

Araştırma Makalesi

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2019;12(3):388-396

doi:10.26559/mersinsbd.626035

Amniyotik sıvı hücrelerinde kök hücre pluripotensi belirteçlerinin ifadesi

Mustafa Ertan Ay¹, Ezgi Çokaklı¹, Murat Çokaklı¹, Ümit Karakaş¹, Özlem İzci Ay¹,

Hüseyin Durukan², Mehmet Emin Erdal¹

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Öz

Amaç: Amniyotik sıvı farklı seviyelerde kendini yenileyebilen hücre gruplarından oluşmaktadır ve bu hücrelerin kök hücre özellikleri henüz tam olarak karakterize edilmemiştir. Son yıllarda amniyotik sıvı hücreleri (AFC) rejenaratif tıp için umut veren kök hücre kaynağı olarak görülmektedir. AFC'ler transfeksiyonel ve kimyasal stratejiler ile indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC)'ler oluşturmak için terminal olarak farklılaşmış hücrelerden daha kolay ve etkili bir şekilde yeniden programlanabilirler. Fakat AFC'lerin kök hücre potansiyelleri ve farklı hücre soylarına farklılaşma kapasitesi tam olarak anlaşılammıştır. Bu çalışmada amniyotik sıvı hücrelerinde kök hücre pluripotensi belirteçlerinin ifadelerinin ve kök hücre karakterlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. **Yöntem:** Bu çalışmada, 17 amniyon sıvısından elde edilen AFC'lerde pluripotensi belirteçlerinin ifade edilip edilmediği geleneksel RT-PCR ile kalitatif olarak araştırılmıştır. **Bulgular:** Elde edilen sonuçlar, farklı hastalardan alınan AFC örneklerinde incelenen pluripotensi belirteçlerinden *OCT3/OCT4, SOX2, KLF4, MYC, KIT, NANOG, DPPA3, DPPA5, FUT4, SALL4*'ün ifade edildiğini, *UTF1* için ise non-spesifik ifade olduğunu göstermektedir. **Sonuç:** Elde edilen bulgular doğrultusunda AFC'nin kendine özgü bir kök hücre profiline sahip olduğu ve pluripotensi belirteçlerinin yeniden programlama ve rejeneratif tıp uygulamaları için hücre seçiminde etkili şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Amniyotik sıvı hücresi, pluripotensi belirteci, ekspresyon, rejeneratif tıp

Expression of stem-cell pluripotency markers in amniotic fluid cells

Abstract

Aim: As being a heterogenous population but having different pools of self-renewing cells, amniotic fluid cells (AFCs) have been considered as promising cell sources for regenerative medicine owing to their multipotency and effective reprogramming capacity.

Yazının geldiği tarih: 27.09.2019 22.10.2019

Sorumlu yazar: Mustafa Ertan AY, Phd, Dr.Öğr.Üyesi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yenişehir/Mersin, Tel: 0 324 241 00 00-29085, E-posta: ertanay@mersin.edu.tr

AFCs can more easily and effectively be reprogrammed than terminally differentiated cells to generate induced pluripotent stem cells (iPSCs) by transfectional and chemical strategies. But stem cell dynamics and differentiation capacity of AFCs into multiple lineages were poorly understood. The aim of this study was to determine the expression and stem cell characteristics of stem cell pluripotency markers in amniotic fluid cells. **Methods:** In this study, the expression profile of pluripotency markers in AFCs taken from 17 patients were investigated by conventional RT-PCR by qualitatively. **Results:** The results showed that all the pluripotency markers (*OCT3/OCT4, SOX2, KLF4, MYC, KIT, NANOG, DPPA3, DPPA5, FUT4, SALL4*) were expressed in AFCs from different patients but *UTF1* is shows a non-specific expression. **Conclusion:** Consequently, our results revealed that AFCs have a unique stem cell profile and pluripotency markers may be impactful when choosing cells for reprogramming and regenerative medicine applications.

