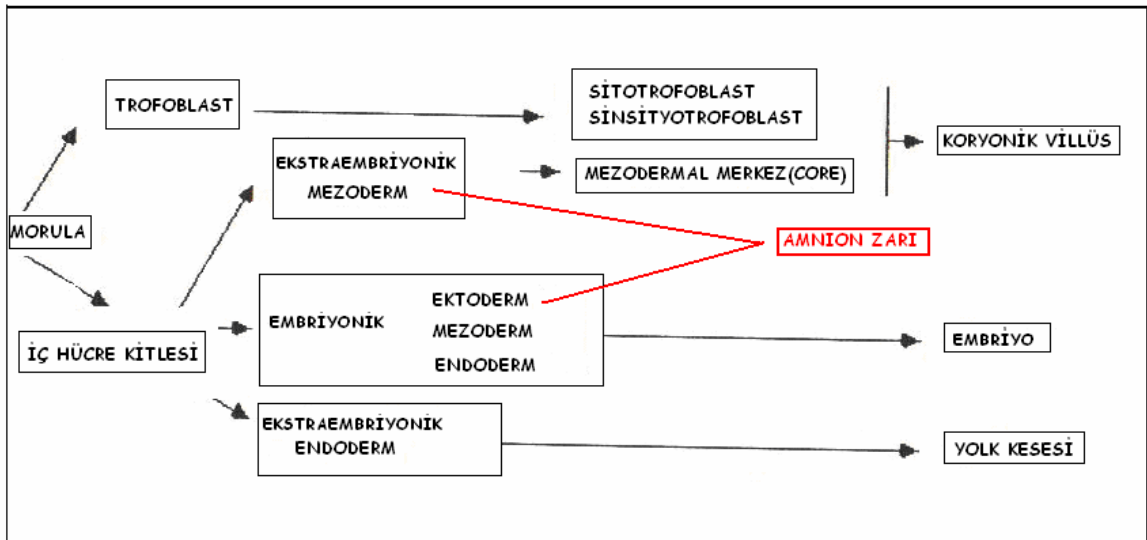
2.2. Amnion kesesi ve Amnion sıvısı

Amniotik sıvı kaynaklı hücreler, başlıca, fetal deri, ürogenital sistem, solunum sistemi, gastrointestinal sistem hücreleri, umbilikal korda ait epitel hücreleri, amniotik membran epiteli ve trofoblastlar gibi (31,78,20) embriyonik ve ekstraembriyonik dokulardan köken almakta ve genetik hastalıkların prenatal tanısında çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

Amniotik sıvı, embriyo/fetüs için birçok yönden önem taşımaktadır (31,8,25,65, 20):

1. Embriyonun simetrik büyümesini sağlar.
2. Embriyonun amnion kesesi duvarına yapışmasını önler.
3. Embriyoyu/fetüsü travmalara karşı korur.
4. Embriyonun/fetüsün vücut ısını ve dış basıncını sabit tutar.
5. Embriyonun/fetüsün akciğer gelişimini sağlar.
6. Embriyo/fetüs' e anti-bakteriyel ortam sağlayarak enfeksiyonlara karşı korur.
7. Fetüsün rahat hareketini sağlayarak, kas ve iskelet sisteminin gelişmesine yardım eder.

Amniotik kese, embrioyu/fetüsü saran ince ama dayanıklı, iki tabakalı şeffaf bir zarıdır. İç tabaka olan amnion, amniotik sıvı ve fetüsü içerirken, dış tabaka olan koryon, amnionu da içeren plasantanın bir parçasıdır. Amniotik membran, başlıca epiblastlardan kaynaklanan embriyonik ektodermal tabaka ve ince non-vasküler ekstraembriyonik mezodermden oluşmaktadır (31) (Şekil-6).



Şekil-6: Amniotik membranın (Amnion zarı) oluştuğu tabakalar

Koryoallantoik plasentanın son şekli, gestasyonun yaklaşık 8-9. gününde, embriyo etrafındaki yolk kesesini ve amnionu çeken embriyonik dönüş hareketiyle oluşur (20).

Amnion kesesinin içi amniotik sıvı ile doludur ve yaklaşık % 99'u sudur, içeriği ise gebelik boyunca her üç saatte bir değişmektedir. Başlangıçta az miktarda amniotik hücre ve çok miktarda maternal doku sıvısının, plasentada desidua parietalisten amniokoryonik membran aracılığıyla difüzyonu ile, sonraları ise, plasentanın intervillöz aralığındaki kanın koryonik plaktan difüzyonu ile oluşur. Gestasyonun ilk yarısında amniotik sıvı, amniotik membran ve fetal deri arasında sodyumun aktif ve klorun pasif difüzyonundan oluşur. Gebeliğin erken döneminde fetal plazma izotoniktir, fetal epitelyal hücreler, proteinler, karbonhidratlar, lipitler, fosfolipitler, üre, elektrolitler, enzim, hormon ve pigmentleri içerir (31,20). Daha sonra terme kadar hipotoniktir (25). Gestasyonun ikinci yarısında, fetüsün solunum sisteminden salgılanan sıvı (günde 300–400 ml) ve 9-12. haftasından sonra atılan idrar (günde 500 ml) bu sıvının oluşumuna büyük katkıda bulunur (31). Fetal yutma hareketi ve gastrointestinal sistem salgıları da azda olsa amniotik sıvının oluşumunda rol alır. Amniotik sıvı, 16. haftada yaklaşık 207 ± 92 ml, 18. haftada 258 ± 97 ml, 20. haftada ise 365 ± 88 ml dir. İçerdiği hücre sayısı, değişken olmakla birlikte, 10-1000 hücre/ μ l olarak bildirilmiştir (32,78,95). Sıvı dinamiklerinin bir sonucu olarak, idrar, solunum ve gastrointestinal sistemde bulunan fetal hücreler amnion sıvısına dökülür (32,31,37,65). Fetüsün dolaşım sistemine geçen amniotik sıvı, plasentada atık maddelerden arındırılır. Fetüsün dolaşımında kalan fazla su ise fetal böbreklerden idrar olarak tekrar amniotik sıvıya verilir.

Genetik hastalıkların doğum öncesi tanısında (prenatal tanı) uzun yıllardır rutin olarak kullanılan amniotik sıvı hücrelerinin orijini ve özellikleri ile ilgili çok az şey bilinmektedir (95,8,31,120,121).

Amniotik sıvıdaki hücrelerin, gestasyon yaşı ve fetal patolojilerle ilişkili olarak morfolojik değişiklikler gösterdiği bildirilmekte (95,90,91,78,32,33,37) ve kültür koşullarında özgün morfolojik özellikler taşıdıkları raporlanmaktadır. Kimi son çalışmalar da amniotik hücreleri, kültür koşullarında yapışan ve yapışmayan hücreler olarak 2 ana alt gruba ayırmaktadırlar (95):

1. Rutin olarak kullanılan ve kültür şartları altında yapışan hücreler
 - a. Bölünen ve koloni oluşturan hücre tipleri

- Amniotik sıvı spesifik (AF-Tip)
- Fibroblastik (F –Tip)
- Epiteloid (E- Tip)

b. Yavaş çoğalan ve sınırlı üreme kapasitesine sahip hücre tipleri

2. Rutin olarak kullanılan kültür şartları altında yapışmayan hücreler

Bu hücrelerin sınıflandırılmaları çoğunlukla “morfolojik” kriterlere dayanmaktadır. Biokimyasal verileri hakkındaki bilgiler son derece sınırlıdır.

Morfolojik temelde tanımlanan üç hücre tipinin kökenleri hakkındaki bilgilerimiz de oldukça sınırlıdır. E-tipi hücrelerin, fetal deri ve ürogenital sistemden, AF-tipinin fetal membranlar ve trofoblastlardan, F-tipi hücrelerin ise fibröz bağ dokusu ve dermal fibroblastlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. AF-tip hücrelerin östrojen, insan koryonik gonodotropin ve progesteron üretmesi nedeniyle bu hücrelerin plasental trofoblastlardan (88,32,94), kültür işleminin geç evrelerinde ortaya çıkan FB-tipi hücrelerin ise mezankimal dokulardan kaynaklandığı düşünülmektedir (94,95,121). Her iki tip hücre de, MHC-klas 1 (HLA-ABC) yüzey antijeni eksprese ederken, MHC-klas 2 (HLA-DR) yüzey antijenini eksprese etmezler (95). Bu hücrelerin temel özellikleri Tablo-II’ de gösterilmiştir (94,33,8,37,127,29,31).

Tablo-II: Amniotik sıvıda bulunan hücre tipleri ve temel özellikleri

Hücre tipi Özellik	Epiteloid (E- tip)	Amniotik sıvı (AF- tip)	Fibroblastik (FB- tip)
Kaynak	Squamos/epitelyal Fetal deri, Mesane, Diğer epitel dokuları Epitelyal	Fetal membran ve trofoblast Hücrelerin çoğunluğu Mezankimal ~ %30 u epitelyal	Fibroblast benzeri fibröz konnektif doku, Dermal fibroblast Mezankimal
Oran	20%	70% fazla	10% az
Morfoloji	Oldukça sıkı bağlantılı küçük koloniler	Sıkı bağlantılı olmayan geniş yerleşimli hücreler	Birbirlerine paralel iğsi hücreler
Klon etkinliği	Zayıf	Orta	Fazla
Mitoz	Nadir	Orta	Yüksek
“Doubling time”*	Düşük	Orta	Yüksek
Tripsinizasyon	Dirençli	Orta	Kolay
Çok çekirdekli	Bazen	Orta	Nadir
HCG üretimi	Negatif	Pozitif	Negatif
Kollajen üretimi	Negatif	Tip 4	Tip1-3
Kollajen lifleri	Yok	Yok	Tip1 lifler
Bazal membran glikoprotein	Yok	Epitelyal bazal membran komponenti	Yok
Fibronektin	Negatif	Pozitif	Pozitif
Dezmosom kompleksi	Hücre-hücre kontaktı	Yok	Yok
Keratin	Pozitif	Pozitif	Negatif
Vimentin	Negatif	Pozitif	Pozitif

*Doubling time: hücre sayısının iki katına çıkması için geçen süre, hücre ikilenme zamanı, belirli bir zamandaki hücre proliferasyon hızı.

Amniotik sıvı ektodermal, endodermal ve mezodermal germ tabakalarından kaynaklanan embriyonik/fetal hücreleri içeren (47,49,96,97,32) heterojen bir hücre popülasyonuna sahiptir (31,95,78); hem insan amniotik epitelyal hücrelerinin, hem de trofoblastların, amniotik hücre spektrumunun bir parçasını oluşturduğu öne sürülmektedir (32,78,95).

Amniotik sıvı hücreleri çok uzun yıllardır genetik hastalıkların prenatal tanısı için rutin olarak kullanılan hücrelerdir.

2.3. Amniosentez ve prenatal tanı (PNT)

İkinci trimester genetik amniosentez, genetik hastalıkların spesifik tanıların konulabilmesi için sıklıkla uygulanmakta olan bilinen en eski prenatal tanı yöntemidir. Amniosentez sonucu elde edilen amniotik sıvı kökenli hücrelerden, fetal karyotip tayini, gen mutasyon analizi (DNA) ni gerçekleştirmek ya da enzimlerin incelenebilmesi olanaklıdır (119).

Amniosentez, gebeliğin yaklaşık 15-16. haftasında, transabdominal yolla, ultrasonografi eşliğinde, amniotik kesedeki sıvıdan 15-20 ml' lik örnek alınarak yapılır. Yaklaşık 1-3 hafta süren hücre kültürleri ve genetik analizler sonunda, ailelere “genetik hastalık riski artmış fetüs’ ler hakkında bilgi verilir (119).

İkinci trimester genetik amniosentez işlemi invaziv bir girişimdir ve % 0.5-% 1.0 lik bir fetal kayıp riski bulunmaktadır. PNT endikasyonları arasında, anne yaşının 35 ve üzerinde olması, önceden de novo kromozom anomalili çocuk varlığı, kromozomal değişiklikler açısından taşıyıcı olan aileler, fetal ultrasonografide anomali saptanması, maternal serumda tarama testlerinin yüksek risk belirlediği gebelikler, aile hikayesinde, DNA analiz yöntemleri ile tanı konabilecek tek gen hastalığı varlığı, özgün durumda fetal seks tayini, önceki gebeliklerde nedeni açıklanamayan düşükler ve ölü doğumlar, önceki çocuklarında zihinsel ya da bedensel problem bulunması, nöral tüp defekti ve anksiyete bulunmaktadır (119).

2. 4. Kök Hücreler

2. 4. 1. Kök hücre tanımı ve kriterleri:

Kök hücreler, kendilerini sürekli yenileyebilen ve farklı hücre tiplerine dönüşebilen hücrelerdir (26). Kök hücrelerin önceden belirlenmiş fonksiyonları yoktur; genlerden ve dış uyarılardan aldıkları kimyasal sinyallere göre mesodermal, ektodermal veya endodermal kaynaklı hücre tiplerine dönüşebilmekte (124) ve herhangi bir hücrede ölüm ya da hasar meydana geldiğinde hangi hücreye ihtiyaç varsa o hücreye farklılaşmaktadırlar (26).

Simetrik ya da asimetrik bölünerek kendilerini yenilerler. Simetrik bölünürken, tüm kök hücre karakteristiğini taşıyan kardeş iki hücre oluştururlar; asimetrik bölünmede ise oluşan bir hücre kök hücre karakteristiğini korurken, diğeri farklılaşma yönünde uyarı alan bir hücre niteliğindedir (124).

2. 4. 2. Plastisite

Kök hücrenin, başka bir doku veya organa ait kök hücre fenotipini kazanabildiği ve bazı durumlarda da mezoderm, ektoderm ve endoderm kökenli hücrelerin birbirlerine dönüşebildiği düşünülmektedir; bu duruma “kök hücre plastisite” si denir. Plastisite, farklı konumlarda gerçekleşebilir (26):

1. Dediferansiasyon: Bir seriye ait matür bir hücrenin daha immatür bir hücreye farklılaşması.
2. Transdeterminasyon: Kök hücrenin farklı bir dokuya ait kök hücreye farklılaşması.
3. Transdiferansiasyon: Farklılaşmış bir hücrenin başka bir dokuya ait hücre fenotipini kazanması.
4. Hücre füzyonu: Hücrelerin diğer hücrelerle kaynaşarak iki hücreye ait özellik taşıyan bir hücre oluşturması.

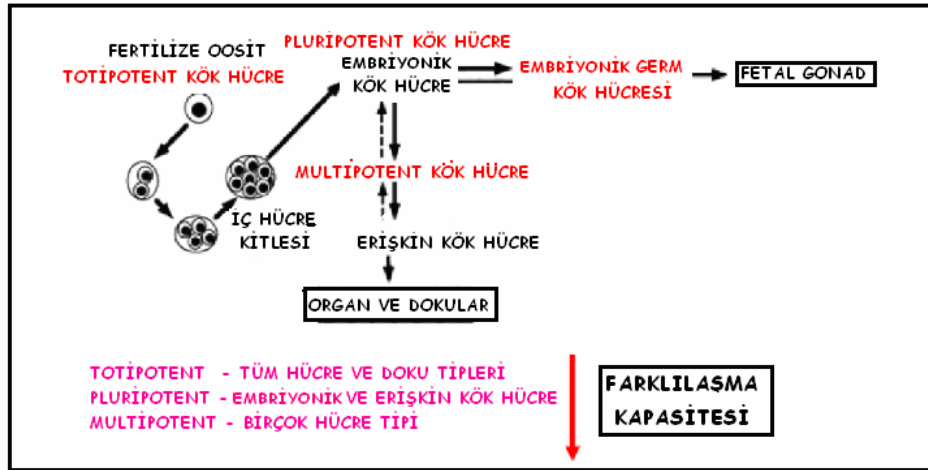
2. 4. 3. Kök hücre sınıflandırılması

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılırlar (26) (Şekil-7).

“**Totipotent**” kök hücreler, embriyonik gelişimde ilk bölünen hücreler olarak tanımlanmaktadır. Fertilizasyonu takiben ilk 4-5 gün içerisinde, 8 blastomerli morula evresine kadar, blastomerlerin her biri tek başına bir organizmayı meydana getirebilme yeteneğindedir.

“**Pluripotent**” kök hücreler, fertilizasyondan 5 gün sonra oluşan blastokistin, iç hücre kitlesinden (inner cell mass) elde edilen hücreler olarak belirtilmiştir. Bu hücreler, üç germ tabakasına da dönüşebilme yeteneğindedir ancak tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar.

“**Multipotent**” kök hücreler, bu dönemden sonra oluşan hücrelerdir. Daha sınırlı fonksiyonlara sahiptir (26). Sadece tek bir hücreye veya germ yaprağına farklılaşabilir(124).



Şekil-7 : Kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri

Kök hücreler köken aldıkları dokulara göre ise başlıca üç ana grupta tanımlanabilirler :

1. Embriyonik kök hücreler
2. Erişkin tip kök hücreler
 - a. Hematopoetik kök hücre
 - i. Kemik iliği
 - ii. Periferik kan
 - iii. Kordon kanı
 - b. Mezankimal kök hücre
3. Fetüs kaynaklı kök hücreler (Fetal kök hücreler)

2. 4. 3. 1. Embriyonik kök hücreler

2. 4. 3. 1. 1. Embriyonik kök hücre

İnsan embriyonik kök hücre izolasyonu, ilk defa 1998 yılında Dr. J Thomson ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir (118,36). Bu hücreler blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilmişlerdir ve in vitro koşullarda üç germ yaprağına da dönüşebilmektedirler (124,118, 36,26,25,77).

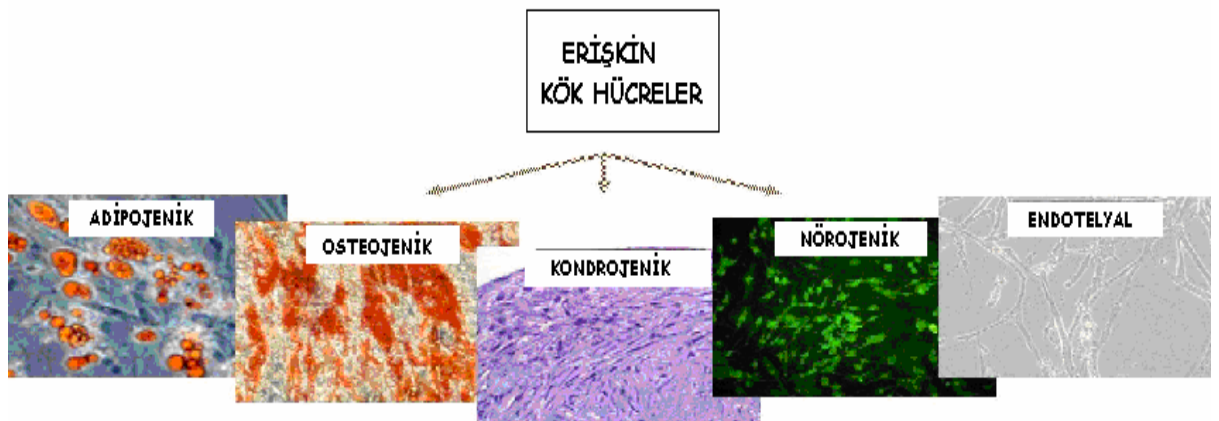
Embriyonik kök hücreler, transkripsiyon faktörlerinden Oct-4, NANOG, rex-1, hücre yüzey belirteçlerinden farede SSEA-1 (Stage Specific Embryonic Antigen), insanda SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 eksprese ederler (77,124,118,36,25); Oct-4 ve NANOG kendini yenileyebilme ve pluripotensi için gerekli olan iki gendir (77). Bir başka dokuya nakledildiklerinde, bu hücrelerin spontan olarak olgunlaştığına ve fonksiyonel olarak farklılaştığına dair çalışmalar mevcuttur (124). Embriyonik kök hücreler ayrıca membran alkale fosfataz ve telomeraz aktivitesine sahiptir (26).

Etik problemler ve teratom oluşturma potansiyelleri, embriyonik kök hücrelerin klinik uygulamalardaki en önemli dezavantajlarıdır (26).

2.4.3.1. 2. Embriyonik germ hücreleri, fetüsün primordial germ hücresinin kültüre edilmesiyle elde edilir. Embriyonik kök hücreler gibi 3 germ yaprağına dönüşebilen pluripotent hücrelerdir ancak teratom oluşturmazlar (26).

2. 4. 3. 2. Erişkin kök hücreler :

Erişkin dokularında bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Organizma yaşadığı sürece kopyalarını üreterek çoğalırlar ve bulundukları dokuda bir hasar olduğunda doku rejenerasyonunu sağlarlar (50). Erişkin kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlıdır, multipotentdirler, tüm hücre tiplerine farklılaşamazlar, bulundukları doku hücreleri dışında sınırlı bir kaç farklı doku hücresine dönüşebilirler (124) (Şekil-8).



Şekil 8 : Erişkin kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri

Erişkin kök hücrelerden en fazla hematopoetik kök hücre (HKH) hakkında çalışma yapılmıştır. HKH, kendini yenileme ve birçok değişik kan hücresine farklılaşma potansiyeline sahiptir. Bu hücreler, bir başka dokuya nakledildikten sonra eksik olan kan hücrelerini fonksiyonel olarak yerine koyar. Kemik iliği nakli, aplastik anemi, talasemi, gaucher ve kanser tedavisi için kemoterapi ve radyoterapi alan hastaların hematopoetik sistemini yenilemek için kullanılır. Erişkin hematopoetik kök hücreleri, kemik iliği, periferik kan ve kordon kanından elde edilmişlerdir (124). İmmünofenotipik olarak, CD14 CD34 ve CD45 pozitif ve CD38 negatiftir (26).

Kemik iliğinden kaynaklanan tanımlanmış diğer pluripotent erişkin kök hücreler (Tablo-III): MAPC (multipotent adult progenitor cells), MIAMI (marrow-isolated adult multilineage), KI-MKH (bone marrow derived multipotent stem cell) olarak sınıflandırılmışlardır (103,124).

MAPC denen pluripotent kök hücre popülasyonu, ilk olarak Verfaillie ve ark., (2001) tarafından tanımlanan, ektodermal, mezodermal ve endodermal seri hücrelerini oluşturabilen ve birbirine dönüşebilme özelliği sayesinde kemik iliği kök hücrelerinden pek çok farklı doku hücreleri oluşturabilen hücrelerdir (102,124). İmmünofenotipik olarak, CD105, CD106' yı, hematopoetik kök hücreden farklı olarak CD34 ve CD45' i, mezankimal kök hücreden farklı olarakta CD44 ve MHC klas-1' i eksprese etmezler ancak SSEA-1, NANOG, Rex1 ve Oct-4' ü eksprese etmesi ile de embriyonik kök hücrelere oldukça benzer özellikler taşırlar. Bu hücrelerin, izolasyonlarının zor olması ve hasarlı dokuda yeterli sayıda elde edilememesi klinik kullanımlarında dezavantaj oluşturmuştur (126,102).

İlk olarak D'Ippolito ve ark., (2004) tarafından tanımlanan MIAMI hücreleri, kemik iliğinden elde edilen indüklenebilir "multilineage", farklılaşmamış hücreler olarak tanımlanır. Bu hücreler, CD29, CD49e, CD63, CD81, CD90, CD122, CD164, hepatosit büyüme faktör reseptörü (cMet), kemik morfogenetik protein reseptör 1B (BMPRII) ve nörotropik tirozin kinaz reseptör 3 (NTRK3)' ü eksprese ederler. CD34, CD36, CD45, CD54, CD56, CD109, CD117 (cKit) ve HLADR negatiftir. Embriyonik kök hücrelere benzer olarak, Oct-4, Rex-1 ve telomeraz eksprese ederler (23,124).

İlk defa kemik iliğindeki stromal hücrelerden elde edilen **mezankimal kök hücreler (MKH)** ise fibroblast-benzeri hücreler olup kemik iliğinde yer alan HKH' lerden farklı bir grup hücredir. Kemik iliğinde homeostazisi, hematopoetik ve non-

hematopoetik hücreler arasında dengeyi sağlarlar (7). Oct4' ü eksprese etmezler (124,103).

Tablo-III: Kemik iliğinden kaynaklanan pluripotent erişkin kök hücrelerin karakteristik özellikleri

HÜCRE TİPİ	Yüzey belirteçleri			Embriyonik kök hücre transkripsiyon faktörleri	Telomeraz aktivitesi
	Negatif	Düşük pozitif	Pozitif		
MAPC	CD10, CD31, CD34, CD45, CD106, CD117, CD36, CD38, CD50, CD62E, HLA-DR, HLA-ABC	CD44, CD90w, KDR, Flt1	CD13, CD49b	Bilinmiyor	Pozitif
MIAMI	CD34, CD36, CD45, CD54, CD56, CD109, CD117, HLA-DR	KDR, Flt1	CD10, CD29, CD44, CD49e, CD63, CD81, CD90, CD103, CD122, CD164, c-met	Oct-4, Rex-1	Pozitif
KİMKH	CD11b, CD13, CD14, CD31, CD34, CD45, CD56, CD133, CD144, HLA-DR		CD29, CD44, CD49a, CD49e, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271, HLA-ABC, Stro-1	Oct-4 Negatif	Pozitif

MAPC (multipotent adult progenitor cells), MIAMI (marrow-isolated adult multilineage), KI-MKH (bone marrow derived multipotent stem cell), CD ["Cluster of Differentiation" (Farklılaşma kümeleri)]

Mezankimal kök hücreler (MKH), kendini yenileme kapasitesine sahip olan ve spesifik biyolojik uyarıların etkisiyle öncülerinden farklı hücrelere, osteosit, adiposit, kondrosit, myosit, kardiomyosit ve nöronlar gibi birçok hücre tipine farklılaşabilen

multipotent hücrelerdir (4,93,125,7,106,121,59,50,89,79,92,12,9,39,40). MKH' ler, halen başta kemik iliği olmak üzere, kemik dokusu, kas dokusu, yağ dokusu, karaciğer, kord kanı gibi vücutta pek çok dokudan elde edilebilmektedir (54,4,50). Dokuya spesifik olmaksızın tüm vücut için rezervuar tamir hücreleridir (93).

Bağ dokusu içeren bütün organlarda MKH bulunmaktadır (125). İlk defa Friedenstein ve ark., (1976) ları tarafından tanımlandığı bildirilmiştir. Friedenstein ve ark., ları plastik kültür kaplarına koydukları fare kemik iliğini uygulamadan 4 saat sonra yıkamış ve kültür kabına yapışmayan hücreleri ayırmışlar, yapışan hücrelerin heterojen bir görünümde olduğunu, kuvvetli yapışan hücrelerin iğsi şekilde 2-4 hücreli odaklar oluşturduğunu ve hızla çoğaldığını görmüşlerdir. Birçok pasajdan sonra, yapışan hücrelerin oldukça homojen ve fibroblastik bir görünüm kazandığını, bunların kemik ve kıkırdak depozitlerine benzediklerinden söz etmişlerdir. Bu hücrelere mezankimal tipte hücrelere farklılaşma sağlandığı için "Mezankimal kök hücre" denmiştir (27,12,13).

MKH' lerin ana kaynağı kemik iliği stromasıdır. Kemik iliğini oluşturan hücrelerin küçük bir kısmını (% 0.01-0.001) oluşturmaktadır (12,124,89). MKH sayısının neonatal dönemde yüksek olduğu, yaşla birlikte sayılarının ve potansiyellerinin azaldığı ileri sürülmektedir. Yenidoğanda yaklaşık 1/10000 hücre olan oranın erişkinde 1/250000 hücreye düştüğü ileri sürülmektedir (10,125,106). Aynı vericiden alındığında bile MKH' lerin kalitesi alındığı dokuya göre değişmektedir (106).

Literatürlerde diğer MKH kaynakları olarak, kordon kanı, periost, trabeküler kemik, adipoz doku, synovium, iskelet kası ve diş etinden söz edilmektedir (54,4); son literatürlerde fetal hücrelerden de MKH elde edildiğinden bahsedilmektedir (bkz. Bölüm, 2. 4. 3. 3: Fetal kök hücreler ve amniotik kök hücreler).

Kemik iliğinden elde edilen MKH sayısı, diğer erişkin dokulardaki mezankimal hücrelerden elde edilenlere oranla daha fazladır (Tablo-IV). Bu nedenle, kemik iliğinin, klinik uygulamalarda kullanılabilecek en uygun MKH kaynağı olabileceğini göstermektedir (106).

Kemik iliği, halen klinikte en yaygın kullanılan erişkin MKH kaynağı olmasına rağmen, ilikte MKH sıklığının göreceli düşük olması, hücrelerin invazif bir işlemle elde edilmesi, kültür sürecinde hücre oranı ve farklılaşma kapasitesinin azalması nedeni ile klinik kullanım olanakları sınırlıdır (79,19,48).

Tablo-IV: Dokulara göre MKH sayısı

DOKU	MİKTAR
Kemik iliği	$9,38 \times 10^3$
Adipoz doku	$2,96 \times 10^3$
Synovium	$2,79 \times 10^3$
Kas	$2,30 \times 10^3$
Periost	$2,06 \times 10^3$

En güçlü kök hücre kaynağı olan **embriyonik KH' ler** ise, embriyonun iç hücre kütesinden alınması nedeni ile etik sorun yaratmaktadır (30) ayrıca vericiye nakledildiklerinde tümör (teratom) oluşturma potansiyelleri, allojenik kullanımlarında immün “red” oluşturmaları ve elde edilmelerindeki teknik problemler de bu hücrelerin de klinik kullanım olanaklarını kısıtlamaktadır (30,124,118).

Bu nedenler insan uygulamalarında kullanılabilir başka kök hücre kaynakları bulma çabaları yaratmıştır (121,95,48,134,97). Fetal mezankimal kök hücreler, bu araştırmalar sonucunda belirlenen kaynaklardır.

2. 4. 3. 3. Fetal kök hücreler ve amniotik kök hücreler

Son literatür verileri, MKH lerin pek çok fetal dokuda da var olduğunu göstermiştir; fetal periferik kanda, kemik iliğinde, karaciğerde, akciğerde, dalakta, plasentada, term umbilikal kordda (9,45,104,121,48,76,134,54) ve amnion sıvısı hücrelerinde MKH ler tanımlanmıştır (25,120,121,124,95,97,8,59,18,49,47,113,112). Amnion sıvısı kaynaklı kök hücrelerin (ASMKH) pek çok doğuştan anomali, kalıtsal ya da ve akkiz hastalık için güçlü bir hücre tedavi kaynağı olabileceğine dair çalışmalar vardır (20,55,56,112,113,87,59,18, 64,120,25,8,97).

Amnion sıvısı (59,49,48) kaynaklı kök hücrelerin, farklı hücre türlerine dönüşüm gücünü tanımlayan çalışmalar mevcuttur ve halen bu hücrelerin etkin kök hücre kaynaklarını temsil edebildiği ileri sürülmektedir (95,8).

Amniotik sıvıda önemli miktarda plastisite ve farklılaşma potansiyeli olan hücreler bulunduğu bildirilmiştir (77). Primer amniosit hücre kültüründen tek hücre düzeyinde amniotik kök hücre klonları üretildiğinde, bu klonal amniotik kök hücrelerin in vitro hızlı bir şekilde ürettiği, uygun kültür şartları altında adiposit ve osteosit gibi

mezodermal hücre tiplerine, nöronal ve glial hücreler gibi ektodermal hücre tiplerine farklılaştığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemler amniotik sıvının multipotent kök hücrelerin bir alt popülasyonunu içerdiğini göstermektedir (120).

Amniotik sıvı hücreleri ve plasentadan kök hücre elde etmek diğer fetal dokulardan kök hücre elde etmekten göreceli olarak daha kolaydır ve bu nedenle kök hücre kaynağı olarak amnion sıvı kaynaklı hücreler, ayrı bir önem taşımaktadırlar (20). Amnion sıvı kaynaklı kök hücreler ve amniotik epitelyal hücreler (AEH), ortak mezankimal hücre tiplerinin (adiposit, osteosit) yanı sıra, nöron benzeri hücrelere de farklılaşabilmektedirler (120,121,59,95,77,8,18).

Amniotik epitelyal hücreler, fertilizasyondan sonra 8. günde epiblasttan oluşan, çift tabakalı amniotik kesenin, direkt amnion sıvısı ile ilişkide bulunduğu iç tabakasındaki hücrelerdir (117,77,75); SSEA3, TRA1-60, TRA1-81 gibi embriyonik kök hücre belirteçleri eksprese ederler; Oct-4 ekspresyonunu sürdürmek için diğer hücre kaynaklı besleyici tabakalar gerektirmemektedirler; tümör oluşturmazlar ve her üç germ yaprağına da [endoderm (karaciğer, pankreas), mesoderm (kardiomyosit) ve ektoderm (nöral hücreler)] dönüşebilme potansiyeline sahip oldukları bildirilmektedir (77). Bu hücreler, HLA-ABC ve HLA-DR' yi eksprese etmediğinden başka bir alıcıya nakledildiklerinde red edilmemektedirler (117,77,75). Bu hücrelerin telomeraz aktivasyonu göstermediği ve kendilerini yenileme potansiyelinin de uzun süreli olmadığı belirtilmiştir (77,93).

Yetişkin kemik iliği, ve ikinci ve üçüncü trimester fetal dokulardan elde edilen MKH' lerin immünofenotipik özelliklerinin birbirine benzer olduğu gözlenmiştir. (CD90, CD105, CD166, CD49e, CD73/SH3, SH4 ve HLA-ABC pozitif, CD31, CD34, CD45, CD49d, CD123, HLA-DR negatif) (47,48,49,18,9,76,134). Ancak, amnion sıvısı kaynaklı MKH' lerin ve plasental MKH' lerin, diğer fetal dokular ve erişkin dokulardan elde edilen MKH' lere göre daha hızlı çoğaldığı belirtilmiştir (47,49,111). Plasental MKH' ler ile amnion sıvısı kaynaklı MKH' ler arasında pek çok benzerlik olması nedeniyle bu iki hücre alt kümesinin aslında aynı olduğunu öne sürülmektedir (25,48).

Fetal kan, karaciğer ve kemik iliği MKH' leri immünofenotipik, morfolojik ve fonksiyonel özellikleri bakımından incelenmiş ve erişkin kemik iliğine benzer özellikler gösterdiklerini belirtilmiştir ancak fetal kemik iliği, adipojenik, osteojenik ve

kondrojenik farklılaşma gösterirken, diğerlerinin adipojenik etkisinin az olduğu belirtilmiştir (9).

Fetal kanda, MKH en fazla 1. trimesterde bulunmaktadır. 2. trimestere doğru sayıları giderek azalmaktadır (% 0.0001) ve kordon kanında da (% 0.00003) daha az miktarda bulunmaktadır. 1. trimester fetal kemik iliği, karaciğer ve kandan elde edilen MKH sayıları karşılaştırıldığında ise en fazla oran sırasıyla fetal kemik iliği, fetal karaciğer ve fetal kan olarak gösterilmiştir (9). 2. trimesterde ise sırasıyla en fazla, fetal kemik iliği, fetal dalak, fetal akciğer ve fetal karaciğer olarak gösterilmiştir (sırasıyla $2,5/10^3$; $1,72/10^3$; $1,39/10^3$; $0,28/10^3$). Hepsinde adipojenik ve osteojenik farklılaşma gösterilirken, fetal dalakta adipojenik, fetal karaciğerde osteojenik farklılaşma kapasitesinin daha az olduğu belirtilmiştir (47,49).

Literatürde, 2. trimester ve term amniotik sıvı hücrelerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, term amniotik sıvıda hücre sayısının fazla olmasına rağmen, canlı hücre oranının az olduğu ve daha az oranda MKH elde edildiği gözlenmiş, aynı durumun plasenta için de geçerli olduğu belirtilmiştir. Bu dokularda, gebelik yaşının ilerlemesine paralel olarak MKH sayısının azaldığı gözlenmiştir (48).

