

***In Vitro* Kültürde Zenginleştirilen Domuz Folikül ve Amniyon Hücrelerinden RNA Ekstraksiyonu**

Gözde R. ÖZALP¹, Elif EVKE², Elçin ÖZOCAK-BATMAZ³, Yasemin ÖZEN-POLAT⁴,
E. Sinem ÖZDEMİR-SALCI⁵, Zeynep KAHVECI⁶

Geliş Tarihi: 15.04.2011

Kabul Tarihi: 30.06.2011

Özet: Amniyotik hücreler fetustan köken alan ve birçok farklı doku tipine dönüşebilen hücrelerdir. Bu durum hücrelerin birçok medikal uygulamada kullanılmasına olanak sağlar. Amniyotik ve foliküler sıvılar, prenatal tanıda çok etkili bir metod olan amniosentez ile toplanmaya çalışılmıştır. Uygulamadan 48 saat sonra domuzlarda abortus görüldüğü ve toplanan hücre sayısının yeterli olmamasından dolayı, örneklerin steril şartlar altında operasyonla toplanmasına karar verilmiştir. Alınan hücreler yeterli sayı ve mitotik aktiviteye ulaşmaya kadar hücre kültüründe geliştirilmiştir. Takibinde Trizol ile muamele edilerek hücrelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Amniyotik ve foliküler hücrelerin iyi kalitede üremelerine rağmen RNA izolasyonlarından alınan sonuçlar çok tatmin edici olmamıştır. RNA bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Elektroforez sonuçlarına göre foliküler hücrelerden elde edilen örnekler için 28s, 18s ve 5s rRNA bantları gözlenirken, amniyotik hücre kültürlerine ait örneklerde hiç bant gözlenmemiştir. Bu sonuçlar domuzda ait amniyotik ve foliküler hücrelerin *in vitro* ortamda üretilebildiğini göstermiştir. Ancak amniyon hücrelerine ait başarısız RNA izolasyonları açıklanamamaktadır. Amniyotik hücreler için hazırlanacak kültüre bazı zenginleştirmeler yapılabileceği yada izolasyon için daha farklı metotların kullanılabileceğini önerilebilir..

Anahtar Kelimeler: Amniyotik hücre, foliküler hücre, domuz.

RNA Extraction From *in vitro* Enriched Cultures of Swine Follicular and Amniotic Fluids

Abstract: Amniotic cells are derived from fetus and they are able to differentiate into various tissue types. This allows many future medical applications. The amniotic and follicular fluids were tried to collect by amniosynthesis which is an effective method in prenatal diagnosis. Since the pigs aborted in 48 hours after the applications and the limited amount of collected samples, the collection were decided to be continued under sterile operational conditions. The cells were cultured in specific cell cultures until they reached adequate numbers of cells and mitotic activity. The cells were treated with Trizol and total RNA isolations were carried out. Although the growth of amniotic and follicular cells were in good quality, RNA isolations were not satisfactory. Integrity of the isolated RNA was verified by agarose-gel electrophoresis. The results of electrophoresis showed three clear bands of 28s, 18s, 5s rRNA from the follicular cell cultures, whereas no bands were observed from amniotic cell cultures. The results showed the proliferations of porcine follicular and amniotic cells *in vitro* conditions. But the

¹ Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü/BURSA.

² Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü/BURSA, evkeelif@gmail.com

³ Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü/BURSA.

⁴ Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi, Balkan Yerleşkesi/EDİRNE.

⁵ Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü/BURSA.

⁶ Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü/BURSA.

unsuccessful results in RNA isolations from amniotic cells remains unclear. Different isolation techniques or utility of enriched cultures with different media can be suggested for qualified proliferations of amniotic cells.

Key Words: Amniotic cells, follicular cells, porcine.

Giriş

Amniyosentez, gebelik esnasında uterustan amniyotik sıvının alınma yöntemine verilen isimdir. Bilinen en eski prenatal tanı yöntemi olan amniyosentez, ilk defa 1881 yılında polihidroamnioslu vakaların tedavisi amacıyla kullanılmaya başlamış ve günümüze kadar artarak gelmiştir⁹. Steele ve Breg 1966 yılında amniyotik sıvıda hücre kültürünü ve karyotiplemeyi başarmışlardır; bu sayede genetik hastalıkların prenatal tanısında geniş bir uygulama alanı oluşmuştur³². Amniyosentez işlemi sadece kromozom analizi için değil çeşitli genetik hastalıkların tanısının konmasında ve/veya araştırılmasında DNA-RNA analizi ve biyokimyasal testleri uygulamak için de yapılmaktadır⁴.