Keywords: Amniotic fluid cells, pluripotency markers, expression, regenerative medicine

Giriş

Heterojen yapıda bir hücre havuzu olan amniyositler, kök hücre karakteristikleriyle uyumlu transkripsiyon düzenleyicileri ve hücre yüzey antijenlerini ifade etmelerinden dolayı embriyonik veya fetal kök hücreler olarak tanımlanmaktadır.¹ Amniyositlerin içerisinde bulunduğu amniyotik sıvı hem fetüsten hem de fetüse ait amniyotik zardan dökülen kök hücreler yönünden zengin bir yapı olduğundan, kök hücre eldesi ve karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmaktadır. Amniyotik sıvının gebeliğin ilk üç ayında kolaylıkla elde edilmesi, elde edilen amniyotik sıvı hücrelerinin (AFC) kültürünün ve saklanması kolay ve ucuz olması, AFC'lerin genetik hastalıklar, ilaç geliştirme çalışmaları gibi uygulamalarda kullanımına neden olmuştur. Son yıllarda, AFC'lerin multipotent epidermal, mezenşimal, hematopoietik ve nöronal kök hücre karakterinde olduğuna dair veriler elde edilmiştir.² Tüm hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip embriyonik kök hücrelerin (ESC) rejeneratif tıpta kullanımı ile ilgili etik kaygılar bulunmakta ve indüklenmiş pluripotent hücrelerin (iPSC) üretimi ve çoğaltılmasında zorluk yaşanmaktadır. Bu nedenle amniyotik kök hücreler; hastalık modelleme, hücre yenileme, yara iyileşmesi, konjenital genetik hastalıkların tedavisi ve doku mühendisliği gibi amaçlarla kullanımı önem taşımaktadır.³ Amniyotik hücre havuzundaki heterojen yapıdaki, farklılaşma aşamalarını tam olarak tamamlamamış ve primitif formdaki hücreler, iPSC'lere göre daha kolay programlanabilmektedir.⁴ Amniyositlerin

pluripotent özellikte oldukları; mezenşimal, endodermal ve ektodermal kökenli hücrelere dönüştürülebildiği ve bu sayede AFC'lerin kardiyomyosit, hepatosit, böbrek ve sinir hücreleri gibi birçok farklı hücre tipine farklılaşabildiği görülmüştür.⁵

Galende E. ve arkadaşları⁴; AFC'lerin hücre ve doku tedavilerinde, aynı bireyden alınarak oluşturulan iPSC'lerin düşük etkinlikte olmasından dolayı kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Bu çalışma ile terminal olarak farklılaşmış amniyotik deri hücreleri yeniden programlanarak, iPSC'lere göre, iki kat hızlı ve 200 kattan daha fazla sayıda kök hücre elde edilmiştir. Yüksek etkinlikteki bu hücrelerin morfolojik ve büyüme karakteristikleri, antijenik kök hücre belirteçleri, kök hücre gen ifadesi, telomeraz aktivitesi, in-vitro ve in-vivo farklılaşma yönünden ESC'lere benzediği gösterilmiştir. Böylece amniyotik kök hücrelerinin daha genç, epigenetik olarak embriyonik hücrelere daha çok benzeyen, hız ve etkinlik olarak klasik iPSC'lerden daha elverişli olduğunu göstererek; kök hücre tedavilerinde yeni bir hücre türü kaynağı olarak amniyosit kullanımını öne sürmüşlerdir. Yine yapılan çalışmalarda AFC'lerin iPSC'lere göre daha kolay ve stabil şekilde yeniden programlanabildiği ve bu hücrelerin kök hücre belirteçleri ifadesini sürekli şekilde koruduğu ve transkriptomik olarak ESC'lere daha çok benzediği gösterilmiştir.⁶ Ditadi A. ve arkadaşları⁷ ise AFC'lerin eritroid, miyeloid ve lenfoid hematopoietik hücrelere dönüşebildiklerini göstermiştir.

Bir hücrenin kök hücre karakterinde olup olmadığı pluripotensi belirteçlerini ifade edip etmediklerine göre belirlenmektedir. İnsan AFC'lerinin moleküler karakterizasyonu ve farklı hücrelere dönüşebilme kapasiteleri ile ilgili ilk çalışma Bossolasco ve arkadaşları⁸ tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada AFC'lerin farklılaşma potansiyelleri incelenmiş ve mezenşimal, epitelyal ve nöroglial belirteçler kullanılarak, farklı hücre soylarına dönüşebilme kapasitesine sahip projenitör hücreler oldukları gösterilmiştir. Kang ve arkadaşları⁹; AFC'lerde bazı kök hücre belirteçlerinin (*KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *DPPA3*, *UTF1*, *GDF3*, *REX1*, *SALL4*, *DAX1*, *TBX3*, *TCL1*, *RIF1*, *NACC1*, *CD24*, *TERT*) ifade edildiğini, bazı belirteçlerin (*OCT3/OCT4*, *NANOG*, *LIN28A*, *LIN28B*, *KIT*, *DPPA5*, *FOXD3*, *FUT4*, *ALPL*, *FGF4*) ise ifade edilmediğini göstermiştir. Ancak genlerin hücre tipine özgü farklı oranlarda ifade edilmesi, AFC'lerin çok sayıda hücre tipinden oluşan bir havuz oluşturması, farklı pluripotensiyel seviyelerinde hücreler bulunması ve kullanılan örnek sayılarının azlığı gibi nedenlerden dolayı birbiri ile çelişen sonuçlar bulunmaktadır.