Kemik iliği ve plasenta kaynaklı MKH'lerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, plasantanın hücre "doubling time" ı (ikilenme zamanının) ile kemik iliği "doubling time" ının birbirine benzer olduğu (sırasıyla 21.3 saat ve 22.6 saat) gösterilmiş (134), bir başka çalışmada ise plasenta kaynaklı MKH lerin, erişkin kemik iliği ve term umbilikal kord kanından elde edilen MKH'lerden daha fazla çoğalma kapasitesi olduğu belirtilmiştir (76).

Yapılan çalışmalarla, amniotik sıvıdan elde edilen MKH'lerin telomer uzunluğunun, kordon kanından ve kemik iliğinden elde edilen MKH'lere göre fazla olduğu belirtilmiştir (Tablo- V). Bu bulgu, amniotik sıvıdan elde edilen MKH'lerin, postnatal dokulardan elde edilen MKH'lere göre daha fazla çoğalma kapasitesine (Tablo-VI) sahip olduğunu düşündürmekte (111,120,20,121,1) ve hücre destekli tedavilerde, acil tıbbi yaklaşımlarda, zaman kazandırması açısından önem taşıyabilmektedir (59,121).

Tablo- V : Telomer uzunlukları karşılaştırılması

Doku	Telomer uzunluğunu
Amniotik Sıvı	14,3 kb
Kordon kanı	12 kb
Kemik iliği	10 kb

Tablo-VI : “Doubling time” (ikilenme zamanı)

Doku	Doubling time
Amnion sıvısı	20-24 saat
Kordon kanı	28-30 saat
Kemik iliği	30 saatten fazla
Embriyonik KH	36 saat

MKH ler hipoimmünojenik olarak tanımlanmaktadır (bkz. Bölüm, 2. 6. MKH lerin hipoimmünojenik özelliği ve klinik kullanım alanları). Kimi literatür verilerine göre, HLA doku uyumu gerektirmeden, allojenik bireylerden elde edilen MKH’ ler, umbilikal kord kanı kök hücreleri (58,84,11), periferik kan kök (62) hücreleri ve HKH ile birlikte alıcılara nakledildiğinde, dokuya engraftman artmakta ve “graft versus host disease” (GVHD) büyük ölçüde önlenmektedir (68,69,11,5).

Amniotik sıvı kaynaklı MKH lerin, otolog veya allojenik donörden elde edilen HKH’ lerle birlikte uygulanabilecek faydalı bir MKH kaynağı olabileceğini bildiren yayınlar mevcuttur (79,11,67). Özellikle, kardeşler arasında uygulanan umbilikal kordon kanı nakillerinde fayda gösterebilecekleri belirtilmektedir (49,25,48,84). Kimi çalışmalarda da, amniotik sıvı kaynaklı kök hücrelerin, embriyonik kök hücreler kadar primitif olmadıkları ancak pek çok erişkin kök hücreden daha primitif potansiyel gösterdikleri raporlanmaktadır (20,59).

Amniotik sıvı kaynaklı kök hücrelerin, Oct-4 (POU5F1), Nanog (115), SSEA-3 (insan embriyonik dönem-spesifik belirteci), SSEA-4, Rex-1, TRA-1-60, Runx-1, ABCG2, nestin [embriyonik ve erken postnatal dönemde serebrumda, dermatomal hücrelerde ve myoblastlarda eksprese olmaktadır] gibi embriyonik kök hücre belirteçleri (8,59) ile GATA-4 (GATA-Bağlayıcı Protein 4), FGF-5 (fibroblast büyüme faktörü 5), BMP-4 (Kemik morfogenetik protein 4), desmin, kollagen 2 gibi bir çok geni eksprese

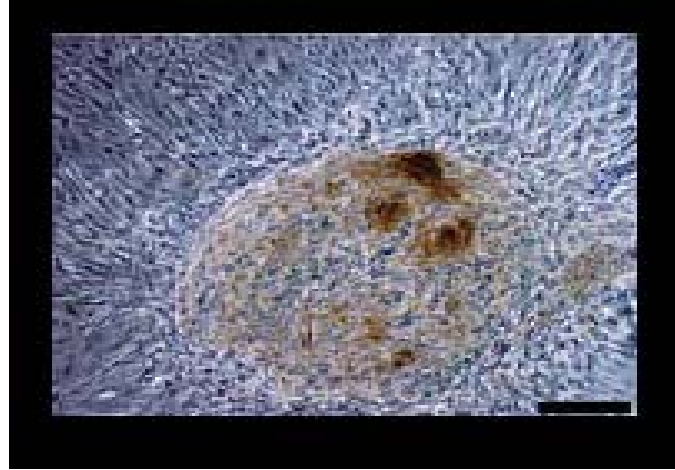
ettiği bildirilmekte ve bu genlerin kemik iliği MKH' lerinde eksprese edilmediğinden söz edilmektedir (59). GATA-4, çinko parmak transkripsiyon faktörü GATA ailesindendir, myokard farklılaşmasından ve fonksiyonundan, FGF-5, nöronal farklılaşma ve devamlılığında, BMP-4, kondrogenezis ve artiküler kıkırdak tamirinden, desmin, kalp ve iskelet kası fonksiyonundan sorumlu olduğu bildirilmektedir.

Kemik iliği MKH' lerinde eksprese edilen HCAM1 ("Homing cell" adezyon molekülü, CD44), ICAM1 ("intercelluler cell" adezyon molekülü, CD54), VCAM1 (vasküler hücre adezyon molekülü, CD106), vWF, a SMA(a smooth muscle actin), kollajen 1, kollajen 3, kollajen 4, fibronektin, vimentin, SCF, CK18 [sitokeratin 18, endodermal KH belirteçidir, hepatik farklılaşmadan sorumlu olduğu bildirilmektedir] gibi belirteçlerin amniotik sıvı hücrelerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu verilerin, amniotik sıvı MKH nin multipotansiyel özelliğini yansıttığı kabul edilmektedir (8,59,108). Amniotik kök hücrelerin, kemik iliği MKH' lerden daha az farklılaşmış oldukları ve çok daha fazla pluripotent embriyonik kök hücreye benzerlik gösterdikleri ileri sürülmektedir (59).

Amniotik sıvı hücrelerinin heterojen kök hücre popülasyonlarını mı yoksa nöral progenitörlerin davranışını gösteren kemik iliği stromal hücrelerine benzeyen primitif kök hücrelerin bir türünü mü içerdiği henüz kesinlik kazanmamıştır. Ancak bu hücrelerin Nanog ve Oct-4' ü eksprese ettiği, nöronal indüksiyondan hem önce hem de sonra NES, TUBB3, NEFH, NEUNA60, GALC, glial fibriler asidik protein (GFAP, proteinin santral sinir sistemine spesifik olan astrositlere has bir izoform) gibi nöronal hücrelere ait belirteçleri eksprese ettiği ve in vitro dopamin salgıladığı gözlenmiştir (120).

Oct-4, POU5F1, adı verilen transkripsiyon faktörü, embriyonel karsinom, totipotent embriyonik KH ve embriyonik germ hücrelerinde eksprese edilen pluripotent bir kök hücre belirteçidir. Oct-4 ün, kök hücrelerin biyolojik özelliklerinin korunmasında rol oynadığı ve farklılaşma sağlandıktan sonra hızla kaybolduğu bildirilmektedir (97,20,59). Amniotik sıvı hücrelerinin, yaklaşık % 0.1-% 0.5 inin Oct-4 ü eksprese ettiği ve c-kit [kök hücre faktörü için reseptör] pozitif olduğu, manyetik mikrokürecikler kullanılarak yapılan immünoseleksiyon ile birçok amniosentez örneğinden izole edilebildiği bildirilmiştir (18, 20). Oct-4 'ü eksprese eden amniotik sıvı

hücrelerinin, kök hücre faktörü (embriyonik, hematopoetik ve mezankimal KH), vimentin (ektodermal, nöronal ve pankreatik KH) ve alkalen fosfataz (embriyonik KH) eksprese ettiği (97), in vitro ortamda “embriyoid body” [insan embriyonik KH leri destek hücrelerinin olmadığı ve LIF içermeyen kültür ortamında “embriyoid body” adı verilen üç boyutlu hücre topluluğuna dönüşür ve bu hücre topluluğu üç germ yaprağına ait farklı hücre tiplerine dönüşebilmektedir (124,115)] benzeri sferoid yapılar oluşturduğu (Şekil-9), her üç germ yaprağı belirteci için pozitif olduğu ve immün yetmezlikli farelere in vivo enjekte edildiğinde teratom oluşturmadığı gözlenmiştir (20). Fenotipik ve genetik olarak stabil, kendini yenileme potansiyeli oldukça fazla olan bu hücrelerin 250 popülasyon “doubling” i olduğunda bile telomer uzunluğunun korunduğu ve telomeraz aktivitesinin bulunduğu belirtilmiştir (20,8,18).



Şekil-9 : Amniotik epitel hücre kültüründen elde edilen “Embriyoid Body” benzeri “sferoid” yapı [Miki ve ark., (2005)]

Telomeraz, replikasyon problemlerinin üstesinden gelmek için kromozom uçlarına telomer tekrarları ekleyen bir enzimdir. Telomeraz aktivitesi, insan pluripotent kök hücrelerinde, germ hücrelerinde ve tümör örnekleri gibi ölümsüz hücre dizinlerinde (cell line) görülmektedir (59). Amniotik sıvı hücreleri, ölümsüz hücre dizinlerini veya tümör hücrelerini içermez ancak kimi çalışmalarda hem kültüre edilmiş hem de kültüre edilmemiş amniotik sıvı hücrelerinde, gestasyonun 14. haftasında telomeraz aktivitesi olduğu gösterilmiştir (81).

Son yayınlar, tanımlanan biyolojik ve genetik özellikleri nedeni ile (Tablo-VII,VIII), amniotik sıvı kökenli MKH lerini, hücre tedavi yaklaşımlarında belirli avantajlara sahip güçlü aday hücreler olarak tanımlamaktadırlar (8,59,18,20,25,34,120,121,47,48,49,55,56, 60,64,87,92,95,96,97,108,111,112,113).

Tablo-VII: Amniotik sıvı kökenli MKH lerin özellikleri

Hücre tipi Özellik	AS MKH	Embriyonik KH	Erişkin MKH
Primitif KH içeriği (120)	+	++	-
Telomer uzunluğu (120)	++	+++	+
Fetal doku mühendisliğinde kullanımı (55,56)	+	-	-
Elde edilme şekli	Minimal invaziv girişim	Embriyo	Major invaziv girişim
Doubling time (hücre ikilenme zamanı) (120,1,20)	20-24 saat	~36 saat	Kordon kanı 28-30 saat Kemik iliği 30 saatten fazla
KH belirteçleri (59)	Primitif/Erişkin	Primitif	Erişkin
Tümör oluşumu (111)	-	+	-
Allojenik ve otolog kullanım	+/+	+/-	+/+
Oct-4 (97)	+	+	-
Telomeraz aktivitesi (81)	+	+	+
Hipoimmünojenik özellik(111)	+	-	+
Diğer KH ile kullanımı (84,49)	+	-	+

Kök hücre (KH), Amnion sıvısı kaynaklı mezankimal kök hücreler (AS MKH), Mezankimal kök hücreler (MKH)

Tablo-VIII: Amniotik sıvı kökenli MKH lerin Avantajları

Özellik	AS MKH Avantajları
Primitif KH içeriği (120)	Amniotik sıvı, çeşitli KH' lerin bir havuzunu içerdiğinden farklılaşma kapasitesi fazladır.
Telomer uzunluğu (120)	AS MKH' leri postnatal KH' lerinden daha fazla çoğalma kapasitesine sahiptir
Fetal doku mühendisliğinde kullanımı (55,56)	Poliglikolik asit polimerlere sağlam yapıştığından fetal doku mühendisliği için güvenilir ve pratik kaynaktır. Hücre nakillerinde etkili doku onarımını gerçekleştirebilir; intrauterin otolog fetal gen tedavisi ve hücresel tedavi zemini sağlar.
Elde edilme şekli	Amniotik sıvı, kolaylıkla ulaşılabilir bir kaynaktır.
Doubling time (120,1,20) (hücre ikilenme zamanı)	"Doubling time" erişkin dokulardan daha az olduğundan daha kısa sürede daha fazla hücre elde etme bakımından daha yüksek bir potansiyele sahiptir
KH belirteçleri (59)	AS MKH'ler, embriyonik ve erişkin kök hücrelerine ait belirteçler eksprese ederler
Tümör oluşumu (111)	AS MKH' lerin 3 aylık izlemde in vivo ve in vitro tümör oluşturmadıkları belirtilmektedir.
Allojenik ve otolog kullanım	AS MKH' leri, allojenik ve otolog kullanılabilirler.
Oct-4 (97)	AS MKH'lerin pluripotensi ve kendini yenileme kapasitesi vardır.
Telomeraz aktivitesi (81)	AS MKH'lerin pluripotensi ve kendini yenileme kapasitesi vardır.
Hipoimmünojenik özellik (111)	Amniotik sıvı hücreleri, T hücre proliferasyonunu inhibe ederek immünsupressif etki gösterirler
Diğer KH ile kullanımı (84)	AS MKH' ler, HKH, periferik kan veya kordon kanı kök hücresi ile birlikte kullanıldığında bu hücrelerin engraftmanını artırır ve GVHD riskini azaltır.

Kök hücre (KH), Amnion sıvısı kaynaklı mezankimal kök hücreler (AS MKH), Mezankimal kök hücreler (MKH)

Hematopoetik kök hücre (HKH), "Graft Versus Host Disease" (GVHD)

2. 5. MKH'nin Biyolojik ve Fonksiyonel Tanımlanması:

2. 5. 1. İmmüfenotipleme: İmmüfenotipleme, hücrelerin yüzeyinde veya hücre içindeki antijenik yapıda olan proteinlerin, floresein izotiyosiyanat (FITC) ve fikoeritrin (PE) gibi floresan boyalarla (florokrom) işaretlenmiş özgün monoklonal antikorlarla inkübe edilerek bu antikorlara bağlanması esasına dayanır. Taşıdıkları antijenik yapının özelliğine göre farklı florokromlarla işaretlenen hücreler akım sitometrisinde bir basınç altında akarken lazer ışınlarına maruz kalırlar. Hücrelerin üzerine bağlanan floresanla konjuge edilmiş monoklonal antikorlar, lazer ışınıni absorbe ederek, üzerindeki florokromun özelliğine göre farklı dalga boylarında ışın saçarlar. Her hücreden saçılan ışınlar, çoklu dedektörler yardımı ile belirlenir ve elektrik enerjisine çevrilen bilgiler, bilgisayar ortamına aktarılarak analiz edilir (21).

2. 5. 1. 1. Mezankimal Kök Hücrelerde Eksprese Olan Antijenik Belirteçler: MKH, heterojen bir hücre topluluğudur. Bu hücreler birçok yüzey antijen belirteci eksprese ederler; morfolojik, immüfenotipik, fonksiyonel özellikleri birbirine benzemektedir (7), fakat hiçbirisi MKH' lere spesifik değildir (12,7).

Literatürde, MKH lerin hematopoetik belirteçlerden, CD11b, CD14, CD34, CD45, CD38 (7,4,12,89,92,124), endotelial belirteçlerden, CD34, CD31 (adezyon molekülü, platelet/endotelial hücre adezyonu molekülü), vWF (89), CD133, CD33 (7), CD80, CD86, CD40, CD18 (lökosit fonksiyon ilişkili antijen1), CD56 (nöronal hücre adezyon molekülü) (12) ve MHC-Klas 2 'yi (4,12) eksprese etmediğini (8,25,7,121,50,89,92,12,134), buna karşın Stro-1, SB10/CD166/ALCAM, CD105/SH2, CD106, CD73/SH3-4, $\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, αv , $\beta 2$, $\beta 4$, MHC-klas 1 (4), CD44, CD90/thy-1, CD71, CD106 (VCAM1), ICAM1 (12,124), CD13, CD54, CD63, CD140b (50), CD49e, CD117 , sca1, CD120, CD124 ve CD29'u eksprese ettiği öne sürülmüştür (12,124,50,7,125).

Birçok çalışmada, amniotik sıvı mezankimal kök hücrelerinin, CD11, CD14, CD34, CD38, CD40, CD80, CD86, CD45 ve HLA-DR negatif, SH2, SH3, CD29, CD44, CD49e, CD71, CD106, CD120a, CD124, CD73, CD90, CD105, CD166, Stro-1 ve HLA-ABC pozitif oldukları gösterilmiştir (50,7,12,89,125) (Tablo-IX).

İkinci trimester amniotik sıvı kök hücrelerinden kaynaklanan MKH' lerin immünofenotipik özellikleri farklı çalışmalar temel alınarak, tablo-IX ve tablo-X da ayrıntılı olarak gösterilmiştir (49,97,18,8,64,108,59,43).

Tablo-IX: Amniotik sıvı kök hücrelerinde eksprese edilen belirteçlerin literatür karşılaştırmaları:

CD	Bulunduğu yer /hücre/doku	Sinonimleri	In 't Anker 2003	Prusa 2003	Tsai 2004	De copp 2007	Bossolasco 2006	Kunisaki 2007	Sartore 2005	Kim 2007
CD90	Mezankimal KH	Thy1	+		+	+		+	+	
CD105	Mezankimal KH	Endoglin, SH2	+		+	+		+	+	
CD73	Mezankimal KH	SH3, SH4	+		+	+	+	+		
CD166	Mezankimal KH	Sb10/ALCAM	+							
HLA ABC	HLA		+		+	+		+		+
HLA DR	HLA		-		-	-				
CD49d	İntegrin	VLA4	-							
CD49e	İntegrin	VLA5	+							
CD11a	İntegrin	LFA1	-							
CD62p	Selektin	P-selektin	-							
CD62e	Selektin	E-selektin	-							
CD62l	Selektin	L-selektin	-							
CD45	Hematopoetik KH	LCA	-			-	-	-	-	
CD34	Hematopoetik KH	GP105-120	-		-	-	-	-	-	
CD14	Hematopoetik KH	LPS-R	-		-			-		
CD58	İmmünglobulin	LFA3	±							
CD54	İmmünglobulin	ICAM1	+							+
CD50	İmmünglobulin	ICAM3	-							
CD106	İmmünglobulin	VCAM Migrasyon	-							+
CD80	İmmünglobulin	B7.1	-							
CD86	İmmünglobulin	B7.2	-							
CD25	Sitokin	IL2	-							
CD123	Sitokin	IL3	±							
CD127	Sitokin	IL7	-							
CD120a	Sitokin	TNFa	-							
CD120b	Sitokin	TNFb	-							
CD71	Diğer Ag	Transferrin reseptör	±					+		
CD44	Adezyon molekülü	HCAM1	+		+	+	+	+		+
CD117	c-kit	Kök hücre Faktörü			-				-	
CD40	Diğer Ag		-							
CD29	İntegrin	B1-integrin				+		+		
CD8								-		

CD56		NCAM						-		
CD31	İmmünglobulin	PECAM						-	+	+
CD19								-		
CD13		APN						+		
CD10		CALLA			-			+		
SCA 1	Kök hücre faktörü								-	
SSEA4	Embriyonik KH					+			+	
OCT4	Embriyonik KH	POU5A		+	+	+	+		+	+
Vimentin	Kas hücresi								+	+
Desmin	Kas hücresi						-		-	+
SMA-SM22	Kas hücresi								+	+
VWF	Endotelial hücre								+	+
MyoD Myf-5 MRF4 Myogenin	Kas hücresi						-			
Nestin	Nöronal hücre						+			+
Rex1 Runx1	Embriyonik KH						+			+
CK8-CK18	Endodermal hücre									+
FGF5	Embriyonik kıkırdak hücresi									+
Scf GATA4	Kalp kası Hücresi									+

Kök hücre (KH), “Homing cell adhesion molecule” (HCAM), “Aktivated Leukocyte adhesion molecule” (ALCAM), “Neuronal cell adhesion molecule” (NCAM), “Platelet endothelial cell adhesion molecule” (PECAM), “Very late antigen” (VLA), İnterlökin (IL), Tümör nekrozis faktör (TNF), “Aminopeptidase N” (APN), “İntercellular cell adhesion molecule” (ICAM), “Vascular cell adhesion molecule” (VCAM), “Leukocyte function antigen” (LFA), “Leukocyte common antigen” (LCA), Glikoprotein (GP), Endotoksin lipoprotein reseptörü (LPS-R).

Tablo-X : İkinci trimester amniotik sıvı kök hücrelerinden kaynaklanan MKH’lerin hücre yüzey antijenlerinin immünofenotipik özellikleri

CD no	Sinonimleri ve fonksiyonları	Bulunduğu yer/doku/hücre/işlev	EKSPRESYON
CD14 (53-55kD)	Endotoksin Lipoprotein reseptörü	HKH	-
CD34 (105-120 kD)	GP105-120 Transmembran proteini (L selektin ligandı, adezyon)	HKH, Endotelial KH	-
CD45 (180-240kD)	LCA (Leukocyte common antigen)	HKH	-
HLA-DR	HLA	MHC-klas 2	-
CD90 (25-35kD)	Thy-1 Ig ailesi (IgSF)	MKH	+
CD73 (69 kD)	SH3, SH4 ekto-5'-nukleotidaz	MKH	+
CD166 (105kD)	SB10/ALCAM ("Aktivated Leukocyte adhesion molecule") Immunoglobulin	MKH, Hücre adezyon Molekülü	+
CD49e (25kD)	VLA-5 Fibronektin reseptörü	a5 İntegrin	+
CD44 (80-95kD)	HCAM-1 ("homing cell adhesion molecule") (hyalüronik asit bağlayıcı) yüzey proteoglikan ailesi Migrasyon, homing, adezyon	Hücre adezyon Molekülü	+
CD29 (130kD)	İntegrin B1 (transmembran glikoprotein) Adezyon molekülü ailesi(VLA) B1 zinciri Migrasyon, embriyogenezis	İntegrin Hücre adezyon Molekülü	+
HLA-ABC	Antijen sunan hücre	MHC-klas 1	+

Hematopoetik kök hücre (HKH), kilodalton (kD)

2. 5. 2. Kök Hücre Rezervuarları (NICHE)

Farklılaşmamış multipotent MKH’lerin, yeri ve özellikleri hakkında bilinenler azdır. Bu hücreler birçok dokuda, kök hücre rezervuarlarında (niche) bulunabilir. Travma, hastalık veya yaşlanma durumunda sessiz kalmış kök hücreler, kendini

yenileyerek ve farklılaşarak etki gösterirler (7,89). MKH' lerin farklılaşma kararı veya rezervuarda sessiz kalması, Wnt gen ailesi tarafından düzenlenir. Wnt sinyalinin, yüksek seviyelerde Oct-4, Rex-1 ve homeodomain transkripsiyon faktör olarak bilinen Nanog salınımı ile farklılaşmayı engellediği bilinmektedir. Wnt- ve Dkk1- (dickkopf-1) ilişkili sinyaller, Notch, Hedgehog ve BMP- yolları, kök hücrelerin çoğalmalarında ve farklılaşmalarında rol oynayan başlıca yollar olarak bildirilmektedir. Uyarı aldıklarında, kök hücre, rezervuarından ayrılır ve dolaşıma geçerek spesifik mikroçevrede bir başka hasarlı alana doğru (homing) çekilir. MKH' lerin "homing" özelliği kemokin reseptörleri sayesinde olur (bkz. Bölüm, 2.5.5. kemokin ve kemokin reseptörleri). Kemokin reseptörleri kök hücrelerinin migrasyonunda rol oynarlar (7).

2. 5. 3. MKH' lerin kültür koşullarında büyüme ve çoğalması

MKH' ler kültür kaplarında ve özgün besiyerlerinde çoğaltılırlar. Kültür işleminin ilk haftasında kültüre yapışan hücreler fibroblastik bir görünüm alır ve koloniler halinde hızla proliferer olurlar (110). Colter ve ark., (2001) nın çalışmasında, MKH' lerin, in vitro büyüme ve gelişmesi üç farklı fazda incelenir. Lag fazı, kültür işleminin başında ilk 3-4 günlük dönemi içerir, sonra hızlı hücre bölünmesinin görüldüğü log fazı gelir ve en son hücre sayısında artış olmadığı ve hızlı üremenin durduğu evre olan durağan faz gözlenir (17).

Dkk-1 ve Wnt5a genleri MKH' lerin büyüme ve çoğalmasından sorumludur. Araştırmacılar, Dkk-1 ve Wnt-5a genlerinin birbirlerinden farklı yönde görev yaptığını, Dkk-1 in en fazla log fazında eksprese olduğunu ve Wnt5a ekspresyonunun log fazında inhibe olurken durağan fazda en fazla olduğunu bildirmişlerdir (7,125).

Literatürlerde, MKH lerin in vitro çoğalması ve büyümesinin, birçok büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Koloni şekillendirici birimin (CFU-F), MKH lerin vitro çoğalmasını ve büyümesini sağladığı, plateletten kaynaklanan büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) nin CFU-F için mitojen olduğu, büyüme ve çoğalmayı inhibe ettiği bildirilmiştir (7). Epidermal büyüme faktörü (EGF) de, MKH proliferasyonunu artırırken interferon-alfa ve interlökin 4 ise proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (7).

KH' lerin farklılaşmadan çoğalabilmesinde rol oynayan birçok yolk tanımlanmıştır. Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) ve onun

reseptörü HER-1 (HB-EGF/HER-1) in, MKH lerin sayıca çoğalmalarını arttırırken, bu hücrelerin farklılaşmalarını önlemektedir (7). Fibroblast büyüme faktörü (FGF)-2, kendilerini yenilemeden sorumlu olan büyüme faktörlerindendir (125). FGF, Wnt ve TGF β yolakları farklılaşmamış kök hücrelerde aktiftir (124). TGF β /aktivin/nodal yolağı ile BMP/GDF yolağı birbirlerine zıt etki etmektedir. TGF β yolakları farklılaşmamış kök hücrelerde aktifken, BMP/GDF yolağı farklılaşmış kök hücrelerde aktiftir, FGF in düşük konsantrasyonları, Wnt/ β -katenin yolağını uyarır, GSK-3B (glikojen sentaz kinaz3) inhibe olur (124). Wnt, ilişkili genlerin transkripsiyonunu başlatır, B-kadhenin, Notch1 ve HoxB4 gibi genleri aktive ederek kök hücrelerin farklılaşmadan kendini yenilemelerini sağlamaktadır (125). Dkk-1, Wnt ile ters etkilidir, β -kadhenin konsantrasyonunu azaltır (125).

MKH ler in vivo uygulandığında hasarlı organa yerleşebilmektedir (121,49). Travma ve enflamasyon durumunda, travma sahasına gidip gelmelerini sağlayan (trafficking), hücre adezyonunu gerçekleştiren ve infiltrasyonda rol alan spesifik reseptörler ve ligandlar eksprese etmektedirler. İnflamasyonda, lökositlerin göçü için kemokin reseptörleri ve kemokin ligandlarının önemli yeri vardır. MKH' lerin, endotelden lökositlerin göçüne neden olan bazı adezyon moleküllerini de eksprese ettiği bildirilmiştir (12).

2. 5. 4. Adezyon molekülleri

Hücre-hücre etkileşimleri, hücrelerin yapı ve fonksiyonlarını korumada gereklidir. Hücre-hücre etkileşimi, hücre adezyon molekülleri aracılığı ile gerçekleşir. Adezyon molekülleri, başlıca, immünoglobulin ailesi (adezyon), “cadherin” ailesi (Ca⁺² bağımlı transmembran interselüler adezyon proteinleri), integrin ailesi (hücre ile ekstraselüler çevre arasında bütünlüğü sağlar), selektin ailesi (inflamasyonda sinyal ileti yolağında görevli), yüzey proteoglikan ailesi (migrasyon, “homing” ve adezyonda görevli), sialomusin aileleri (anti adezyon molekülleridir) olmak üzere, altı grupta incelenir. Başlıca görevleri, hücre sinyal iletimidir. Hücrelerin dokulara migrasyonunda, hücre büyümesi, farklılaşması, embriyogenezis ve inflamasyonda görev alırlar (12,22).

Selektinler, lökositlerin endotele yapışarak yuvarlanmasını sağlar. E, L, P selektin olmak üzere üçe ayrılırlar. L-selektin eksikliğinde, lenfositler lenf nodüllerine yerleşemez. P-selektin eksikliğinde lökositler kan damarları üzerinde yuvarlanma

yeteneğini yitirirken, inflamasyon alanına ulaşabilirler, E-selektin eksikliği çok önemli olmasa da, E- ve P-selektinin inflamasyon alanındaki mobilitesini engeller. Farklı selektinler, inflamasyonun farklı zamanlarında rol alması nedeniyle önemlidir (12).

İntegrinler, heterodimer yapıda transmembran proteinlerdir. Birbirlerine non-kovalent bağlı alfa (α) ve beta (B) alt üniteleri vardır. Molekölün aktivitesi için her iki alt ünite de gereklidir. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , B1, B3, B4, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3, ALCAM ve endoglin/CD105 MKH üzerinde eksprese olabilirler. B1 integrinlere “Very Late Activation (VLA)”, VLA-4, ($\alpha 4$ B1, CD49d) adı verilir. B1 integrinler, lökositlerin endotel hücrelerine ve hücre-dışı dokuya bağlanmasında görev alırlar. P-selektin, VCAM-1, lökosit adezyonunda rol alır ve MKH’ lerinin endotele adezyonunu sağlarlar. PECAM-1/CD31, lokositlerin endotelden transmigrasyonu sağlar MKH’ lerde tanımlanmamıştır (12).

2. 5. 5. Kemokin ve kemokin reseptörleri

Kemokinler (kemotaktik sitokinler) biyolojik ve patolojik süreçte düzenleyici görevleri olan, 8–10 kDa moleküler ağırlığında küçük glikoproteindir. Kemokinler, inflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve kök hücrelere göç yaptıran sitokinlerdir. Kemokinler, lökosit-endotel hücre ilişkilerinde, T ve B hücre olgunlaşmasında ve iletişimde, immün sistemin denetiminde ve primer immün cevabın oluşmasında görevli, heparin bağlayan proteinlerdir. Lökositlerin hasarlı doku sahasına gidip gelmesini (trafficking), hematopoezis, angiogenezis ve organogenezi sağlarlar. Kemokinlerin, uygun reseptöre bağlanması sonucunda sinyal iletimi ile uyarılan hücreler, doku zedelenmesi, inflamasyon veya göç (kemotaksi) yapmak üzere harekete geçerler (12).

Kemokin reseptörleri, G-protein-bağımlı, hücre-içi sinyal ileten, yapılarında 7-transmembran domainleri bulunduran proteinlerdir. Hedef hücrelerdeki özellikli G-protein-bağımlı hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar ve hücre-içi sinyali başlatıp hücre göçü ile aktivasyonu sağlarlar (12).

Kemokinler, yapılarında bulunan sistein (cystein) rezidülerinin bulunduğu molekölün N-terminal ucundaki yerleşim pozisyonlarına göre 4 gruba ayrılmaktadırlar (Cys1-Cys3 ve Cys2-Cys4). Alpha (α) ve beta (B) kemokinler, yapılarında 4 sistein bulunduran en büyük grubu oluşturmaktadırlar (12).

2.5.6. Farklılaşma

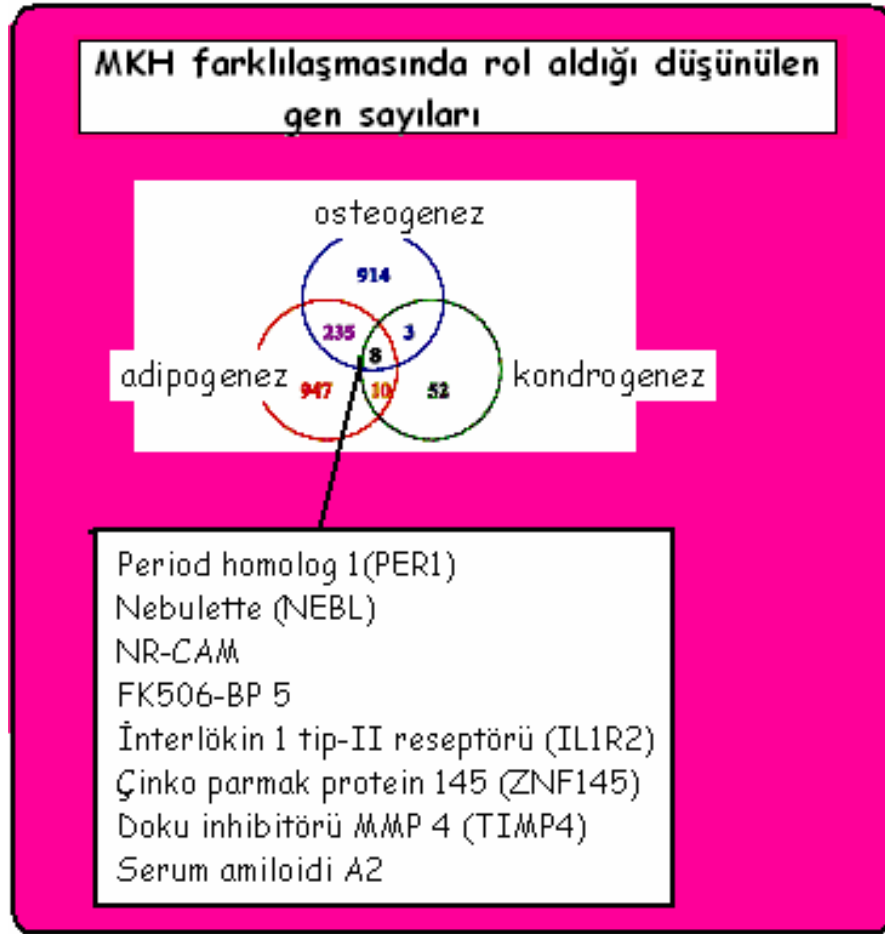
MKH' ler, in vitro osteosit, kondrosit, adiposit gibi mezodermal hücre tiplerine (9,47,114,24,106,46,89,57) farklılaşabildiği gibi, yeni çalışmalarla gösterildiği üzere, endotel, myosit, hepatosit (20), tenosit ve nöronal hücrelere de (94,55) farklılaşabilirler.

Amniotik sıvıdan kaynaklanan kök hücrelerinin de in vitro adipojenik, osteojenik, nörojenik (121,8,25,49,111,96,120), kondrojenik (59,60), endotelyal, hepatik, myojenik (20,18) farklılaşma potansiyellerinin olduğu gösterilmiştir.

Literatür bilgilerine göre, rutin hücre kültürü uygulanan ve normal hücre besiyerleri (chang medium) ile çoğalmaları sağlanan primer amniotik sıvı hücre kültürleri, kültür işleminin sonunda % 20 fetal dana serumu ve bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) içeren “ α -modified minimum essential medium” (α -MEM) la (121) işleme tabi tutulduğunda, 37° C' de, % 5 CO₂ 'li ve nemli ortamdaki kültür kabında tek tabakalı üreme gösterirler (50) ve amniotik mezankimal kök hücreler elde edilir (121).

In vitro koşullarda, MKH kültürlerinde her bir özelleşmiş farklılaşma sürecinin gelişimini sürdürebilmesi için birçok transkripsiyon faktörü, sitokin, büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks molekülleri gibi otokrin ve parakrin faktörler gereklidir (89,2)

Farklılaşmadan sorumlu genlere ait 39 bin transkript incelenmiş, bunlardan, 914 genin osteojenik, 947 genin adipojenik, 52 genin ise kondrojenik farklılaşmadan sorumlu olduğu bildirilmiştir. 8 genin her üç farklılaşmada ortak olduğu ileri sürülmüştür (Şekil-10). Bu genler: PER1, NEBL, NRCAM, FKBP5, ILR2, ZNF145, TIMP4, serum amiloid A' dır (114).



Şekil-10: MKH' lerin farklılaşmasında rol aldığı düşünülen gen sayılarının şematik görünümü.