Amniyotik sıvı fetustan köken alan ve elektrolitler, enzim ve hormonlar, embriyonal büyüme ve gelişme için gerekli çeşitli faktörleri (molekülleri) içerir. Yapılan çalışmalar amniyotik sıvının içerik özelliğinin birçok tür için 'fetal tissue engineering' için hücre kaynağı oluşturduğunu göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı, hücreler mezenşimal orjinli multipotent kök hücreleri olarak kabul edilmektedir^{5,8,17,28,30,33,36,37}. Amniyotik hücreler deri, kıkırdak, kalp, sinir, kas ve kemik gibi birçok doku tipine farklılaşabilme yeteneğinde olup gelecekte bazı medikal uygulamalar için önem arz etmektedir^{1,2,5-8,11,14,18,19,23-28, 30,31,34,36,37}.

Son dönemlerde IGF gibi, doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP), α 2-makroglobulin ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi proteinlerin de bulunduğu amniyotik sıvının yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi gibi birçok patolojide kullanılabilirliği ve tedavi edici etkileri araştırılmaktadır^{13,16,20,22,29,35}. Tüm bu çalışmalar insan hekimliğinde araştırma ve uygulama alanları oluştururken Veteriner Hekimlikte henüz çok yeni durumdadır. Amniyon ve folikül hücrelerinin, yukarıda adı geçen yara iyileşmesi ve doku yenilenmesinde etkili olan faktörler yönünden değerlendirilebilmek ve klinik olarak kullanılabilirliğini göstermek için yaptığımız ön çalışmalarda, amniyon ve folikül sıvılarında hücre popülasyonunun az olmasından dolayı *in vitro* şartlarda çoğaltılarak değerlendirilmesine karar verildi. Bu amaçla önce amniyosentezle alınan ancak uygulamadan kısa

süre sonra gebelikleri sonlandığı için operasyonla aspire edilen folikül ve amniyon sıvıları toplandı. Bu hücrelerin RNA izolasyonu yapabilecek kadar *in vitro* kültürlerde üretilebilmesi için veriler elde edilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Amniyon ve Folikül Sıvılarının Toplanması: Çalışma materyali, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan 6 adet domuzdan toplanmıştır. Çalışma için Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminden etik kurul onayı alınmıştır. Folikül ve amniyon sıvısı alınacak domuzlar rasgele iki gruba ayrılmıştır.

Grup 1 (n=3): Folikül sıvısı alınacak olan domuzlarda östrus belirtilerinin gözlenmesinden sonra genel anestezi altında ultrasonografik olarak ovaryum ve folikül muayenesi yapılmıştır. Ancak ultrason eşliğinde foliküler sıvının alınması mümkün olmamıştır.

Grup 2 (n=3): Amniyon sıvısı alınacak domuzlar östrus takipleri yapılarak kontrollü olarak çiftleştirilmiştir. Çiftleşme tarihinin bir gün sonrası gebeliklerin 1. günü olarak kabul edilmiştir. Gebelik muayeneleri genel anestezi altında ultrasonla yapılmıştır. Gebeliğin orta döneminde (ikinci 1/3'lük dönem) amniyosentez ile amniyon sıvısı alınmıştır. Inguinal bölge traş edildikten sonra benzalkonyum klorür 10% (Zefiran Forte, Sandoz/İstanbul) ve iyot solüsyonu (Polyod, Drugsan/Ankara) ile dezenfekte edilmiştir. Steril şartlarda ultrason eşliğinde yavru kesesine ulaşılmış ve 2.5 cc amniyon sıvısı alınmıştır ve laboratuvara gönderilmiştir. Ancak amniyosentezden 45 saat sonra abortus gözlenmiş ve gebelik sona ermiştir.