Bu çalışmada AFC'lerdeki ifadeleri araştırılmak üzere, hücre içi fonksiyonları ve kök hücre pluripotensiyelindeki önemleri dikkate alınarak *OCT3/OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *NANOG*, *DPPA3*, *UTF1*, *KIT*, *DPPA5*, *REX1*, *FUT4*, *SALL4* ve *NACC1* kök hücre pluripotensiyel belirteçleri seçilmiştir. *OCT3/OCT4*, *SOX2* ve *NANOG* embriyonik kök hücrelerde hem erken embriyo gelişiminde hem de pluripotensiyel durumunun sürdürülmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörleridir.¹⁰ Yamanaka faktörleri olarak bilinen *OCT3/OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC* genleri embriyonik kök hücrelerde yüksek oranda ifade edilmekte ve embriyonik kök hücre pluripotensiyeli için gelişimsel sinyal ağında düzenleyici olarak görev almaktadırlar.¹¹ *UTF1* ise *OCT3/OCT4* ve *SOX2* kompleksi ile etkileşime girerek düzenleyici rol oynamaktadır. *DPPA3* transkripsiyonel baskılama, hücre bölünmesi ve hücre pluripotensiyelinin sağlanmasında, *DPPA5* ise embriyonik germ ve embriyonik kök hücre stabilitesinde görevlidir.¹² *NANOG* kök hücrelerin

kendilerini yenilemesinde işlevsel iken *KIT* ve *REX1* birçok hücre tipi için önemli bir transkripsiyon faktörüdür. *FUT4*; kök hücre diferansiyasyon belirteci olarak kullanılmaktadır. *SALL4* ise *NANOG* ile birlikte işlev gören transkripsiyon faktörüdür. *NACC1*; proliferasyon, apoptoz ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok hücresel süreçte yer almaktadır.^{10,12-16}

Geleneksel RT-PCR ve agaroz jelde görüntüleme yönteminin kullanıldığı bu çalışma, farklı kök hücre pluripotensiyel belirteçlerinin AFC'lerdeki ifade düzeylerinin gestasyonel-maternal yaşa ve hücre pasaj sayısına göre değişiminin belirleneceği ve Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018-1-TP2-2793 proje numarası ile desteklen çalışmanın ön çalışması olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilecek bu ön veriler ile daha sonra yapılacak çalışmamız için AFC'lerde sadece yüksek oranda ifade edilen belirteçlerin seçimi ve bunlara özgün primer-prob dizaynı ve Real-time PCR ile ifade düzeylerinin kantitasyonu planlanmaktadır.

Yöntem

Amniotik sıvı hücrelerinin seçimi ve kültürü

Bu çalışmada hastalardan herhangi bir ek amniyon sıvısı örneği alınmayarak rutin amniyosentez materyalinden sitogenetik analiz işlemi sonrasında atılacak olan hücreler kullanıldı. Çalışmanın etik onayı "Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" tarafından verilmiştir. 2018-2019 yılları arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğinde amniyosentez işlemi yapılan 17 kadından alınan amniyon sıvısı örneğinden elde edilen hücreler çalışmaya dahil edildi. Hastaların seçiminde kötü obstetrik öykü, herhangi bir kronik hastalık varlığı ve düzenli ilaç kullanımı olması dışlanma kriteri olarak belirlendi. Çalışmaya sadece tarama testi riski yüksekliği ve USG bulgusu endikasyonu ile gelen, sitogenetik olarak kromozomal anomali saptanmayan bireyler dahil edildi. Hastaların yaş aralığı 26-36 yıl, gestasyonel yaş aralığı ise 12-19 hafta olarak belirlendi.

Hücrelerin kültür işlemi ve çoğaltılması BioAmf-1 Medium (Biological Industries, İsrail) kullanılarak yapıldı. Klasik uzun süreli hücre kültür yöntemi ile çoğaltılan hücreler yeterli sayıya ulaştığında Hank's solüsyonu (Capricorn Scientific, Almanya) ve %0,05'lik 1X Tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco by Life Technologies, İngiltere) kullanılarak kültür kabından kaldırıldı ve üzerine 350 µL RNAlater solüsyonu (Qiagen, Almanya) eklenerek bir gece 2-8 °C'de bekletildi ve ertesi gün uzun süreli saklama için -20 °C'ye alındı.