Osteojenik ve adipojenik farklılaşma: Adipojenik ve osteojenik farklılaşma, spesifik bir transkripsiyon programını kullanmaktadır. Burada bir sistemin aktivasyonu diğer sistemin inhibisyonuna neden olmaktadır. Runt homology domain transcription factor (Runx) 2 ve peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ) sırasıyla osteojenik ve adipojenik yolda etkindir. Osteojenik yolda, Runx2 aktive olurken, PPAR- γ downregüle olmakta ve adipogenezisi baskılamaktadır (125). Adipojenik yolda PPAR γ aktive olurken, Runx2 “downregüle” olmakta ve osteogenezisi baskılamaktadır (89,125).

Wnt sinyal yolağı inhibitörü, Dkk-1, aktive olurken osteojenik farklılaşma inhibe olmaktadır, hücrelerin adipogenezise gidebilmesi için, Wnt sinyal yolağı inhibe olmalıdır (125).

Wnt, sisteinden zengin glikoproteinleri sentezler ve embriyonik gelişim sürecinde kök hücrelerin korunmasında, çoğalmasında ve farklılaşmasında görev alır. Wnt sinyali ile GSK-3B aktivitesinin reseptör bağımlı inaktivasyonu ile sitoplazmik β -kadeninin stabilizasyonu artırılır. β -kadenin/TCF/LEF kompleksi aktive olarak, hücre proliferasyonunu ve alkalen fosfataz, osteokalsin gibi osteojenik farklılaşma ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu sağlar (2). Wnt sinyali yoksa GSK3B inhibe olmaz, intraselüler β -kadenin azalır, transkripsiyon ve hücre proliferasyonu olmaz. Osteojenik farklılaşma olmaz. Wnt 3a osteogenezisten sorumludur (2).

CD166, farklılaşmamış MKH lerde bulunur ve hücre osteojenik hücreye farklılaştıkça kaybolur, hücre yüzey alkalen fosfatazı eksprese olmaya başlar. Spesifik SB-10 antijeni/CD166 hücrenin osteojenik farklılaşmasından sorumlu olabileceği düşünülmektedir (4).

Dekzametazon ve B-gliserofosfat, moleküler regülasyonda önemlidir. B-gliserofosfat, mineralizasyonu, osteoblast aktivasyonunu ve osteopontin ekspresyonuna neden olur. Fosfatlar cbfa 1 (core binding faktor α 1) genini aktive edip osteogenezisi sağlarlar. cbfa 1, osteoblast ve hipertrofik kondrositlerde eksprese olan kemik ekstraselüler matriksin yapısal proteininin gen ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (24). Askorbik asit ve 1.25 dihidroksivitamin D3, alkalen fosfataz ve osteokalsin aktivitesine neden olur (24). BMP' ler in vitro osteoinduksiyona, BMP-2, nodül formasyonuna ve kalsiyum artışına neden olur. BMPR-1B reseptöründe selektif blok, adipojenik farklılaşmaya neden olur (12,89,92,24). Diğer osteojenik faktörler, TGF, Insulin-benzeri büyüme faktörü (IGF), beyin dokusundan elde edilen büyüme faktörü (BDGF), FGF-2, Leptin, Paratiroid hormon ilişkili peptid (PTHrP) dir. Bu faktörler matriks proteinlerinin sekresyonunu düzenleyerek kemiğin yeniden yapılanması için gerekli sinyalleri eksprese ederler (89).

Kondroblast farklılaşması: Kondroblast farklılaşmasında birçok faktörün rolü bulunmaktadır. En başta, bu hücrelerin kondansasyonu gereklidir çünkü in vitro pelet formasyonu oluşmamışsa kondrogenezis sağlanamamaktadır (46). TGF-B, BMP ve kıkırdaktan kaynaklanan morfogenetik protein (CDMP) aileleri, kondrogenesiste çok önemli rol oynamaktadır (110,24,114,125).

TGF-B3 (transforme edici büyüme faktörü) reseptörü, hücre sinyal ileti yollarından olan SMAD yolağı veya MAP kinaz yolağı ile sinyal açığa çıkarıp kıkırdak matriksi ortaya çıkaran genlerin (tip2 kollajen gibi) aktivasyonuna ve ekstraselüler matriksin artışına neden olur (24,125).

Sox genleri in vivo ve in vitro kıkırdak formasyonu için gerekli transkripsiyon faktörleridir (46). Sox 5-6 ile bir kompleks olan Sox-9' un mRNA ekspresyonu (110,46) ile Tip-2 kollajeni kodlayan col2a1 geninin ekspresyonu sağlanarak kıkırdak matriksin sentezi oluşur (46).

BMP2-4-6: Kondrojenize neden olurlar. En etkilisi olan BMP-2 dir (110). “N-cadherin” ve NCAM üretimini arttırarak etki ederler (46).

“Brachury”, Msx2, FGFR-3, “aggrecan” kondrojeniz için spesifik olan diğer faktörlerdir (110). Aktive T lenfositlerinin nükleer faktörü, NAFT-p (“nuclear factor of activated T cell”)’ nin, aktivitesi kondrojenizi inhibe etmektedir (89).

Amniotik sıvı ve plasentadan elde edilen hücreler, birçok fenotipe farklılaşabilirler. Her bir farklılaşmayla ilgili dokuya spesifik fenotipik, biokimyasal değişiklikler ile spesifik farklılaşma özellikleri tablo XI ve XII de gösterilmiştir (20,8,18).

Tablo-XI: Amniotik sıvı ve plasentadan elde edilen hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ve özellikleri

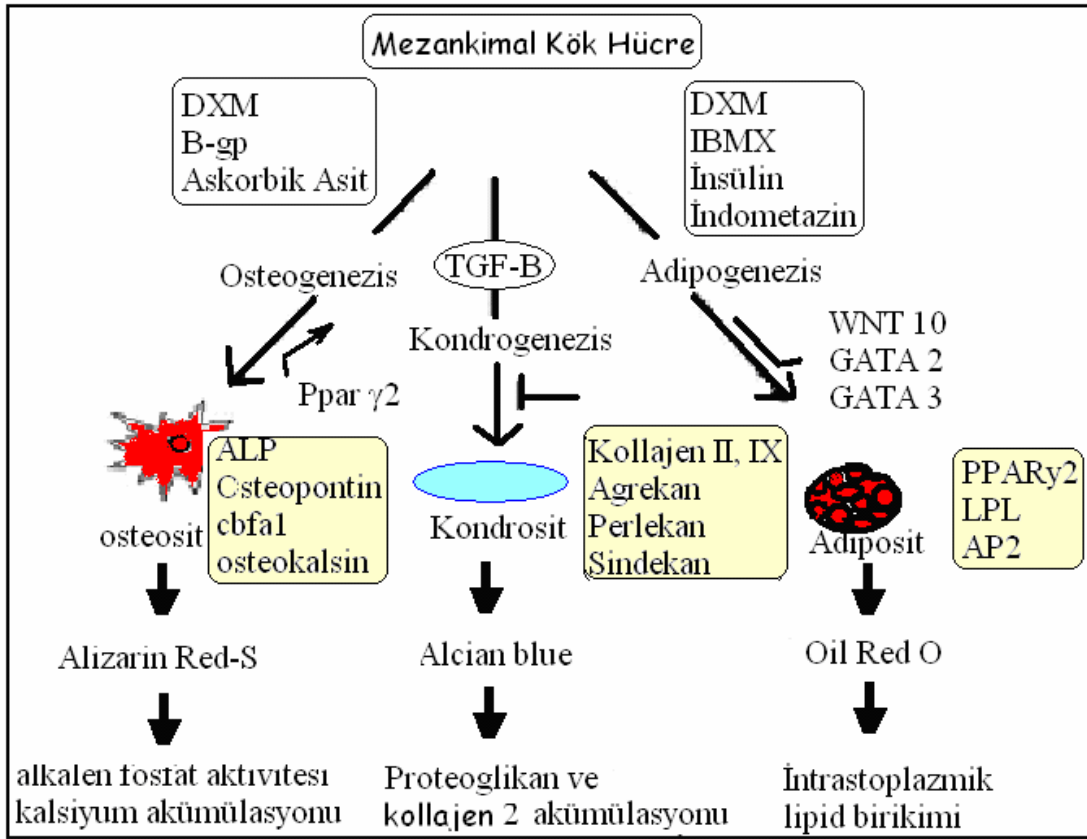
Farklılaşma	Spesifik gen	Diğer	Ortalama farklılaşma süresi
Osteojenik	runx2, osteokalsin, AP	Mineralize kalsiyum	8gün
Myojenik	Myo-D, Mrf4, desmin		8gün
Adipojenik	LPL, Ppar γ 2	Lipid birikimi	16gün
Endotelyal	CD31, VCAM-1	Kılcal damar benzeri yapılar	8gün
Hepatik	Albumin	Üre	45gün
Nörojenik	Nestin	L-glutamat	2gün

Alkalen fosfataz (AP), lipoprotein lipaz (LPL), “Peroxisome proliferation-activated receptor-2” (PPAR- γ 2) , “Cluster of Differentiation” (CD), “Vascular cell” adezyon molekülü (VCAM)

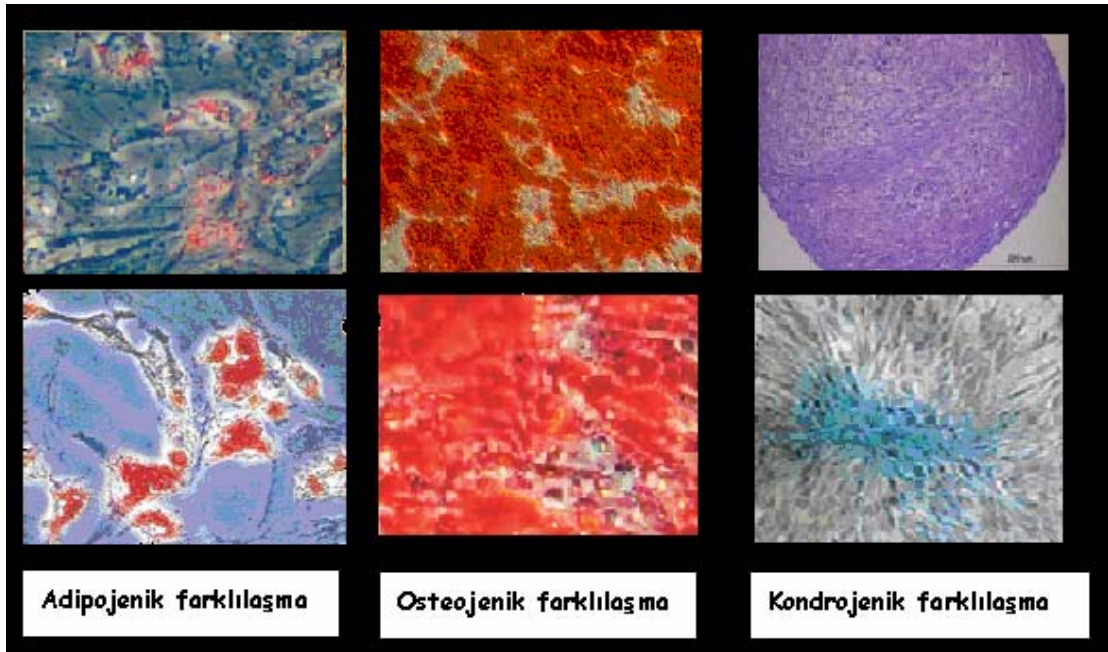
Tablo-XII: AS MKH' lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmasındaki özellikler

Hücre Farklılaşması	Hormonal Kokteyl	Boya	Hücre düzeyinde bulgular	Moleküler düzeyde bulgular
Adipojenik 2-3 hafta	Dekzametazon, 3-isobutil-1-metilksatin (IBMX), İnsülin, İndometazin	Oil-Red O	Lipitten zengin vakuollerin intrasellüler birikimi (Şekil-12)	PPAR- γ 2 (peroxisome proliferation-activated receptor-2), lipoprotein lipaz (LPL), fatty acid-binding protein (aP2), adipisin
Osteojenik 2-3 hafta	Dekzametazon, Beta gliserofosfat, Askorbik Asit	Von kossa Alizarin-Red S	Kalsiyum (Ca^{+2}) akümüasyonu, mineralize depositler, agregat ve nodüller (Şekil-12)	Alkalen fosfat, Osteopontin, cbfa1, osteokalsin, kemik-sialoprotein
Kondrojenik 2-3 hafta	Dekzametazon, Askorbik asit, Sodyum püruvat, Prolin, L-glutamin, Büyüme faktörü:TGF- β <u>ITS+Premiks:</u> İnsülin, Transferrin, Selenious asit, BSA (bovin serum albumin) , Linoleik asit	Safranin-O Toluidin blue Alcian blue	Zengin ekstraselüler matriks (Şekil-12) Asit mukopolisakkaridazlar glikozaminoglikanlar proteoglikanlar Kondrosit benzeri lakün	Kollajen II, Kollajen IX, Agrekan, Perlekan, Sindekan.

Amniotik sıvı MKH' lerinin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmasında temel bilgiler Şekil-11 de gösterilmiştir.



Şekil-11: Amniotik sıvı MKH' lerinin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmasında temel bilgiler.



Şekil-12: AS MKH lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma görüntüleri [Tsai ve ark., (2004, 2006), Kim ve ark., (2007), Kolambkar ve ark., (2007)]

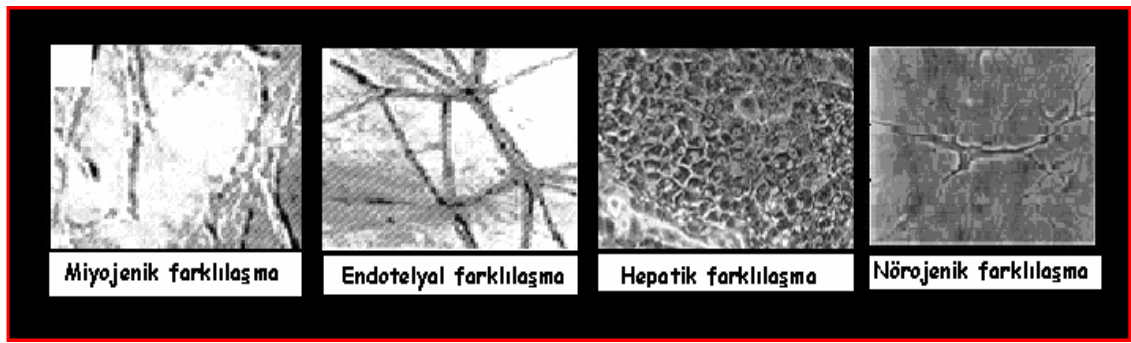
Endotel hücrelerine farklılaşma: Amniotik sıvı kök hücreleri, jelatin kaplı alanlarda spesifik endotelial bazal besiyeri kullanılarak üretildiğinde, fenotipik değişikliklerin birinci haftada başladığı ve tam farklılaşmanın 1 ayda olduğu bildirilmiştir. Farklılaşma işleminden sonra, kültürde in vitro kılcal damar benzeri yapılar oluşturur ve PECAM 1/CD31 ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) eksprese ederler; özel endotelial hücre yüzey belirteci (P1H12), faktör 8 ve “kinaz insert domain reseptör” (KDR) pozitifdir. Farklılaşma olmamış hücrelerde işlem öncesi bu belirteçler negatiftir (20).

Hepatosit hücrelerine farklılaşma: Amniotik sıvı kök hücrelerinde, matrijel veya kollajen kaplı alanlarda hepatosit büyüme faktörü, insülin, onkostatın M, deksametazon, fibroblast büyüme faktörü 4, monotiogliserol varlığında hepatik farklılaşma sağlanır. Morfolojik değişiklikler, 7. günde başlarken, tam farklılaşma 45 günde olur. Hücrelerin uzun boyları toparlanarak, kaldırım taşı görünümüne dönüşür. Bu hücreler, albumin, HNF4- α (hepatosit nükleer faktör 4- α), hepatosit büyüme faktörü reseptörü (c-met), “multidrug” direnç (MDR), membran transportör ve α -fetoprotein eksprese ederler (20,59).

Myosit hücrelerine farklılaşma: Amniotik sıvı kök hücrelerinin, at serumu ve tavuk ekstraktı içeren spesifik besiyeri ile ince matrijel kaplı kültürde, ilk 24 saatte, 5-azasitidin kullanılarak elde edilen kültürlerde, hücreler çok çekirdekli hücreler oluşturmak için birleşerek, ritmik olarak kasılan myoblastlara farklılaşırlar. Bu hücrelerde, tropomyozin ve dezmin pozitifdir. 8. günde Myf6 ve dezmin ekspresyonu başlar, 16. günde Myf6 ekspresyonu azalırken, dezmin ekspresyonu artar (50,20,59).

Nöronal hücre farklılaşması: Amniotik sıvı kök hücrelerinde, dimetilsulfoksit (DMSO), butillenmiş hidroksianisol ve nöronal büyüme faktörü kullanılarak, ilk 24 saatte nöronal hücrelere ait morfolojik şekil değişikliği elde edilir. Büyük düz hücreler ve küçük iki kutuplu hücreler meydana gelir. Bu hücrelerde, Nestin (nöroepitelyal belirteç) oldukça yüksek eksprese olmaktadır (20,8). Beta tubulin-3 ve GFAP, sırasıyla nöronal ve glial farklılaşma belirteçleri, zamanla artar, 6. günde bir plato yapar. Bu hücreler, tam farklılaşmış nöronal hücrelerden sekrete edilen nörotransmitter olan glutamik asit salgılar (20). Amniotik sıvı kökenli hücrelerin, özel bir nörojenik hücre üreme besiyeri ile işleme tabi tutulmadan önce ve sonra mRNA ve protein seviyesinde nöronal belirteçleri eksprese ettiği gösterilmiştir (8). İşlem öncesi, nöronal hücreler için

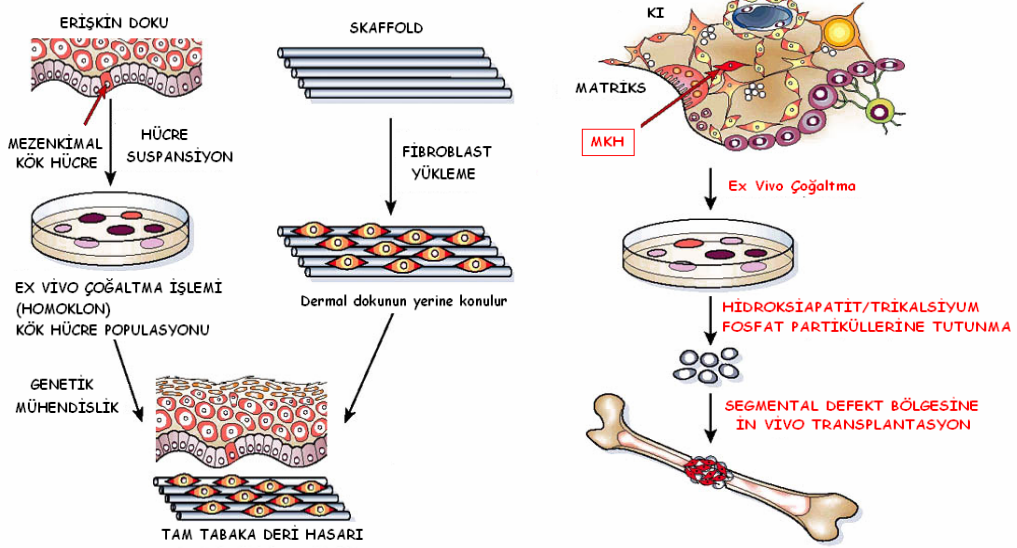
nestin %80 pozitif iken, işlem sonrası dopaminerjik nöronlara özellikli bir belirteç olan GIRK (“g-protein-gated” içeriden potasyum atan kapı) genini eksprese ettiği belirtilmiştir (8). Ayrıca, plasentadan kaynaklanan epitelyal hücrelerin de nöronal ve glial hücrelere dönüşme özelliği olduğu (107), amniotik epitelyal KH lerinin de nörotropik etkileri olduğu (asetilkolin ve katekolamin sentez ve salınımı) ve bunun nöroepitelyal yapılanma ile embriyonun nöronal gelişiminin erken fazlarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (107,77,117,75). Amniotik mezankimal hücrelerin, nörogial hücreler eksprese ettiği ve optimal farklılaşma protokolü ile nörogial farklılaşmayı gösteren başka yayınlar da vardır (107,120,96).



Şekil-13: AS MKH lerin farklılaşma görüntüleri [Prusa ve ark.,(2004), Delo ve ark.,(2006)]

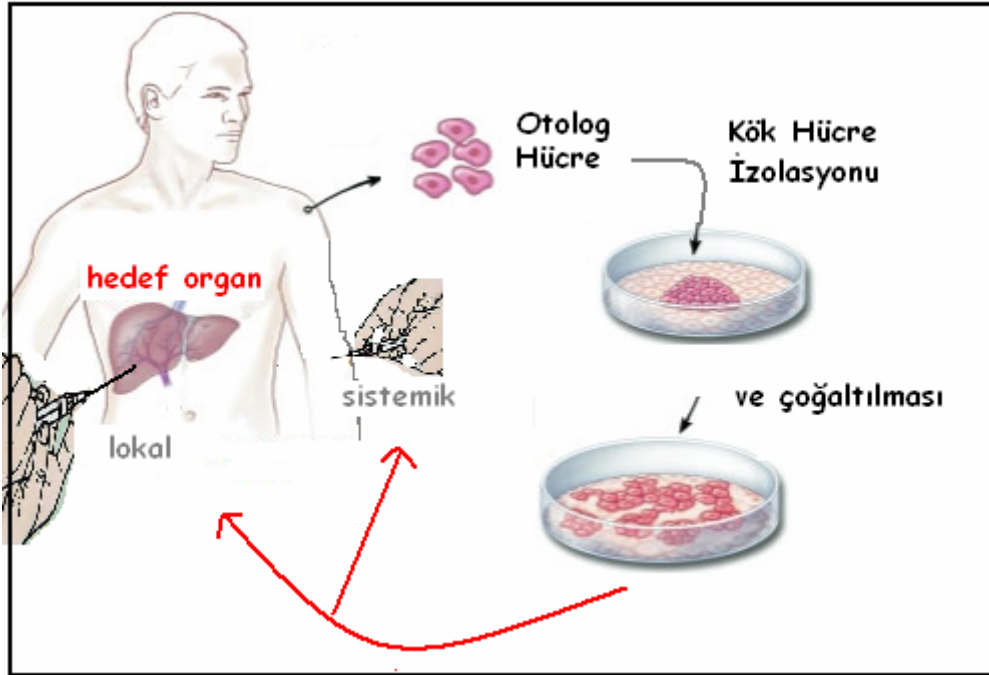
2.6. MKH' lerin hipoimmünojenik özelliği ve klinik kullanım alanları

Rejeneratif tıp, hasarlı veya kaybedilmiş organ veya dokuların, laboratuvar koşullarında oluşturulmasıyla ilgilenen multidisipliner yaklaşımları içermektedir (6). Hücre tedavisi ve doku mühendisliği, rejeneratif tıbbın ana komponentleridir. Doku mühendisliğinde, üç boyutlu biyomateryallerle (skaffold) birlikte doku kültürü ortamında (in vitro, ex vivo) çoğaltılan hücreler, kaybedilen hücre ve dokuların onarılması için alıcıya (in vivo) nakledilmektedir (35,6) (Şekil-14). Rejeneratif tıpta, doku/organ onarımı, hücre tedavisi ile, biyomateryal (skaffold) teknolojisi ile veya biyomateryal ve kök hücrelerin birlikte kullanıldığı yollarla sağlanmaya çalışılır (36).



Şekil-14 :MKH’ lerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları

Kök hücreler, otolog (alıcının kendi dokusu) veya allojenik (kendi türünden), olabilir ve sistemik yolla (kan yoluyla) veya lokal (direkt dokuya) olarak (Şekil-15) uygulanabilirler (35,6,36,93). Literatürdeki örnekleri az olmakla birlikte, insan KH lerinin hayvanlarda kullanıldığı “ksenograft” (farklı türler arasında) hücre nakilleri de bulunmaktadır (63,109,111).



Şekil-15 : Kök hücre tedavisi

Doku mühendisliği ve hücre tedavi uygulamalarında, genellikle otolog hücreler kullanılmaktadır; otolog MKH, rejeneratif tıbbın birçok klinik uygulama alanında kullanılmak üzere, hastaların kendisinden kolayca elde edilebilir; ancak otolog doku uygulamalarında uygulanacak doku bazen kolayca elde edilememektedir veya üretilmemektedir. Acil durumlarda etkisi sınırlıdır, çünkü çok fazla hücre gerektiği zaman, zaman alacak pahalı bir yöntemdir. Bakteriyel ve viral kontrollerin yapılması ve implantasyondan önce hücre çoğaltılması gereklidir. Allojenik MKH' nin terapötik yaklaşımında kullanılmasının birçok avantajı olabilir. Örneğin, myokard infarktüsü gibi akut bir durumda, rutin kontrolleri yapılmış ve çoğaltılmış olan allojenik MKH ler erkenden uygulanabilecektir. Dezavantajı ise vericiden alıcıya potansiyel hastalık geçirme riskidir (4,36).

MKH' nin en önemli özelliklerinden biri alıcıda inflamasyonu ve immünolojik yanıtları baskılamasıdır (4,25). MKH' lerin, T ve B lenfositlerin çoğalmalarını, parakrin inhibisyonla engellediği düşünülmektedir (123). MKH ler, MHC-klas 2 ve CD40, CD80, CD86 gibi eşlik eden uyarıcı molekülleri eksprese etmezler, MHC- klas 1, T lenfositleri aktive eder ancak eşlik eden uyarıcı olmazsa sekonder sinyal oluşmaz, T lenfositleri anerjik bırakıp immunosupresif özellikte olurlar. MKH' lerin, immunomodulator özelliği dendritik hücrelerin matürasyon ve fonksiyonuna da zarar verir. B lenfosit proliferasyonunu, farklılaşmasını ve kemotaksisini in vitro inhibe ederler (123,12). MKH, T-hücre proliferasyonunu, doğal ve hafızalı T hücre cevabını inhibe eder ve antijen sunan hücrelerle T hücreler arasındaki ilişkiyi engeller. Prostaglandin, IL-10 ve indolamin 2,3 dihidrooksijenaz oluşumu aracılığı ile immünsupresif bir mikroçevre yaratır (123,25,10). Bu nedenle terapötik yaklaşımlarda, allojenik hücre naklinde immünsupresyona gerek duyulmadığı ileri sürülmektedir (123,34,4).

MKH lerin çeşitli alanlarda kullanıldığı hayvan deneyleri ve sınırlı insan çalışmaları bulunmaktadır. MKH lerin, in vitro birçok değişik hücre tipine farklılaşmaları, kültür koşullarında kolayca çoğaltabilmeleri, genetik olarak stabil olmaları, alternatif kaynaklardan elde edilebilir olmaları ve hiposupresif karakteristikleri, doku kaybı ile seyreden pek çok hastalığın tedavisinde güvenilir bir kaynak olduklarını düşündürmektedir (36,111,55,56,73, 34,35). Özellikle, travmatik ve

ortopedik durumlarla ilişkili tedavi yaklaşımlarında (93,4), in vivo deri graftının yaşam süresini arttırdığı belirtilmektedir (5,19).

MKH' lerin kullanıldığı farelerde gerçekleştirilen deneysel otoimmün ensefalomyelitte (multipl skleroz modeli), bu hücrelerin hasarlı dokuya göç ettiği ve immunsupressif etkisiyle tedavide yararlı olduğu bildirilmiştir. Bu etkisini, farenin “self-reactive” T hücreleri ile periferal toleransı artırarak hastalık semptomlarının gelişiminin engellenmesiyle sağladığı belirtilmiştir (133).

İnsandan elde edilen amniotik membran, ratların limbal alan, intrakorneal yüzey ve böbrek kapsülünün altına uygulanmış, limbal hücre naklinde, CD4 ve CD8 T hücreleri, amniotik grafta orta derecede cevap verirken, intrakorneal transplantasyonda konakçı cevabı olmadığı, böbrek kapsülünün altına uygulanan hücre naklinde, amniotik membranın dokuya infiltre olduğu ve oldukça nadir konakçı cevabı gözlemlendiği bildirilmiştir. Amniotik membranın hipoimmünojenik doğası ve HLA-G ve Fas ligand gibi bazı immün düzenleyici faktörleri içermesi, hücre nakli uygulamalarında önem taşımaktadır. Amniotik membranın, deri ülseri ve yanık tedavisinde kullanılabilecek biyolojik bir membran olduğu raporlanmıştır (63). Kimyasal yanık, oküler pemfigoid ve Stevens-Johnson sendromu gibi birçok ciddi konjunktival hastalıkta, amniotik membranın olağanüstü terapotik etkisi olacağından bahseden yayınlar bulunmaktadır (122). Bir diğer çalışmada, kornealarında kimyasal yanık oluşturulan farelere, insan kemik iliği MKH' leri nakledilmiş ve korneada rekonstruksiyon sağlanmış (73).

MKH' lerin potansiyel klinik kullanım alanlarından biri, kemik iliği supresyonu yapılmış kemoterapi veya radyoterapi uygulanan hastalarda yeniden hematopoezin hızlanmasını desteklemektir (62). Allojenik HKH naklinden sonra hastaların yaklaşık % 50 sinin hayatını tehdit eden ciddi bir transfüzyon reaksiyonu olan başlıca, deri döküntüsü, ishal ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma şeklinde kendini gösteren “Graft Versus Host Disease” (GVHD) in (132) azaltılmasında da MKH ler kullanılmaktadır. Bu hastalarda, MKH infüzyonundan sonra, infüzyonun toksik etkisine rastlanmamış, hem graft kaybı olmamış hem de immunomodulator etki gösterilmiştir. İmmünosupresif etki dikkat çekici oranda gözlenmiş ve hücre naklinden bir yıl sonra bile kemik iliği ve kanda minimal rezidüel hastalık saptanmadığı bildirilmiştir (62). Bir başka çalışmada, progressif GVHD olan ve tedaviye cevap vermeyen bir çocuğa

annesinden alınan MKH' lerin intravenöz uygulama ile verilmesinden sonra tam klinik düzelme gözlemlendiği belirtilmiştir (69).

MKH' ler hipoimmünojenik özellikleri ve HLA uygun olmayan bireyler arasında hücre nakli başarısı nedeniyle diğer kök hücrelere göre ön plana geçmiştir (69,93). Kimi klinik uygulamalarda ise, umbilikal kordon kanı HKH lerin ve allojenik kemik iliği MKH lerin birlikte naklinin, kordon kanının engraftman başarısını arttıracığı yönünde görüş bildirilmektedir (11,67,58,49,1112,113). Benzer şekilde, amniotik sıvı kökenli MKH lerin, umbilikal kordon kanı HKH leri ile eş zamanlı olarak aynı alıcıda kullanılabilmesi ve hatta kardeşler arasında uygulanabilmesi olasılığından bahseden yayınlar bulunmaktadır (49,84).

Osteogenezis Imperfekta (OI), Tip 1 kollajen yapımında bozukluk olan kısa boy, kemik kırıkları ve osteopeni ile seyreden bir hastalıktır. Horwitz ve ark., (1999) nın çalışmasında, ciddi OI' lı çocuklara kemoterapinin ardından sistemik olarak allojenik kemik iliği kökenli MKH nakli uygulanmış, nakledilen MKH' lerin kemiğe ulaştığı ve 3 ay sonra yeni kemik yapımı meydana geldiği, toplam vücut mineral kapasitesinin arttığı, büyüme kapasitesinin arttığı, tüm hastalarda kemik kırıklarının azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışma, kemik iliği kaynaklı mezankimal hücrelerin OI' lı çocuklara naklinde, alıcının kemiklerine verici MKH lerin yerleşebileceğini göstermiş ve nakledilen hücrelerin osteoblastlara farklılaşarak kemik yapısını ve fonksiyonunu iyileştirebileceği fikrini desteklemiştir (40).

Bir başka çalışmada daha önceden konvansiyonel kemik iliği nakli yapılmış çocuklara, kültüre edilmiş ve çoğaltılmış MKH uygulanmış, bu hücrelerin hasarlı kemik yapısına yerleşerek osteoblastlara farklılaştığı gösterilmiş ve MKH naklinin, kemik iliği naklinin klinik yararlarını arttırdığı belirtilmiştir (39,40).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, HLA-uyumsuz (mis-match) bir erkek fetüsün karaciğerinden MKH ler izole edilmiş, çoğaltılmış ve HIV, HTLVI ve II, Hepatit B ve C antijenleri yönünden steril oldukları belirlenen hücreler, 32 haftalık ağır OI lı bir fetusa, "in utero" infüze edilmişlerdir. Bebek doğumu takiben 2 yaşına dek izlenmiş ve 3 adet kırık dışında önemli bir komplikasyon gözlenmediği bildirilmiştir (68).

Allojenik MKH lerin, altı metakromatik lökodistrofi (MLD) ve beş mukopolisakkaridoz tip 1 (MPS-1H) (hurler) hastasına uygulandığı bir başka çalışmada,

infüzyonun toksik etkisine rastlanmamış ve MLD hastalarında sinir hücrelerinde iyileşme sağlanmış, MPS-1H hastalarında ise kemik gelişiminde ve dansitesinde artma gözlenmiştir. Araştırmacılar, allojenik donör uygulamasında, MKH lerin oldukça güvenilir bir kaynak olduğundan bahsetmişlerdir (61).

Allojenik kemik iliği MKH' lerinin, vücudunun % 40' ında 2. ve 3. dereceden derin deri yanıkları bulunan bir bayan hastaya naklinden dört gün sonra anjiogenezin aktive olduğu ve hızla düzelme sağlandığı bildirilmiştir (100).

MKH' lerin geniş kırıkda ve kemik defektlerinin tedavisinde de tek başına veya biyomateriyallerle beraber kullanıldığı ve hasar onarımında yüksek başarı elde edildiği bildirilmiştir. Progresif doku hasarı olan ve tamir mekanizmasının mümkün olmadığı osteoartrit gibi dejeneratif hastalıklarda, in vitro çoğaltılan otolog MKH ler, kollajen jellere emdirilmiş ve artiküler kırıkda defekti olan bölgelerde başarı ile kullanılmıştır (4,128). MKH lerin, osteonekrozda, hasarlı kas hücrelerinin rejenerasyonunda (93), ve menisküs tedavisinde (128) de çok önemli rol oynadıkları çeşitli araştırmalarda belirtilmiştir.

MKH 'ler, hasar gören dokulara dönüşebilme kapasiteleri yanında, sınırlı sayıda canlı kalmış hücrelerin fonksiyonlarını da düzenleyip, ömrünü uzatabilir, yeni damar oluşumunu sağlayarak dolaşımını düzenleyebilir, doku rejenerasyonuna katkıda bulunabilir ve hasarlı dokuda inflamasyonu baskılayarak skar dokusu oluşumunu engelleyebilirler.

Myokard infarktüsünün MKH ile tedavisi son zamanlardaki potansiyel klinik araştırmalardan biri olmuştur. MKH lerin, in vitro kardiomyositlere farklılaşmasından bahseden pek çok yayın vardır. Chen ve ark., (2004) MKH lerin direkt kalp kasına enjeksiyonu ile yeni damarlanmaların oluştuğunu, kardiomyosit oluşumunun tetiklendiğini ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun anlamlı derece düzeldiğini raporlamışlardır (15).

Barbash ve ark., (2003) deneysel myokard infarktüsü oluşturulan ratlarda, MKH lerin sistemik olarak uygulanması ile doku rejenerasyonu sağlamışlardır. MKH' lerin sistemik olarak uygulanması ile bu hücrelerin özellikle akciğerler olmak üzere birçok farklı dokuya göç ettiği de raporlanmıştır. Myokard infarktüsünü takiben, infüzyondan dört saat sonra, infarkt alanında % 1' den az hücre gözlenmiştir (3).