Gebe domuzlarda erken dönemde yapılan amniyosentez abortusa neden olmuş, gebe olmayan domuzlarda ise foliküler sıvının alınması mümkün olmamıştır. Bu nedenle her iki sıvının da deneysel laparoskopi yöntemi ile genel anestezi altında alınmasına karar verilmiş ve tüm örnekler operasyonlar sırasında steril şartlarda alınmıştır.

Anestezi Protokolü: Gebe domuzlara preanestezi için 5mg/kg dozda intramuskuler (im) Xylazine (Alfazine®) ve 10mg/kg dozda

Ketamine (Alfamine®) uygulanmıştır. Domuzlar vena auricularisten a 22-g anjiyocat ile kateterize edilmiştir. Intravenöz (iv) propofol (4mg/kg; Propofol®) uygulaması yapıldıktan sonra, entubasyon ve mekanik ventilasyona geçilmiştir. Operasyon süresince elektrokardiyogram, NIBP, End-Tidal CO₂, SpO₂ monitorize edilmiştir. Sirurjikal aşamada 'balanced' tekniği kullanılmıştır: inhalant olarak desflurane (%8-12 to stabilize MAC at 1,5; Suprane®), propofolün iv uygulamasıyla desteklenmiş ve karprofen 4mg/kg dozda ağrı kontrolü için im uygulanmıştır (Rimadyl®).

Hücre Kültürü: Amniyosentez işlemine başlamadan önce kullanılacak olan, steril gazlı bez, 2 adet 10 ml ve 1 adet 2.5 ml'lik steril disposable enjektör steril bir örtü üzerinde hazırlandı. Amnion ve follüküler sıvılarda maternal kontaminasyonu elimine etmek için kan hücresi bulunan örnekler incelemeye alınmamıştır. Hücre kültürlerinde, Hoehn ve ark'nın protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır¹⁵. Alınan sıvıların santrifüjü yapıldıktan sonra çöken hücreler 25 cm²'lik kültür flasklarına bu hücreler için spesifik medyumla birlikte (BIOAMF-1 Basal medium and supplement, Biological Industries, Cat.# 01-190-1; 01-192-19) aktarılmıştır. Medyum içine etkinliğinin sürekliliğini ve koruyuculuğunu artırmak için 2 ml L-Glutamin (L-Glutamine Solution 200mM, Biological Industries, Cat. No. 03-020-1) ve 1 ml antibiyotik (Gentamicin, Biological Industries, Cat. No. 03-035-1) ilave edilmiştir. Kültür flaskları 37°C'de, %5 CO₂, %95 nemli ortamda inkübe edilmiştir, 3-4 gün sonra kültür flaskının zeminine yapışan hücreler invert mikroskop altında izlenmiştir. Kültür ortamında uygun sayıya ve mitotik aktiviteye ulaşan hücreler RNA izolasyonunda kullanılmak üzere alınmıştır.

RNA izolasyonu: Hücreler 500 µl'lik guanidin tiyosiyanat (Trizol® Reagent, Invitrogen/Life Technologies, Cat. No. 15596 1) ile muamele edildikten sonra 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Takibinde -20°C'de soğutulmuş 0.2 ml kloroform ilave edilmiş, 5 dakika oda ısısı inkübasyonu sonrasında +4°C'de 15 dakika 7,500 x g'de santrifüj edilmiştir. RNA içeren üst sıvı fazı dikkatlice uzaklaştırılmış ve steril başka bir tüp içine alınarak kloroform fazı tekrar edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz alınarak eşit hacimde izopropanol eklenmiş ve RNA'yı çöktürmek için 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. +4°C sıcaklıkta 7,500 x g'de 10 dakika santrifüj uygulanarak RNA topak haline getirilmiştir. Oluşan RNA

çökeltisi 0.5 ml 70%'lik soğuk ethanol ile 10 dakika +4°C'de bekletilerek 7,500 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. RNA'yı ethanol ile yıkama aşaması 2 kez yapılmıştır. Santrifüj sonunda oluşan pelletlerden ethanol dikkatle çekildikten sonra oda ısısında 10 dakika kurutulmuştur. Üzerine 25 µl otoklavlanmış distile su konarak RNA çözdürülmüştür. Tüpler kısa vortexlendikten sonra 1.25 µl RNase İnhibitörü eklenerek -20°C'de saklanmıştır.