RNA eldesi ve cDNA sentezi

Amniyosit kültürlerindeki AFC'lerden RNA eldesi için geleneksel guanidyum isotiyosyonat/fenol kloroform yöntemi kullanıldı.¹⁷ Elde edilen RNA'ların saflıkları ve miktarları spektrofotometrik (Shimadzu, Biospec-nano, Japonya) ölçüm ile belirlendi. Spektrofotometrik ölçüm sonucunda tüm RNA örneklerinin saflık kriterlerini karşıladığı görüldü. cDNA sentezlenecek kalıp RNA miktarı (400 µg) spektrofotometrede yapılan ölçümler sonrasında elde edilen miktarlara bağlı olarak belirlendi. Sentez 100 pmol Random Hexamer primer (Thermo-Fisher Scientific, Amerika), 4 µL Reaksiyon Tampon Solüsyonu (Thermo-Fisher Scientific, Amerika), 0,5 µL 20U RNase inhibitörü (Thermo-Fisher Scientific, Amerika), 1mM (2 µL) dNTP miks (Thermo-Fisher Scientific, Amerika), 1 µL revers transkriptaz enzimi (200 U) (Thermo-Fisher Scientific, Amerika) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyonun ısı döngüsü 10 dk 25 °C, 60 dk 42°C, 10 dk 70°C ve sonrasında 4°C olarak uygulandı.

Pluripotensi belirteçleri için polimeraz zincir reaksiyonu ve agaroz jelde görüntüleme

Çalışmaya konu olan pluripotensi belirteçlerinin ifadelerinin belirlenmesi için her bir örnekten elde edilen cDNA'dan 2'şer µL (400µg) kalıp olarak kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirildi. *OCT3/OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *NANOG*, *DPPA3*, *UTF1*, *KIT*, *DPPA5*, *REX1*, *FUT4*, *SALL4*, *NACC1* ve *ACTB* (kontrol geni) genleri için primer dizileri Primer-3

programı (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) kullanılarak dizayn edildi. Kullanılan primer dizileri Tablo 1'de verilmektedir. PCR ana karışımı, Takara Premix Ex Taq(2X)(TAKARA, Japonya) ve primerlerden (10 µm) (IDT, Amerika) oluşmaktadır. Son reaksiyon hacmi 25 µL olup kalan hacim dH₂O ile tamamlanmıştır. Reaksiyon döngüsü ilk denatürasyon için 1 döngü 95 °C'de 30 dk, toplam 40 döngü olmak üzere denatürasyon için 95°C'de 15 sn ve bağlanma/ uzama için 60 °C'de 60 saniye olarak uygulandıktan sonra tüm örnekler 4°C'ye alınmıştır. Elde edilen PCR ürünlerine 1X TBE tampon çözeltisi içerisinde 0,5 µg/mL Etidyum Bromür (EtBr)(10µg/mL) (Thermo-Fisher Scientific, Amerika) eklenerek hazırlanan %2'lik agaroz (Applchem, Almanya) jelde 300mA, 120V'ta elektroforez (Nüve, Türkiye) uygulandı. Jeller transilluminatörde (Vilbert Loulmar, Fransa) görüntülendi. Marker dizi olarak 50 bp DNA Ladder (GeneDireX, Amerika) kullanıldı.