MKH' lerin sol ventrikül kavitesine infüzyonu ile infarkt sahasında daha fazla migrasyon ve kolonizasyon olduğu belirtilmiş ve post iskemik kalbe, erken dönemde uygulanan MKH infüzyonunun da, infarkt alanında daha fazla hücre gözlenmesine neden olduğu bildirilmiştir. Travma sahasında, MKH' lerin infiltre olmasına, adezyon ve trafiğine neden olan spesifik reseptörler veya ligand ekspresyonunun, doku hasarından kısa bir süre sonra yüksek olduğu, sonra giderek azaldığı belirtilmiştir (3). MKH' lerin, direkt kardiyak veya ekstrakardiyak kompartmanlara uygulanarak miyokard tamiri ve post iskemik kalpte hücre yenilenmelerine neden olduğunu gösteren hayvan çalışmasında, hücrelerin bu etkilerini, transdiferansiyasyon, füzyon ve büyüme faktörü/sitokin stimülasyonu ile gösterdikleri belirtilmiştir (85).

Günümüzde, kök hücrelerin Parkinson ve Alzheimer hastalığı, kalp hastalıkları, diyabet, felç, omurilik yaralanmaları ve yanıklar dahil sayısız hastalığı tedavi etme ve iyileştirme potansiyeli olduğu ileri sürülmektedir (41,130,25,26). Parkinson dışında inme, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Huntington hastalığı gibi, değişik tipte birçok nöronun etkilendiği birçok nörodejeneratif hastalıkta da kök hücre uygulamaları bulunmaktadır (72, 41).

Erişkin rat kemik iliğinin, embriyonik ratların beynine, transuterin intraventriküler uygulamasından yaklaşık 2 ay sonra, incelenen hasarlı beyin dokusunda periventriküler germinal zonda, neokortekste, hipokampusta, rostral migratuar ve olfaktor bulbusta, nöronal ve radial glial oluşum gösterilmiş ve GFAP, B3 tubulin, tau, NeuN, nestin gibi nöronal belirteçlerin eksprese edildiğinden bahsedilmiştir (82). Bu çalışma, in vivo MKH lerin dokulara göçünün, bu dokulara yerleşmesinin, farklılaşma kapasitesinin ve uzun süre embriyonik fare beyinde kaldığının gösterildiği ilk çalışma olarak belirtilmiştir (82).

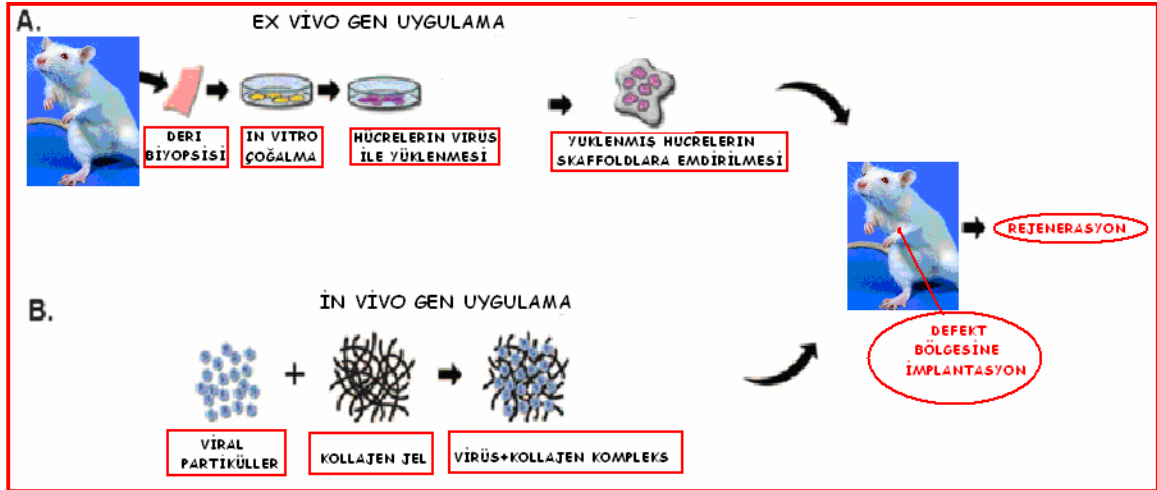
Ratlarda iskemik beyin hasarında, MKH' lerin intravasküler infüzyonu ile travma alanına spesifik migrasyon gösterdiğini, bu bölgede MKH migrasyonunu arttırdığını, ve normal beyin dokusunda bulunmayan ancak iskemik beyin dokusunda bulunan ve MKH' ler için kemotaktik bir faktör olduğu söylenen "Monocyte chemoattractant protein-1" (MCP-1)' in, hasarlı beyin dokusunda arttığını gösteren yayınlar vardır (129). Ratlarda MKH uygulamasını takiben, korpus kallosum, talamik nükleus, substantia nigra, travma bölgesine migrasyon ile iyileşme sağlandığı raporlanmıştır. Bu değişimin, nöroprotektif faktörleri salgılayarak mı yoksa nöral doku

faklılaşması ile mi oluştuğu henüz açık değildir (50). Bir başka çalışmada, spinal kord travması olan paraplejik farelere, travmadan bir hafta sonra MKH enjekte edilmiş, travma sahasının çevresinde spinal kord lezyonuna doğru rejenerasyonun ve düzelmenin olduğu gösterilmiştir (38).

37 yaşında spinal kord travması olan bir bayan hastada da, HLA uyumlu kordon kanı MKH lerinin transplantasyonundan 41 gün sonra, kalça ve uylukta duyu algılaması olduğunu ve hareket kabiliyetinin morfolojik ve fonksiyonel olarak düzeldiğinden bahsedilmiştir. CT/MRI sonuçları ile spinal kord travma sahasında ve kauda ekinada rejenerasyonun sağlandığı gösterilmiş, spinal kord travmasında kordon kanı MKH lerinin tedavideki öneminden bahsetmişlerdir (53). Portmann ve ark., (2006) peripartum dönemde nörolojik morbiditeye neden olabilecek potansiyel beyin hasarının tedavisinde, otolog graft olarak plasental MKH lerin kullanılabileceğini belirtmiştir (92).

KH lerin gelecekte ümit vaadeden uygulama alanlarından biri de gen tedavisidir (2,101,93) (Şekil-16). Gen tedavisinde amaç, hücrede eksikliği veya fonksiyon bozukluğu olan bir genin bir vektör aracılığıyla hedef hücrelere gönderilmesi ve hücre içinde fonksiyonların oluşturulmaya başlanmasıdır. MKH lerin gen tedavisi yaklaşımlarında, multipotansiyel özellikleri ve kendilerini yenileme kapasiteleri sayesinde oldukça güçlü bir araç olarak belirtilmektedir (2).

MKH lerin gen tedavisinde kullanılabılır olduğunu bildiren pek çok yayın vardır. Nakamura ve ark., (2004) malign gliomu olan ratların tümörlerine, antitümör özellikteki interlökin 2 taşıyan adenoviral vektör ile değişikliğe uğratılan MKH lerin uygulanmasını takiben, Studeny ve ark., (2002) malign melanomlu farelerde, adenoviral vektörler kullanılarak IFN- β yüklenen insan MKH lerinin uygulanmasıyla, in vivo malign hücrelerin büyümesinin anlamlı derecede azaldığını ve hayvanlarda sağkalım sürelerinin arttığını bildirmiş (83,116), MKH lerin malignitede uygulanacak biyolojik ilaçların konakçıya aktarım aracı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (116). MKH lerin gen tedavisi yaklaşımlarında kullanılmasının, tedaviye dirençli tümörlerin iyileştirilmesi için umut verici yaklaşım olduğu bildirilmekte, Parkinson, kalp hastalıkları ve iskemik beyin hastalıkları gibi birçok hastalık modellerinde de MKH destekli gen tedavisinin denenmekte olduğundan söz edilmektedir (125,101).



Şekil-16: Gen tedavisi uygulamaları

Yang ve ark., (2007) farelerde myokard infarktüsü sonrası, myokard perfüzyonunun ve kalp fonksiyonlarının yenilenmesinde, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) geni ile transfeke edilmiş MKH' lerin kullanılmasının, tek başına diğer hücresel veya gen tedavilerinin kullanılmasından daha avantajlı olduğunu bildirmiştir (131).

Kraniofasial doku mühendisliği uygulamalarında, MKH' ler, gen tedavileri için mükemmel bir transmitter molekülü olarak düşünülmektedir. Adenovirüs aracılı PDGF geni kullanılarak gingival yara iyileşmesi hızlanmakta, polimer skaffoldların, direkt periodontal kemik defektleri olan hasarlı alana uygulanması ile periodontal rejenerasyon sağlanmaktadır. BMP geni, uzun kemiklerin ve kraniofasial kemiklerin rejenerasyonunda kullanılmakta, kalvaryal defektlerde yeni kemik oluşumu sağlanmaktadır (74).

OI, COL1A1 ve COL1A2 genlerinde 150 den fazla mutasyon sonucu oluşan, kemiğin major ekstraselüler matriks proteini olan tip 1 kollajenin defektif oluşuyla ortaya çıkan kalıtsal bir hastalıktır. Halen sadece destek tedavisi uygulanan ve kesin tedavisi olmayan bu hastalıkta olası tedavi stratejisi kollajen bütünlüğünü sağlamaktır. Bu nedenle umut verici tedavi araçlarının hücre nakli ve gen tedavisi olduğu düşünülmektedir. Chamberlain ve ark., (2004,2008) OI lı hastaların kemik iliği MKH lerinden elde edilen dominant-negatif mutant kollajen genini (COL1A1, COL1A2), adenovirüs vektörler kullanarak (AAV-COLe11NpA, AAV-COL2e4Inloxpa) in vitro

genetik değişikliklerle düzeltilmiş, farelerde in vivo uygulama ile normal kollajen üretimi ve kemik oluşumu sağlandığını belirtmiştir (13,14).

MKH lerin, gen transferi etkinliği stabil olduğundan hemofili, Faktör VIII ve IX tedavisi, defektif enzim terapisi, kemik defektlerinin tamirinde kullanılabilecekleri belirtilmiştir (7). Son çalışmalarda, v-myc geni taşıyan retroviral vektörlerle fetal kemik iliğinden ya da fetal telansefalondan elde edilen nöronal KH lerin, iskemik fare beynine nakli sonrasında, beyin dokusuna entegre olabildikleri, nöron ve astrositlere farklılaşabildiklerini ve farelerde fonksiyonel bir iyilik saptayabildiklerinden bahsedilmiştir (70).

Amniotik sıvıda, fetusda santral sinir sistemi anomalisinin olmadığı durumlarda da, nöral progenitör hücrelerin bulunduğu raporlanmaktadır (96,120,121,20). % 90 DMEM/F-12, % 10 FDS, 10 µm forskolin içeren dopaminerjik besiyeri uygulanan AS MKH leri, 7 gün sonra, 2 dakika düşük K⁺ ardından 10 dakika yüksek K⁺ ile depolarize edildiğinde dopamin sentezi yapabildikleri ve tek hücre düzeyinde NANOG, Oct-4, NES, TUBB3, NEFH, NEUNA60, GALC, GFAP gibi nöronal hücre belirteçleri eksprese ettikleri gösterilmiştir (120). Bossolasco ve ark., (2006) amniotik sıvı MKH lerinin GAP43, NSE, Nestin, MAP2, GFAP, beta tubulin III gibi nöronal belirteçler eksprese ettiğini göstermiştir. Benzer biçimde, AEH lerinin belirli şartlar altında, asetilkolin, norepinefrin ve dopamin (DA) dahil nörotransmitterler sentezleyen olgun nöral hücrelere farklılaştıkları da rapor edilmiştir (107,51,52,117).

Literatürde, AEH lerin DA üretmesiyle L-trozin, BH₄ in zamanla çoğaldığı ve trozin hidroksilaz (TH) inhibitörü olan α-metil-*D*-trozinin azaldığı bildirilmiştir. E.Coli lacZ belirteç geni (β-gal) ile enfekte edilen AEH' ler, immünsüprese farelerin dopamin deplesyonu yapılmış striatumu içine nakledildiğinde, hedef dokuda, 2 hafta sonra aşırı çoğalma göstermeksizin canlı kaldığı β-gal-pozitif hücrelerle gösterilmiştir (50). Bu çalışmada, TH immünreaktif hücrelerin gösterilmesi ile Parkinson hastası fare beyninde, AEH lerinin DA ürettiği gösterilmiştir (51).

Amniotik sıvı kökenli MKH' ler, domuzlardaki myokard infarktüsü modellerinde kullanılmış, bu hücrelerin kardiomyositlere farklılaşmadığı ama vasküler tipte hücrelere farklılaşabildiği belirtilmiştir (108), ayrıca amniotik sıvı kökenli MKH' lerin, neonatal fare kardiomyositleri ile FGF-2 veya aktivin-a ile stimülasyonu ile kültüre edilip in vivo uygulandığı bir başka çalışmada, yaklaşık iki ay sonra alıcı fare

kalbinde, kardiomyositlere benzer değişiklik gözleendiği ve kalbe ait birçok geni, GATA4, MLC2a, cTnI, cTnT, eksprese ettiği belirtilmiştir (135).

Bir başka çalışmada ise, c-kit pozitif amniotik sıvı KH' leri immünsupresse veya immün yetmezlikli farelerde myokard infarktüsünde kullanılmış ve bu hücrelerin rejeksiyonundan bahsedilmiştir. Ancak, rejeksiyonun nedeni olarak c-kit selektif olan hücreler gösterilmiş, bu hücrelerin eritroid hücre soyuna farklılaşmış olabileceğini ve immün cevabın buna bağlı olabileceği hipotezi öne sürölmüştür (16).

Amniotik sıvı KH' leri, skaffoldlara emdirilip, bir hafta osteojenik karışım içeren besiyerine maruz bırakılmış, in vivo cilt altı uygulamadan aylar sonra kemik oluşumunun sağlandığı gözlenmiş ve alkalen fosfataz sekrete ettiği belirtilmiştir. Uygulamadan iki ay sonra mikro CT ile oluşan mineralizasyon doğrulanmıştır (18). Bu çalışmada, amniotik sıvı MKH' lerinde osteojenik farklılaşma sağlanarak kemik formasyonunun oluştuğu ve kolaylıkla doku mühendisliği ile uygulanabileceği gösterilmektedir (8,18).

MKH lerin umut vaadeden klinik uygulama alanlarından biri de konjenital anomalilerdir. Konjenital anomalilerin cerrahi tedavisi, kimi durumlarda yetersiz doku nedeniyle problem yaratabilmektedir. Bir çok vakada rekonstruksiyon için protezler kullanılmakta ve enfeksiyon, graft hasarı, dokunun afonksiyone olması gibi komplikasyonlar yaşanmaktadır. Kök hücre destekli fetal doku mühendisliği, neonatal periotda doğum kusurlarının cerrahi rekonstruksiyonunda ümit vericidir. Amniotik kök hücrelerin bu uygulamalarda ayrı bir önemi olduğu düşünölmektedir. Hamile koyunlarda yapılan bir çalışmada, 24 saat költür aşamasını takiben, amnion sıvı kökenli fetal kök hücreler ve adult kök hücrelerin büyüme/çoğalma potansiyelleri ve DNA içeriği incelenmiş, amnion sıvısının büyüme/çoğalma potansiyeli ve DNA içeriği, fetal ve erişkin dokulardan daha fazla bulunmuştur (55,56).

Fetal doku yapılarının, amniotik sıvı kökenli hücrelerden üretilip üretilemediğini belirlemeyi hedefleyen bir çalışmada, insan amniotik sıvı hücreleri özelliikli költür şartları altında titiz bir şekilde üretilmiş, immünhistokimyasal olarak bu hücrelerin vimentin, SMA, sitokeratin 8-18, FSP için pozitif olduğu, Desmin ve CD 31 için negatif olduğu gösterilmiştir. Bu profil, MKH, fibroblast/myofibroblast hücrelerinde gözlenmiştir. Üretilen bu hücreler daha sonra poliglikonik asit polimer/poli-4 hidroksibutirat "skaffold" üzerine ekilmiş, oluşan yapı optik ve tarayıcı elektron

mikroskobu ile analiz edilmiş, polimer matriksleri çevreleyen kalın, birbirine tutunmuş hücre tabakaları ve her iki “skaffold”da sıkı hücre tutunması gösterilmiştir. Çalışmanın, amniotik sıvı hücrelerinin fetal doku mühendisliği için verimli ve ideale yakın bir hücre kaynağı olduğu fikrini desteklediği ileri sürülmüştür (55,56). Hayvan çalışmalarında diyafragmatik herni veya gastroşizis gibi pek çok konjenital anomalide, amniotik kök hücreler konjenital bozukluğu onarmak için bir yama olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar raporlanmıştır (28,55,56). Yenidoğan kuzularda oluşturulan diyafragmatik defekt, hücrel ve hücrel olmayan dermis ve ince barsak submukozasına ait yamalarla kapatılmaya çalışılmış, otolog amniotik sıvı hücrelerinin kullanıldığı yama naklinde postoperatif 1 yıllık izlemi takiben, defekte rekürrensini daha az olduğu, hücrel grafitin gerilme kuvvetine karşı daha dayanıklı olduğundan bahsedilmiştir (28).

Kimi araştırmacılara göre konjenital defektlerin cerrahi rekonstrüksiyonunda (Fetal doku mühendisliği) AS MKH leri, minimal invaziv bir teknikle elde edilip kültüre edilebilir ve gebeliğe paralel olacak şekilde istenilen şekilde yönlendirilebilirler (56). Otolog hücrel bioprotezin, doğumdan hemen sonra uygulanabileceği düşünülmektedir. Benzer çalışmalar, hayvan deneylerinde başarılı olmuş ve bu çalışmalarda komplikasyonsuz bir şekilde ve kolayca fetal doku elde edilebileceği, yaşamın ileri dönemlerinde kullanılmak istendiğinde de AS MKH lerinin dondurulabileceği belirtilmiştir (55,56).

Amniotik sıvı kökenli KH’ leri kullanan doku mühendisliği uygulamalarında son gelişmelerden biri, in vitro böbrek organogenezisinin sağlanmasıdır. Bu çalışmada, primordial fare metanefrik böbreği steril durumda laboratuvar ortamında diseke edilmiş, c-kit+, yeşil floresan protein (GFP) ve Lac Z geni enfekte edilmiş amniotik sıvı hücreleri ile işleme sokulmuş ve 2-10 gün sonra farklılaşma için gerekli olan genetik modifikasyon veya ekzojen böbrek üretimini sağlayan proteinlere gerek olmadan, böbrek dokusunda GFP ve Lac Z ile pozitif boyanma olduğu ve “glial derived neurotrophic factor” (GDNF), “Zona Occludens-1” (ZO-1) ve “claudin” ekspres ettiği gözlemlenmiştir (87).

KH temelli tedavide, reflü nefropatisi olan çocukların böbrek fonksiyonu tam olarak bozulmadan önce, hasarlı böbreğin amniotik sıvı kökenli KH ler ile tedavisi, European Union KIDSTEM projesinin ana hedefi olarak belirlenmiştir (112,113). Amniotik sıvı kökenli MKH ler, rutin amniosentez örneklerinden kolaylıkla elde edilen

ve gelecekte, kök hücre bankaları ile hayatın ileri dönemlerinde gerekebilecek otolog hücre tedavilerinde, allojenik hücre nakillerinde alıcılarla donör hücreleri arasında uyuma gerek kalmadan kullanılabilecek, kök hücre araştırmalarında, doku mühendisliğinde, gen tedavisinde ve maternal-fetal tıpta uygun araçlar olarak kullanılabilecek bir kaynak olarak değerlendirilmiştir (20,25,120,112,113).

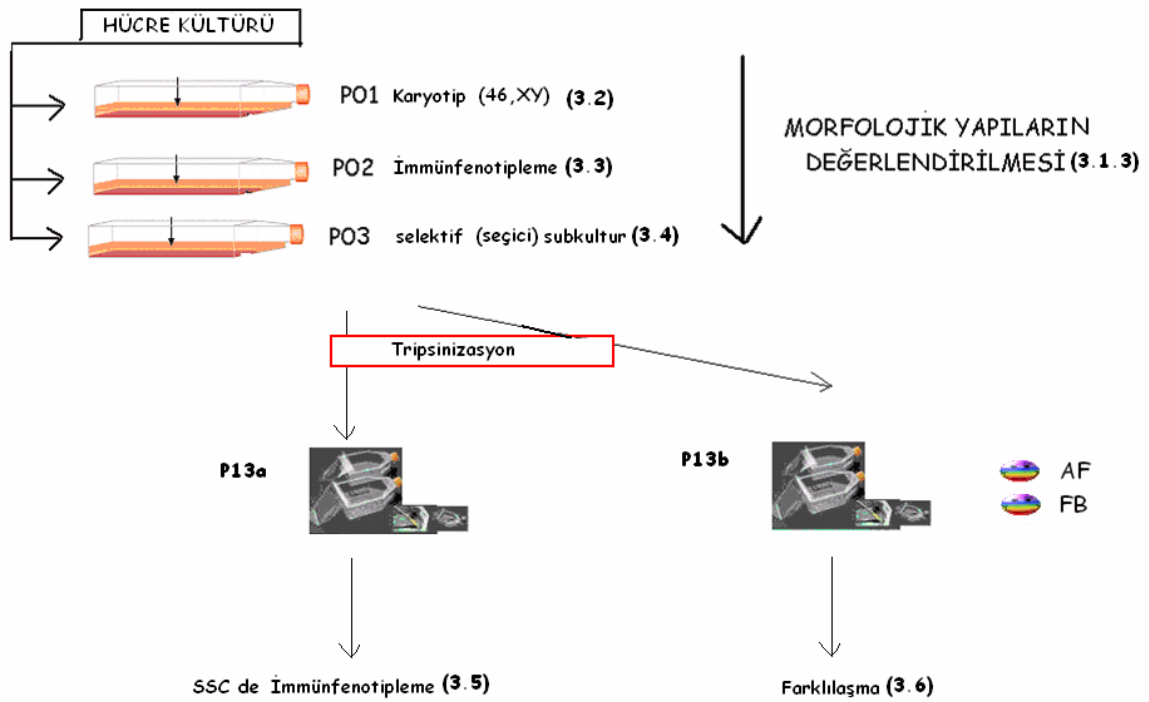
Klinik uygulamalarda önemli konulardan birisi de, hücre temelli tedavilerde kullanılacak hücrelerin ksenojenik materyal ile temasıdır. Kunisaki ve ark., (2007) çalışmalarında, amnion sıvısı hücrelerinin, FDS (Fetal dana serum) ve ABS (AB insan serumu) ile üretildiğinde, hücre çoğalmaları arasında bir fark olmadığı belirtmiştir. FDA (US Food and Drug administratio Agent) onayının sağlanması için, ABS kullanılmasının öneminden bahsetmiş ve böylelikle ksenojenik materyalden kaynaklanabilecek bakteriyel, viral ve prion patojenlerle kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılabileceği belirtilmiştir (64).

Hücre tedavilerindeki ilk çalışmalar, amniotik sıvı kökenli kök hücrelerin, en az invaziv yolla elde edilmeleri, sayılarının ve çoğalma kapasitelerinin yeterli olması, hücre naklini takiben red edilmemeleri, konakçı dokuya entegre olabilmeleri, in vitro/in vivo tümöral doku oluşturmamaları ve kontrolsüz çoğalmanın olmaması özellikleri nedeni ile hücre tedavisi klinik uygulamalarında önemli bir yer kapsadığını göstermekte, amniotik sıvı kökenli MKH lerin klinik uygulamalardaki ümit vaadeden önemini açık olarak vurgulamaktadır.

Bilgilerimiz dahilinde ülkemizde fetal kök hücre ile ilgili yayınlar son derece az sayıdadır (54); amniotik hücrelerin mezankimal kök hücre potansiyeli, farklılaşma özellikleri ve morfolojik yapılanma ilişkileri ile ilgili bir araştırma ise henüz yayınlanmamıştır.

4. MATERYAL VE METOD

Çalışma, amniotik sıvı kökenli hücrelerden fetal karyotip tayini, kültür hücrelerinin morfolojik değerlendirilmesi, yüzey antijenik belirteç tayini (immünolojik değerlendirilmesi) ve kök hücre tanımlaması, seçici (selektif) sub-kültür üretimi, sub-kültür hücrelerinde immünfenotipleme ve osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmanın gösterilmesi olmak üzere başlıca 7 aşamada gerçekleştirildi (Şekil-17).



Şekil-17: Materyal-Metodun şematik çizimi

3. 1. Amniotik sıvı kökenli kök hücre izolasyonu ve hücre kültürü

3. 1. 1. Hücre Kaynağı

Çalışmada 2. trimester amniotik sıvı hücreleri kullanıldı. Hücreler 16 ve 19 hafta arasında, genetik tanı amaçlı rutin amniosentez yapılan 15 prenatal tanı olgusunun “atık” kültüre hücrelerinden elde edildi. Fetal ultrasonografide malformasyon saptanan fetüsler ile hemorajik özellikteki amniotik sıvı hücreleri çalışma dışında bırakıldı. Etik kurul onayını takiben her olgudan gönüllü “olur formu” (konsent) alındı [OMÜ Rektörlük projeleri, T-393, T-394].

3. 1. 2. Hücre kültürü

Amniotik sıvı örnekleri, 1500 rpmde 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen hücre çöktürüsü 3 ml, 100 U/ml penisilin, 0.1 mg/ml streptomisin ve % 1 L- Glutamin (Gibco) içeren Bio-AMF-1 (Biological Industries, Kibutz Beit Haemek) ile süspanse edilip 3 farklı 25 cm² lik üreme kabına (flask) (Nunc, Rochester, MN) ekildi. Flasklar P0₁, P0₂ ve P0₃ olarak isimlendirildi. 7 gün sonra, yapışmayan hücreler atıldı ve flask yüzeyine yapışan hücrelere taze besiyeri eklendi. Yapışan hücreler tam olarak kültür kabını doldurunca, P0₁ flaskı rutin sitogenetik analiz için (fetal karyotip tayini) kullanıldı (105). Atık hücre durumunda kalan P0₂ ve P0₃ flasklar ileri çalışmalar için kullanıldı.

3. 1. 3. Hücre morfolojisi

Tüm flasklar, 2 haftalık kültür ve sub-kültür sürecinde, morfolojik karakteristik özellikleri açısından ters (invert) mikroskopta (OLYMPUS CKX41) incelendi ve görüntü alındı. Koloniler literatürde benzer çalışmalar temelinde belirlenmiş ve tanımlanmış 3 hücre tipi temelinde incelendi: (1). hücre tipi “amniotik sıvı spesifik hücre tipi (AF)”, (2). hücre tipi “fibroblastoid hücre tipi (FB1, FB2)” ve (3). hücre tipi ise “epiteloid hücre tipi (E)” olarak isimlendirildi (78,37,31,32,33,95).

3. 2. Karyotipleme

P0₁ hücreleri konvansiyonel yöntemlerle sitogenetik analiz için kullanıldı (105). 46,XY normal karyotipe sahip materyal belirlendi ve atık durumda kalan P0₂ ve P0₃ flaskları ileri çalışmaya alındı.

3. 3. İmmüfenotipleme

P0₂ flaskında (15 Olgı), yapışan hücreler flaskı doldurunca tripsin/EDTA C 10X solusyon (Bio. Ind., 03-053-1) ile tripsinize edilip kaldırıldı. Fosfat Buffer Salın (PBS) ile iki kez yıkandı. Beklemeden, monoklonal antikorlar (Tablo-XIII) ile boyanan hücreler, FACSCalibur (Becton Dickinson, Biosciences) akım sitometri cihazı ile okundu ve “Cell Quest Software” [Becton Dickinson immünsitometri sistemi, Mac OS X 10.3.6 (7R28)] programında analiz edildi. Otofloresan ve uygun izotipik kontrol kullanılarak hazırlanan örnekler, negatif kontrol olarak kullanıldı. Kadranlar veya

histogram işaretleyiciler, bu negatif kontrollere göre ayarlandı. Her olgu için 10 test tüpü (5 ml “polystyrene round-bottom tube” BD Falcon™) hazırlandı. Tüplerin üstlerine olgunun kodu, selektif sub-kültür ise tipi, tüpte kullanılacak antikorun ismi ve tüp numarası yazıldı (Tablo-XIII).

Tablo-XIII: İmmüfenotipleme protokolü

<u>TÜP NO</u>	<u>ANTİKOR</u> (Becton Dickinson, Biosciences)
1	CD 45 (FITC) / (Bazen CD 14) (PE)
2	Ig G1κ (FITC) / Ig G1κ (PE) (izotipik kontrol)
3	CD 34 (FITC) / CD 73 (PE)
4	HLA-DR(FITC) / CD 166 (PE)
5	/ CD 29 (PE)
6	/ CD 44 (PE)
7	/ CD 90 (PE)
8	/ CD 49e (PE)
9	HLA-ABC (FITC) /
10	Otofloresan kontrol (amniyon hücreleri, hiçbir monoklonal antikor ile boyanmadan aynı işlemlerden geçirildi)

“Fluorescein isothiocyanate” (FITC), “Phycoerythrin” (PE), “Cluster of Differentiation” (CD), İmmünglobulin G1-kappa (Ig G1κ)

Tüplere, hücre konsantrasyonu 1×10^6 /ml olacak şekilde 100’ er µl amniotik sıvı örnekleri kondu. Üzerine uygun titrasyonlarda (5-10 µl arası) monoklonal antikorlar konularak vortekslendi. 15 dk, 4° C de ve karanlıkta inkübe edildi. Üzerine 1 ml yıkama solusyonu (PBS+ % 0,1 Na azid) eklenerek, 1400 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Hücre çöktisine tekrar 0.5 ml yıkama solusyonu eklenerek, FACSCalibur (Becton Dickinson, Biosciences) akım sitometri cihazı ile okundu ve “Cell Quest Software” [Becton Dickinson immünsitometri sistem, Mac OS X 10.3.6 (7R28)] programında analiz edildi.

3. 4. Seçici (Selektif) Sub-kültür (SSC)

P0₃ flaskında yapışan hücre kolonileri, morfolojik olarak (OLYMPUS CKX41) günlük izlendi. Sub-kültür için mekanik kazıma metodu kullanıldı (BD Falcon™ cell

scraper). Heterojen koloniler arasından tek bir hücre tipine (FB/AF) sahip koloniye ayrı ayrı üretmek için, diğer hücre tiplerine ait koloniler mekanik olarak kazındı. Seçilmiş kalıcı koloniler flaskı doldurunca, sub-kültür yapılan flask, tripsin/EDTA C 10X solusyon (Bio. Ind., 03-053-1) ile tripsinize edilip iki ayrı flaskta çoğaltıldı ve çoğaltılan flasklardan biri hücre yüzey antijeni tayini için kullanılırken (immünfenotipleme), diğeri farklılaşma çalışmalarını sağlamak için kültür devamı yapmak üzere kullanıldı.

3. 5. Seçici (Selektif) Sub-kültür (SSC) de İmmünfenotipleme

Seçici sub-kültür yapılan flasklardan (P1_{3a}) (10 Olgu) elde edilen hücreler, yukarıda değinilen yöntemle (bkz. Bölüm, 3. 3) immünfenotipik olarak yeniden değerlendirildi.

3. 6. Farklılaşma

3. 6. 1. Farklılaşma protokolü

Mezankimal kök hücrelerin adipojenik, osteojenik, kondrojenik farklılaşma potansiyellerini göstermek için özel uyarıcı maddeler içeren besiyerleri kullanıldı. Farklılaşma potansiyelleri, karakteristik morfolojik yapılarıyla ve histokimyasal boyanma özellikleriyle değerlendirildi.

3. 6. 1. 1. Osteojenik farklılaşma

Osteojenik farklılaşma çalışmalarında, in vitro kültür ortamında çoğaltılan hücreler, yöntem olarak Pittenger ve ark., (1999) nın literatür bilgileri doğrultusunda çalışıldı (89). Tripsinize edilmiş hücreler, yaklaşık 1 hafta kültür aşamasından sonra osteojenik besiyeri ile [% 10 Fetal dana serum (FDS) (Euroclone Ltd. UK), deksametazon (100 nM, Sigma, USA), beta gliserofosfat (10 mM, Sigma, USA) ve askorbik asit (0,2 mM, Sigma, USA) içeren DMEM-LG (Euroclone Ltd. UK)] işleme tabi tutuldu. 21 gün boyunca her 3-4 günde bir besiyeri tazelendi. 21. günün sonunda, ekstraselüler matriks kalsifikasyonunun bir delili olan kalsiyum birikimi makroskopik olarakta gözlenen beyaz madde birikimi şeklinde gözlemlendi ve farklılaşan hücreler, literatürde benzer çalışmalarda değinildiği şekilde “Alizarin Red-S” ile boyanarak belirlendi (98,47,89,107,92,48,120,8,20,18).

3. 6. 1. 2. Adipojenik farklılaşma

Adipojenik farklılaşma çalışmalarında, in vitro kültür ortamında çoğaltılan hücreler, yöntem olarak Pittenger ve ark., (1999) nın literatür bilgileri doğrultusunda çalışıldı (89). Tripsinize edilmiş hücreler, flask tam doluncaya kadar beklenildi. Sonra, adipojenik besiyeri [% 10 FDS (Euroclone Ltd. UK), dekzametazon (1 µM, Sigma, USA), indometazin (60 µM, Sigma, USA), 3-isobutil-l-metilksantin (IBMX) (500 µM, Sigma, USA) ve insulin (5 µg/ml, Sigma, USA) içeren DMEM-LG (Euroclone Ltd. UK)] ile 3-4 günde bir besiyeri tazelandı ve 21. günde adipojenik farklılaşma varlığını gösterebilmek için, “Oil-Red O” ile boyandı (99,89,17,9,102,47,121,134,106,121,20,8,48,92).

3. 6. 1. 3. Kondrojenik farklılaşma

Kondrojenik farklılaşma çalışmalarında, yöntem olarak Pittenger ve ark., (1999) nın literatür bilgileri doğrultusunda çalışıldı (89). Tripsinize edilmiş hücreler, 2 ayrı 15-ml polipropilen santrifüj tüpü içerisine (2.5×10^5 hücre) konulup 1000 rpm da 5 dakika santrifüj edildi ve pelet formatına getirildi. Pelet 37 °C de % 5 CO₂ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kondrojenik besiyeri [dekzametazon (100 nM, Sigma, USA), TGF-B3 (10 ng/ml, Peprotech, USA), askorbik asit (50 µg/ml, Sigma, USA), ITS+Premix (50 mg/ml 500 B&D Biosciences) içeren DMEM-HG (Euroclone Ltd. UK)] ile işleme tabi tutuldu ve 21 gün boyunca her 3-4 günde bir besiyeri tazelandı. 21. günün sonunda, peletten 5 µm kalınlığında “frozen” kesitler alındı ve preparatlar, “Alcian Blue” ve “Hematoksilen Eosin” ile boyandı (71,92,59).

3. 6. 2. Histokimyasal Boyama

3. 6. 2. 1. Oil-Red O ve Alizarin Red-S Boyama:

“Oil-Red O” ve “Alizarin Red-S” ile histokimyasal boyama, Pittenger ve ark., (1999) ve In ‘t Anker ve ark., (2003) nın çalışmalarında belirtildiği gibi yapıldı (89,47). Tüm kuyucuklardaki (CELLSTAR, Greiner bio-one, TC-Plate 12 well) besiyerleri boşaltıldı ve 1 ml PBS ile yıkandı. Sonra, tüm kuyucuklara 1 ml formol konulup 10 dakika beklendi. Süre sonunda, formol boşaltılıp, osteojenik farklılaşma besiyeri ile işleme tabi tutulmuş kuyucuklara 1 ml “Alizarin Red S (Sigma, USA)”, adipojenik farklılaşma besiyeri ile işleme tabi tutulmuş kuyucuklara ise 1 ml “Oil Red O (Sigma-

Aldrich, USA)” boyası konuldu. Kontrol kuyucuklarından 1 tanesi Oil Red O ile diğeri de Alizarin Red S ile boyandı. 15 dakika sonra, tüm kuyucuklar 3 kez distile su ile yıkandı. Kuyucukların kurutulmasından sonra mikroskopta (Olympus CKX41) 10x 100 büyütmede farklılaşma varlığı incelendi.

3. 6. 2. 2. “Alcian Blue” ve “Hematoksilen Eosin” ile Boyama:

Patolojide, yarı otomatik döner kollu mikrotomda (RM2125RT Leica) 5 µm lik kesit alınan kıkırdak hücre lamaları aşağıdaki şekilde boyandı (71,44).