RNA Bütünlüğü Kontrolü (Integrity Control) & Agaroz Jel Elektrofrezisi: Elde edilen RNA'dan 1.5 µl alınarak 4.5 µl Loading Dye ile karıştırılarak 5 dakika 65°C'de su banyosunda bekletilerek şok soğutma ile buzun üzerine alınmıştır. 1.2 gm agaroz 84,7 ml DEPC ile muamele edilmiş distile su ve 10 ml MOPS Buffer içine konarak 2 dakika mikrodalga içinde eritilmiştir. Jel birkaç dakika soğumaya bırakıldıktan sonra içine 5.2 ml 37%'lik Formaldehit ve 4 µl ethidium bromide katılarak jel tankına dökülmüştür. Yarım saatlik polimerizasyondan sonra, soğukta bekletilen RNA'lar jele yüklenmiştir. Örnekler 100 V ve 300 mA'lik güç kaynağı ile 1.2%'lik agaroz jelde 60 dakika boyunca yürütülmüştür.

Bulgular

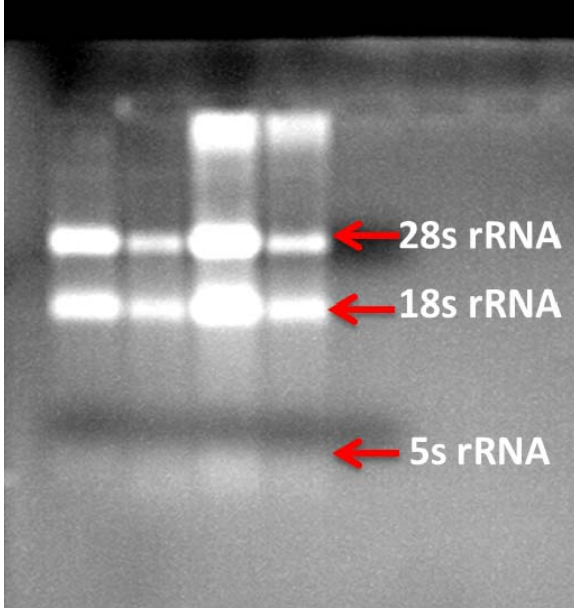
Klinik Bulgular: Amniyosentezle alınan amniyotik sıvı miktarı 2.5-3 cc olarak belirlenmiştir. Ancak bu hücrelerin 14-21 günlük kültüre edilmeleri sonunda bazı flasklarda çok az üreme olmuş bazılarında ise hiç üreme gözlenmemiştir. Uygulamayı takiben 48 saat içinde gebelikler abortusla sonlanmıştır.

Ultrason eşliğinde amniyotik sıvı çok az da olsa alınmasına rağmen folikül sıvısı alınmamıştır.

Tüm bu uygulamaların başarısız olmasından sonra, sıvıların steril şartlarda deneysel laparotomi ile alınmasına karar verilmiştir. Bu uygulama operasyondan sonra gebeliklerin yine abortusla sonlanmasına yol açmıştır.

Hücre Kültürü: Amniyosentez uygulanan domuzlara ait flaskların bir kısmında hiç üreme olmamış, bir kısmında ise kültür ortamında amniotik hücrelerde uygun sayıya ulaşamamıştır. Bunu amniyotik hücre yetersizliği, mikroorganizma kontaminasyonu ve diğer teknik nedenlere bağlamaktayız. Ancak steril şartlarda alınan amnion ve folikül sıvılarında yoğun üremeler gözlenmiştir.

RNA izolasyonu: İzolasyon sonunda elde edilen RNA'lar, miktarın az olmasından dolayı spektrofotometre ile ölçülmedi. Ancak RNA bütünlüğü kontrolü (Integrity Control) agaroz jel elektroforezinde yapıldı. Folikül sıvılarından kültüre edilen hücreler jel üzerinde 28s, 18s ve 5s rRNA'lık 3 adet ribozomal bantların varlığı ve yoğunluğu ile izole edilen RNA'ların bütünlüğünü koruduğunu gösterdi (28S rRNA > 18S rRNA > 5S rRNA) (Resim 1) Kültüre edilen amniyon hücrelerinin RNA izolasyonlarında ise hiç bant gözlenmedi. Folikül hücrelerinin kültürlerinden elde edilen RNA'nın stabil izole edildiği gözlenirken, aynı durumun amniyon hücre kültürlerinden elde edilen RNA'larda olmadığı gözlemlendi.