Bulgular

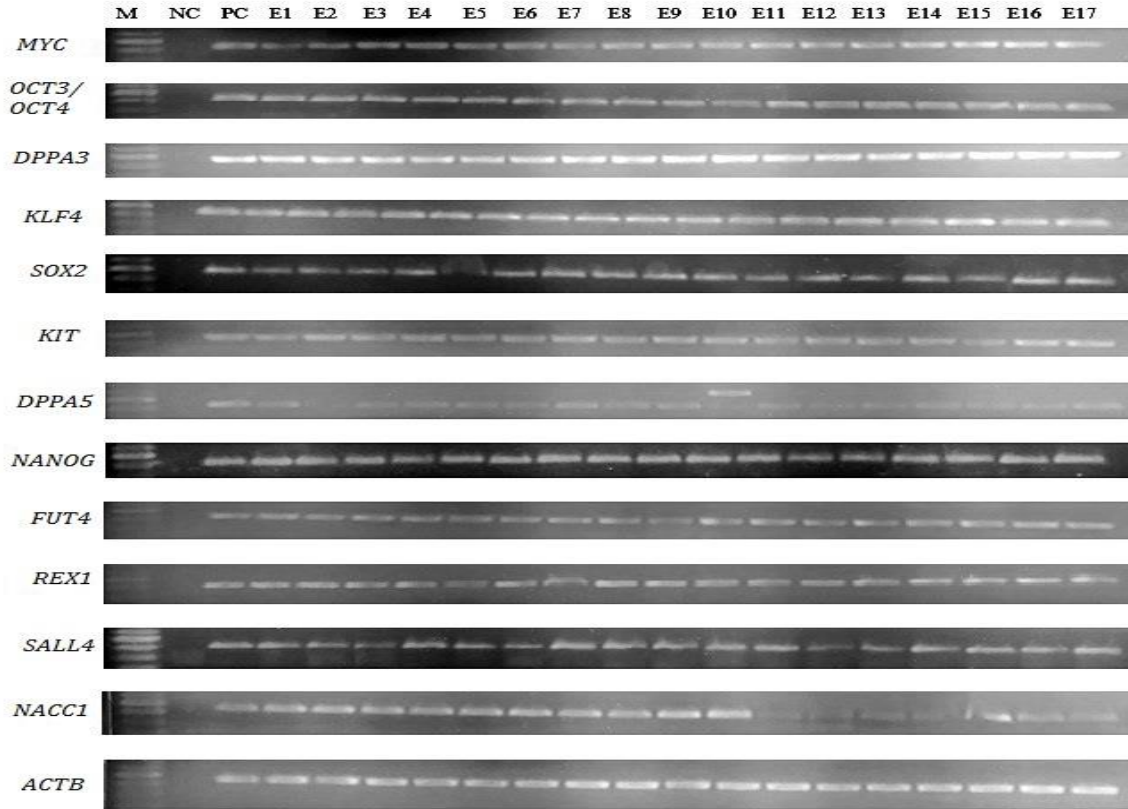
Kök hücre pluripotensi belirteçlerine (*OCT3/OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *NANOG*, *DPPA3*, *UTF1*, *KIT*, *DPPA5*, *REX1*, *FUT4*, *SALL4*, *NACC1*) ait PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü Şekil 1.'de verilmiştir. Çalışma sonucuna göre, AFC örneklerinin tamamında kalitatif olmak üzere değişik düzeylerde *OCT3/OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *NANOG*, *DPPA3*, *KIT*, *DPPA5*, *REX1*, *FUT4* ve *SALL4*'ün ifade edildiği ancak *NACC1* pluripotensi belirtecinin ifade düzeyinde kalitatif farklılıklar görüldüğü (AFC-11, AFC-12, AFC-13 ve AFC-14 numaralı örneklerde çok düşük miktarda) saptanmıştır. *NACC1* ifadesinde görülen bu farklılığın hastaların klinik özellikleri ile korele olmadığı görülmüştür. AFC-10 numaralı örnekte ise *DPPA5*'in PCR amplikon boyutu beklenenden daha büyük olarak bulunmuş ve muhtemel bir transkripsiyonel varyant veya insersiyonun varlığı düşünülmüştür. Tüm örneklerde *UTF1* için elde edilen PCR ürünleri non-spesifik bantlar verdiği ve yapılan optimizasyon çalışmalarından sonuç alınmadığı için deney setinden çıkarılmış ve jel görüntüsü

verilmemiştir. Sonuç olarak *OCT3/OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *NANOG*, *DPPA3*, *KIT*, *DPPA5*, *REX1*, *FUT4*, *SALL4* ve *NACC1* pluripotensi belirteçlerinin AFC'lerde ifade edildiği ve ifade edilme düzeylerinin AFC'lerde

yapılacak diğer ileri kök hücre pluripotensi düzeyi belirleme ve indüklenabilir kök hücre oluşturma çalışmalarında kullanılabileceği gösterildi