3. 6. 2. 2. 1. Alcian Blue (pH:1) Boyama:

- Ksilen 2 dak-2 dak
- % 100 Alkol 2 dak-2 dak
- % 95 Alkol 2 dak-2 dak
- % 80 Alkol 2 dak-2 dak
- Distile su 2 dak-2 dak
- Alcian Blue (Sigma, USA) 30 dak.
 - 1 gr Alcian Blue
 - 100 ml 0,1 N Hidroklorik asit (HCl)
- Su 2 dak
- % 80 Alkol 2 dak-2 dak
- % 95 Alkol 2 dak-2 dak
- % 100 Alkol 2 dak-2 dak
- Ksilen 2 dak-2 dak

Tamamen kurutulmuş lamalar üzerine 2 damla ksilen damlatılarak üzerine lamel kapatılıp ışık mikroskopunda incelendi (71).

3. 6. 2. 2. 2. Mayer’ in Hematoksilen Eosin Boyama

- o Ksilen 2 dak-2 dak
- o % 100 Alkol 2 dak-2 dak
- o % 95 Alkol 2 dak-2 dak
- o % 80 Alkol 2 dak-2 dak
- o Distile su 2 dak-2 dak

- o 4dk Hematoksilen
 - 2 gr Hematoksilen
 - 100 gr Amonyum-alimunyum sülfat
 - 2 gr Sitrik asit
 - 0.4 gr Sodyum iyodat
 - 100 gr Kloral hidrat
 - 2 litre Distile su
- o 2dk Su
- o 2 dk Amonyaklı su (1 lt su+1 ml amonyak)
- o 2 dk Su
- o 2 dk Alkol
- o 2 dk Eosin
 - 6 gr Eosin
 - 450 ml Distile su
 - 1050 ml Alkol
 - 60 ml GAA (% 1 asetik asit, % 70 alkol)
- o 2 dk Alkol serisi
 - % 80 Alkol 2 dak-2 dak
 - % 95 Alkol 2 dak-2 dak
 - % 100 Alkol 2 dak-2 dak

Ksilen 2-4-6 dk ve entellan ile kapatma (44).

4. BULGULAR

4. 1. Amniotik sıvı kökenli hücre izolasyonu ve hücre kültürü

4. 1. 1. Hücre Kaynağı

Hücre kaynağı olarak çalışmaya 15 amniosentez olgusu dahil edildi. Gebelik haftası 16^{+3} ve 19^{+5} hafta arasında, anne yaşı ise 24 ve 44 yaş arasında değişmekte idi (Tablo-XIV).

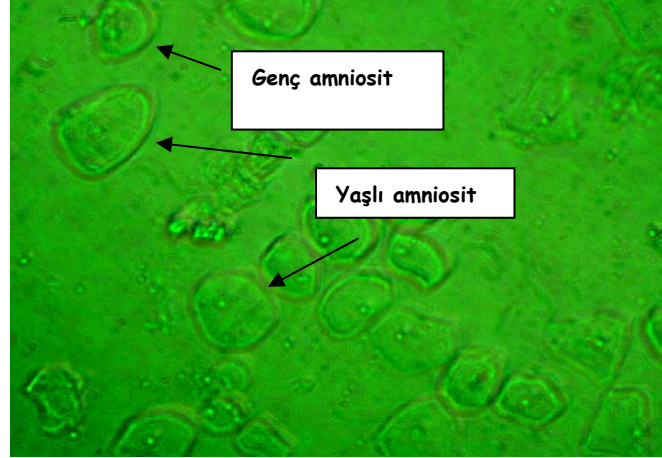
Tablo-XIV: Amniosentez Olguları

KOD	YAŞ	GEBELİK HAFTASI
001	43	17^{+4}
002	38	18^{+3}
003	37	19
004	30	17^{+6}
005	37	19^{+4}
006	32	18
007	24	18^{+6}
008	30	17^{+4}
009	44	16^{+3}
010	37	18^{+5}
011	26	17^{+2}
012	32	19^{+4}
013	31	19^{+5}
014	39	18^{+2}
015	41	17^{+1}

15 prenatal tanı endikasyonu olan gebelikten amniosentez yolu ile elde edilen hücrelerin tümünde kültür işlemleri, immünofenotipleme ve farklılaşma işlemleri önceden planlandığı şekilde yürütüldü ve değerlendirildi (Şekil-17).

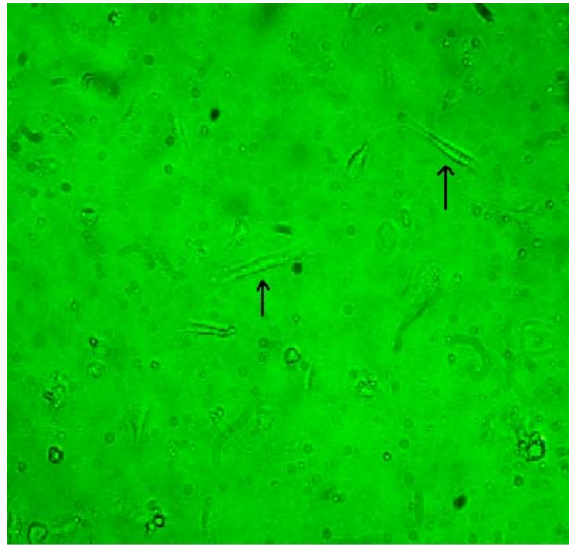
4. 1. 2. Hücre kültürü ve hücre morfolojisi

Steril koşullarda laboratuvarımıza ulaştırılan amnion sıvısından 3 ayrı flaska ekilen hücreler, farklı olgunlukta (genç ve yaşlı) amniositlerden oluşmakta idi (Şekil-18);

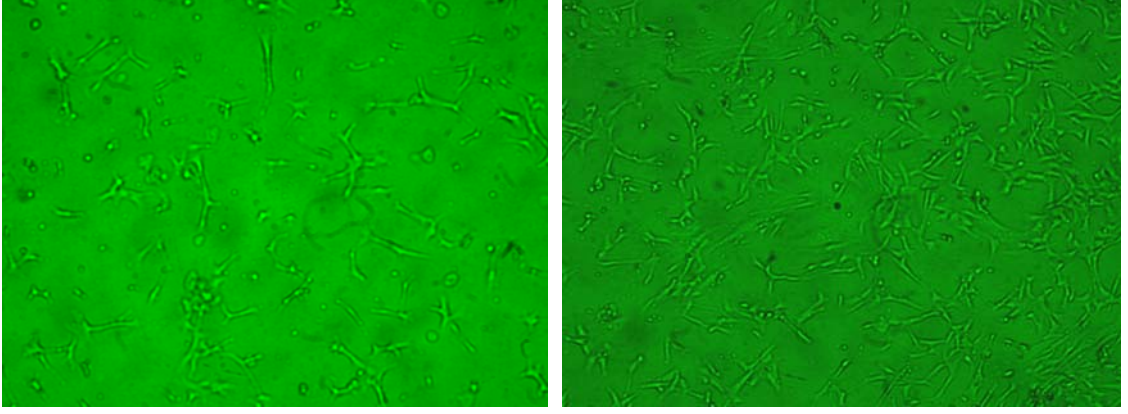


Şekil-18 : Amnion sıvı hücrelerinin kültürdeki ilk gün görünümü (OLYMPUS CKX41, 10X)

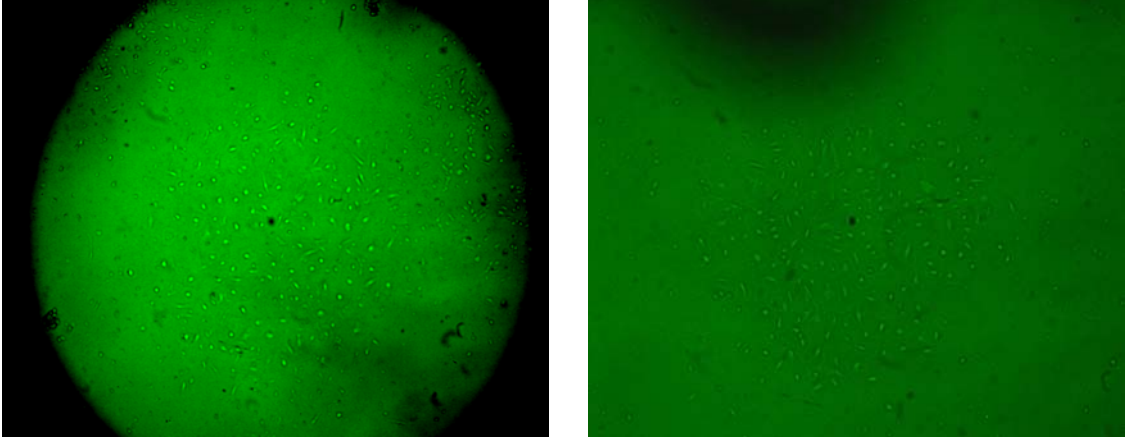
İlk hücre yapışmaları, primer amniotik sıvı hücre kültürünün ilk 24-48 saati içinde (Şekil-19) gözlemlendi. Kültürlerimizde amnion hücreleri, kültür kabı plastik yüzeylerine, flaskların % 20 sinde ilk 24 saatte yapışmış (13/66), 48 saatte flaskların % 36 sında (24/66), 72 saatte ise % 82 sinde (54/66) yapışma sağlanmıştır; geriye kalanlarda ise ilk hücre yapışmaları 4. günde izlenmiştir. İlk koloniler 3-5. gün oluşmuş (Şekil-20, 21, 22), 8-11. günlerde hücre yoğunluğu kültür kabının 2/3 ünü doldurmuştur. (bkz. Bölüm, 4.6.3, istatistiksel analizler)



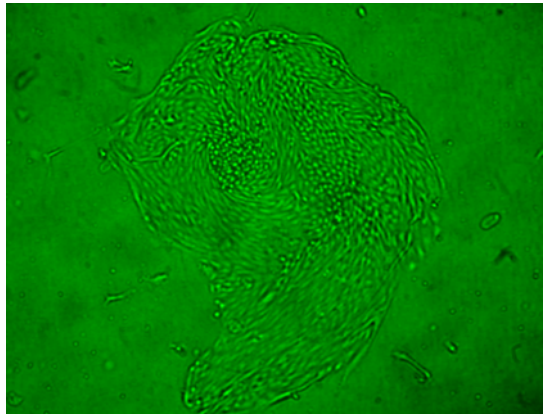
Şekil-19 : Kültür, ilk 24-48 saat, ilk hücre yapışmaları (OLYMPUS CKX41, 10X)



Şekil-20 : İlk 3-5 gün, FB2 tipi hücre yapışmaları (ilk koloniler) (OLYMPUS CKX41, 4X)



Şekil-21 : İlk 3-5 gün AF-tipi hücre yapışmaları (ilk koloniler) (OLYMPUS CKX41, 4X)

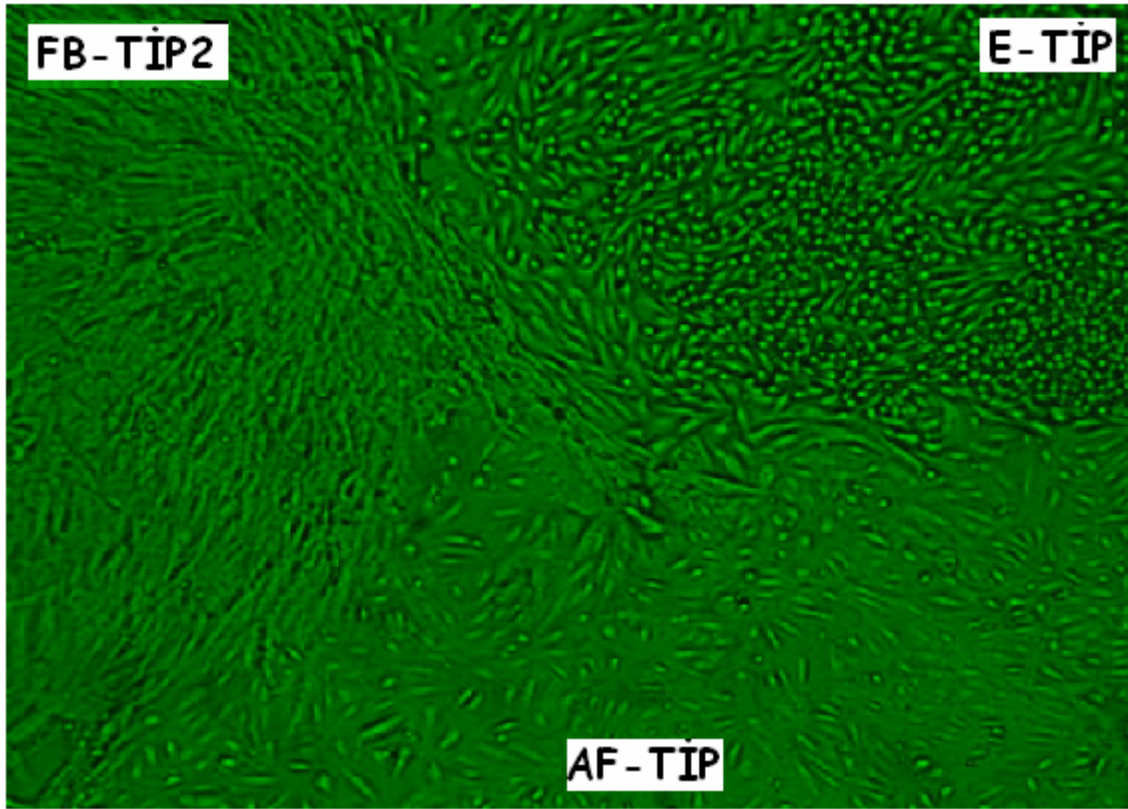


Şekil-22: İlk 3-5 gün epitelooid tipte hücre yapışmaları (ilk koloniler) (OLYMPUS CKX41, 4X)

2 haftalık izlem sürecinde koloniler 3 hücre tipinde gözlemlendi (78,37,31,32,33,95). (1) Amniotik sıvı spesifik hücre tipi (**AF**), (2) Fibroblastoid hücre tipi (**FB1, FB2**) ve (3) Epiteloid hücre tipi (**E**).

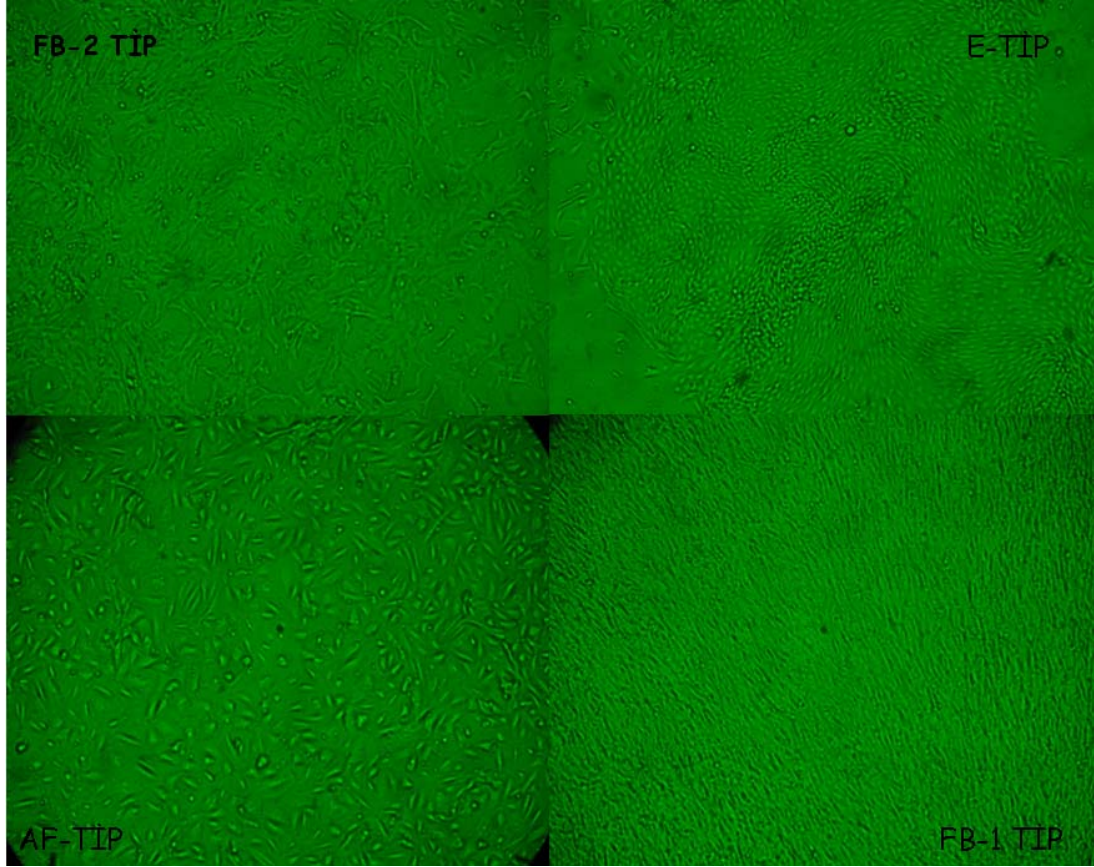
Fibroblastoid-tip hücreler birbirine paralel iğ şeklinde hücrelerdi; FB1 hücrelerinin uzun ve ince yapısı, FB2 hücrelerine göre daha homojen idi (Şekil-24). AF-tip hücreler sıkı bağlantılı olmayan, yuvarlak şekilli ve poligonal hücreler (Şekil-21), epiteloid-tip hücreler oldukça ise sıkı bağlantılı, küçük koloniler oluşturan, yuvarlak ve keskin kenarlı, adamsı morfolojiye sahip hücrelerdi (Şekil-22).

Kültürün başlangıç aşamasında, heterojen bir hücre popülasyonu mevcuttu: fibroblastoid (Şekil-20,23,24), AF-tip (Şekil-21,23,24) ve epiteloid hücre tipleri birlikte idi (Şekil-22,23,24).



Şekil-23 : Amnion hücre kültüründe bulunan hücre tipleri (OLYMPUS CKX41, 10X)

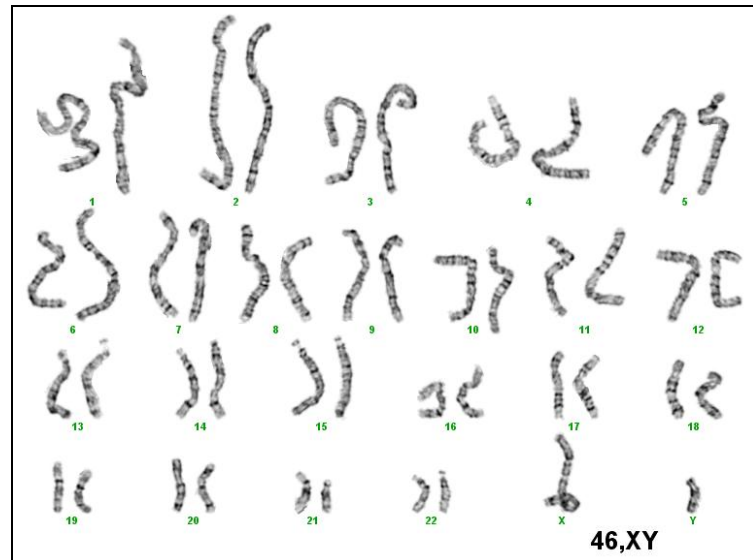
AF-tip hücreler bütün kültür işlemi sürecinde gözlemlendi; E-tipi hücreler kısa süre sonra önemli ölçüde azaldı. FB1-tipi hücreler ise, kültür işlemi sürecinde göreceli olarak geç dönemde, ortalama 10 günde ortaya çıktı (bkz. Bölüm, 4.6.3, istatistiksel analizler).



Şekil-24 : Amnion hücre kültüründe bulunan hücre tipleri (OLYMPUS CKX41, 10X)

4. 2. Karyotipleme

Çalışmaya alınan tüm olgularda, primer hücre kültüründe (P0₁) fetal sitogenetik analiz sonucu normal 46,XY olarak belirlendi (Şekil-25).



Şekil-25 : Primer hücre kültüründe (P0₁) fetal sitogenetik analiz

4. 3. İmmüfenotipleme

Primer hücre kültürünün 15-18. günlerinde (P0₂), 15 olguda akım sitometri cihazı ile hücre yüzey antijen ekspresyonu çalışıldı. İmmüfenotiplemede (IF), CD90, CD73, CD166, CD49e, CD44, CD29, HLA-ABC pozitif, CD34, CD45, HLA-DR negatif saptandı (Tablo-XV, XVI).

Tablo-XV: Primer hücre kültürüne ait immüfenotipik özellikler

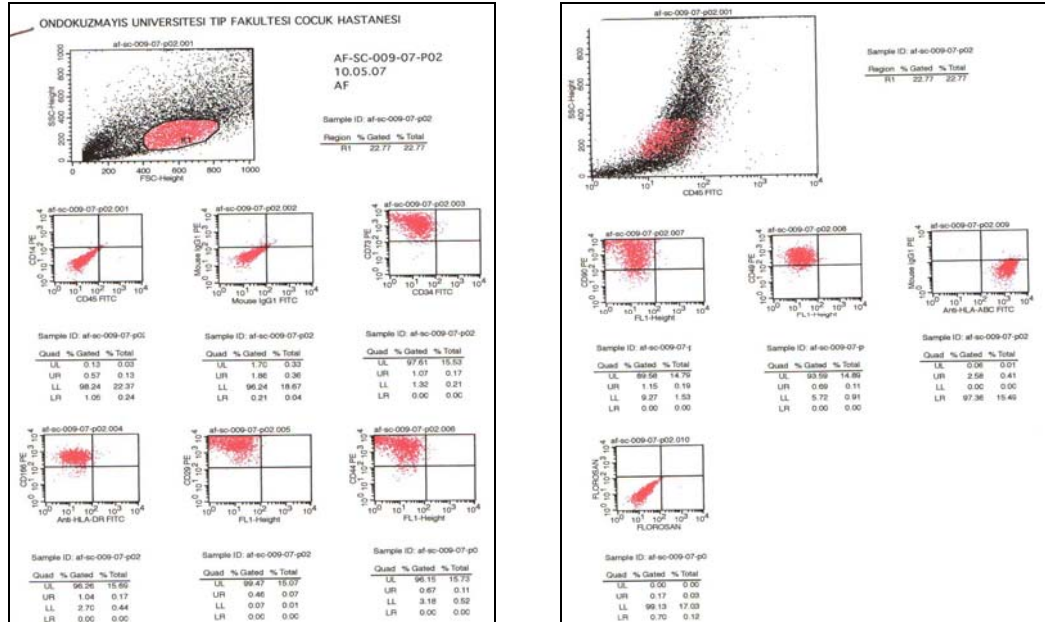
CD' ler	EKSPRESYON
CD 90	+
CD 73	+
CD 166	+
CD 49e	+
CD 44	+
CD 29	+
HLA-ABC	+
CD 34	-
CD 45	-
HLA-DR	-
CD 14	-

Tüm olguların “Dot-plot” (Şekil-26) ve “histogram grafikleri” (Şekil-27) çıkarıldı.

10 olguda ayrıca CD14 antikoru ile hücre yüzey antijeni bakıldı ve negatif bulundu (Tablo-XVI).

Tablo-XVI: Primer hücre kültürü (P0₂) “Dot-plot” IF sonuçları

Olgu Kodu	CD73	CD90	CD166	CD49e	CD44	CD29	HLA-ABC
001	96.85	94.06	99.52	99.01	99.73	100	99.82
002	99.60	93.57	99.62	98.29	99.58	100	99.79
003	99.55	84.95	99.64	99.21	99.80	100	100
004	96.30	84.18	99.18	98.62	100	100	99.85
005	98.51	89.34	99.76	98.20	99.95	100	99.87
006	97.63	87.43	99.77	99.61	100	100	100
007	89.77	82.44	93.13	87.74	97.69	99.30	97.84
008	100	-	98.15	98.07	99.87	99.94	99.95
009	98.68	90.73	97.30	94.28	96.82	99.93	99.94
010	99.16	83.00	98.89	97.21	99.76	99.91	98.89
011	98.43	96.97	88.08	96.11	98.66	100	99.08
012	85.93	37.09	90.65	75.93	99.21	98.26	97.47
013	84.97	80.56	46.66	63.41	96.76	98.45	80.95
014	93.36	78.86	90.53	62.73	98.75	99.68	92.76
015	99.38	90.04	94.78	89.73	98.53	99.94	98.14
Ortalama	95,87	83,80	93,04	90,54	99,01	99,69	97,62

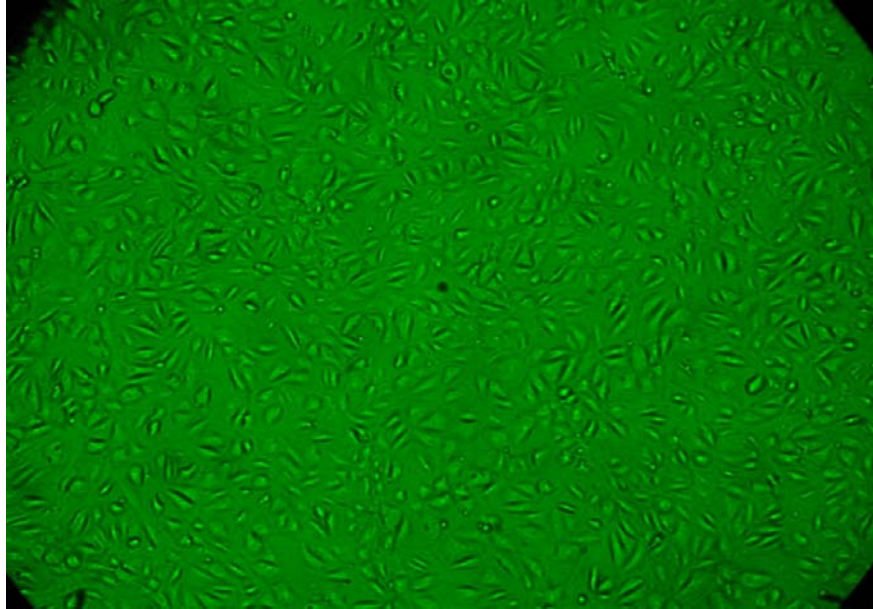


Şekil-26 : Primer hücre kültürüne (P0₂) ait örnek Dot-Plot (Olgu No.: 9)

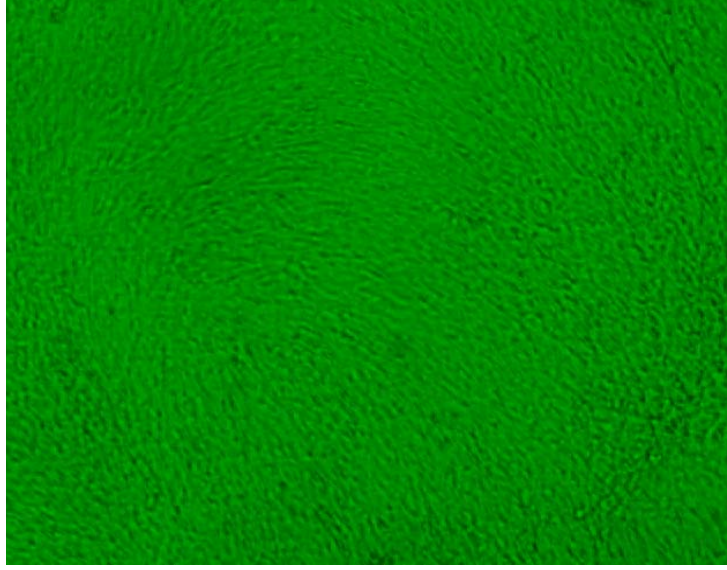
Tablo-XVII : SSC yapılan kùltùrlere ait bilgiler

OLGU KODU	SEÇİCİ (SELEKTİF) SUB-KÜLTÜR (SSC)
001	AF
006	AF
008	FB2
009	FB2
010	AF
011	FB2
012	FB2
013	AF
014	FB2
015	FB2

10 olgudan 4' üne AF-tip (Şekil-28)., 6' sına ise FB2-tip (Şekil-29) selektif sub-kùltür yapılabildi.

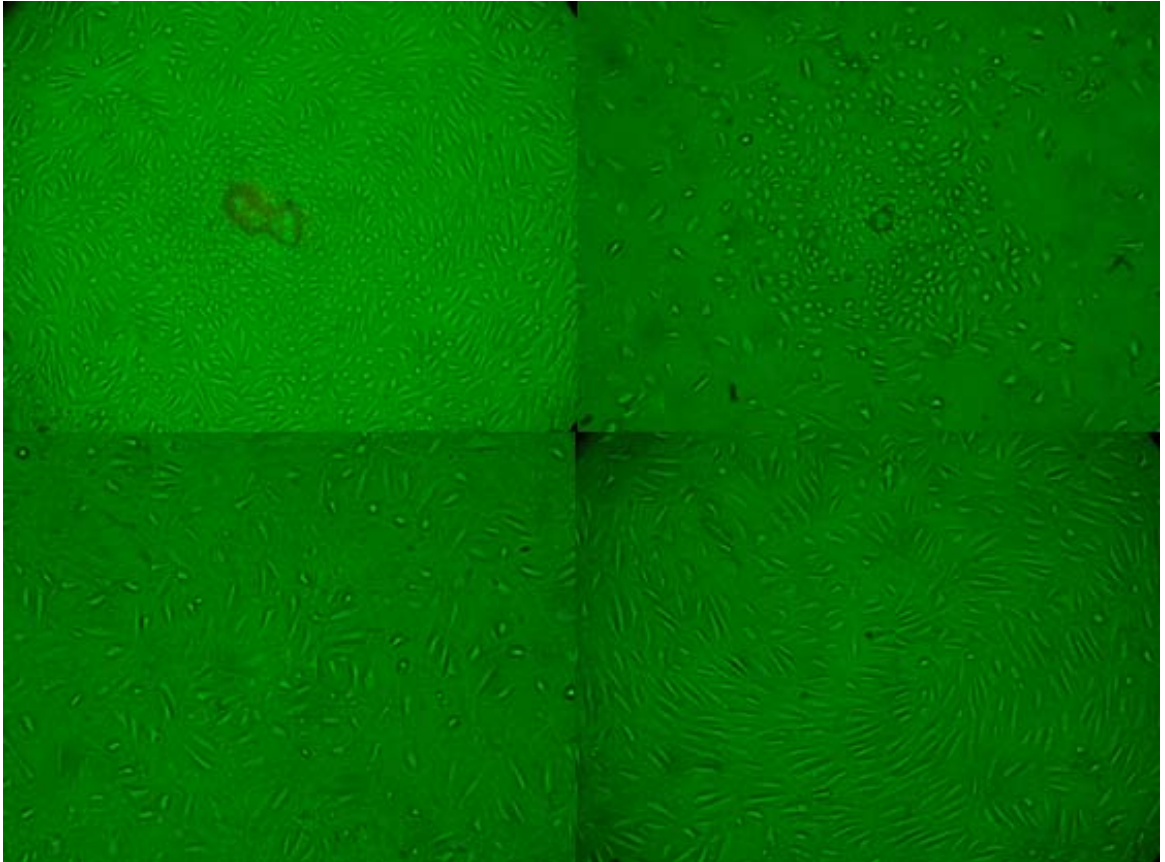


Şekil-28: AF kaynaklı selektif sub-kùltüre ait görüntü (Olympus CKX41, 10X)

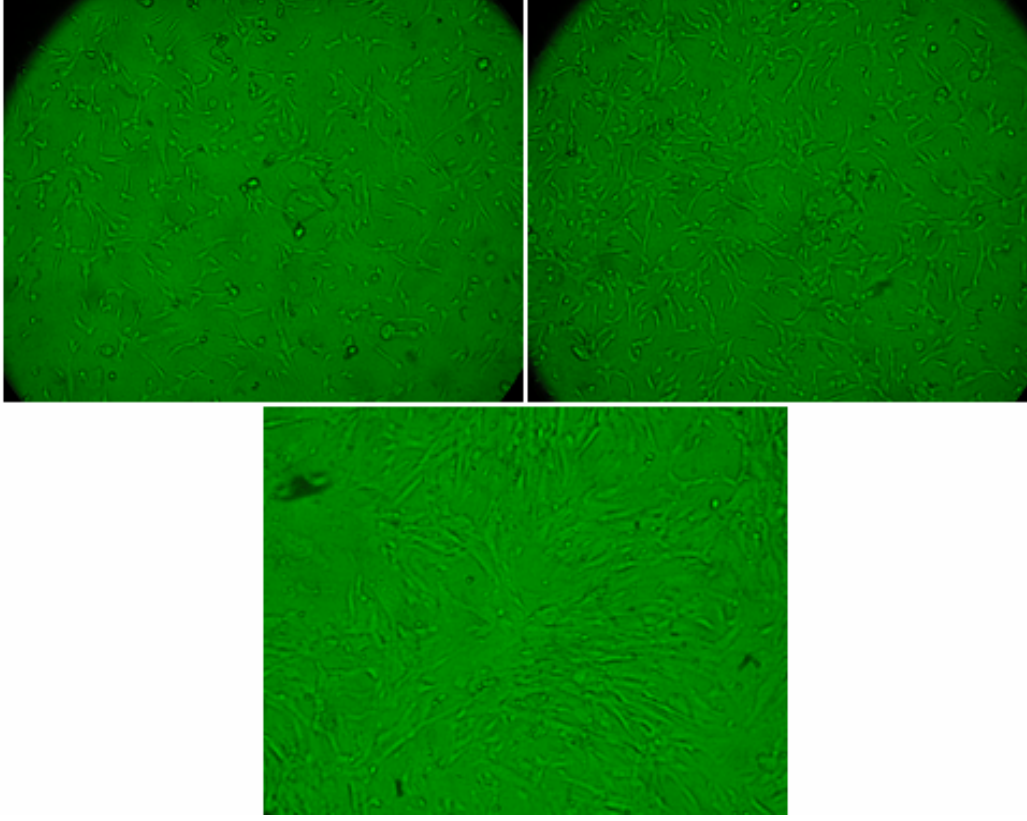


Şekil-29: FB2 kaynaklı selektif sub-kültüre ait görüntü (Olympus CKX41, 10X)

Kültür flaskı tüme yakın dolduğunda, sub-kültür yapılan flask, tripsin/EDTA C 10X solusyon (Bio. Ind., 03-053-1) ile tripsinize edilip iki ayrı flaskta çoğaltıldı (Şekil-30,31).

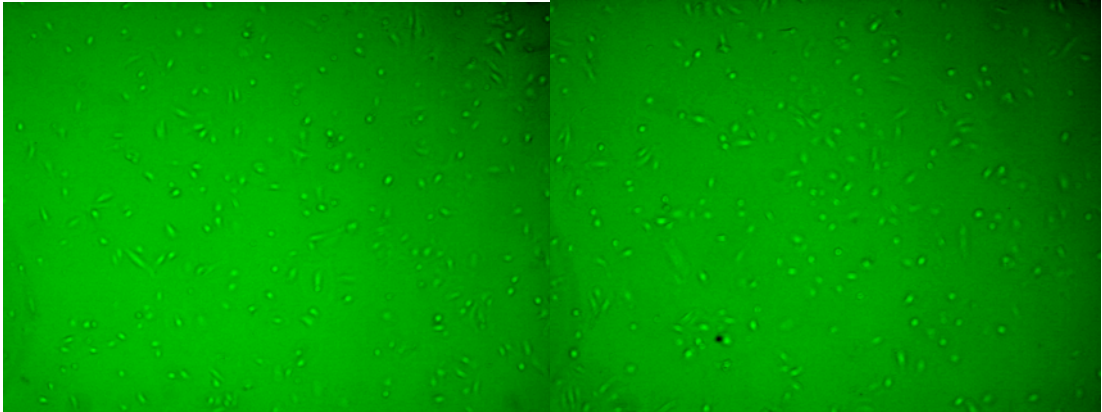


Şekil-30: AF kaynaklı selektif sub-kültürlerin tripsinizasyon sonrası görüntüleri (Olympus CKX41, 10X)



Şekil 31 : FB2 kaynaklı selektif sub-kültürlerin tripsinizasyon sonrası görüntüsü (Olympus CKX41, 10X)

FB2 ve AF kaynaklı selektif subkültürler tripsinizasyon işleminden sonra morfolojik özelliklerini korudu (Şekil-30,31). AF kaynaklı selektif subkültürlerde “embriyoid body” benzeri sferoid yapılanmalar gözlemlendi (Şekil-31). FB2 kaynaklı selektif sub-kültürler 3. pasaj sonrasında kültür devamlılığını sağlarken, AF kaynaklı selektif sub-kültürler aynı sürede dejenere oldu (Şekil-32).