Resim 1: Foliküler hücre kültüründen izole edilen RNA'nın agaroz jel görüntüsü

Figure 1: Visualization of RNA isolation from follicular cell culture on agarose gel

Tartışma

Amniyon ve folikül sıvıları iki farklı yöntemle alınarak, bu hücrelerin in vitro kültürlerde çoğaltılabilirliği ve RNA izolasyonunda kullanılabilirliğine ait veriler değerlendirildi. Amniyosentez insan hekimliğinde çok sık başvuru ve prenatal tanı için vazgeçilmez bir tekniktir⁴. Veteriner hekimlikte çok az kullanım alanı bulan bu teknik, domuzlarda ilk kez uygulanmış ve klinik sonuçları değerlendirilmiştir. İnsanlarda bu uygulama sonunda abortus riski çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Deneyimli ellerde amniyosenteze bağlı fetal kayıp oranları %0.5 - 1'den fazla değildir. Eddlemann

ve ark. fetal kayıp oranını %0.15 olarak bulmuşlardır¹⁰. Armstrong ve ark. fetal kayıp oranını %0.2 olarak bildirmişlerdir³. Ancak hayvanlarda tekniğe ait kullanım alanı bulunmadığından konuya ait klinik veriye rastlanmamıştır. Uygulamanın steril şartlar altında yapıldığı durumda uzun süreli anestezi, gebe uterusun lokalizasyonunun bozulması operasyon sonrası abortusa neden olabilir. Ancak kısa süreli anestezi altında, ultrason eşliğinde direkt uterus hedef alınarak yapılan uygulamanın neden abortusa yol açtığı bilinmemektedir.

Amniyosentezle alınan sıvının miktarının az olması ve buna bağlı olarak hücre sayısının az olmasından dolayı üreme gözlenemediği sanılmaktadır. Hücre sayısının istenen düzeyde olmaması ve uygulama anında steril şartların yetersizliğinin hücre üremeleri üzerine negatif etkileri olduğu sanılmaktadır. Nitekim çalışmamızın başlarında ortaya çıkan kontamine örnekler ve steril şartlarda alınan örneklerde yoğun üremelerin gözlenmesi bu düşüncemizi desteklemektedir. Ortaya çıkan başarısız sonuçların, özellikle girişim tecrübesi ve dallar arası koordinasyon artıkça iyileştirilebileceği düşünülmektedir.

Domuz amniyon ve folikül hücrelerinin kültür ortamında üretilebildiği çalışmamızda gösterilmiştir. Kültüre amniyon hücrelerinden yapılan RNA izolasyonunda RNA eldesinin olmama nedeni laboratuvarımızda manuel olarak Trizol metodunun uygulanması olabilir. Ancak amniyon hücrelerinden tekrar kültürler kurularak üretildiğinde ticari olarak satılan etkin ve purifiye olarak küçük miktarlardaki materyallerden bile 100µg'a kadar total RNA elde edilebilen RNA izolasyon kitlerini kullanarak çalışmayı gözlemlemek ve sonuçları kıyaslamının etkili olacağı düşünülmektedir. Bu tür kıyaslamayı amniyon ve koryon villus hücrelerinde eş zamanlı olarak yapmak aynı zamanda faydalı olacağını düşünüyoruz. Diğer taraftan folikül hücre kültürlerinin Trizol metodu ile yüksek kalitede RNA izolatları alınabildiği gösterilmiştir²¹.

Hücre terapileri için hazırlanan, hücre büyümesi ve devamlılığı için zenginleştirilmiş kültürler özellikle domuz folikül sıvılarının katılması tercih edilmektedir. Moleküler yapısı incelendiğinde homotetramer formda protein ailesine bağlı ve iki çift disulfit-benzeri zincir içeren proteinlerden oluşan foliküler sıvının hücre büyüme aktivitesini ve matris özelliklerini artırdığı belirtilmektedir. Foliküler sıvıdan hazırlanan hücre kültürlerinin amniyondan hazır-

lanan kùltürlere oranla hızlı ve kalite üremeleri ve stabil RNA eldesinin nedeni olabileceği düřünölmektedir¹².