Tablo 1. Pluripotensi belirteçlerine ait primer dizileri

Gen adı	Primer dizisi	Amplikon uzunluğu
<i>OCT3/OCT4</i>	İleri 5'-GTACTCCTCGGTCCCTTTCC-3' Geri 5'-CAAAAACCCTGGCACAAACT-3'	168 bp
<i>KLF4</i>	İleri 5'-CCCACACAGGTGAGAAACCT-3' Geri 5'-ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC-3'	169 bp
<i>SOX2</i>	İleri 5'- AGTCTCCAAGCGACGAAAAA-3' Geri 5'- TTTCACGTTTGCAACTGTCC-3'	189 bp
<i>MYC</i>	İleri 5'-CAGATCAGCAACAACCGAAA-3' Geri 5'-GGCCTTTTCATTGTTTTCCA-3'	168 bp
<i>NANOG</i>	İleri 5'-CAAAGGCAAACAACCCACTT-3' Geri 5'-TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT-3'	158 bp
<i>DPPA3</i>	İleri 5'-CACAAATGCTCACCGAAGAA-3' Geri 5'-GATTTCCCTGAGGACTGCTG-3'	179 bp
<i>UTF1</i>	İleri 5'-AGCTGCTGACCTTGAACCAG-3' Geri 5'-GCCTGGAGAGGGGAGACT-3'	164 bp
<i>KIT</i>	İleri 5'-GCAAATACACGTGCACCAAC-3' Geri 5'-GCACCCCTTGAGGGAATAAT-3'	176 bp
<i>DPPA5</i>	İleri 5'-CCGAAGACCTGAAAGATCCA-3' Geri 5'-TAGGAGCCGTAAACCACGAC-3'	172 bp
<i>REX1</i>	İleri 5'-GGCGGAAATAGAACCTGTCA-3' Geri 5'-CTTCCAGGATGGGTTGAGAA-3'	152 bp
<i>FUT4</i>	İleri 5'-GCAGGTGGGACTTTGTTGTT-3' Geri 5'-TTCCTCCAAGGACAATCCAG-3'	155 bp
<i>SALL4</i>	İleri 5'-ATGCCTTCCTTCCCAAAT-3' Geri 5'-TGTGAACCTGTGATGGGAAA-3'	153 bp
<i>NACC1</i>	İleri 5'- GTGCTCCACGCTGTCAAGTA-3' Geri 5'-AAGGTGGTGTAGGCGTCATC-3'	170 bp
<i>ACTB</i> (β -Actin)	İleri 5'-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3' Geri 5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-3'	171 bp



Şekil 1. Pluripotensi belirteçlerinin agaroz jeldeki ifade değişimleri (E1-E17 olarak adlandırılan jel kuyucuklarında sırasıyla AFC1-17 numaralı örnekler bulunmaktadır, M:Marker)

Tartışma

Bu çalışma kapsamında bir hücrenin kök hücre karakterinde olup olmadığını belirleyen, aynı zamanda elde edilip çoğaltılan bir kök hücrenin kök hücre karakterini sürdürüp sürdürmediğinin belirlenmesinde kullanılan, pluripotensi belirteçlerinden seçilen 13 tanesinin AFC'lerdeki ifade durumları araştırıldı. Araştırma sonucunda çalışılan pluripotensi belirteçlerinden *UTF1* hariç tümünün AFC için kök hücre karakterizasyon çalışmalarında kullanılabileceği gösterildi.

İçerisinde fetal atıklar, fetal deri ve amniyondan köken alan terminal diferansiye epitel hücreleri bulunan amniyon sıvısında, projenitör kök hücre karakterine sahip hücrelerin de bulunduğu son yıllarda yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca amniyotik sıvı örneklerinden elde edilen mezenseyal kök hücrelerin erişkin kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerle benzer özellikler taşıdığı da bilinmektedir.^{1,2} Ancak

henüz AFC'lerin kök hücre potansiyelleri ve gelişimsel süreçteki transkripsiyonel dinamikleri tam olarak anlayamamıştır. AFC'ler, ESC'ler gibi yüksek proliferatif kapasiteye sahip olmakla birlikte, ESC'lerin aksine in-vivo'da tümör ve in-vitro'da embriyoid yapı oluşturmazlar. Bu nedenle AFC'lerin pluripotenslik durumunun belirlenmesi ve pluripotensliği etkileyen parametrelerin saptanması, mevcut terapötik kök hücre uygulamaları açısından son derece önem taşımaktadır.

Birçok çalışma AFC'lerin pluripotent kök hücre özelliğinde olduğunu vurgulamaktadır.^{18,19} Ancak farklı çalışmalarda farklı pluripotenslik belirteçleri tespit edilmiştir. Kullanılan örnek sayılarının farklı/yetersiz olması ve/veya sadece belli bazı hücre gruplarının seçilmesi nedeniyle AFC'lerin kök hücre belirteçleri genel olarak saptanamamıştır. Li ve arkadaşları⁶ dört önemli pluripotenslik belirteci olan Yamanaka faktörlerinin (*OSKM/OCT4, SOX2, KLF4, MYC*) AFC'lerde ektoptik olarak ifade edilmesinden