Şekil-32: AF kaynaklı selektif subkültürler dejenere oldu (Olympus CKX41,10X)

4. 5. Seçici (Selektif) Sub-kültür (SSC) İmmünofenotipleme

P1_{3a} flaskında selektif sub-kültür yapılan 10 olguda, immunofenotipik olarak, CD90, CD73, CD166, CD49e, CD44, CD29, HLA-ABC pozitif, CD34, CD45, HLA-DR negatif saptandı (Tablo-XVIII, XIX).

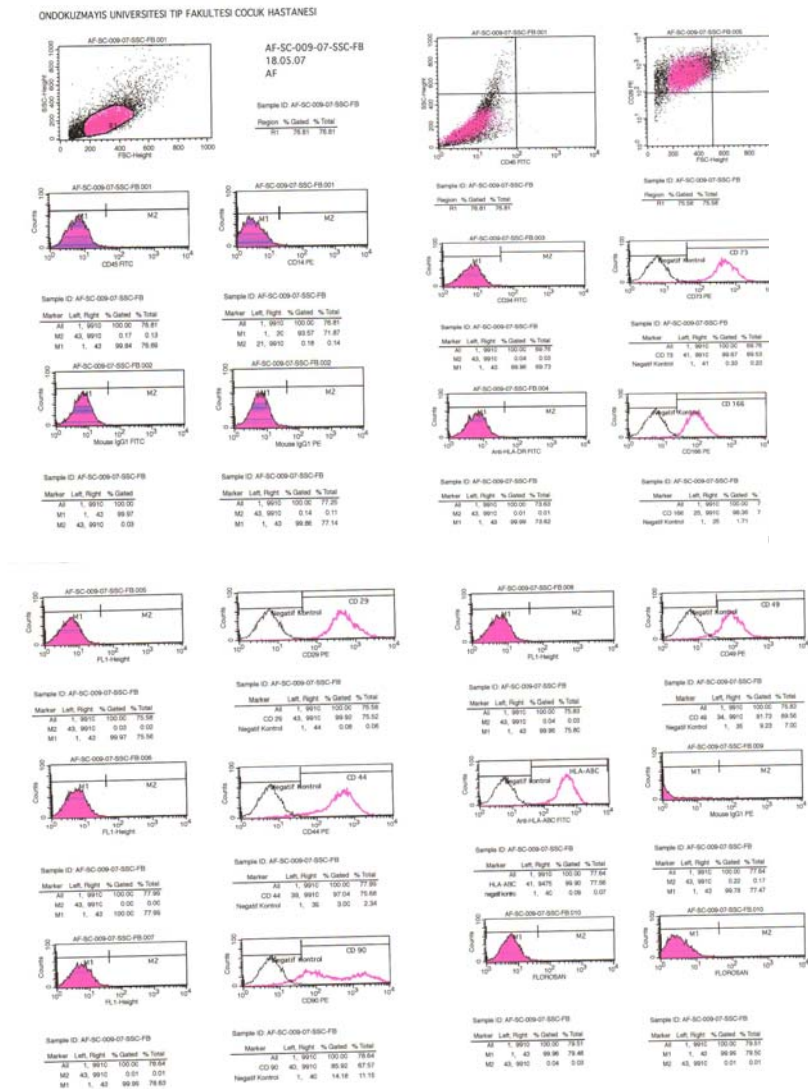
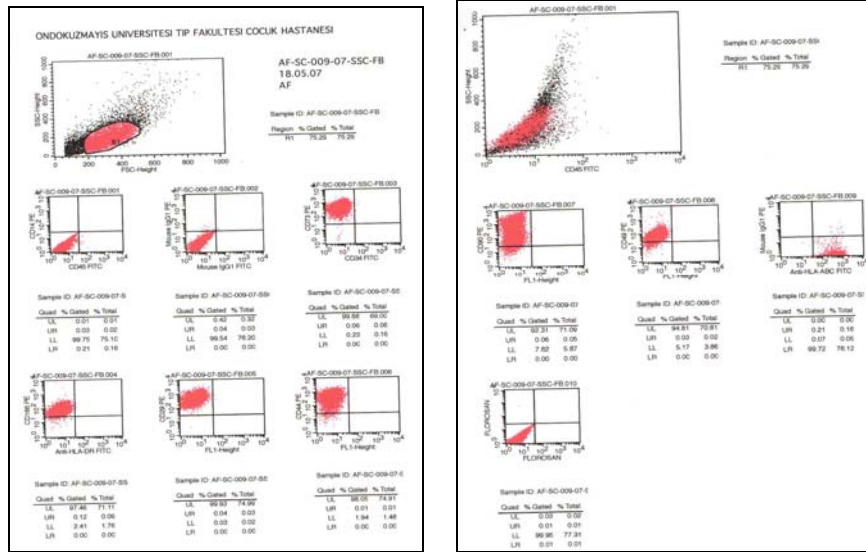
Tablo-XVIII: Selektif sub-kültür yapılan hücrelere ait immünofenotipik özellikler.

CD' ler	EKSPRESYON
CD 90	+
CD 73	+
CD 166	+
CD 49e	+
CD 44	+
CD 29	+
HLA-ABC	+
CD 34	-
CD 45	-
HLA-DR	-
CD 14	-

3 olguda CD 14 antikoruna ile hücre yüzey antijeni bakıldı ve negatif bulundu (Tablo-XVIII). Tüm olguların “Dot-plot” (Şekil-33) ve “histogram grafikleri çıkarıldı (Şekil-34).

Tablo-XIX : SSC “Dot-Plot” IF sonuçları:

Olgu Kodu	SSC	CD73	CD90	CD166	CD49e	CD44	CD29	HLA-ABC
001	AF	96.64	29.80	98.14	96.64	99.44	99.73	98.06
006	AF	98.30	26.05	99.20	98.92	99.98	100	99.67
008	FB2	99.84	98.89	98.48	99.53	98.84	100	98.20
009	FB2	99.77	92.37	97.58	94.84	98.06	99.97	99.93
010	AF	99.52	33.51	99.59	96.60	99.86	99.95	99.93
011	FB2	99.70	90.28	95.91	99.07	95.58	99.96	98.42
012	FB2	98.92	89.41	95.20	84.54	99.24	99.81	87.38
013	AF	99.59	76.20	99.17	94.51	99.90	99.68	98.84
014	FB2	99.81	75.62	98.11	91.74	99.53	99.99	99.25
015	FB2	95.28	87.53	96.70	91.97	98.44	99.82	97.35
Ortalama		98.73	69.96	97.80	94.83	98.88	99.89	97.70



Sonuçta, tüm primer hücre kültürleri (PO) ve P1_{3a} selektif sub-kültürler, immunofenotipik olarak benzer şekilde, CD90, CD73, CD166, CD49e, CD44, CD29, HLA-ABC pozitif, CD34, CD45, HLA-DR, CD14 negatifti.

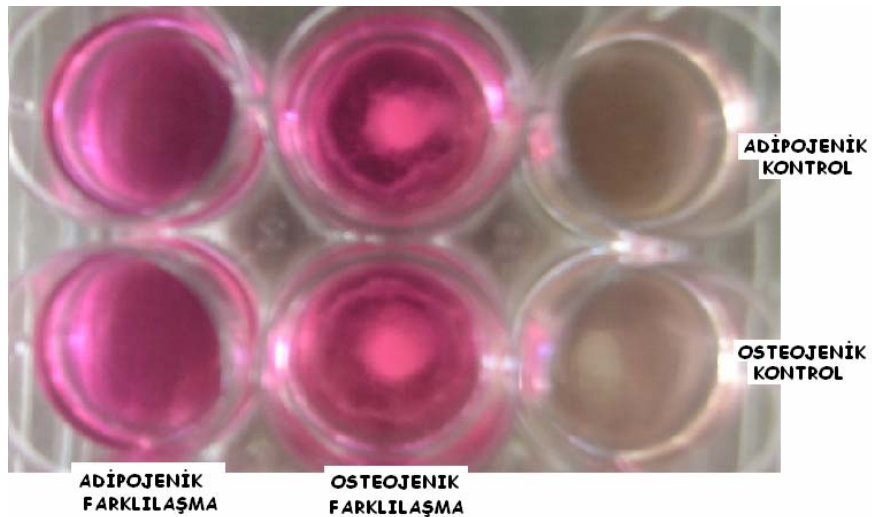
4. 6. Farklılaşma

4. 6. 1 . Adipojenik ve Osteojenik farklılaşma

Toplam 8 olguda, FB2 kaynaklı selektif subkültür yapılabildi. 4 olguda pasaj 2' de, 3 olguda pasaj 3' te ve 1 olguda da pasaj 4' te iken farklılaşma çalışmaları başlatıldı (Tablo-XX).

Tüm FB2 kaynaklı selektif subkültür yapılan olgularda, osteojenik besiyeri ile farklılaşma çalışması başlatılan kuyucuklarda, makroskopik olarak gözlenen, kalsiyum birikimini işaret eden beyaz renkte madde birikimi gözlemlendi (Şekil-35) (47, 120,121,4,89,50,59,8,18,20,134), birbirinden farklı pasajlardaki tüm olgularda osteojenik farklılaşma saptandı (Şekil-35,36), ancak adipojenik farklılaşma işlemlerinde, intrastoplazmik lipid birikimi gösterilemedi, adipojenik farklılaşma tespit edilmedi (Şekil-37).

AF kaynaklı selektif subkültür başlatılan toplam 5 olguda hücrelerin erken dejenere olduğu gözlemlendi. Heterojen karakterde 1 olgu, pasaj 1 de çalışmaya alındı; osteojenik farklılaşma saptanırken adipojenik farklılaşma gözlenmedi.

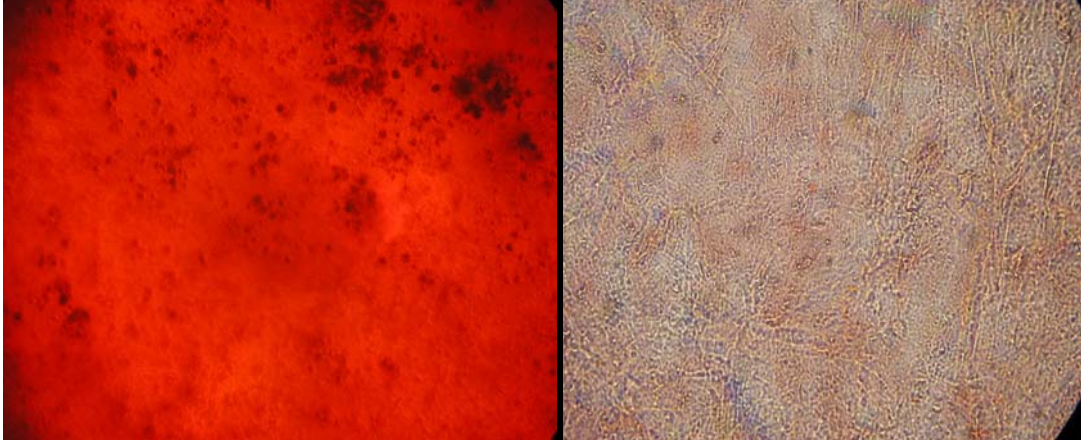


Şekil-35 : Osteojenik farklılaşmanın makroskopik izlenmesi.

Osteojenik Farklılaşma (Alizarin Red-S boyama)

Osteojenik farklılaşma (POZİTİF)

Kontrol (NEGATİF)



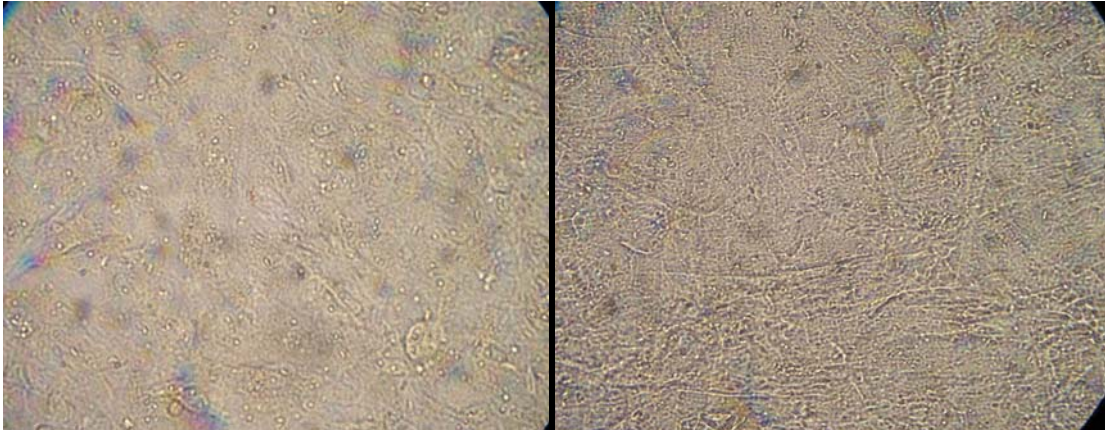
(Olympus CKX41, 40X) (Orijinal büyüklüğün %22 si)

Şekil-36: Alizarin Red-S ile boyama görüntüleri

Adipojenik Farklılaşma (Oil Red-O boyama)

Adipojenik farklılaşma (NEGATİF)

Kontrol (NEGATİF)



(Olympus CKX41, 40X) (Orijinal büyüklüğün %21 i)

Şekil-37: Oil Red-O ile boyama görüntüleri

Tablo-XX : Adipojenik ve osteojenik farklılaşmanın özeti

Olgu Kodu	Farklılaşma Kodu	SSC	Pasaj	Adipojenik farklılaşma	Osteojenik farklılaşma
011	ÖS-1	FB2	P2	Gözlenmedi	POZİTİF
011	ÖS-1	FB2	P4	Gözlenmedi	POZİTİF
012	ÖS-2	FB2	P2	Gözlenmedi	POZİTİF
016	ÖS-3	Heterojen	P1	Gözlenmedi	POZİTİF
08	ÖS-4	FB2	P3	Gözlenmedi	POZİTİF
009	ÖS-5	FB2	P2	Gözlenmedi	POZİTİF
009	ÖS-5	FB2	P3	Gözlenmedi	POZİTİF
010	ÖS-6	AF	P2	Hücre çoğalmadı. Çalışma yapılamadı.	
010	ÖS-6	AF	P4	Hücre çoğalmadı. Çalışma yapılamadı.	
013	ÖS-7	AF	P4	Hücre çoğalmadı. Çalışma yapılamadı.	
013	ÖS-7	FB2	P2	Gözlenmedi	POZİTİF
006	ÖS-8	AF	P3	Hücre çoğalmadı. Çalışma yapılamadı.	
014	ÖS-9	AF	P2	Hücre çoğalmadı. Çalışma yapılamadı.	
014	ÖS-9	FB2	P3	Gözlenmedi	POZİTİF

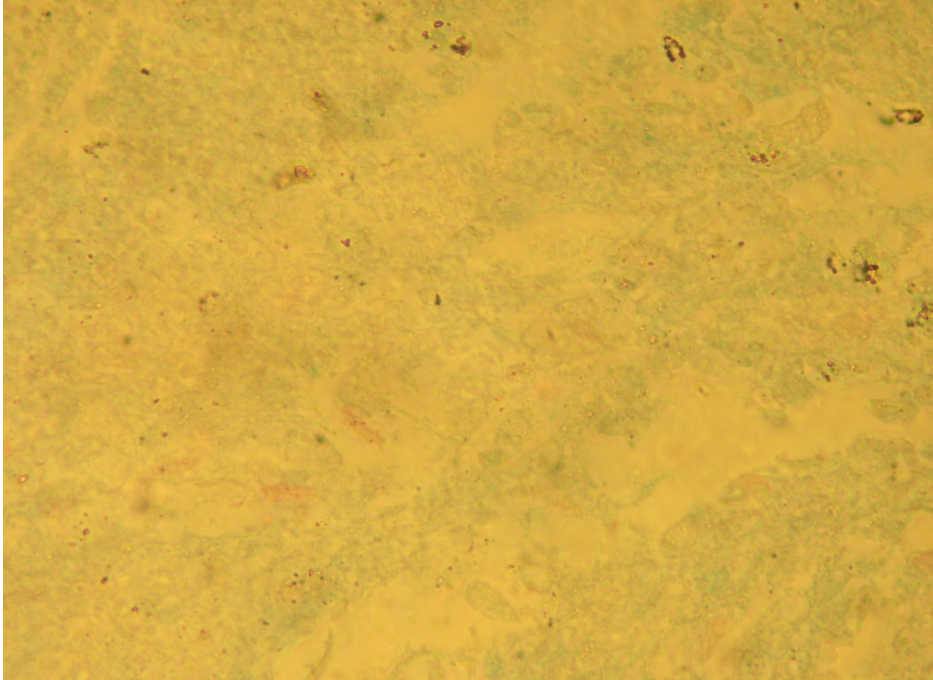
4. 6. 2. Kondrojenik farklılaşma

Toplam 11 olguda, Alcian Blue ve Hematoksilen/Eosin ile kıkırdak benzeri farklılaşma saptandı (Şekil-38,39). Olguların 8 'i FB2 kaynaklı selektif sub-kültür, 2' si AF kaynaklı selektif sub-kültür ve 1' i de heterojen karakterde idi (Tablo-XXI).

Tablo-XXI : Kondrojenik farklılaşma çalışmalarının özeti

Farklılaşma kodu	Olgu Kodu	SSC	Kıkırdak Farklılaşması
ÖS-1,1	011	FB2	Pozitif
ÖS-1,2	011	FB2	Pozitif
ÖS-2	012	FB2	Pozitif
ÖS-3	016	HETEROJEN	Pozitif
ÖS-4	008	FB2	Pozitif
ÖS-5	009	FB2	Pozitif
ÖS-6	010	AF	Pozitif
ÖS-7	013	AF	Pozitif
ÖS-8	015	FB2	Pozitif
ÖS-9	014	FB2	Pozitif
ÖS-10	010	FB2	Pozitif

Alcian Blue ile boyama



Kondrojenik kontrol (NEGATİF) (OlympusBX51,100X) (Orijinal büyüklüğün %35 i)



**Kondrosit
Benzeri Hücre**

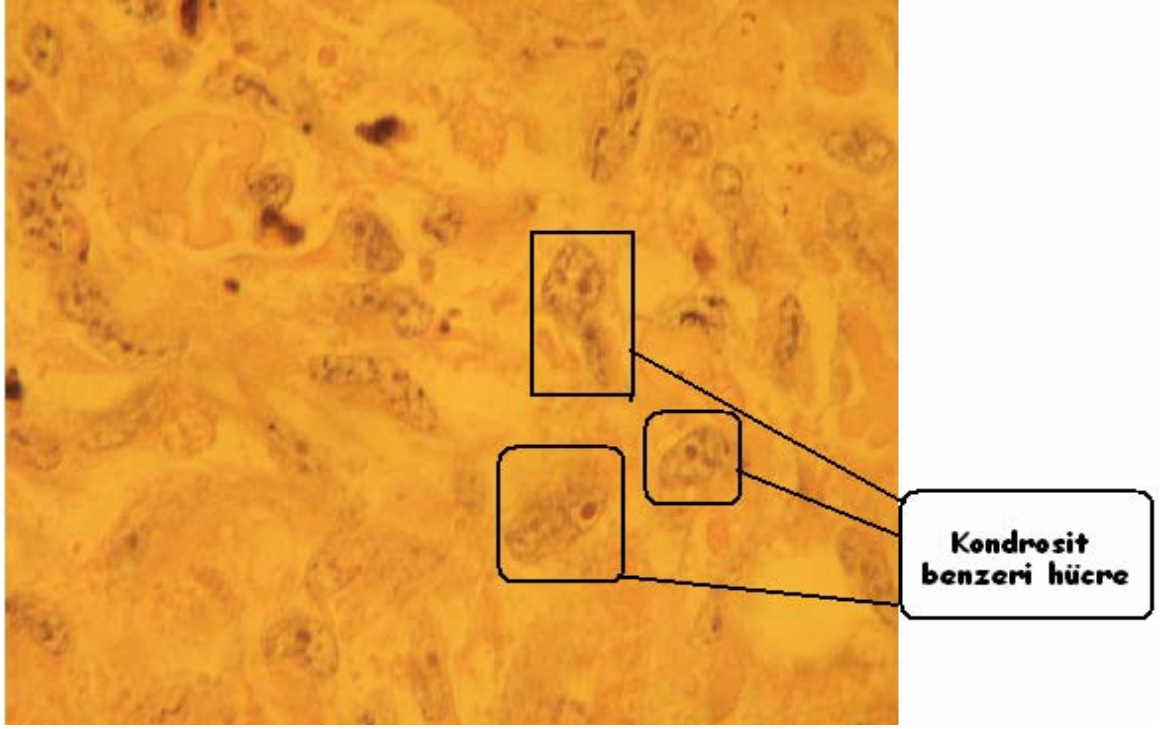
Kondrojenik farklılaşma (POZİTİF)(OlympusBX51, 100X)(Orijinal büyüklüğün %35 i)

Şekil-38: Alcian Blue ile boyama görüntüleri

Hematoksilen/Eosin ile boyama

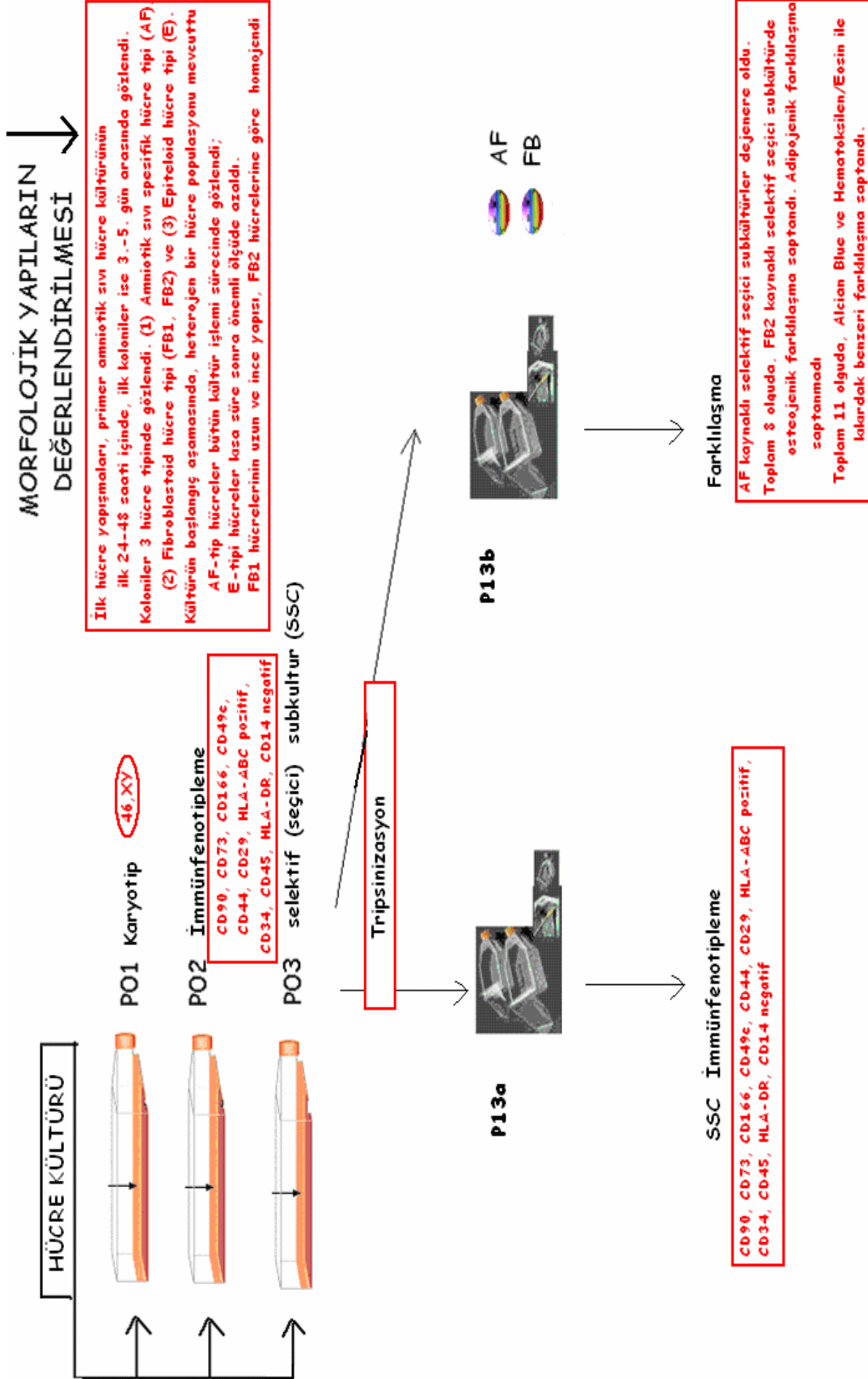


Kondrojenik Kontrol (NEGATİF) (OlympusBX51,100X) (Orijinal büyüklüğün %35 i)



Kondrosit-benzeri Farklılaşma (POZİTİF) (OlympusBX51, 100X) (Orijinal büyüklüğün %35 i)

Şekil-39: Hematoksilen/Eosin ile boyama görüntüleri



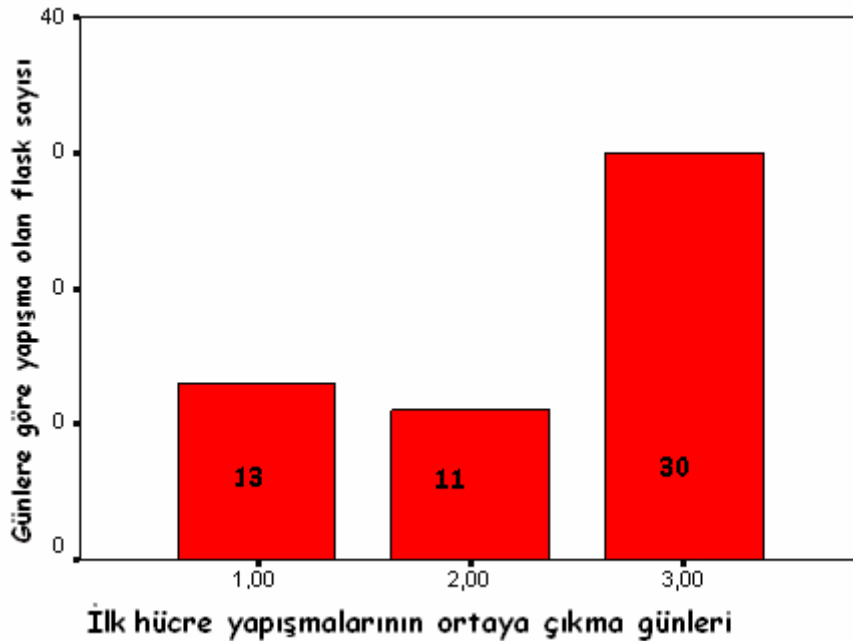
4. 6. 3. İstatistik analizler

Primer hücre kültürlerinde, morfolojik değerlendirme, “tanımlayıcı istatistik” ve “yüzde” olarak ifade edildi.

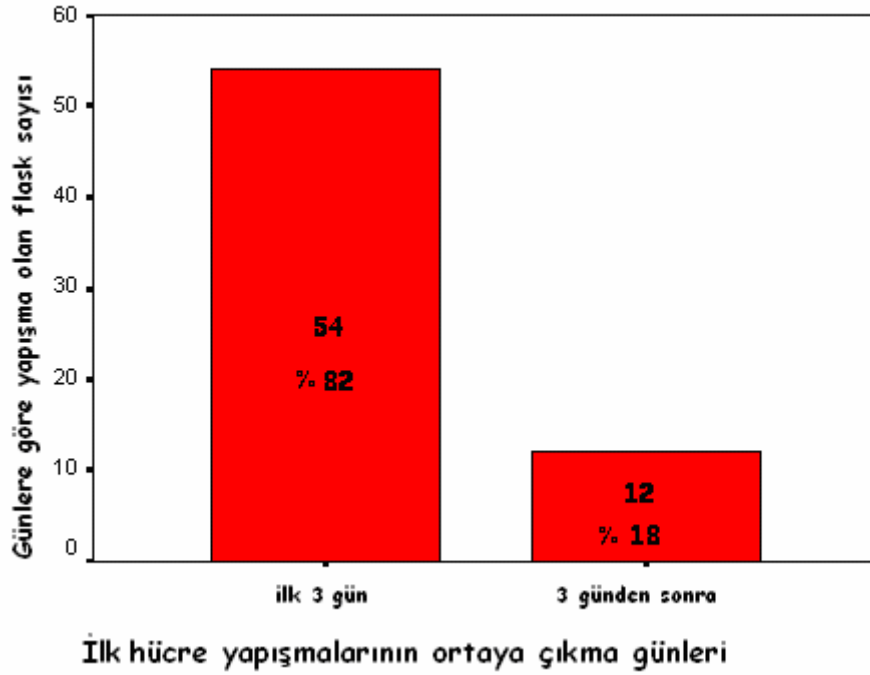
Tablolarda (Tablo-XXII) primer hücre kültürlerinde, **ilk hücre yapışmalarının** ortaya çıkma günlerine göre sıklık ve yüzde değerleri, minimum ve maksimum değerleri, ortalama $\pm$ standart sapma değerleri verilmiştir. Ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği çıkarılmıştır (Şekil-41,42).

Tablo-XXII: Primer hücre kültürlerinde, ilk hücre yapışmalarının ortaya çıkma günlerine göre sıklık ve yüzde değerleri

Gün	Günlere göre yapışma olan flask sayısı (Sıklık)	Yüzde (%)
1,00	13	19,7
2,00	11	16,7
3,00	30	45,5
> 3 gün	12	18,2
Total	66	100,0



Şekil-41: Primer hücre kültürlerinde, ilk hücre yapışmalarının ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği



Şekil-42: Primer hücre kültürlerinde, ilk hücre yapışmalarının ilk 3 gün ve 3 günden sonra ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği

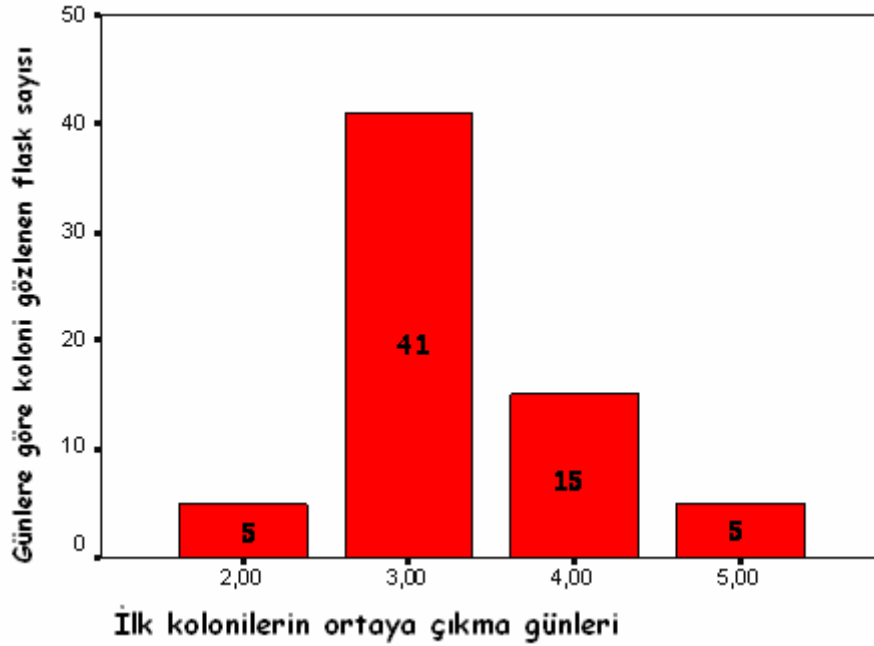
Tablolarda (Tablo-XXIII,XIV) primer hücre kültürlerinde, **ilk kolonilerin** ortaya çıkma günlerine göre sıklık ve yüzde değerleri, minimum ve maksimum değerleri, ortalama $\pm$ standart sapma değerleri verilmiştir. Ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği çıkarılmıştır (Şekil-43).

Tablo-XXIII: Primer hücre kültürlerinde, ilk kolonilerin ortaya çıkma günleri yüzde değerleri

Gün	Günlere göre koloni gözlenen flask sayısı (Sıklık)	Yüzde (%)	Kümülatif yüzde (%)
2,00	5	7,6	7,6
3,00	41	62,1	69,7
4,00	15	22,7	92,4
5,00	5	7,6	100,0
Total	66	100,0	

Tablo-XXIV : Primer hücre kültürlerinde, ilk kolonilerin ortaya çıkma minumum ve maksimum değerleri, ortalama $\pm$ standart sapma değerleri

Tanımlayıcı	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std.sapma
istatistik		Gün	gün		
KOLONI	66	2,00	5,00	3,3030	0,7226



Şekil-43: Primer hücre kültürlerinde, ilk kolonilerin ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği

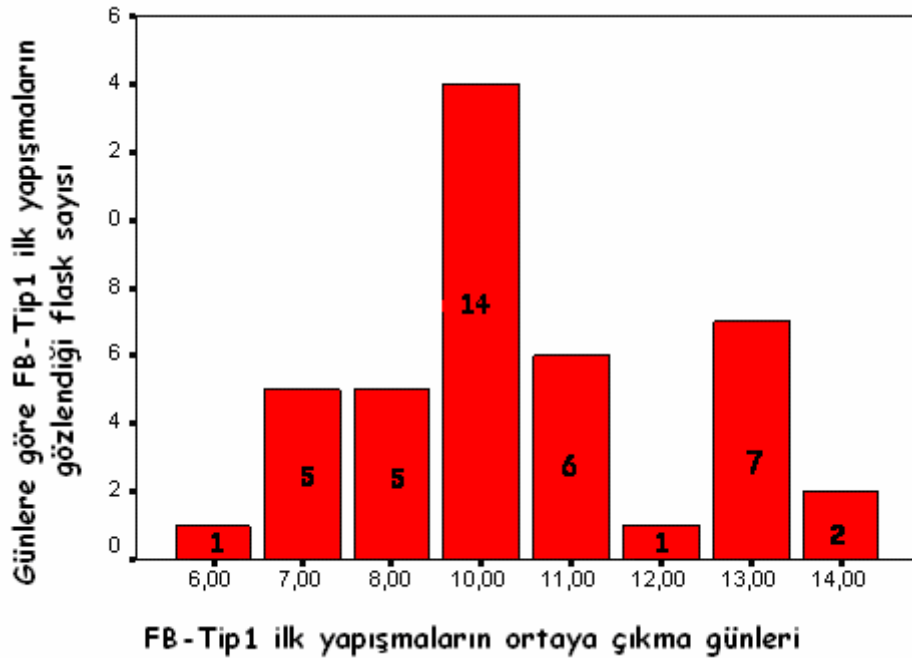
Tablolarda (Tablo-XXV,XXVI) primer hücre kültürlerinde, **FB-Tip1 ilk yapışmaların** ortaya çıkma günlerinin sıklık ve yüzdeleri, ortalama $\pm$ standart sapma ile birlikte minimum ve maksimum değerleri verilmiştir. Ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği çıkarılmıştır (Şekil-44).