Bu sonuçlar her iki sıvı hücrelerinin kùltürlerde üretilebileceğini göstermiştir. Kùltüre edilecek hücrelerin toplanması sırasında gösterilecek azami hassasiyet çalışmaların başarısını artıracakđını ve bu hücrelerden RNA elde edilebileceğini de gösterilmiştir. Amniyotik hücreler için hazırlanacak kùltürlerin ise kaliteli üretilebilmesi için medyumlarında bazı zenginleştirmeler yapılabileceği yada izolasyon için daha farklı metotların kullanılabileceğini önerilebilir.

Teřekkür

Çalışmamızın klinik uygulamalarına destek veren U.Ü. Veteriner Fakùltesi 5. Sınıf öğrencileri H. Ozan KURTARAN, N. Sarp SEVGİSUNAR ve Cem ÇALIřIR'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abdi, R., Fiorina, P., Adra, C.N., Atkinson, M., Sayegh, M.H. 2008. Immuno-modulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 57: 1759-1767
- Antonucci, I., Iezzi, I., Morizio, E., Mastrangelo, F., Pantalone, A., Mattioli-Belmonte, M., Gigante, A., Salini, V., Calabrese, G., Tete, S., Palka, G., Stupia L.2009. Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step culture protocol. *BMC Biotechnol.*9: 9
- Armstrong, J., Cohen, A.W., Bombard, A.T.2002. Comparison of amniocentesis – related loss rates between obstetrician-gynecologists and perinatologists. *Obstet Gynecol.* 99: 65.
- Beksaç, M.S. Fetal Tıp; Prenetal Tanı. Ankara, Medical Network, 1996: 29 -38.
- Canazi, M., Atala, A., De Coppi, P. 2009. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *Reprod Biomed Online.* 18 Suppl 1: 17-27
- Caplan, A.I.2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 217: 318-324
- Centeno, C.J., Busse, D., Kisiday, J., Keohan, C., Freeman, M., Karli, D. 2008. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician.* 11: 343-353
- De Coppi, P., Bartsch, G. Jr. Siddiqui, M.M., Xu, T., Santos, C.C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A.C., Snyder, E.Y., Yoo, J.J., Furth, M.E., Soker, S., Atala, A.2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology.* 25:100-106
- Drugan, A., Johnson, M.P., Evans, M.I.1992. Amniocentesis in: Evans MI (Ed) *Reproductive Risks and Prenatal Diagnosis.* Apple- ton & Lange Connecticut. 191-200
- Eddleman, K., Berkowitz, R., Kharbutli, Y.2003. Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis: The FASTER trial. *Am J Obstet Gynecol.* 189: 111.
- Fuchs, J.R., Kaviani, A., Oh, J.T., LaVan, D., Udagawa, T., Jennings, R.W., Wilson, J.M., Fauza, D.O.2004. Diaphragmatic reconstruction with autologous tendon engineered from mesenchymal amniocytes. *J Pediatr Surg.* 39: 834-838
- <http://www.freepatentsonline.com/y2007/0104691.html>
- Harris, M.C., Mennuti, M.T., Kline, J.A., Polin, R.A.1998. Amniotic fluid fibronectin concentrations with advancing gestational age. *Obstet Gynecol.* 72:593-595.
- Hauser, P.V., De Fazio, R., Bruno, S., Sdei, S., Grange, C., Bussolati, B., Benedetto, C., Camussi, G. 2010. Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery. *Am J Pathol.* 177:2011-21
- Hoehnn, H., Bryant, E.M., Karp, L.E., Martin, G.M. 1974. Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. I. Clonal morphology and growth potential. *Pediatr Res.* 8: 746-754
- Jingushi, S., Joyce, M.E., Bolander, M.E. 1993. Basic fibroblast factors in rat fracture repair. *Orthop Trans.* 17: 713-714.
- Kaviani, A., Perry, T.E., Dzakovic, A., Jennings, R.W., Ziegler, M.M., Fauza, D.O. 2001. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg.* 36:1162-1165
- Kunisaki, S.M., Freedman, D.A., Fauza, DO. 2006. Fetal tracheal reconstruction with cartilaginous grafts engineered from mesenchymal amniocytes. *J Pediatr Surg.* 41: 675-682
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R.M., Bacigalupo, A., Fibbe, W., Ringden, O. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371: 1579-1586
- Merimee, T.J., Grant, M., Tyson, J.E. 1984. Insulin-like growth factors in amniotic fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 752: 55.
- Özalp, G.R., şimşek, G., Akçađlar, S., Shenavai, S. 2010. Trizol RNA Ekstraksiyon Metodu: İnek Plasentomu için Oldukça Etkili Metod Deđerlendirmesi. *Uludağ Univ. J.Fac. Vet.Med.* 1: 1-6