dolayı iPSC'lere göre daha kolay ve stabil şekilde yeniden programlanabildiğini göstermişlerdir. Bu belirteçler için elde ettiğimiz stabil ifade verileri bu çalışmayı destekler niteliktedir. Ge ve arkadaşları²⁰ ise elde ettiğimiz verilere benzer şekilde AFC'lerin güçlü *OCT4* ve *NANOG* ifadesi gösterdiğini ve bu sayede bu hücrelerin pluripotensiyel potansiyelinin yüksek olduğunu saptamıştır. Araştırmacılar bu veriler doğrultusunda amniyotik mezenşimal kök hücreleri dört Yamanaka faktörü ile programlayarak kardiyomiyosit oluşumunu gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen hücrelerin kardiyak farklılaşma sonrası, spontan kontraksiyon gösterdiği, karakteristik kalsiyum akımına sahip olduğu ve bu hücrelerin gen ifade profilinin doğal kardiyak hücrelere çok benzediği gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre AFC'lerin kolayca kardiyak hücrelere dönüştürülebildiği ve pluripotensiyel özelliklerinin yüksek olduğu gösterilmiş ve kardiyak kök hücre tedavisi için amniyotik hücrelerin kullanımı önerilmiştir.

Anchan ve arkadaşları²¹; AFC'lerde *OCT4* ifadesinin düşük olduğunu ve *SOX2*, *GDF3*, *REX1* ve *DNMTB3B* ifadelerinin ise tespit edilemediğini göstermiştir. Bu çalışmadaki *OCT4* ve *SOX2* verileri çalışmamız verileri ile çelişmektedir. Ancak bu çalışma ile de AFC'lerin diğer pluripotent hücrelere göre daha kolay ve etkin bir şekilde programlanabildiği, teratom ve embriyoid yapı oluşturabildiği ve bu özellikleri ile ESC'lere benzediği gösterilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan örnek sayısı n=17 olup literatüre göre oldukça yüksektir. Elde ettiğimiz veriler bu nedenle güvenilirdir. Literatürle çelişen verilerimizin ise kullandığımız örnek sayısının yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir. Verilerimizin kalitatif oluşu çalışmamızın kısıtlayıcı bir özelliği olarak gösterilebilir. Ancak elde ettiğimiz verilerin araştırma grubumuz tarafından yürütülen AFC'lerdeki farklı kök hücre pluripotensiyel belirteçlerinin ifade düzeylerinin Real-time PCR kullanarak gestasyonel-maternal yaşa ve hücre pasaj sayısına göre değişiminin kantitatif olarak belirleneceği çalışmada kullanılacak olmasından dolayı bir ön

çalışma verisi olarak önem taşımaktadır. Bu veriler ile çok sayıda kök hücre belirteci arasından doğru kök hücre belirteçlerinin seçilerek kantite edilmesi hem çalışmanın etkinliğini artırma hem de maliyeti düşürme bakımından faydalı olacaktır. Çalışma tamamlanınca elde edilecek verilerin, hem amniyositlerin pluripotensiyel profillerinin anlaşılmasına hem de potansiyel kök hücre uygulamaları için amniyosit seçimi ve kullanımında dikkat edilmesi gereken özelliklerin belirlenmesine katkı sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

Rejeneratif tıp uygulamalarında AFC'ler uygun bir kök hücre kaynağı olarak görünse de, amniyotik kök hücrelerin tedavi potansiyellerine dair çalışmalar yakın zamanlarda yapılmaya başlanmıştır.²² Kök hücre kaynağı olarak diğer hücre tiplerine göre AFC'lerin en önemli avantajı yüksek plastisitetleri ve otolog hücre-tabanlı tedaviler için (doğum öncesi ve sonrası dönemlerde) uygun olmalarıdır.²³ Amniyositlerin kök hücre potansiyelleri ve gelişimsel süreçteki transkripsiyonel dinamiklerinin anlaşılmasıyla elde edilecek bulguların, doku/organ mühendisliği, konjenital genetik hastalıkların tedavisi ve hücre yenileme gibi olası tıbbi uygulamalar için AFC'lerin kullanılabilirliğine yönelik önemli veriler sağlayacağı açıktır.

Çıkar çatışması: Yoktur

Yazar Katkıları: Mustafa Ertan Ay, çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve yazılması; Ezgi Çokaklı, Murat Çokaklı, Ümit Karakaş, çalışma deneylerinin yapılması; Özlem İzci Ay, çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve yazılması; Hüseyin Durukan, çalışmada kullanılan hücrelerin temini, Mehmet Emin Erdal, Bilimsel danışman.