Tablo-XXV: Primer hücre kültürlerinde, FB-Tip1 ilk yapışmaların ortalama $\pm$ standart sapma, minimum ve maksimum değerleri

Tanımlayıcı	istatistik	N	Minimum	Gün	Maksimum	Gün	Ortalama	Std. sapma
FB-Tip1		41	6,00		14,00		10,1951	2,1473
ilk yapışmalar								

Tablo-XXVI: Primer hücre kültürlerinde, FB-Tip1 ilk yapışmaların ortaya çıkma günlerine göre sıklığı

Gün	Günlere göre FB-1 yapışmaların ortaya çıkma günlerine göre flask sayısı (Sıklık)	Yüzde (%)
6,00	1	2,4
7,00	5	12,2
8,00	5	12,2
10,00	14	34,1
11,00	6	14,6
12,00	1	2,4
13,00	7	17,1
14,00	2	4,9
Total	41	100,0



Şekil-44: Primer hücre kültürlerinde, FB-Tip1 ilk yapışmaların ortaya çıkma günlerine göre sıklık grafiği

İmmünofenotipleme yapılan primer kültür hücrelerine (Po) ve AF/FB2 seçici sub-kültürlere ait yüzey belirteçlerin verilerinin önce normallik analizleri yapılmıştı; normal dağılım gösterilemediğinden, parametrik olmayan istatistik Kruskal-Wallis yöntemi ile 3 grup (PO/AF/FB) karşılaştırılması yapıldı.

Sadece CD90 yüzey antijeni ile ilgili anlamlı fark gözlemlendi; diğer belirteçlerde ise fark yoktu. Daha sonra, CD90' a ait verilere Dunn's testi ile ikişerli grup

karşılaştırmaları (PO/AF, PO/FB, AF/FB) yapıldı. P <0,05, önemlilik düzeyi olarak kabul edildi.

Tablolarda (Tablo-XXVII, XXVIII) ortalama $\pm$ standart sapma ile birlikte minimum ve maksimum değerler verildi.

Tablo-XXVII: Primer hücre kültürlerinde, yüzey antijenik belirteçlerin ortalama $\pm$ standart sapma, minimum ve maksimum değerleri

Primer hücre kültürleri	N	Minimum (%)	Maksimum (%)	Ortalama (%)	Std. sapma
CD34	15	,06	17,98	6,3433	7,1896
CD45	15	,04	20,46	7,9427	7,4703
CD73	15	84,97	100,00	95,8747	5,0316
CD90	14	37,09	96,97	83,8014	14,4799
CD166	15	46,66	99,77	93,0440	13,4330
CD49	15	62,73	99,61	90,5433	12,7917
CD44	15	96,76	100,00	99,0073	1,1236
CD29	15	98,26	100,00	99,6940	,5756
HLADR	15	,06	19,23	5,9740	6,9881
HLAABC	15	80,95	100,00	97,6233	4,9808
CD14	10	,70	20,34	9,3580	6,6601
Valid N (listwise)	10				

Tablo-XXVIII: Selektif sub-kültürlerde, yüzey antijenik belirteçlerin ortalama $\pm$ standart sapma, minimum ve maksimum değerleri

Selektif sub-kültür	N	Minimum (%)	Maksimum (%)	Ortalama (%)	Std. Sapma
CD34	10	,09	2,80	,5860	,8248
CD45	10	,20	3,35	1,3370	1,1336
CD73	10	95,28	99,84	98,7370	1,5732
CD90	10	26,05	98,89	69,9660	28,6348
CD166	10	95,20	99,59	97,8080	1,4646
CD49	10	84,54	99,53	94,8360	4,5573
CD44	10	95,58	99,98	98,8870	1,3264
CD29	10	99,68	100,00	99,8910	,1202
HLADR	10	,09	1,93	,5850	,6543
HLAABC	10	87,38	99,93	97,7030	3,7275
CD14	3	,04	,70	,4367	,3496
Valid N	3				

Tablo-XXIX: CD90 belirtecinin Kruskal-Wallis ve Dunn' s testi sonuçları

Gruplar	n	Ortalama (%)	P0	AF	FB
PO	14	86,19	1,00000	0,00794	0,46449
AF	4	31,66	0,00794	1,00000	0,00392
FB	6	89,85	0,46449	0,00392	1,00000

AF (n=4) ve FB2 (n=6) tipi seçici sub-kültürlerde eksprese olan belirteçlerin kantitatif düzeyi, primer kültür hücreleri (n=15) ile karşılaştırıldığında, kimi yüzey antijen düzeylerinin FB seçici alt-kültürlerinde daha yüksek olduğu gözlemlendi ancak fark anlamlı değildi ($p > 0,05$). İstatistiksel olarak, sadece CD90 belirtecinde, AF-SSC de anlamlı fark gözlemlendi [P0 ve AF-SSC ($p < 0,05$; $p: 0,008$); AF-SSC ve FB-SSC ($p < 0,05$; $p: 0,04$); P0 ve FB-SSC ($p > 0,05$; $p: 0,46$)]. CD90 belirtecinin AF-SSC de, FB2-SSC ve primer kültür hücrelerine göre daha düşük düzeyde eksprese olduğu gözlemlendi (ortalama % 31,66).

5.TARTIŞMA

Fetal mezankimal kök hücreler (MKH) lerle ilgili ilk çalışmalar 2000 li yıllarda yapılmış ve fetal dokuların pek çoğundan (kan, karaciğer ve kemik iliği) MKH izole edilebileceği gösterilmiştir (9). Aynı tarihlerde prenatal tanıda (PNT) rutin olarak kullanılan amniotik sıvı (AS) kökenli hücrelerin, doku mühendisliği yaklaşımlarında kullanılabileceği fikrine dikkatler çekilmiş ve AS hücrelerinin perinatal dönemde konjenital anomalilerin cerrahi tamirinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (56).

İzleyen çalışmalarla, AS hücrelerinin, kök hücre çalışmalarında yeni bir kaynak olabileceği fikri desteklenmiş (95) ve bu hücrelerin pluripotent kök hücreleri içerdiği ifade edilmiştir (97,47). Araştırmalar, amniosentez örneklerindeki hücrelerin % 0.1–0.5 inin embriyonik kök hücre belirteci olan Oct-4 ü eksprese ettiğini ve amniotik sıvının 1,000-5,000 hücre/µl Oct-4 pozitif hücre içerdiğini göstermişlerdir (97,95,112,113).

AS MKH yüzey antijenleri, hematolojik kök hücrelerin eksprese ettiği CD45, CD34, CD14 gibi yüzey antijenlerini taşımamakta, CD29, CD44, CD49e, CD90, CD105, CD73 ve CD166 için ise pozitif sinyal vermektedirler (120,121,49,64,16,111, 47). Erişkin kemik iliği mezankimal kök hücrelerine benzer biçimde osteojenik, kondrojenik, adipojenik ve myojenik farklılaşma göstermektedirler (18,20,8,59,60,47, 111,120,121).

Çalışmamızda, laboratuvar koşullarımızda rutin olarak işleme alınan amniotik sıvı kökenli hücrelerin mezankimal kök hücre potansiyelinin araştırılması ve hücre morfolojisi ilişkilerinin belirlenmesi hedeflenmiş bu amaçla, genetik tanı için rutin amniosentez yapılan ve sitogenetik analizleri tamamlanıp sonuçları verilen, atık konumdaki kültüre edilmiş hücreler kullanılmıştır. Primer kültür hücrelerinin morfolojik özellikleri ve MKH temelinde, immünofenotipik özellikleri değerlendirilmiş, mekanik kazıma yöntemi ile üretilen alt kültür hücrelerinde immünofenotip yeniden belirlenmiştir; ek olarak bu hücrelerin farklılaşma kapasiteleri izlenmiştir.

Olası bir maternal hücre kontaminasyonunu engellemek ve kültüre edilmiş MKH lerin fetal orijinini gösterebilmek amacıyla, hemorajik özellikteki amniotik sıvı örnekleri çalışmamıza dahil edilmemiş ve fetal karyotip tayini sonucu sadece 46,XY olarak sonuçlanan kültürler alınmıştır.

In 't Anker ve ark., (2003) çalışmalarında maternal hücre kontaminasyonunu engellemek amacıyla benzer biçimde hemorajik olmayan amniotik sıvı örnekleri kullanmış, bunun yanında aynı örneğe ait fetal, maternal ve kültüre AS MKH lerde, HLA-A ve HLA-B doku tiplendirmesi yaparak fetal orijini desteklemişlerdir (49). De Coppi ve ark., (2007) ve Sessagaro ve ark., (2008) ise çalışmalarında, protokolümüzde olduğu gibi 46,XY kültürler kullanmışlardır (18,111).

Çalışmamızda, amniotik sıvı hücre kültürleri, rutin fetal hücre kültürü koşullarında yürütülmüş (bkz. Bölüm, 3.1.2, hücre kültürü) ve bu hücrelerin yüksek oranda MKH yüzey antijeni eksprese ettiği gösterilmiştir. Bossolasco ve ark., (2007) nın yayınlarındaki protokoller, çalışmamızla yakın benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar, amniositleri Amniomed (Euroclone, UK) besiyeri ile 37° C da % 5 CO₂ li ve nemli ortamda üretmiş, tripsinize edilen hücreler, alt kültürle ayrıştırılmıştır. Besiyeri olarak % 20 fetal dana serum (FDS) eklenen α -DMEM “Dulbecco’s modified Eagle’s medium” veya 20 µg/ml endotelyal hücre büyüme faktörü (ECGF) eklenen M199 da kullanılmış ve en az iki pasaj gerçekleştirilmiştir (8).

Kim ve ark., (2007) çalışmalarında insan amniotik sıvı örneklerini, kandan ve hücre kalıntılarından kurtarmak için 300 g de 15 dk santrifüj etmiş ve peleti iki kez düşük glukozlu DMEM ile yıkayarak 100 U/ml penisilin, 0.1 mg/ml streptomisin, 3.7 mg/ml sodyum bikarbonat, 10 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF) ve % 10 FDS eklenen DMEM besiyeri ile 25 cm² lik kültür kaplarında üretmişlerdir. Yaklaşık bir hafta sonra hücreler kültür kabını doldurduklarında tripsinize edilerek homojen fibroblastlar tanımlanmış ve takiben 2 pasaj daha gerçekleştirmişlerdir (59).

Kaviani ve ark., (2001,2003) amniotik sıvı örneklerini 1800 rpmde 15 dakika santrifüj ettikten sonra, hücreleri % 20 FDS, 5 ng/ml fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve glutamin, penisilin, fungizon eklenen 2 ml DMEM besiyerinde, % 95 nem, 37° C ve % 5 CO₂ li ortamda 48 saat üretmiştir. Hücre yapışmaları olduğunda morfolojik olarak farklı hücreler mekanik olarak serbestleştirilmiş ve yeniden ekim yapılmıştır (55,56). Fuchs ve ark., (2004) çalışmalarında aynı protokolü uygulamışlardır (28). Kunisaki ve ark., (2007) ise Kaviani ve ark., (2001, 2003) nın MKH kültür protokolünü modifiye ederek uygulamış, farklı olarak çalışmaya % 20 FDS yerine % 20 insan AB serumu eklenen 2. bir protokol eklemişlerdir (64).

Delo ve ark., (2006) De coppi ve ark., (2007) Chiavegato ve ark., (2007) Kolambkar ve ark., (2007) Perin ve ark., (2007) benzer çalışmalarında amniotik sıvı kökenli KH elde etmek için % 18 Chang B, % 2 Chang C, % 15 Emriyonik kök hücre-FDS, % 1 penisilin/streptomisin, % 1 L-glutamin içeren α -DMEM kullanmış ve membran reseptör c-kit (CD117) eksprese eden hücreler pozitif seleksiyon ile elde edilmiştir (18,20,16,60,87). Tsai ve ark., (2004) ise amniotik sıvı kökenli hücrelerden MKH elde edilmesi için iki basamaklı bir kültür metodu geliştirmiştir. Birinci basamakta, amniositler 35mm doku kültür kabında, Chang medium ile beslenerek primer in situ kültürler elde edilmiş, 2. basamakta, primer amniosit kültür kabından 5. günden itibaren yapışmayan amniositler toplanarak santrifüj edilmiş ve hücreler, % 20 FDS, 4 ng/ml FGF eklenen α -DMEM ile, 25 mm² lik kültür kabında 37 ° de % 5 CO₂ li ortamda üretilmiştir (121).

Amniotik sıvı kökenli hücrelerin, kültür koşullarında **morfolojik** değerlendirmesi göreceli olarak az sayıda çalışmada gösterilmiştir (78,37,94,32,29,88). Gerbie ve ark., (1972) amniotik sıvı hücrelerini epitelyal-benzeri ve fibroblast-benzeri hücreler olmak üzere 2 gruba ayırmışlar, fibroblast-benzeri hücreler, kolayca üretilen hücreler olarak, epitelyal-benzeri hücreler ise kültürde üretilmeleri güç hücreler olarak tanımlanmıştır (29).

Hoehn ve ark., (1974) amniotik sıvı hücrelerini morfolojileri ve büyüme özellikleri temelinde, F, AF ve E olmak üzere üç sınıfta incelemiştir. F tip hücreler, morfolojik olarak birbirine paralel, iğsi, yüksek çoğalma potansiyeli olan hücreler olarak tanımlanmıştır. AF tipi hücreler, AS hücre kültürlerinde erken evrede yoğunlaşan hücreler olarak bildirilmiş, pleomorfizm gösterdikleri, büyüme ve çoğalma kapasitelerinin düşük olduğu raporlanmıştır. E tipi hücreler ise tripsinizasyona dirençli, geniş tabanlı ve çok çekirdekli olabilen, primer kültürlerde kısa süre sonra kaybolan, tabaka şeklinde sıkı ilişkili hücreler olarak tanımlanmıştır (37).

Priest ve ark., (1978) amniotik sıvı hücrelerini, elektron mikroskopik ve morfolojik özelliklerine göre, F ve AF tipi olarak ayırmışlardır. F tipi hücrelerde, dermal fibroblastlarda olduğu gibi ekstraselüler tip 1 kollajenin bolca bulunduğunu, AF tipi hücrelerde ise bulunmadığını bildirmiştir. Ek olarak AF tipi hücrelerde epitelyal bazal membranda glikoprotein olduğundan söz edilmiştir. AF tipi hücrelerin, fetal membranlarda olduğu gibi çok çekirdekli hücreler oluşturabildiği, HCG ürettiği, bu

nedenle trofoblastlardan kaynaklanabileceği, F tipi hücrelerin, dermal fibroblastlara benzer özelliklerinin bulunduğu, fibröz konnektif doku ve fibroblastlardan kaynaklandıkları belirtilmiştir (94).

Gosden ve ark., (1983) nın çalışmalarında epiteloid hücreler küçük koloniler oluşturan, çoğalma kapasitesi zayıf, tripsinizasyona dirençli, mitotik özelliği az, hücre– hücre ilişkisi kuvvetli ve keratin pozitif boyanan hücreler olarak tanımlanmıştır; amniotik sıvı hücreleri ise, hücre ilişkisi zayıf, oldukça pleomorfik, HCG ve tip 4 benzeri prokollajen sentezleyen hücreler olarak raporlanmıştır. Fibroblastik hücreler, iğsi şekilli, birbirine paralel fibroblast benzeri yapıda, çoğalma kapasitesi yüksek ve keratin negatif hücreler olarak belirtilmiştir (32).

Phillips ve ark., (1989) amniotik sıvı hücrelerini, amniosit (AF hücre), fibroblast (F hücre) olarak 2 sınıfta incelemiş, dermal fibroblastlarla morfolojik ve biokimyasal olarak karşılaştırmıştır. AF hücreler çok çekirdekli, pleomorfik, HCG, östrojen ve progesteron üreten, HLA-ABC antijen eksprese eden, tip4 kollajen üreten ve bazal membranda glikoproteini olan hücre tipi olarak, F hücreleri ise dermal fibroblastlara benzer şekilde, iğsi, birbirine paralel, HLA-ABC antijen eksprese eden, tip1 kollajen üreten hücreler olarak tanımlanmıştır (88).

Bu tanımlamalardan farklı olarak, Prusa ve ark., (2002) amniotik sıvı hücrelerini rutin kültür koşullarında yapışan ve yapışmayan hücreler olarak ikiye ayırmışlar, rutin kültür koşullarında yapışan ve koloni oluşturan hücreleri de, epiteloid (E-Tip), amniotik sıvı spesifik (AF-Tip), fibroblastik (F-Tip) olmak üzere üçe ayırmışlardır (95).

AF-Tipi ve E-Tipi hücrelerin kültür başlangıcında gözlemlendiği, E-Tipi hücrelerin kültür sürecinde anlamlı derecede azaldığı, F-Tipi hücrelerin, kültür aşamasının ilerleyen dönemlerinde gözlemlendiği belirtilmiştir. AF-Tipi hücrelerin, fetal membran ve trofoblastlardan, F-Tipi hücrelerin, fibröz konnektif doku ve dermal fibroblastlardan, E-Tipi hücrelerin hücrelerin, fetal deri ve üriner sistemden kaynaklandığının düşünüldüğü ancak her üç hücre tipinin henüz bilinmeyen başka kaynakları olabileceğine inandıklarını belirtmişlerdir (95).

Tsai ve ark., (2004) da, amniotik sıvı hücrelerini morfolojik olarak, Prusa ve ark., (2002) gibi değerlendirmiştir (121,95). İki basamaklı kültür protokolü ile elde edilen AS kaynaklı MKH lerin, AS daki fibroblastik F tipi hücreler olduğunu ileri

sürmüşler ve bu hücrelerin morfolojik, immünofenotipik ve farklılaşma özellikleri temelinde mezankimal kaynaklı olduğunu raporlamışlardır (121).

Çalışmamızda, hücre morfolojisi hücre kültürünün ilk ekim anından itibaren izlenmiş ve 1. 3. 5. Gün, 1. hafta, 2. hafta ve tripsinizasyon sonrası görüntüler değerlendirilmiştir. Yapışıp üreyen hücreler, (1) Amniotik sıvı spesifik hücre tipi (**AF**), (2) Fibroblastoid hücre tipi (**FB1, FB2**) ve (3) Epiteloid hücre tipi (**E**) olarak üç sınıfta değerlendirilmiştir. Fibroblastoid-tip (FB1 ve FB2), birbirine paralel iğ şeklindeki hücreler olarak belirlenmiştir; FB1 hücrelerinin uzun ve ince bir yapılarının olduğu ve FB2 hücrelerine göre çok daha homojen olduğu gözlemlenmiş, AF-tip hücreler ise sıkı bağlantısı olmayan, yuvarlak şekilli ve poligonal hücreler olarak not edilmişlerdir. Çalışmamızda epiteloid-tip hücrelerin oldukça sıkı bağlantılı, küçük koloniler oluşturan, yuvarlak ve keskin kenarlı, adacıklar oluşturan hücreler olduğu saptanmıştır.

Kültürlerimizde amnion hücreleri, kültür kabı plastik yüzeylerine, flaskların % 20 sinde ilk 24 saatte yapışmış (13/66) , 48 saatte flaskların % 36 sında (24/66), 72 saatte ise % 82 inde (54/66) yapışma sağlanmıştır; geriye kalanlarda ise ilk hücre yapışmaları 4. günde izlenmiştir. İlk koloniler 3-5. gün oluşmuş, 8-11. günlerde hücre yoğunluğu kültür kabının 2/3 ünü doldurmuştur.

Kültürün başlangıç aşamasında, FB2, AF ve epiteloid-tip olmak üzere heterojen bir hücre popülasyonu izlenmiş, bu hücrelerin kültür sürecinin başlarında ortaya çıkan hücreler olduğu gösterilmiştir. AF-tip hücreler kültür işlemi süresince varlığını sürdürürken, E-tipi hücreler kısa süre sonra önemli ölçüde azalma göstermişlerdir. FB1-tipi hücreler ise, kültür işlemi sürecinde ortalama 10 günde,, göreceli olarak geç dönemde ortaya çıkmaktadırlar.

Gosden ve ark., (1977, 1983) ve Polgar ve ark., (1987, 1989) normal fetüs kaynaklı amnion hücrelerinin, in vitro kültürde cama ve plastik yüzeylere, 3-4 günde yapıştığını belirtmişler, fetüste açık nöral tüp defekti veya gastroşizis varlığında, hücrelerin büyüme oranının daha hızlı olduğunu, kültür kabına 24 saatten daha kısa sürede yapışmaya başladığını ve hücre morfolojilerinin farklı olduğunu bildirmişlerdir (32,33,90,91). Çalışmamıza, ultrasonografide fetal malformasyon saptanan gebelikler dahil edilmemiştir.

“Mekanik kazıma” yöntemi, hücre kültürlerinde özgün klon seçimini sağlayabilen pratik bir yöntemdir. Çalışmamızda da morfolojik değerlendirme

paralelinde seçici sub-kültürler üretilmiştir. Başlangıçta her üç hücre tipine ait sub-kültür çalışmaları yürütülmüş ancak FB1 tipi hücrelerin kültür işleminin göreceli olarak daha geç dönemlerinde ortaya çıkması ve diğer hücrelerle kontamine olması, ve E tipi hücrelerin azalıp kaybolması nedeniyle sub-kültür çalışmaları, sadece AF ve FB2 tipi hücrelerle yapılabilmektedir. Sub-kültürde, seçilmiş hücre tipinin çoğalmaya devam etmesi sağlanmış, diğer hücre tipleri her gün tekrarlanan mekanik kazıma işlemiyle ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Literatürde benzer çalışmalar göreceli olarak azdır. Kaviani ve ark., (2001, 2003) amnion hücre kültürlerinde hücre yapışmaları başladığında morfolojik olarak farklı hücreleri mekanik olarak ortamdan uzaklaştırmış, hücre çoğalmaları devam ettirilmiş ve yeniden ekim yapmıştır (55,56). Fuchs ve ark., (2004) da çalışmalarında aynı protokolü uygulamışlardır (28).

Tsai ve ark., (2006) yapışmamış amniotik sıvı hücrelerine ait primer hücre kültürlerinden, hücre dilüsyon yöntemi kullanarak, tek hücre düzeyinde sub-populasyon elde etmiştir. Öncelikle 96 kuyucuklu hücre kaplarına ekim yapılmış, kültür kabı % 80-90 dolduğunda, pasaj yapılarak sırasıyla, 24 kuyucuklu, 12 kuyucuklu, 6 kuyucuklu kültür kapları kullanılmıştır. Sonra 25-T ve 10-cm kültür kabına ekim yapılarak fibroblast benzeri morfolojiye sahip AS kaynaklı kök hücrelere ait sub-kültürler elde etmişlerdir (121).

Delo ve ark., (2006), De coppo ve ark., (2007), Chiavegato ve ark., (2007), Kolambkar ve ark., (2007), Perin ve ark., (2007) çalışmalarında kültüre edilmiş amniotik sıvı örneklerinden, membran reseptör c-kit (CD117) eksprese eden hücreleri pozitif seleksiyon ile elde ederek, AS MKH lerine ait sub-kültürler elde etmiştir. Takip eden çalışmalarda, klonal AS MKH leri, hücre dilüsyon yöntemiyle (single cell) 96 kuyucuklu hücre kaplarına aktarılmıştır (20,18,16,60,87). Çalışmamızda, seçici sub-kültürlerde, tripsinizasyon sonrasında spesifik hücre tipine ait ana morfolojik yapının korunduğu gözlenmiştir. AF tipi hücrelerde tripsinizasyon işleminden sonra geniş tabanlı ve bölünmeyen hücreler gözlemlenmiş ve özellikle 3. pasajdan sonra hücreler çoğaltılamamışlardır. F tipi hücreler ise, tekrar eden pasajlarda hızla proliferasyon olmuştur.

Çalışmamızın amaçlarından biri de, rutin amniotik hücre kültürü koşullarımızda üreyen amniotik hücrelerin, **mezankimal kök hücre immünfenotipik özelliklerini**

yansıtıp yansıtmadığını görmek ve MKH potansiyelini ortaya koymaktı. Bu nedenle, MKH lere özgün hücre yüzey antijen paneli kullanıldı ve akım sitometri cihazı ile mezankimal kök hücre immünfenotiplemesi yapılan primer kültür hücrelerinin, CD29, CD73, CD166, CD44, CD49e, CD90 pozitif ve CD34, CD45 ve HLA-DR negatif olduğu gösterildi. 10 olguda CD 14 antikoru ile de hücre yüzey antijeni bakıldı ve negatif bulundu.

Seçici sub-kültürlerde de [AF (n=4) ve FB2 (n=6)], primer kültür hücrelerindeki gibi, mezankimal kök hücre immünfenotipik özelliklerinin varlığı gösterildi (CD29, CD73, CD166, CD44, CD49e, CD90 pozitif ve CD34, CD45 ve HLA-DR negatif). 3 olguda ek olarak CD 14 antikoru ile hücre yüzey antijeni bakıldı ve negatif bulundu.

AS hücre kültürü yüzey belirteç sonuçlarımız literatürde bildirilen, plasenta, birinci ve ikinci trimester fetal dokular, term umbilikal kord ve erişkin kemik iliği kaynaklı MKH immünfenotip sonuçları ile örtüşmekte idi (Tablo-XXX) (9,47,48,49, 97,121,34,134,106,76,92,16,64,18).

Tablo-XXX: Amnion sıvısı kökenli MKH lerin akım sitometri sonuçlarının literatürle karşılaştırılması

CD	Bulunduğu yer /doku/hücre	Sinonimleri	Çalışmamız (n=25)	Amnion A (n=6) B (n=11) C (n=20) D (n=5) E (n=7) G (n=5)	H Amnion zarı (n=10) Amnion sıvısı (n=10) Plasenta (n=10)	I, K, N Plasenta Kemik iliği I (n=37) K (n=14)	L Fetal kan (n=7), karaciğer (n=4), kemik iliği (n=4) M Fetal kemik iliği (n=11), dalak (n=7), akciğer (n=11), karaciğer (n=11) F Fetal karaciğer (n=6)	Kemik iliği MKH Bobis Pittenger Jackson	J Erişkin Kemik iliği Yağ dokusu Perioist Synoviom Kas (n=5)
CD90	Mezankimal KH	Thy1	+	+ACDE G	+	+I	+MF	+	+
CD105	Mezankimal KH	Endoglin SH2	TE	+ACDE G	+	+IKN	±L +M	+	+
CD73	Mezankimal KH	SH4-SH4	+	+ACDE G	+	+IN	+LM	+	TE
CD166	Mezankimal KH	Sb10/ALCA M	+	+A	+	+IN	+MF	+	+
HLA-ABC	HLA		+	+ACDE G	+	+IN	+F	+	TE
HLA-DR	HLA		-	-ACG ±D	-	-IKN	-L	-	TE
CD49d	İntegrin	VLA4	TE	-A	-	TE	TE	TE	TE
CD49e	İntegrin	VLA5	+	+A	+	+I	TE	TE	TE
CD11	İntegrin	LFA1	TE	-AC	TE	TE	TE	-	TE
CD62p	Selektin		TE	-A	TE	TE	TE	TE	TE
CD62e	Selektin		TE	-A	TE	TE	TE	TE	TE
CD62l	Selektin		TE	-A	TE	TE	TE	TE	TE
CD45	Hematopoetik KH	LCA	-	-ADG	-	-IKN	-LMF	-	-
CD 34	Hematopoetik KH	GP105-120	-	-ACDEG	-	-IKN	-LFM	-	-
CD14	Hematopoetik KH	LPS-R	- (n=13)	-ACE	TE	-I	-F	-	TE
CD58	Ig	LFA3	TE	±A	TE	TE	TE	TE	TE
CD54	Ig	ICAM1	TE	+A	TE	TE	TE	TE	TE
CD50	Ig	ICAM3	TE	-A	TE	TE	TE	TE	TE
CD106	Ig	VCAM	TE	-A	TE	-K	+L	+	-
CD80	Ig	migrasyon B7.1	TE	-A	TE	TE	TE	+	TE
CD86	Ig	B7.2	TE	-A	TE	TE	TE	+	TE

CD25	Sitokin	IL2	TE	-A	TE	TE	TE	TE	TE
CD123	Sitokin	IL3	TE	±A	-	TE	TE	TE	TE
CD127	Sitokin	IL7	TE	-A	TE	TE	TE	TE	TE
CD120a	Sitokin	TNFα	TE	-A	TE	TE	TE	+	TE
CD120b	Sitokin	TNFβ	TE	-A	TE	TE	TE	TE	TE
CD71		Transferrin reseptör	TE	±A	TE	TE	TE	+	TE
CD44	Adezyon molekülü	HCAM1	+	+ACDE G	TE	+IKN	+LF	+	+
CD 117	c-kit		TE	+D -G	TE	TE	TE	+	-
CD40			TE	-A	TE	TE	TE	TE	TE
CD29			+	+CDEG	TE	+IKN	+LF	+	TE
CD31		PECAM	TE	-G	-	TE	-LM	-	-
CD19			TE	TE	TE	-K	TE	TE	TE
CD13			TE	TE	TE	+I	TE	+	TE
CD10			TE	-C +E	TE	TE	TE	TE	-
SSEA4	Embriyonik KH		TE	+DG	TE	TE	TE	TE	TE
OCT4	Embriyonik KH		TE	+B,C,D, G	TE	TE	TE	TE	TE
Vimentin	Kas hücresi		TE	+G	TE	TE	TE	TE	TE
SMA-SM22	Kas hücresi		TE	+G	TE	TE	TE	TE	TE
VWF	Endotelial hücre		TE	+G	TE	TE	-L	TE	TE
Scf	Kalp kası		TE	-G	TE	TE	TE	TE	TE
GATA4	hücresi		TE	-DG	TE	TE	TE	-	TE
CD133	Hematopoetik KH		TE						
CD146			TE	+G	TE	TE	TE	TE	TE
CD68			TE	TE	TE	TE	-L	TE	TE

A (In t' Anker, 2003), B (Prusa, 2003), C (Tsai, 2004), D (De Coppi, 2007), E (Kunisaki, 2007), F (Götterström, 2004), G (Chiavegato, 2007), H (In t' Anker, 2004), I (Portmann, 2006), J (Sakaguchi, 2005), K (Miao, 2006), L (Campagnoli, 2001), M (In t' Anker, 2003), N (Zhang, 2004)

Kök hücre (KH), “Homing cell adhesion molecule” (HCAM), “Aktivated Leukocyte adhesion molecule” (ALCAM), “Neuronal cell adhesion molecule” (NCAM), “Platelet endothelial cell adhesion molecule” (PECAM), “Very late antigen” (VLA), İnterlökin (IL), Tümör nekrozis faktör (TNF), “Aminopeptidase N” (APN), “İntercellular cell adhesion molecule” (ICAM), “Vascular cell adhesion molecule” (VCAM), “Leukocyte function antigen” (LFA), “Leukocyte common antigen” (LCA), Glikoprotein (GP), Endotoksin lipoprotein reseptörü (LPS-R).

Çalışmamızda, AF (n=4) ve FB2 (n=6) tipi seçici sub-kültürlerde eksprese olan belirteçlerin kantitatif düzeyi, primer kültür hücreleri (n=15) ile karşılaştırıldığında, kimi yüzey antijen düzeylerinin FB seçici alt-kültürlerinde daha yüksek olduğu gözlemlendi ancak fark anlamlı değildi ($p > 0,05$). İstatistiksel olarak, sadece CD90 belirtecinde anlamlı fark gözlemlendi [P0 ve AF-SSC ($p < 0,05$; $p: 0,008$); AF-SSC ve FB-SSC ($p < 0,05$; $p: 0,04$); P0 ve FB-SSC ($p > 0,05$; $p: 0,46$)]. CD90 belirteçlerinin AF-SSC de, FB2-SSC ve primer kültür hücrelerine göre daha düşük düzeyde eksprese olduğu gözlemlendi.

FB2 yönünde sub-kültür yapılan flasklarda, Kim ve ark., (2007), Bossolasco ve ark., (2007), Kunisaki ve ark., (2007) nın çalışmalarında belirtildiği gibi, kemik iliği kaynaklı mezankimal kök hücrelerine benzer fibroblastoid morfoloji saptanmıştı (59,8, 64). FB tipi hücrelerin, kültürlerde hızla prolifer olmaları, pasaj devamlılıklarının daha stabil olması ve yapılarının kemik iliğinden kaynaklanan MKH' ler gibi fibroblastoid şekilde olmaları, immünofenotipik ve farklılaşma özellikleri nedeniyle, Tsai ve ark., (2004) nın da ileri sürdüğü gibi (121), mezankimal kök hücrelerin, fibroblastik (FB tip) tipteki amnion hücreleri olduğu görüşü ağırlık kazandı.

Çalışmamızda, AF yönünde sub-kültür yapılan flasklarda, “embriyoid body” benzeri “sferoid” koloniler izlenmişti. Sferoid yapıların, Miki ve ark., (2005) nın 2005 yılında yayınladıkları çalışmalarındaki sferoid yapılara benzer olduğu görüldü (77).

Miki ve ark., (2005) amniotik epitelyal hücrelerden sferoid yapıları izole etmiş ve bu yapıların yüksek düzeyde, Oct-4, nanog ve SSEA-4 gibi embriyonik kök hücre belirteçleri eksprese ettiklerini belirtmişlerdir (77). Çalışmamızda, AF yönünde sub-kültür yapılan flasklardaki sferoid kolonilerden seçici klon elde edilmedi ve Oct-4 ve benzeri embriyonik kök hücre belirteçleri çalışılmadı fakat AF yönünde sub-kültür yapılan flasklarda da, primer kültür hücreleri ve FB sub-kültür hücrelerinde olduğu gibi, MKH immünofenotipik belirteçlerin eksprese edildiği gösterildi. AF yönünde sub-kültür yapılan flasklardaki MKH belirteç ekspresyonunun, sferoid yapıları oluşturan az sayıdaki güçlü kolonizasyon özelliği olan MKH den kaynaklanabileceği düşünüldü.

Morfolojik ve immünofenotipik değerlendirmenin ötesinde çalışmamızın önemli bir diğer komponenti, amnion sıvısı kökenli MKH lerin in vitro **farklılaşma kapasitesinin** değerlendirilmesi idi.

Çalışmamızda, toplam 11 olguda, kırkıdak benzeri farklılaşma (**kondrojenik farklılaşma**) saptandı. Olguların 8 'i FB2 kaynaklı selektif sub-kültür, 2' si AF

kaynaklı selektif sub-kültür ve 1' i de heterojen karakterde idi. Kondrojenik çalışma protokolünde, Pittenger ve ark., (1999) ve Ichinose ve ark., (2005) nın literatür çalışmaları temel alındı (89,46).

Amniotik sıvı kökenli MKH lerle kondrojenik farklılaşma potansiyeli gösterilen çalışma sayısı sınırlıdır. Ichinose ve ark., (2005) çalışmalarında in vivo ve in vitro kondrogenezisin birbirlerine benzer tarafları olduğunu belirtmiş, embriyogenezde, ekstremiteler gelişirken, MKH lerin bu bölgelere göç ettiğini ve kemik yapısını oluşturduğunu bildirmişlerdir. İlginç olarak in vitro MKH lerin kondrojenik farklılaşma için öncelikle kondanase olmaları gerektiği (hücre topağı oluşturmaları), daha sonra kıkırdak benzeri farklılaşmanın sağlandığı belirtilmiştir. Otörler, kültür işlemlerinde MKH lere, santrifüjle üç boyutlu yapı sağlamış ve bu yapının iskelet gelişiminin başlangıcında gözlenen kondansasyon basamağına benzediğinden bahsetmiştir (46).

In vitro kondrogenezde, pelet boyutlarının hücre proliferasyonu olmaksızın ekstraselüler matriksin artması ile oluştuğu bildirilmiş, pelet formasyonu oluşturulan ve oluşturulmayan MKH kültürlerinin aynı kondrojenik besiyeri ile işleme tabi tutulması sonucu, farklılaşmanın üç boyutlu pelet formasyonu oluşturulan hücrelerde gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu nedenle kondrojenik farklılaşma için öncelikle hücre kondansasyonun şart olduğunu düşünülmektedir (46).