22. Özgenel, G.Y., Filiz, G., Özcan, M. 2004. Effects of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondrial grafts in rabbits. *Br J Plast Surg.* 57: 427-428.
23. Parolini, O., Soncini, M., Evangelista, M., Schmidt, D. 2009. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? *Regen Med.* 4: 275-291
24. Perin, L., Sedrakyan, S., Da Sacco, S., De Filippo, R. 2008. Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability. *Methods Cell Biol.* 86: 85-99
25. Perin, L., Giuliani, S., Jin, D., Sedrakyan, S., Carraro, G., Habibian, R., Warburton, D., Atala, A., De Filippo, R.E. 2007. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. *Cell Prolif.* 40: 936-948
26. Prusa, A.R., Marton, E., Rosner, M., Bettelheim, D., Lubec, G., Pollack, A., Bernaschek, G., Hengstschlager, M. 2004. Neurogenic cells in human amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 191: 309-314
27. Schmidt, D., Achermann, J., Odermatt, B., Genoni, M., Zund, G., Hoerstrup, S.P. 2008. Cryopreserved amniotic fluid-derived cells: a lifelong autologous fetal stem cell source for heart valve tissue engineering. *J Heart Valve Dis.* 17: 446-455
28. Sessarego, N., Parodi, A., Podesta, M., Benvenuto, F., Moggi, M., Raviolo, V., Lituania, M., Kunkl, A., Ferlazzo, G., Bricarelli, F.D., Uccelli, A., Frassoni, F. 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica.* 93: 339-346
29. Steigman, S. A., Ahmed, A., Shanti, R.M., Tuan, R.S., Valim, C., Fauza, D.O. 2009. Sternal repair with bone grafts engineered from amniotic mesenchymal stem cells. *Journal of Pediatric Surgery.* 44: 1120-1126
30. Siegel, N., Valli, A., Fuchs, C., Rosner, M., Hengstschlager, M. 2009. Induction of mesenchymal/epithelial marker expression in human amniotic fluid stem cells. *Reprod Biomed Online.* 19: 838-846
31. Siegel, N., Rosner, M., Hanneder, M., Freilinger, A., Hengstschlager, M. 2008. Human amniotic fluid stem cells: a new perspective. *Amino Acids.* 35: 291-293.
32. Steele, W.W., Breg, W.R. 1996. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet* 1: 383-385
33. Steigman, S.A., Armant, M., Bayer-Zwirello, L., Kao, G.S., Silberstein, L., Ritz, J., Fauza, D.O. 2008. Preclinical regulatory validation of a 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol. *J Pediatr Surg.* 43:1164-1169
34. Steigman, S.A., Ahmed, A., Shanti, R.M., Tuan, R.S., Valim, C., Fauza, D.O. 2009. Sternal repair with bone grafts engineered from amniotic mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg.* 44: 1120-1126
35. Tirelioğlu, O., Bilgen, M.S., Atıcı, T., Yalçınkaya, U., Bilgen, Ö.F. 2007. Tavşanda De-novisel Osteoartrit Modelinde İnsan Amniotik Sıvısının Eklem İçi Uygulamasının Kıkırdak Doku ve Sinovya Üzerindeki Etkileri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 33:121-125
36. Walther, G., Gekas, J., Bertrand, O.F. 2009. Amniotic stem cells for cellular cardiomyoplasty: promises and premises. *Catheter Cardiovasc Interv.* 73: 917-924
37. Zhang, P., Baxter, J., Vinod, K., Tulenko, T.N., Di Muzio, P.J. 2009. Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells; synergism of biochemical and shear force stimuli. *Stem Cells Dev.* 18: 1299-1308