Kaynaklar

1. Roubelakis MG, Trohatou O, Anagnou NP. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: marker discovery. *Stem Cells International* 2012, 107836.
2. Gholizadeh-Ghalehaziz S, Farahzadi R, Fathi E, Pashaiasl M. A mini overview of isolation, characterization and

- application of amniotic fluid stem cells. *International Journal of Stem Cells* 2015; 8(2): 115-120.
3. Klemmt PA, Vafaizadeh V, Groner B. The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11(10): 1297-1314.
 4. Galende E, Karakikes I, Edelman L, Desnick AJ, Kerenyi T, Khoueiry G, Lafferty J, McGinn JT, Brodman M, Fuster V, Hajjar R, Polgar K. Amniotic fluid cells are more efficiently reprogrammed to pluripotency than adult cells. *Cellular Reprogramming* 2010; 12(2): 117-125.
 5. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, Antsaklis A, Anagnostou NP. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16(6): 931-952.
 6. Li C, Zhou J, Shi G, Ma Y, Yang Y, Gu J, Yu H, Jin S, Wei Z, Chen F, Jin Y. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Human Molecular Genetics* 2009; 18(22): 4340-4349.
 7. Ditadi A, Coppi P, Picone O, Gautreau L, Smati R, Six E, Bonhomme D, Ezine S, Frydman R, Cavazzana-Calvo M, Andre-Schmutz I. Human and murine amniotic fluid c-Kit⁺/Lin⁻ cells display hematopoietic activity. *Blood* 2017; 113(17): 3953-3960.
 8. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatiotis S, Soligo D, Bosari S, Silani V, Deliliers LG, Rebulli P, Lazzari L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Research* 2006; 16: 329-336.
 9. Kang JH, Park HJ, Jung YW, Shim SH, Sung SR, Park JE, Cha DH, Ahn EH. Comparative transcriptome analysis of cell-free fetal RNA from amniotic fluid and RNA from amniocytes in uncomplicated pregnancies. *Plos One* 2015; 10(7): 1-13.
 10. Chen L., Daley GQ. Molecular basis of pluripotency. *Human Molecular Genetics* 2008; 17(1): 23-27.
 11. Liu X, Huang J, Chen T, Wang Y, Xin S, Li J, Pei G, Kang J. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Research* 2008; 18: 1177-1189.
 12. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules* 2012; 17: 6196-6236.
 13. Pazhanisamy S. Adult stem cells and embryonic stem cell markers. *Mater Methods* 2013; 3: 200.
 14. Feng C, Jia YD, Zhao XY. Pluripotency of induced pluripotent stem cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2013; 11: 299-303.
 15. Ramirez JM, Gerbal-Chaloin S, Milhavet O, Qiang B, Becker F, Assou S, Lemaitre JM, Hamamah S, De Vos J. Brief report: benchmarking human pluripotent stem cell markers during differentiation into the three germ layers unveils a striking heterogeneity – all markers are not equal. *Stem Cells* 2011; 29:1469-1474.
 16. Maguire CT, Demarest BL, Hill JT, Palmer JD, Brothman AR, Yost HJ, Condit ML. Genome-wide analysis reveals the unique stem cell identity of human amniocytes. *PloS One* 2013; 8(1): 1-16.
 17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-159.
 18. Kunsaki SM, Freedman DA, Fauza DO. Fetal tracheal reconstruction with cartilaginous grafts engineered from mesenchymal amniocytes. *Journal of Pediatric Surgery* 2006; 41: 675-682.
 19. Gekas J, Walther G, Skuk D, Bujold E, Harvey I, Franc O, Bertrand F. In-vitro and in-vivo study of human amniotic fluid-derived stem cell differentiation into myogenic lineage. *Clinical Experimental Medicine* 2010; 10: 1-6.
 20. Ge X, Wang IE, Toma I, Sebastiano V, Liu J, Butte MJ, Pera RAR, Yang PC. Human mesenchymal stem cell-derived induced pluripotent stem cells may generate a universal source of cardiac cells. *Stem Cells and Development* 2012; 21(15): 2798-2808.
 21. Anchan RM, Quaas P, Gerami-Naini B, Bartake H, Griffin A, Zhou Y, Eaton JL, George LL, Naber C, Turbe-Doan A, Park

- JP, Hornstein MD, Maas RL. Amniocytes can serve a dual function as a source of iPS cells and feeder layers. *Human Molecular Genetics* 2011; 20(5): 962-974.
22. Kunisaki SM, Armant M, Kao SG, Stevenson K, Kim H, Fauza DO. Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials. *Journal of Pediatric Surgery* 2007; 42: 974-980.
23. Kaviani A, Guleserian K, Perry TE, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. Fetal tissue engineering from amniotic fluid. *Journal of the American College of Surgeons* 2003; 196: 592-597.