Bu çalışmada in vitro kondrojenik farklılaşmanın sağlanması için Ichinose ve ark., (2005) nın çalışması doğrultusunda, öncelikle üç boyutlu pelet formasyonu sağlanmıştır. Kondrojenik farklılaşma besiyeri olarak, Dekzametazon (100 nM, Sigma, USA), TGF-B3 (10 ng/ml, Peprotech, USA), askorbik asit (50 µg/ml, Sigma, USA), ITS+Premix (50 mg/ml 500 B&D Biosciences) içeren DMEM-HG (Euroclone Ltd. UK) kullanılmış, 21. günün sonunda, peletten kesitler alınmış ve preparatlar kıkırdak farklılaşmasını gösterebilmek için “Alcian Blue” ve “Hematoksilen Eosin” ile boyanmıştır.

Pittenger ve ark., (1999) çalışmalarında, benzer kondrojenik besiyerinde hücre oluşturulmuş ve 21. günün sonunda, hücre kesitlerini C4F6 monoklonal antikörle boyamış, ve kesitlerde proteoglikandan zengin ekstraselüler matriks, kondrosit benzeri lakünler, “aggrecan”, tip2 kollajen varlığını göstermişlerdir (89).

Portman ve ark., (2006) plasental dokularda kondrojenik farklılaşmayı “Alcian Blue” boyama ile göstermiş, ekstraselüler matriksin proteoglikandan zengin olduğunu

belirtmiş, ve monoklonal antikor kullanarak tip2 kollajen varlığını göstermiştir (92). Kim ve ark., (2007) nın çalışmalarında, amniotik sıvı kaynaklı MKH lerde kondrojenik farklılaşma, hücrelerin “Alcian Blue” boyanması ile gösterilmiştir (59). Jackson ve ark., (2007) MKH lerdeki kondrojenik farklılaşmanın, “Safranin-O”, “Toluidin Blue” ve “Alcian Blue” ile boyama (sırasıyla, mukopolisakkaritler, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar) ve kollajen 2, kollajen 11, “aggrecan”, “perlecan”, “syndecan” gibi kondrojenik belirteçler kullanılarak gösterilebileceğini belirtmişlerdir (50).

Kolambkar ve ark., (2007) farklı büyüme faktörü eklenerek kondrojenik farklılaşma potansiyeli gösterilen amniotik sıvı kaynaklı MKH leri “Toludin Blue” ile boyamıştır. Otorler çalışmalarında, c-kit immünoseleksiyon ile elde edilen AS MKH leri, farklı büyüme faktörleri ile indüklemiş [TGFB-1 (10 ng/ml), TGFB-3 (10 g/ml), BMP-2 (500 ng/ml), IGF-1 (100 ng/ml)], sonuçta, farklılaşma besiyerine TGFB-1 ve TGFB-3 eklenince, AS KH lerinin, glikozaminoglikan (GAG) üretiminin önemli derecede arttığını belirtmişlerdir. TGFB-1, TGFB-3 e göre daha fazla GAG oluşturmakta, % 2 FBF ile birlikte sadece TGFB-1 e göre DNA miktarını 4.4 kat arttırmaktadır. TGFB-3 ve BMP-2 nin AS KH lerinde kondrojenik farklılaşmayı belirgin arttırmadığı, IGF-1 ve TGFB-1 in farklılaşmayı arttırdığı ve FGF-2 etkisinin kısıtlı olduğu bildirilmiştir (60).

Osteojenik ve adipojenik farklılaşma çalışmalarımız, FB2 kaynaklı ve AF kaynaklı selektif sub-kültürlerde ayrı ayrı yapılmıştır. Toplam 8 FB2 olgunun 4 ünde pasaj2 de, 3 ünde pasaj3 te ve 1 inde pasaj4 te iken farklılaşma çalışmaları başlatıldı. Heterojen hücre karakterinde olan 1 olgu ise, pasaj1 de çalışmaya alındı. AF kaynaklı selektif subkültür başaltılan toplam 5 olguda hücrelerin erken dejenere olması nedeniyle osteojenik farklılaşma ve adipojenik farklılaşma çalışmaları yapılamadı.

Osteojenik besiyeri ile farklılaşma çalışması başlatılan tüm kültür kuyucuklarında makroskopik olarakta gözlenen, kalsiyum birikimini işaret eden beyaz renkte madde birikimi gözlenmiş, kuyucuklardaki osteojenik farklılaşma “Alizarin red-S” ile boyama yapılarak incelenmiştir. Birbirinden farklı pasajlardaki tüm olgularda osteojenik farklılaşma saptanmıştır.

Çalışmamızda, in vitro kültür ortamında çoğaltılan hücreler, yöntem olarak Pittenger ve ark.(1999) nın literatür bilgileri doğrultusunda çalışılmışır (89). Pittenger ve ark., (1999) kültür işleminden [% 10 FDS, dekzametazon (100 nM), beta

gliserofosfat (10 mM) ve askorbik asit (0,2 mM) içeren DMEM-LG] 1 hafta sonra, kültürlerde kalsiyum (Ca^{+2}) birikiminin gözlemlendiğini, 21. günün sonunda, agregatların ve yumruların oluştuğunu bildirmişlerdir. Osteojenik farklılaşma, çalışmamızda olduğu gibi “Alizarin Red-S” boyama ile gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin alkalen fosfataz eksprese ettikleri belirtilmiştir (89).

Kim ve ark., (2007) 3. pasajda fibroblastoid hücre tipi elde edilen amniotik sıvı kökenli MKH lerin, 2 hafta osteojenik besiyeri [% 10 FDS, dekzametazon (0.1 μm), beta gliserofosfat (100 mM) ve askorbik asit (50 μm)] içeren DMEM-LG ile kültür işlemi sonrasında, mineralize Ca^{+2} birikimini “Von Kossa” boyama ile göstermiştir. Kim ve ark., (2007) nin farklılaşma besiyerinde kullandığı beta gliserofosfat düzeyi çalışmamızda kullandığımız miktardan 10 kat fazla, askorbik asit düzeyi ise 4 kat daha azdır (59).

Tsai ve ark., (2004, 2006) amnion sıvısı MKH leri, benzer osteojenik besiyeri ile işleme tabi tutmuş, hücre agregatları ve Ca^{+2} birikimi “Von Kossa” boyama göstermiştir (120,121).

Bossolasco ve ark., (2007) nin osteojenik farklılaşmada kullandığı farklılaşma besiyeri, çalışmamızdaki besiyeri ile aynı özelliktedir; çalışmamızda olduğu gibi kültürlerdeki Ca^{+2} birikimi “Alizarin Red-S” boyama ile gösterilmiş ve ayrıca “Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR) ile osteokalsin ekspresyonu gösterilmiştir. Bossolasco ve ark., (2007) amnion sıvısı hücre kültürlerinde predominant hücre tipinin fibroblastoid tip olması halinde osteojenik farklılaşma elde ettiklerini belirtmişlerdir (8).

Delo ve ark., (2006) amnion sıvısı ve plasentadan, De coppi ve ark., (2007) amnion sıvısı kökenli hücrelerden, manyetik kürecikler kullanarak immünoseleksiyon yolu ile [c-kit (CD117) pozitif] kök hücre elde etmişler, kültürde çoğaltmışlar ve çalışmamızdaki osteojenik besiyerine benzer bir besiyeri ile farklılaştırmışlardır. Alizarin Red-S ile Ca^{+2} birikimini, lamellar kemik benzeri yapıları, osteoblastlarda ve hipertrofik kondroblastlarda eksprese olan CBFA1 transkripsiyon faktörünü, osteokalsini ve alkalen fosfataz ekspresyonunu göstermişlerdir (18, 20).

In ‘t Anker ve ark., (2003, 2004) 2. trimester fetal karaciğer, akciğer, dalak, kemik iliği ve plasentadan kaynaklanan MKH lerin, osteojenik farklılaşmasını benzer

besiyeri ile çalışmış, farklılaşma alkalen fosfataz düzeyi ve “Alizarin Red-S” le Ca^{+2} birikiminin gösterilmesiyle değerlendirilmiştir (47,48).

Campagnoli ve ark., (2001) farklılaşmayı Ca^{+2} birikiminin gümüş nitratla boyanması ile değerlendirmişlerdir. Otörlerin 1. trimester fetal kan, karaciğer ve kemik iliğinden kaynaklanan MKH lerin osteojenik farklılaşmasında kullandığı besiyeri çalışmamızda kullandığımız besiyeri ile aynı özelliklere sahiptir (9). Portman ve ark., (2006) plasental dokularda gösterilen osteojenik farklılaşma çalışmasında, yine aynı özellikte besiyeri kullanmış, ekstraselüler matriksin mineralizasyonunu Alizarin Red-S boyama ile göstermiştir. Osteokalsine karşı kullanılan poliklonal antikör ve alkalen fosfataz aktivitesi ile de osteojenik farklılaşma değerlendirilmiştir (92). Jackson ve ark., (2007) ise MKH lerde osteojenik farklılaşma ve in vitro Ca^{+2} mineralizasyonunun Alizarin Red-S ve Von Kossa boyama (gümüş nitrat) ve osterix, cbfa1, osteopontin, osteokalsin gibi genlerin ekspresyonu ile gösterilebileceğini belirtmişlerdir (50).

Adipojenik farklılaşmayı gösterebilmek amacıyla, çalışmamızda Pittenger ve ark., (1999) nın literatür bilgileri kullanılmıştır (89). Osteojenik farklılaşma ile eş zamanlı, in vitro kültür ortamında adipojenik besiyeri ile uyarılan hücreler, 21. günün sonunda, adipojenik farklılaşma varlığını gösterebilmek için Oil Red O ile boyanmış ancak hiçbir olguda adipojenik farklılaşmanın göstergesi olan intrastoplazmik lipid birikimi gözlenememiştir. Literatürde, amniotik sıvıdan elde edilen MKH lerin adipojenik farklılaşma kapasitesini gösterebilen çalışmalar mevcuttur (8,59,18,20,120, 121,47,48).

Bossolasco ve ark., (2007) nın adipojenik farklılaşma için kullandığı besiyeri çalışmamızda kullanılan besiyerine benzemekle birlikte indometazin yaklaşık 3 kat fazla, insulin yaklaşık 2 kat fazla kullanılmıştır; otörler ayrıca 0.5 μ M hidrokortizon, 60 mM indometazin, 100 ng/ml insülin de kullanmışlardır (8). Çalışmamızda adipojenik farklılaşmanın gösterilememesi, uygulanan protokolün yetersiz kullanımına ait olabileceği gibi farklı dozlarda uygulanan kimyasallarla da ilişkili olabilir. Kim ve ark., (2007) adipojenik farklılaşma çalışmalarında indometazini yaklaşık 3 kat fazla ve insulini 100 kat düşük dozda kullanmış ayrıca, MKH izolasyonu için epidermal büyüme faktörü ve FDS içeren besiyeri kullanmışlardır (59). MKH elde edilğinde kullanılan büyüme faktörleri ve kimyasallardaki farklı dozlar, çalışmamızdaki adipojenik farklılaşmanın gösterilememesinin bir başka nedeni olabilir.

De coppı ve ark., (2007), Delo ve ark., (2006), alışmamızda 500 µM kullandığımız 3-isobutil-l-metilksantin (IBMX) i, 1mM (2 kat fazla), 5 µg/ml kullandığımız insulini, 10 µg/ml (2 kat fazla) kullanmışlardır ayrıca AS KH leri c-kit pozitif hücre seleksiyonu ile elde etmişlerdir (18,20). Çalışmamızda elde edilen kök hücre oranı, adipojenik farklılaşma için yetersiz kalmış olabilir.

Tsai ve ark., (2004, 2006) insan amniotik sıvı kökenli MKH çalışmalarında, adipojenik besiyerindeki kimyasalların dozlarını çalışmamızda kullanılan miktarlarda kullanmışlar ve farklılaşmayı, intrastoplazmik lipid birikiminin Oil red O boyanması ile göstermişlerdir ancak MKH eldesinde besiyerine % 20 FDS ve 4 ng/ml fibroblast büyüme faktörü eklemişlerdir (120,121). Bu büyüme faktörü çalışmamızda kullanılmamıştır.

In ‘t Anker ve ark., (2003, 2006) 2. trimester fetal karaciğer, akciğer, dalak, kemik iliği, amniotik sıvı, ve plasentadan kaynaklanan MKH leri, çalışmamızdaki protokole benzer besiyeri ile işleme tabi tutmuş ve farklılaşma, intrastoplazmik lipid birikiminin Oil red O boyanması ile gösterilmiştir. Bu çalışmada da, MKH eldesinde % 10 FDS ve 20 µg/ml endotelial büyüme faktörü kullanılmıştır (47,48).

Jackson ve ark., (2007) literatürde, MKH lerdeki adipojenik farklılaşmanın ‘‘Oil Red-O’’ boyamada intrastoplazmik lipid birikiminin gösterilmesiyle, ayrıca adipsin, aP2, PPAR-gama2, lipoprotein lipaz gibi genlerin ekspresyonu ile gösterilebileceğini belirtmişlerdir (50).

Amnion sıvısı kaynaklı MKH lerin adipojenik, osteojenik, kondrojenik farklılaşmasının yanı sıra myojenik, endotelial, nöronal ve hepatik hücrelere farklılaşma kapasitesinin olduğu da bildirilmiştir (18,20). Tsai ve ark., (2004, 2006), Kim ve ark., (2007), Bossolasco ve ark., (2007), AS MKH lerin nöronal, Kaviani ve ark., (2003) myofibroblast/fibroblast, Perin ve ark., (2007) renal farklılaşma kapasitesi olduğunu göstermişlerdir (120,121,59,8,55,87). Bizim çalışmamız bu farklılaşmaları içermemektedir.

Özetle, bu çalışmada rutin laboratuvar kültür koşullarında üretilen amniotik sıvı kökenli hücrelerin immünfenotipik temelde ‘‘Mezankimal Kök Hücre’’ karakteri gösterilmiş, ve osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyelleri belirlenmiştir. Morfolojik değerlendirme verileri, AS MKH nin, AS nin heterojen

hücre popülasyonu içinde özgün bir hücre grubundan (FB2 tip hücreler) kaynaklandığını düşündürmektedir.

Çalışmamızla birlikte literatürdeki benzer çalışmalardan elde edilen veriler, amniotik sıvı kökenli MKH lerin, in vitro ortamda etkin olarak farklılaşabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda 2 farklı hücre soyunda (osteojenik ve kondrojenik) yeterli farklılaşma gösterebilmiş olması, kendi laboratuvarlarımızdaki rutin fetal hücre kültür koşullarının, amniotik hücre kökenli MKH izolasyonu için bir avantaj sağladığını düşündürmekte ve ilerideki benzer çalışmalar açısından da önemli bir kolaylık sağlamaktadır.

Amnion sıvısı ile ilgili son gelişmelerden biri, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında, AS kökenli MKH kullanımının geniş yer bulmasıdır. Gelecekte kök hücre tedavilerinin yaygınlaşmasıyla, örneğin hücre kaplanmış stent ve kataterler aracılığı ile kardiovasküler sistem hastalıkları tedavisine ve eklem hastalıklarının artroskopik tedavisine olanak sağlanabileceği ileri sürülmektedir. Daha da öte, AS KH ler de dahil olmak üzere fetal KH lerin, nörodejeneratif hastalıklar, kalıtsal genetik hastalıklar, depo hastalıkları, osteogenezis imperfekta gibi kemik hastalıkları, lösemi ve otoimmün hastalıklar, yara ve yanık tedavisi ve kimi spinal kanal travmalarının tedavilerinde de yaygın uygulama alanı bulacağı öngörülmektedir.

Çalışmamızın sonucunda, laboratuvarlarımızda amniotik sıvı kökenli hücrelerden MKH elde etmeye yönelik oluşturulan öncül protokoller ve elde edilen deneyimlerin, gelecek vaadeden pek çok pre-klinik/klinik araştırmaya olanak sağlayabileceği ve klinikte pek çok “çaresiz” hastalıkta, “kök hücre tedavisi (cell therapy) uygulamaları”nın öncüsü olabileceği inancındayız.

6. SONUÇLAR

1. Amniotik sıvı kökenli MKH ler, laboratuvarımızın rutin amniotik hücre kültür koşullarında üretilmiştir.
2. Amniotik sıvı hücreleri, (1) Amniotik sıvı spesifik hücre tipi (**AF**), (2) Fibroblastoid hücre tipi (**FB1**, **FB2**) ve (3) Epiteloid hücre tipi (**E**) olarak üç sınıfta değerlendirilmiştir. Fibroblastoid-tip (FB1 ve FB2), birbirine paralel iğ şeklindeki hücreler olarak belirlenmiştir; FB1 hücrelerinin uzun ve ince bir yapılarının olduğu ve FB2 hücrelerine göre çok daha homojen olduğu gözlemlenmiştir. AF-tip hücreler, sıkı bağlantısı olmayan, yuvarlak şekilli ve poligonal hücreler olarak, epiteloid-tip hücreler ise oldukça sıkı bağlantılı, küçük koloniler oluşturan, yuvarlak ve keskin kenarlı, adacıklar oluşturan hücreler olduğu saptanmıştır.
3. Amniotik sıvı hücrelerinin, in vitro hücre kültüründe, hücre kültürü plastik yüzeylerine en erken 24-48 saatte yapıştığı, 3-5 gün içinde ise küçük koloniler oluşturduğu belirlenmiştir.
4. AF-tip, FB2-tip ve E-tipi hücre tipinin kültür işleminin başında ortaya çıkmaktadırlar; AF-tip hücreler kültür işlemi süresince varlığını sürdürürken, E-tipi hücreler önemli ölçüde azalma göstermektedir. FB1-tipi hücreler ise, kültür işlemi sürecinde geç dönemde ortaya çıkmaktadır.
5. Mekanik kazıma yöntemi ile alt kültürler ait özgün klonlar üretilmeye çalışılmış ve morfolojik değerlendirme paralelinde AF ve FB yönünde selektif sub-kültürler üretilmiştir.
6. Selektif sub-kültür yapılan olgularda, tripsinizasyon sonrasında, spesifik hücre tipine ait morfolojik yapının korunduğu gözlenmiştir.
7. FB yönünde yapılan selektif sub-kültürlerin, kültürlerde devamlılığı daha uzun süre sağladığı görülmüş, AF tipi hücrelerin ise tripsinizasyondan kısa bir süre sonra geniş tabanlı ve bölünmeyen hücreler halinde gözlenmiştir.
8. Rutin prenatal tanı hücre kültür koşullarında üretilen amniotik sıvı hücrelerinin ve AF/FB tipi sub-kültürlerin, MKH immünofenotipik belirteçlerinden CD29, CD73, CD166, CD44, CD49e, CD90 için pozitif olduğu, hematolojik kök hücre belirteçlerinden CD34, CD45 ve HLA-DR için negatif olduğu gösterilmiştir.

9. AF (n=4) ve FB2 (n=6) tipi sub-kültürlerde eksprese olan belirteçlerin kantitatif düzeyi, primer kültür hücreleri (n=15) ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak, sadece CD90 belirtecinde, AF-SSC de anlamlı fark gözlenmiştir. [P0 ve AF-SSC ($p < 0,05$; $p:0,008$); AF-SSC ve FB-SSC ($p < 0,05$; $p:0,04$); P0 ve FB-SSC ($p > 0,05$; $p:0,46$)]. CD90 belirteçinin AF-SSC de, FB2-SSC ve primer kültür hücrelerine göre daha düşük düzeyde eksprese olduğu gözlenmiştir (ortalama % 31,66).
10. AF selektif sub-kültürlerde, “embrioid body” lere benzer biçimde ”sferoid” kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir.
11. Amnion sıvı kaynaklı MKH immünofenotipi taşıyan hücrelerin, in vitro koşullarda osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyelleri olduğu gösterilmiş ancak adipojenik farklılaşma elde edilememiştir.
12. Çalışmamızın sonucunda, laboratuvarlarımızda amniotik sıvı kökenli hücrelerden MKH elde etmeye yönelik oluşturulan öncül protokoller ve elde edilen deneyimlerin, gelecek vaadeden pek çok pre-klinik/klinik araştırmaya olanak sağlayabileceği inancındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovits-Eldor J & Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology*. 2000. 227; 271–278.
2. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
3. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg M, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes L, Kloner R, Leor J. Systemic Delivery of Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells to the Infarcted Myocardium Feasibility, Cell Migration, and Body Distribution. *Circulation* 2003;108;863-868.
4. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):568-84.
5. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30:42-48.
6. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):118-21.
7. Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006; 44(4):215-30.
8. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S, Soligo D, Bosari S, Silani V, Deliliers GL, Rebulli P, Lazzari L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res*. 2006 Apr;16(4):329-36.
9. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2396-402.
10. Caplan AI. Adult Mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*. 2007; 213:341-347.

11. Castello S, Podesta M, Menditto GV, Ibatici V, Pitto A, Figari O, Scarpati D, Magrassi L, Bacigalupo A, Piaggio G, Frassoni F. Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: An alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Experimental Hematology* 32 (2004) 782–787
12. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2739-49. Epub 2007 Jul 26.
13. Chamberlain JR, Deyle D, Schwarze U, Wang PR, Hirata R, Li Y, Byers P, Russel D. Gene Targeting of mutant COL1A2 alleles in mesenchymal stem cells from Individuals with Osteogenesis Imperfecta. *Molecular therapy*. 2008 vol.16 no.1,187-193
14. Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata R. Gene Targeting in Stem Cells from Individuals with Osteogenesis Imperfecta. *Science*; Feb 20, 2004; 303, 5661
15. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Liao LM, Lin S. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J*. 2004 117(10):1443-1448.
16. Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M, Callegari A, Gasparotto L, Taiani J, Piccoli M, Lenzini E, Gerosa G, Vendramin I, Cozzi E, Angelini A, Iop L, Zanon GF, Atala A, De Coppi P, Sartore S. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42 (2007) 746–759
17. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapid self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *PNAS*. 2001;98:7841-7845
18. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. 2007. Jan;25(1):100-6. Epub 2007 Jan 7.
19. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875-84

20. Delo DM, De Coppi P, Bartsch G Jr, Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:426-38. Review.
21. Desmond A. McCarthy. Cytometric analysis of cell phenotype and function. 2001, 1-13.
22. Desmond A. McCarthy. Cytometric analysis of cell phenotype and function. 2001, 247-266.
23. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci.* 2004 Jun 15;117 (Pt 14):2971-81. Epub 2004 Jun 1.
24. Eslaminejad, M.B, Poopak Eftekhari Yazdi, Mesenchymal Stem Cells: In Vitro Differentiation among Bone and Cartilage Cell Lineages. *Yakhteh Medical Journal.* Autumn 2007, Vol 9, No 3,
25. Fauza DO. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004 Dec;18(6):877-91.
26. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg.* 2005 Sep-Oct;34(5):415-23.
27. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Trend Mol Med* 1976; 4:267-274.
28. Fuchs J, Kaviani A, Oh JT, LaVan D, Fauza D. Diaphragmatic reconstruction with autologous tendon engineered from mesenchymal amniocytes. *Journal Of Pediatric Surgery.* 2004 June; Vol.39, No 6. 843-838.
29. Gerbie AB, Melancon SB, Ryan C, Nadler HL. Cultivated epithelial-like cells and fibroblasts from amniotic fluid: their relationship to enzymatic and cytologic analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 1972. Oct 1;114(3):314-20.
30. Gilbert DM. The future of human embryonic stem cell research: addressing ethical conflict with responsible scientific research. *Med Sci Monit.* 2004. May;10(5):RA99-103. Epub 2004 Apr 28.
31. Gosden, C. (1992). Prenatal diagnosis and screening. Edited by Brock D, Rodeck C, Ferguson-Smith MA. Longman group UK Limited, New York. Cell Culture, 85-98.

32. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull.* 1983; 39:348-54.
33. Gosden CM. Morphology of rapidly adhering amniotic fluid cells as an aid to the diagnosis of neural-tube defects. *Lancet.* 1977. 919-922.
34. Gotheström C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:239-245
35. Guillot PV, Cui W, Fisk N, Polak DJ. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 11, No 5, 2007. 935-944.
36. Hipp J, Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 2008 Mar;4(1):3-11.
37. Hoehn H, Bryant EM, Karp LE, Martin GD. Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. I. Clonal morphology and growth potential. *Pediat Res* 1974; 8:746-754
38. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19;99(4):2199-204.
39. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *PNAS.* 2002; 99:8932-8937
40. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999. Mar;5(3):309-13.
41. Hou L, Hong T. Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci China C Life Sci.* 2008. Apr;51(4):287-94. Epub 2008 Mar 27
42. <http://www.genome.gov/10004765>
43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=imm.table.2497>
44. [http://www.protocol-online.org/SURGICAL PATHOLOGY - HISTOLOGY STAINING MANUAL](http://www.protocol-online.org/SURGICAL_PATHOLOGY_-_HISTOLOGY_STAINING_MANUAL)

45. Hu Y. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Volume 141, Issue 5, 342-349
46. Ichinose S, Tagami M, Muneta T, Sekiya I. Morphological examination during in vitro cartilage formation by human mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*. 2005 Nov;322(2):217-26. Epub 2005 Nov 3.
47. In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 2003 Aug;88(8):845-52.
48. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004;22(7):1338-45.
49. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1548-9.
50. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med*. 2007 Apr-Jun;53(2):121-7.
51. Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol*. 2000 Sep;165(1):27-34.
52. Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, Itakura T. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions *Brain Research* 980 (2003) 48–56
53. Kang KS, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Song CH, Han H. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy*. 2005;7(4):368-73

- 54.** Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*. 2007 Feb;25(2):319-31. Epub 2006 Oct 19
- 55.** Kaviani A, Guleserian K, Perry TE, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. Fetal tissue engineering from amniotic fluid. *J Am Coll Surg*. 2003 Apr;196(4):592-7.
- 56.** Kaviani, A., Perry, T. E., Dzakovic, A., Jennings, R. W., Ziegler, M. M., & Fauza, D. O. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery*, (2001). 36, 1662–1665.
- 57.** Kılıç E, Ceyhan T, Çetinkaya DU. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin kıkırdak ve kemik hücrelerine farklılaşma potansiyelinin değerlendirilmesi. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2007;41(4):295-301
- 58.** Kim DW, Chung YJ, Kim TG, Kim YL, Oh IH. Cotransplantation of third-party mesenchymal stromal cells can alleviate single-donor predominance and increase engraftment from double cord transplantation. *Blood*. 2004. 103: 1941-1948.
- 59.** Kim J, Lee Y. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif*. 2007;40, 75–90
- 60.** Kolambkar YM, Peister A, Soker S, Atala A, Guldberg RE. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *J Mol Hist* (2007) 38:405-413
- 61.** Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Mesenchymal stem cells. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPSIH) Bone Marrow Transplantation (2002) 30, 215–222
- 62.** Koc ON, Gerson SL, Cooper B, Dyhouse S, Haynesworth S, Caplan A, Lazarus HM. Rapid Hematopoietic Recovery After Coinfusion of Autologous-Blood Stem Cells and Culture-Expanded Marrow Mesenchymal Stem Cells in Advanced Breast Cancer Patients Receiving High-Dose Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 2000., Vol 18, No 2 (January), 307-316
- 63.** Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Jun;42(7):1539-46.

64. Kunisaki SM, Armant M, Kao GS, Stevenson K, Fauza DO. Tissue engineering from human mesencymal amnocytes: a prelude to clinical trials. *J Pediatr Surg.* 2007;42:974-980.
65. Langman, J. (1969) *Medical embryology*, 2nd edn. Development of the fetus, fetal membranes, and placenta (third to tenth monts of development), The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 69-83.
66. Larsen, W. (1997). *Human embryology*, 2nd edn. Churchill Livingstone Inc, Philadelphia, 1-55.
67. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005. 11:389-398.
68. Le Blanc, C. Gotherstrom, O. Ringden, M. Hassan, R. McMahon and E. Horwitz et al., Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta, *Transplantation* 79 (2005), pp. 1607–1614.
69. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M , et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363:1439-41.
70. Lee HJ, Kim K, Kim E, Choi HB, Lee KH, Park H, Ko Y, Jeong SW, Kim SU. Brain transplantaion of immortalized human neural stemcells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model. *Stem cells.* 2007;25:1204-1212.
71. Lev and S. S. Spicer, Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* 12 (1964), 309
72. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med.* 2004 Jul;10 Suppl:S42-50. Review
73. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006 Feb;24(2):315-21. Epub 2005 Aug 18.

74. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res*. 2006 Nov;85(11):966-79.
75. Matsuura, K., Terada, S., Koyano, S., Miyajima, T., Hoshika, A., and Sakuragawa, N. Synthesis and release of erythropoietin by human amniotic epithelial cells. *J. Tokyo Med. Univ.* (2001), 59, 38–44.
76. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2006 Sep;30(9):681-7. Epub 2006 Apr
77. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005 Nov-Dec;23(10):1549-59. Epub 2005 Aug 4.
78. Milunsky A. (2004). *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention, and Treatment*, 5th edn. Johns Hopkins University Press, London, 100–179.
79. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001 Jun;226(6):507-20.
80. Moore and Persaud (1993) *The developing human: clinically oriented embryology*. 5th ed. Edited by Saunders W.B. The placenta and fetal membranes, 113-141.
81. Mosquera A, Fernandez JL, Campos A, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz J, Gosalvez J. Simultaneous decrease of telomere length and telomerase activity with ageing of human amniotic fluid cells. *J Med Genet* 1999;36:494-6.
82. Muñoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci*. 2004 May 12;24(19):4585-95.
83. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cell in a rat glioma model. *Gene therapy* (2004) 11, 1155-1164.
84. Noort W, Kruisselbrink A, in't Anker PS, Kruger M, Bezooijen R, Paus R, Heemskerk M, Löwik C, Falkenburg F, Willemze R, Fibbe W. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34₊ cells in NOD/SCID mice. *Experimental Hematology* 30 (2002) 870–878.

- 85.** Orlic D, Kajstura J, Chiment S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Anversa Piero. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. PNAS. August 28, 2001, vol.98, no.18, 10344-9
- 86.** Parolini O. Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. Stem Cells Express, 2007 November 8: 594
- 87.** Perin L, Giuliani S, Jin D, Sedrakyan S, Carraro G, Habibian R, Warburton D, Atala A, De Filippo RE. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. Cell Prolif. 2007 Dec;40(6):936-48.
- 88.** Phillips CN, McCue PA, Whitsett CF, Priest JH. Differentiation in human chorionic villus cultures: hCG and HLA expression. Prenat Diagn. 1989 Apr;9(4):227-42.
- 89.** Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143–147.
- 90.** Polgar K, Abel G, Laczko J, Sipka S, Papp Z. Immunocytochemical characterization of amniotic fluid macrophages in cases of fetal neural tube defects. Am J Clin Pathol. 1987 Jan;87(1):37-42.
- 91.** Polgár K, Adány R, Abel G, Kappelmayer J, Muszbek L, Papp Z. Characterization of rapidly adhering amniotic fluid cells by combined immunofluorescence and phagocytosis assays. Am J Hum Genet. 1989 Nov;45(5):786-92.
- 92.** Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. Am J Obstet Gynecol. 2006 Mar;194(3):664-73.
- 93.** Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. Injury. 2005 Nov;36 Suppl 3:S8-S12.
- 94.** Priest RE, Marimuthu KM, Priest JH. Origin of cells in human amniotic fluid cultures: ultrastructural features. Lab Invest 1978; 39:106-109
- 95.** Prusa A.R and Hengstschläger M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. Med Sci Monit (2002) 8,253–257.

- 96.** Prusa A.R, Marton E, Rosner M, Bettelheim D, Lubec G, Pollack A, Bernaschek G, Hengstschläger M. Neurogenic cells in human amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2004) 191, 309-14
- 97.** Prusa A.R, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschläger M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research?. *Hum Reprod.* 2003 Jul;18(7):1489-93.
- 98.** Putschler, S. Meloan, M.S. Terry, On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium, *J. Histochem. Cytochem.* 17 (1969) 110–124.
- 99.** Ramirez JL, Castro F, Kuri W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil Red O. *Histochemistry* (1992) 97: 493-497.
- 100.** Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA, Krashennnikov ME, Kravchenko VI, Gorshenin TL, Pidtsan RE, Potapov IV. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull Exp Biol Med.* 2005 Jan;139(1):141-4.
- 101.** Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2005 december; 5(12):1571-1584.
- 102.** Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 2001 Nov 1;98(9):2615-25.
- 103.** Rojewski MT, Weber B, Schrezenmeier H. Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 2008;35:168-184.
- 104.** Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003;21:105e10.
- 105.** Rooney D.E, Czepulkowski B.H.(eds)(1986) *Human Genetics: A practical approach* first edition, IRL Pres. Oxford, 18-25
- 106.** Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005 Aug;52(8):2521-9.

- 107.** Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, Okano H, Uchida S, Kamo I, Kobayashi M, Yokoyama Y. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res.* 2004 Oct 15;78(2):208-14. Erratum in: *J Neurosci Res.* 2005 Mar 1;79(5):725.
- 108.** Sartore S, Lenzi M, Angelini A, Chiavegato A, Gasparotto L, De Coppi P, Bianco R, Gerosa G. Amniotic mesenchymal cells autotransplanted in a porcine model of cardiac ischemia do not differentiate to cardiogenic phenotypes. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 Nov;28(5):677-84. Epub 2005 Sep 26.
- 109.** Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005 106:756-763.
- 110.** Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res.* 2005 May;320(2):269-76. Epub 2005 Mar 19.
- 111.** Sessagaro N, Parodi A, Podesta M, Benvenuto F, Moggi M, Raviolo V, Litania M, Kunkl A, Frasson F. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Hematologica.* 2008;93(3),339-346.
- 112.** Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Freilinger A, Hengstschläger M. Human amniotic fluid stem cells: a new perspective *Amino Acids* (2007) Aug 21
- 113.** Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Valli A, Hengstschläger M. Stem cells in amniotic fluid as new tools to study human genetic diseases. *Stem Cell Rev.* 2007 Dec;3(4):256-64.
- 114.** Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.* 2004 Jun;18(9):980-2. Epub 2004 Apr 14.
- 115.** Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction* (2004) 128, 259–267.
- 116.** Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- β delivery into tumors. *Cancer research.* 2002. 62,3603-3608.

117. Terada S, Matsuura K, Enosawa S, Miki M, Hoshika A, Suzuki S, Sakuragawa N. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy. *Cell Transplant*. 2000 Sep-Oct;9(5):701-4
118. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998. 282, 1145–1147.
119. Thompson&Thompson. *Genetics in medicine*. 6th edn, revised reprint. Chapter 18. Prenatal Diagnosis. 359-374.
120. Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, Cheng FC, Lee JL, Chang YJ Clonal amniotic fluid-derived stem cells Express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol. Reprod.* (2006) 74, 545–551
121. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.* (2004) 19, 1450–1457
122. Tseng SG. Amniotic Membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*. 1998;116:431-441
123. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006 Oct;36(10):2566-73.
124. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005 Vol.100, No.1, 12-27
125. Väänänen K. Mesenchymal stem cells. *Annals of Medicine*. 2005; 37: 469–479
126. Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Hematology*. 2005;10 Suppl 1:293-6. Review.
127. Virtanen I. Cultured human amniotic fluid cells characterized with antibodies against intermediate filaments in indirect immunofluorescence microscopy. *J. Clin. Invest.* 1981. volume 68:1348-1355.
128. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002 Mar;10(3):199-206.

- 129.** Wang L, Li Y, Chen J, Gautam SC, Zhang Z, Lu M, Chopp M. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Experimental hematology* 30(2002) 831-836.
- 130.** Weissman IL. Stem Cells: Units of Development, Review Units of Regeneration, and Units in Evolution Cell, Vol. 100, 157–168, January 7, 2000
- 131.** Yang J, Zhou , Zheng W, Ma Y, Lin L, Tang T, Liu J, Yu J, Zhou X, Hu J. Effects of myocardial transplantaion of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growht factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction. *Cardiology* 2007;107:17-29.
- 132.** Yenicesu İ, Çetinkaya DU. Graft versus host hastalığı. *T Klin Pediatr* 2003, 12:125-131.
- 133.** Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1755-61. Epub 2005 May 19.
- 134.** Zhang Y, Li CD, Jiang XX, Li HL, Tang PH, Mao N. Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow. *Chin Med J (Engl)*. 2004 Jun;117(6):882-7.
- 135.** Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005;79:528–35.